

на правах рукописи

СТАРОСТИНА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие
искусственные антигены вируса гриппа**

1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Карпенко Лариса Ивановна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Научный консультант: Бажан Сергей Иванович, доктор биологических наук, доцент, заведующий теоретическим отделом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: Дейнеко Елена Викторовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии и генетики СО РАН»; Коваль Ольга Александровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Ведущая организация: НИИ Вирусологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Защита состоится "17" декабря 2021 г. в 9-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан " ____ " _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.С. Непомнящих

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Грипп в его зоонозной, сезонной эпидемической и пандемической формах остается серьезной угрозой здоровью населения. Сезонный грипп является высокоинфекционным острым вирусным заболеванием, вызываемым вирусами гриппа А и В. Сезонные эпидемии гриппа могут поражать 10-20 % населения и ежегодно уносить тысячи человеческих жизней (Paules, Subbarao, 2017). Поэтому вакцинация представляет собой как профилактически, так и экономически эффективный способ сдерживания эпидемий гриппа и сохранения общественного здоровья. С момента введения вакцинации в 1940-х годах сезонные противогриппозные вакцины спасли большое количество жизней и ограничивали распространение пандемии.

Тем не менее, высокая изменчивость вирусного генома позволяет вирусу гриппа уклоняться от существующего иммунитета населения. При этом антигенный дрейф создает серьезные трудности для вакцинации населения, так как вакцинные штаммы приходится менять каждые 2-3 года (Barbezange et al., 2018). Для решения этой проблемы многие исследовательские коллективы и фармакологические компании в настоящее время ведут разработку универсальных противогриппозных вакцин (Sautto, Kirchenbaum, Ross, 2018; Krammer, Palese, 2019). Однако остается много нерешенных проблем, связанных с иммуногенностью вакцины и её способностью обеспечивать защиту от широкого спектра субтипов вируса гриппа.

В защите организма от вируса гриппа принимают участие как гуморальный, так и клеточный иммунный ответы, тем не менее, до сих пор нет четкого понимания о соотношении их вклада. Что касается гуморального иммунного ответа, основной мишенью антител, которые обеспечивают защиту против вируса гриппа, является гемагглютинин (НА) (Wrammert et al., 2008). Поэтому для создания «универсальных» В-клеточных иммуногенов перспективным является подход, основанный на использовании консервативных фрагментов ствола (или стебля) гемагглютинина вируса гриппа (Mallajosyula et al., 2014; Sautto G.A., 2018). Другими антигенами – кандидатами для включения в состав универсальной вакцины могут быть консервативные белки NP, PB1 и M1 (Wang et al., 2015; Padilla-Quirarte et al., 2019) и экзодомен консервативного вирусного белка M2 (M2e), экспонированный на поверхности инфицированных клеток и вириона (Kim et al., 2017; Rashid Manzoor, 2017).

Вместе с этим для защиты от инфекций, вызываемых высоко изменчивыми вирусами, в том числе и вирусом гриппа, чрезвычайно важным является Т-клеточный иммунный ответ, который может существенно ограничивать репродукцию вируса гриппа, снижая тяжесть

заболевания и смертность как у людей (Grant et al., 2016; Hufford et al., 2015; Koutsakos et al., 2019), так и у экспериментальных животных (Schmidt, Varga, 2018; Holzer et al., 2019). Поэтому многие исследователи основной упор делают на проектирование искусственных антигенов, содержащих консервативные Т-клеточные эпитопы из белков разных штаммов и субтипов вируса гриппа.

Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» был проведен дизайн искусственных белков-антигенов, в состав которых входят консервативные В- и Т-клеточные эпитопы антигенов вируса гриппа, способные индуцировать развитие иммунного ответа к различным субтипам вируса гриппа (Bazhan et al., 2020).

Цель и задачи исследования

Целью данной диссертационной работы явилась разработка ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены вируса гриппа, и исследование их специфической активности.

Задачи исследования:

1. Получить ДНК-вакцинные конструкции с генами искусственных иммуногенов, состоящих из консервативных фрагментов поверхностных, коровых и неструктурных белков вируса гриппа.
2. Исследовать экспрессию генов, кодирующих искусственные иммуногены в эукариотических клетках.
3. Изучить иммуногенность полученных ДНК-вакцинных конструкций.
4. Оценить протективные свойства полученных ДНК-вакцинных конструкций на модели лабораторных животных.

Научная новизна и практическая значимость работы

В результате выполнения работы реализован один из возможных подходов к созданию универсальной противогриппозной вакцины, основанный на компьютерном дизайне искусственных антигенов, разрабатываемых на платформе ДНК-вакцин. Полученные результаты показывают, что ДНК-вакцинация плазмидами, кодирующими целевые антигены, вызывает как специфические антитела, так и Т-клеточные ответы против двух проанализированных штаммов вируса A/California/4/09(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2) у иммунизированных мышей и обеспечивает перекрестную защиту животных от смертельного заражения этими штаммами. Результаты показали, что компьютерный подход может быть успешно использован для рационального проектирования искусственных полиэпитопных антигенов, кандидатов универсальной вакцины против гриппа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. ДНК-конструкции, кодирующие искусственные Т- и В-клеточные иммуногены, обеспечивают экспрессию целевых генов и наработку кодируемых ими белков в трансфицированных клетках.

2. ДНК-конструкции индуцируют специфические антитела и Т-клеточный иммунный ответ у иммунизированных мышей линии BALB/c.
3. ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие В- и Т-клеточные иммуногены, приводят к защите иммунизированных животных от заражения вирусами гриппа A/California/4/09(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждена грамотной статистической обработкой полученных результатов и применением современных биохимических, молекулярно-биологических и биоинформационных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Результаты всех экспериментов получены с использованием сертифицированного оборудования, а их воспроизводимость подтверждалась несколькими повторами.

Представленные в диссертации результаты были доложены на конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, Россия, 2019); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, Россия, 2019); на VII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, Россия, 28-31 октября 2020) (on-line). В рамках 4th International Conference «Perspective technologies of vaccination and immunotherapy» (October 27-29 2020) (on-line) был представлен устный доклад, занявший призовое третье место по итогам конкурса молодых ученых.

По материалам диссертации опубликовано три статьи в журналах списка, рекомендованного ВАК Минобрнауки России.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 151 странице, включает 31 рисунок, 10 таблиц. Список литературы включает 319 источников.

Личный вклад автора

Все основные эксперименты, включая конструирование рекомбинантных плазмид, исследование экспрессии целевых генов в составе полученных ДНК-вакцинных конструкций, наработку препаративных количеств плазмидных ДНК, их очистку от эндотоксинов, трансфекцию клеток НЕК 293Т, иммунизацию животных и забор органов, оценку иммуногенности и специфической активности сконструированных рекомбинантных плазмид, выполнены автором лично. Теоретический дизайн полиэпитопных иммуногенов (Ub-mTA_g, Ub-hTA_g, LP-mTA_g-

LAMP и hTAg-LAMP, AgH1, AgH3 и AgM2) проводился канд. биол. наук Антоном Д.В. (теоретический отдел ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Секвенирование образцов ДНК, кодирующих целевые гены, осуществлялось в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Оценка протективности конструкций была проведена под руководством канд. биол. наук Марченко Василия Юрьевича (отдел зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа представлена в виде двух частей. Первая часть посвящена конструированию и исследованию иммуногенных свойств искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов – кандидатов ДНК-вакцины против вируса гриппа А. Вторая часть – конструированию и исследованию свойств ДНК-вакцин, кодирующих искусственные антигены, спроектированные на основе консервативной области ствола гемагглютинаина и белка М2 вируса гриппа А.

Иммуногенные и протективные свойства искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов

Конструирование Т-клеточных иммуногенов – кандидатов ДНК-вакцин против гриппа

Поскольку мы планировали изучить иммуногенность и защитные свойства сконструированных антигенов у мышей, мы разработали два варианта полиэпитопов:

– мышинный Т-клеточный антиген (muTAg), содержащий исключительно Т-клеточные эпитопы, рестриктированные мышинными молекулами МНС класса I и II, типичными для мышей BALB/c;

– человеческий Т-клеточный антиген (huTAg), содержащий Т-клеточные эпитопы, рестриктированные наиболее распространенными алломорфами HLA I и II класса, и несколько Т-клеточных эпитопов, рестриктированных аллелями мышей МНС I класса, для тестирования иммуногенности у мышей BALB/c.

Каждая полиэпитопная конструкция включает два основных модуля: poly-CTL-эпитопный фрагмент (polyCTL), содержащий CD8+ Т-клеточные эпитопы, и poly-Th-эпитопный фрагмент (PolyTh), состоящий из CD4+ Т-хелперных эпитопов (рис. 1).

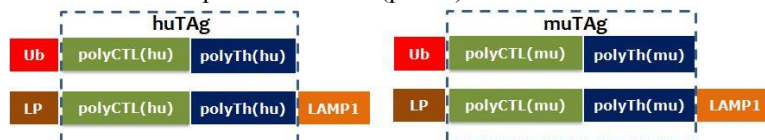


Рисунок 1. Принципиальная схема строения целевых полиэпитопных антигенов. huTAg – человеческий полиэпитопный антиген, состоящий из модулей polyCTL(hu) и polyTh(hu), которые содержат Т-клеточные эпитопы, рестриктированные молекулами HLA I и II классов соответственно. muTAg – мышинный полиэпитопный антиген, состоящий из модулей polyCTL(mu) и polyTh(mu), которые содержат CTL- и Th-клеточные эпитопы, рестриктированные молекулами MHC I и II классов мышей BALB/c соответственно. Ub – N-концевой убиквитин; LP – N-концевой лидерный пептид; LAMP1 – C-концевой мотив белка LAMP1 человека

Чтобы обеспечить эффективную презентацию целевых иммуногенов по пути MHC I и II классов, человеческие и мышинные конструкции содержали дополнительные N- и C-концевые сигнальные последовательности: либо N-концевой убиквитин (Ub), чтобы нацелить полиэпитопный иммуноген на протеасому, либо N-концевой лидерный пептид (LP) вместе с C-концевым фрагментом белка LAMP-1 человека, чтобы направить полиэпитопный иммуноген из секреторного пути в лизосому. Таким образом, были сконструированы четыре варианта Т-клеточных антигенов: [Ub-muTAg], [LP-muTAg-LAMP1], [Ub-huTAg] и [LP-huTAg-LAMP1], структуры которых изображены на рисунке 1 (Bazhan et al., 2020).

Синтез и клонирование целевых генов

Гены, кодирующие спроектированные антигены Ub-muTAg, Ub-huTAg, LP-muTAg-LAMP1 и LP-huTAg-LAMP1, были синтезированы и клонированы в составе векторной плазмиды pсDNA3.1. В результате были сконструированы четыре рекомбинантные плазмиды – кандидаты ДНК-вакцины против вируса гриппа: p-Ub-muTAg, p-Ub-huTAg, p-LP-muTAg-LAMP1 и p-LP-huTAg-LAMP1.

Оценка экспрессии целевых генов huTAg и muTAg

Экспрессию целевых генов оценивали с использованием двух методов: (1) по синтезу специфической мРНК и (2) с помощью иммуноокрашивания трансфицированных клеток. Для оценки синтеза специфических мРНК выделяли суммарную РНК из клеток 293Т, трансфицированных плаزمидами, содержащими гены, кодирующие спроектированные Т-клеточные антигены, и получали кДНК в ОТ-ПЦР. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР с использованием пар праймеров к генам huTAg и muTAg. Результаты, представленные на рисунке 2, показывают, что размеры амплифицированных фрагментов соответствуют теоретически рассчитанным: 657 п.н. для muTAg и 798 п.н. для генов huTAg. Полученные данные подтвердили наличие целевых мРНК в трансфицированных клетках.

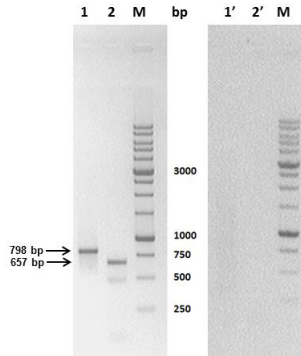


Рисунок 2. Электрофоретический анализ продуктов ОТ-ПЦР в 1 % агарозном геле. 1, 2 – фрагменты ПЦР 798 и 657 п.н., полученные с использованием κДНК в качестве матрицы и праймеров для генов huTA_g и muTA_g соответственно; 1', 2' – результаты ПЦР с использованием тех же праймеров и тотальной РНК, выделенной из клеток 293Т, трансфицированных плазидами без стадии обратной транскрипции (контроль на отсутствие целевых плазмид в изолированных образцах тотальной РНК). М – маркер молекулярной массы (M12, СибЭнзим), включающий фрагменты ДНК 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 и 250 п.н.

Способность разработанных ДНК-вакцинных конструкций индуцировать синтез целевых белков-иммуногенов была изучена с помощью иммуногистохимического окрашивания трансфицированных клеток эукариот 293Т после их трансфекции плазмидными ДНК p-Ub-muTA_g, p-Ub-huTA_g, p-LP-muTA_g-LAMP и p-LP-huTA_g-LAMP. Целевые полипептиды были обнаружены с помощью окрашивания клеток с использованием моноклональных антител 29F2/30A6 к Gag-эпиту поу EPFRDYVDRFYKTLR, включенному во все разработанные конструкции полипептидов.

Окрашивание наблюдалось только в клетках 293Т, трансфицированных ДНК-вакцинными конструкциями, и не было зарегистрировано в клетках, трансфицированных векторной плазмидой pсDNA3.1 (рис. 3). Эти результаты подтвердили присутствие целевых полипептидов в трансфицированных клетках.

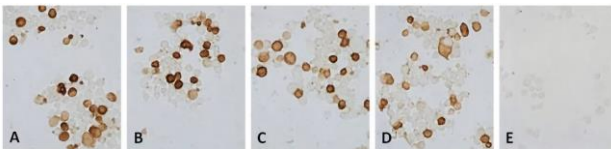


Рисунок 3. Иммунохимическое окрашивание клеток 293Т, трансфицированных целевыми ДНК-вакцинными конструкциями. А – p-LP-huTA_g-LAMP; В – p-LP-

muTAg-LAMP; C – p-Ub-huTAg; D – p-Ub-muTAg; E – векторная плаزمида pcDNA3.1 – отрицательный контроль. Окрашивание проводили с использованием моноклональных антител 29F2/30A6 и конъюгата кроличьих антител против мышиного IgG с пероксидазой хрена

Моделирование трехмерной структуры Т-клеточных антигенов

Модели трехмерных структур Т-клеточных антигенов были предсказаны с помощью программы I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement, 2018 г., <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>). Программа позволила исследователям предсказать пространственную укладку белков на основе их аминокислотных последовательностей с высокой точностью, основываясь на принципе моделирования, посредством гомологии с известными белковыми структурами. Результаты моделирования I-TASSER показаны на рисунке 4. Изображенные трехмерные модели показали, что последовательности сконструированных Т-клеточных антигенов содержат компактные глобулярные структурные единицы (домены). В случае LP-huTAg-LAMP1 и LP-muTAg-LAMP1 антигенов существуют два домена, соответствующие фрагментам последовательностей poly-CTL-эпитопа и poly-Th-эпитопа человека и мыши (рис. 4 С и D). Трехмерные структуры Ub-huTAg и Ub-muTAg содержат дополнительный третий домен, который соответствует последовательности убиквитина (рис. 4 А и В). Для индукции CTL-ответа антигены представляются для CD8⁺ Т-лимфоцитов в виде коротких пептидов (8–12 аминокислотных остатков), связывающиеся с молекулами МНС I класса. Эти короткие антигенные эпитопы образуются из эндогенно синтезированных вирусных белков, как результат протеасомно-опосредованного процессинга и перенесенные в просвет эндоплазматического ретикулума белками ТАР, где они связываются с молекулами МНС I класса. Поскольку целевые антигены были разработаны для облегчения процессинга и связывания полученных пептидов с молекулами МНС I класса, мы смоделировали построение комплексов молекул МНС I класса с процессирующими пептидами для демонстрации формирования эффективного комплекса. В результате мы выбрали пептид IPKRNRSL, так как он образует комплекс с молекулами МНС I класса как у людей (HLA-B*07:02), так и у мышей (H-2Dd). К тому же этот пептид использовали для стимуляции спленоцитов для оценки иммуногенности вакцинных конструкций у мышей BALB/c.

Модели комплексов молекул МНС I класса с процессирующими Т-клеточными пептидами были построены с использованием моделирования гомологии (рис. 5). В базе данных PDB (<http://rcsb.org>) были обнаружены шаблоны, которые соответствовали комплексам 9-мерных пептидов с аналогичным аминокислотным составом в карманах их связывающих бороздок. Построение модели выполнялось с использованием пакета

Modeller 9.14 (Webb, Sali, 2016). Рисунок был подготовлен с использованием UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Данные предсказывали, что пептид IPKRNRSIL связывается как с молекулами МНС I класса человека, так и мыши.

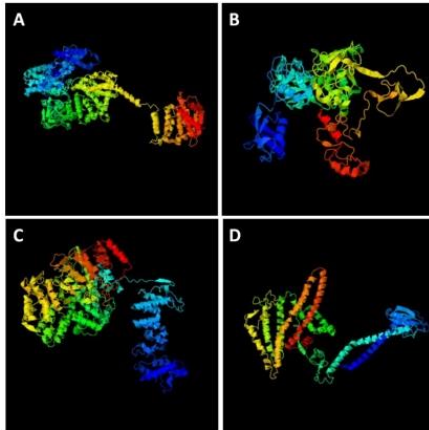


Рисунок 4. Гипотетические трехмерные структуры искусственных Т-клеточных антигенов. Показаны структурные модели, предсказанные для (А) Ub-huTAg; (В) Ub-muTAg; (С) LP-huTAg-LAMP1; (D) LP-muTAg-LAMP1

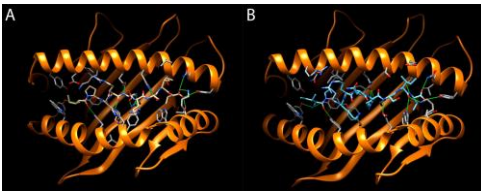


Рисунок 5. Пептид IPKRNRSIL в связывающей бороздке молекулы H-2Dd (А) мыши и HLA-B*07:02 (В) человека МНС I класса. N-концевая часть пептида находится слева. Атомы углерода МНС I показаны серым цветом. Возможные водородные связи показаны зеленым цветом. Было предсказано, что пептид связывает как человеческие, так и мышиные молекулы МНС I класса

Исследование иммуногенных и протективных свойств ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих целевые Т-клеточные антигены

Для изучения иммуногенности и протективности сконструированных ДНК-вакцинных конструкций использовали мышей BALB/c, самок весом 16-18 г. Исследование включало одну экспериментальную и три контрольные группы:

- mAg(U+L) – мыши, иммунизированные комбинацией p-Ub-muTAg + p-LP-muTAg-LAMP (экспериментальная группа);

- pcDNA3.1 – мыши, иммунизированные векторной плазмидой (отрицательный контроль);
- Flu1 – мыши, иммунизированные вакцинным штаммом вируса гриппа A/California/07/09 (положительный контроль);
- Flu2 – мыши, иммунизированные вакцинным штаммом вируса гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) (положительный контроль).

Все экспериментальные и контрольные группы включали 24 мыши. Восемь мышей использовались для оценки иммуногенности и другие 16 – для изучения протективности вакцинных конструкций. Все мыши в каждой группе были трёхкратно иммунизированы с двухнедельными интервалами. Через две недели после последней 3-й иммунизации у восьми животных из каждой группы были выделены спленоциты для исследования вирус-специфического Т-клеточного ответа. Оставшиеся 16 животных в каждой группе были интраназально инфицированы под кратковременным эфирным наркозом, восемь из них были инфицированы вирусом A/California/4/2009(H1N1pdm09), а восемь других – вирусом A/Aichi/2/68(H3N2).

Иммуногенность ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих целевые антигены

Оценка индуцированных Т-клеточных реакций проводилась с использованием метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), описанного в разделе "Материалы и методы". Ответы IFN- γ CD3+/CD8+ Т-клеток на стимуляцию специфическими пептидами в экспериментальной и контрольных группах мышей показаны на рисунке 6.

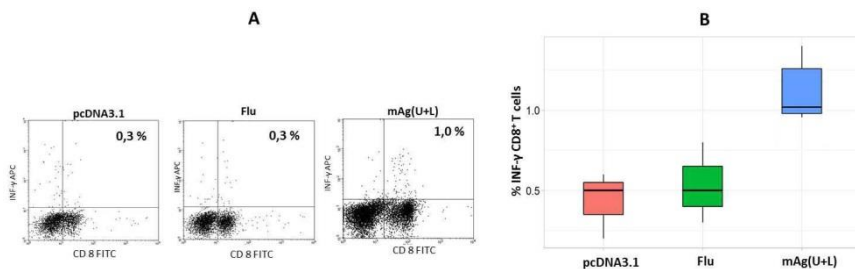


Рисунок 6. Ответы IFN- γ CD3+ CD8+ Т-клеток на стимуляцию специфическими пептидами у иммунизированных мышей. (А) график проточной цитометрии CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN- γ . (В) статистический анализ проводился с использованием одностороннего теста Уэлча с коррекцией FDR. mAg(U+L) > pcDNA3.1 ($p = 0,047$), mAg(U+L) > Flu ($p = 0,087$), Flu > pcDNA3.1 ($p = 0,343$). Группы мышей: mAg(U+L) – мыши, иммунизированные комбинацией ДНК-вакцинных конструкций p-Ubq-muTag + p-LP-muTag-LAMP; pcDNA3.1 – мыши, иммунизированные векторной плазмидой (отрицательный контроль); Flu – мыши,

иммунизированные живым вирусом гриппа A/California/07/09 (положительный контроль)

FACS-анализ показал, что наибольшее количество CD3+/CD8+ клеток, экспрессирующих внутриклеточный IFN- γ после стимуляции вирусными пептидами, было обнаружено у животных, иммунизированных комбинацией ДНК-плазмид, кодирующих полиэпитопные конструкции (медиана, ME: 0,8 %, первый квартиль, Q1: 0,75 %, Q3: 1,1 %), по сравнению с животными, иммунизированными векторной плазмидой (ME: 0,5 %, Q1: 0,35 %, Q3: 0,56 %) и вакцинным штаммом вируса гриппа A/California/07/09 (ME: 0,5 %, Q1: 0,4 %, Q3: 0,65 %). То, что у животных, иммунизированных целевыми вакцинными конструкциями, регистрировался более высокий ответ IFN- γ CD3+/CD8+ Т-клеток по сравнению с животными, иммунизированными живым вирусом гриппа, может быть результатом неполного соответствия между пептидами, используемыми для стимуляции, и аминокислотными последовательностями вирусных антигенов.

Перекрестная защита иммунизированных мышей

Способность полученных ДНК-вакцинных конструкций индуцировать перекрестный защитный иммунитет исследовалась путём летального заражения иммунизированных мышей двумя сезонными штаммами вируса гриппа A/California/4/2009(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2), принадлежащими к двум разным подтипам вируса. Мы использовали летальную дозу вируса, равную значению 10 LD₅₀. Исследование проводилось с использованием одной экспериментальной и трёх контрольных групп мышей.

Все мыши в каждой группе были иммунизированы трижды с интервалом в две недели. Через четырнадцать дней после последней 3-й иммунизации животные каждой группы были интраназально инфицированы под кратковременной эфирной анестезией: восемь мышей вирусом A/California/4/2009(H1N1pdm09) и восемь других животных вирусом A/Aichi/2/68(H3N2).

На рисунке 7 показаны данные о выживаемости мышей из разных групп. Все животные, иммунизированные векторной плазмидой pcDNA3.1, погибали на 8-й день после летальной дозы вирусом A/California/4/2009(H1N1pdm09). Иммунизация живым вирусом A/California/07/09 (группа Flu1) обеспечивала максимальную защиту от последующего смертельного заражения тем же вирусом по сравнению с животными, иммунизированными пустым вектором pcDNA3.1 ($p = 0,00037$, рис 7B). Выживаемость в группе Flu1 составила 87,5 % (выжили 7 из 8 животных). Хотя мыши из группы Flu2, иммунизированные живым вирусом A/Aichi/2/68(H3N2), демонстрировали на четыре дня более

длительную выживаемость по сравнению с отрицательной контрольной группой pcDNA3.1, этот результат был недостоверным ($p = 0,17$, рис.7C). Три мыши из восьми в группе mAg(U+L), иммунизированных комбинацией ДНК-вакцинных конструкций p-Ub-muTAg + p-LP-muTAg-LAMP, выжили после летального испытания вирусом A/California/4/2009(H1N1pdm09) (выживаемость 37,5 %), и выживаемость в этой группе достоверно отличалась от выживаемости в мышей в контрольной группе pcDNA3.1 ($p = 0,044$, рис.7A).

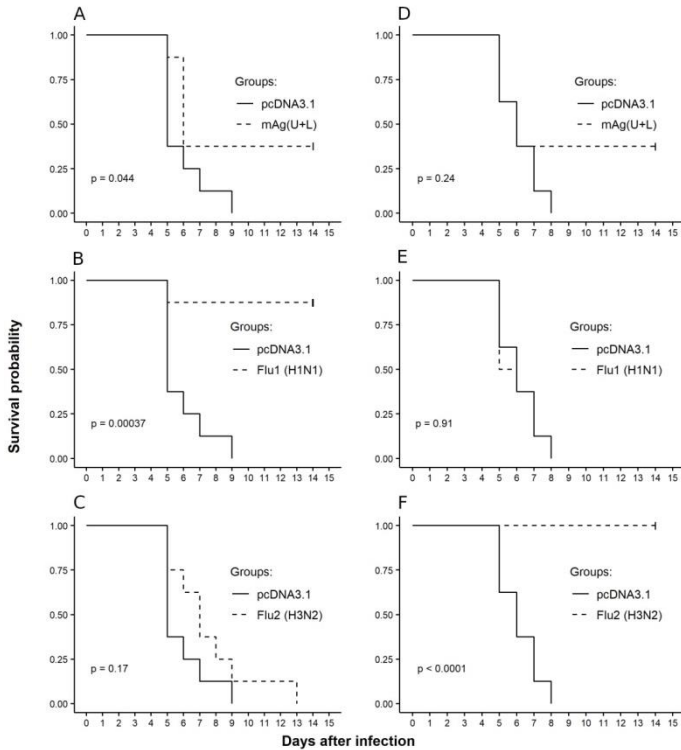


Рисунок 7. Кривые выживаемости, полученные в различных группах иммунизированных животных после летального заражения патогенными вирусами гриппа А. Левые диаграммы (А, В, С) – заражение вирусом A/California/4/09(H1N1pdm09); правые диаграммы (D, E, F) – заражение вирусом A/Aichi/2/68(H3N2); группа mAg(U+L) – мыши, иммунизированные комбинацией p-Ub-muTAg и p-LP-muTAg-LAMP; группа pcDNA3.1 – мыши, иммунизированные векторной плазмидой (отрицательный контроль); группа Flu1 – мыши, иммунизированные вакцинным штаммом вируса гриппа A/California/07/09

(положительный контроль); Группа Flu2 – мыши, иммунизированные вакцинным штаммом вируса гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) (положительный контроль)

Аналогичное исследование было проведено при заражении животных летальной дозой вируса A/Aichi/2/68(H3N2). Иммунизация живым вирусом A/Aichi/2/68(H3N2) была наиболее протективной (группа Flu2) – все животные в этой группе выжили. Разница между кривыми выживаемости в этой группе и в группе pcDNA3.1 оказалась статистически значимой ($p < 0,0001$, рис. 7F). Защитный эффект наблюдался также в группе mAg(U+L). Выживаемость в этой группе также составила 37,5 % (3 мыши из 8), как у животных, инфицированных вирусом A/California/4/2009(H1N1pdm09), однако статистически значимой разницы между кривыми выживаемости в этой группе и группы pcDNA3.1 обнаружено не было (рис.7D). Мыши, иммунизированные векторной плазмидой pcDNA3.1 (отрицательный контроль) и живым вирусом A/California/07/09 (специфический контроль), показали практически одинаковую выживаемость – все животные в этих группах погибли на 7-й и 8-й день после заражения ($p = 0,91$, рис.7E).

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что иммунизация мышей комбинацией ДНК-вакцинных конструкций p-Ub-muTAg и p-LP-muTAg-LAMP стимулирует Т-клеточные иммунные ответы, которые обеспечивают частичную защиту мышей от летальной инфекции, вызванной двумя сезонными штаммами вируса гриппа А, относящимися к двум разным подтипам. Более низкая частота CD3+/CD8+ Т-лимфоцитов у мышей, иммунизированных вирусом гриппа A/California/07/09, может быть связана с низким перекрытием между Т-клеточными эпитопами, включенными в иммуногенные конструкции, и теми, которые распознаются Т-клетками, стимулированными вакцинацией с использованием целого вируса. В результате пептиды, используемые для стимуляции спленоцитов в группе животных, иммунизированных mAg(U+L), не смогли индуцировать адекватный Т-клеточный ответ в группе животных, иммунизированных вирусом гриппа.

Иммуногенные и протективные свойства ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены на основе консервативной области ствола гемагглютинина и белка M2 у мышей

Дизайн и конструирование ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих стебель HA и белок M2

В данной работе для индукции ответа антител и цитотоксических Т-лимфоцитов сконструировано три антигена (Ag). Два из них, AgH1 и AgH3, спроектированы на основе консервативных фрагментов стебля

гемагглютинаина двух субтипов вируса гриппа А – H1N1 и H3N2, а третий, AgM2, – на основе консервативного вирусного белка M2.

Дизайн структуры AgH1 (H1N1) антигена проведен на основе гемагглютинаина Influenza A virus A/Puerto Rico/8/1934(H1N1), как описано в статье (Mallajosyula et al., 2014). За основу была взята структура гемагглютинаина 1RU7 (рис. 8).

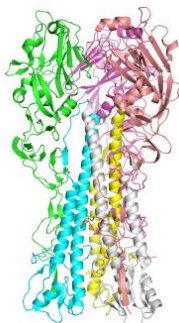


Рисунок 8. Пространственная структура гемагглютинаина вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934(H1N1). Элементы вторичной структуры показаны с помощью ленточной диаграммы. Разные полипептидные цепи окрашены в разные цвета. Изображение создано в программе PyMOL (DeLano, 2004)

Структура иммуногена была спроектирована с использованием фрагментов субъединиц HA1 и HA2, формирующих ствол гемагглютинаина, и имеет следующий вид: HA1₁₈₋₄₁–GSA–HA1₂₉₀₋₃₂₃–GSAGSA–HA2₅₄₁₋₆₁₃–QGTGG. Аминокислотная последовательность искусственного антигена была разработана на основе гемагглютинаина вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) согласно алгоритму, описанному в статье (Squires et al., 2012) с сохранением С-концевого трансмембранного и цитозольного фрагментов (отделены дефисом):

MKANLLVLLCALAAADA–DTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDShgsaNSSLPYQNTHTPTNGESP KY
VRSALRMVTGLRNgagsaTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQDTATGKEFNKDEKR MENLNKKVD
DGFLDIWTYNAELLVLENERLDAHDS–**NVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKDCNECM**
ESVRNGTYDPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQILAIYSTVASSLVLLVSLGATSFWMCSNG
SLQCRICI

Здесь **MKANLLVLLCALAAADA** – лидерный пептид; строчными буквами обозначены аминокислотные остатки, соответствуют линкерным пептидам. В аминокислотную последовательность антигена были введены следующие мутации: I298T, V301T, I303N, V566T, F610A – чтобы снизить гидрофобность на экспонированной поверхности; F563D, L573D – для дестабилизации структуры, формируемой в кислой среде; C306S – для того, чтобы избежать формирования нежелательных дисульфидных связей (Mallajosyula et al., 2014). Мутации S554T и N582K – для того, чтобы приблизить последовательность антигена к наиболее распространенному варианту последовательности. С помощью программы Modeller (Sali and Blundell, 1993) была построена модель пространственной структуры AgH1 (рис. 9).

C-концевой трансмембранный и цитозольный фрагменты были включены в состав итоговой конструкции, чтобы спроектированный иммуноген мог использоваться в качестве поверхностного антигена при конструировании вирусоподобных частиц либо мог экспрессироваться на поверхности клеток, трансфицированных ДНК-вакциной конструкцией, кодирующей данный антиген при ДНК-иммунизации.



Рисунок 9. Модель пространственной структуры искусственного антигена, спроектированная на основе гемагглютинаина вируса гриппа A /Puerto Rico/8/1934(H1N1). За основу была взята структура гемагглютинаина 1RU7 (PDB). Серым показана структура гемагглютинаина вируса гриппа. Красным — искусственного антигена. Изображение получено в программе PyMOL (DeLano, 2004)

Искусственный антиген AgH3 (H3N2) спроектирован на основе структуры искусственного антигена AgH1 (H1N1) с использованием консенсусной последовательности, полученной путём выравнивания вакцинных штаммов, принадлежащих к субтипу H3N2. Для анализа использовались последовательности гемагглютининов вакцинных штаммов

A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), A/HongKong/4801/2014(H3N2),

A/Wisconsin/67/2005(H3N2), A/Brisbane/10/2007(H3N2),

A/Perth/16/2009 (H3N2),

A/Victoria/361/2011(H3N2),

A/Texas/50/2012(H3N2), а также штаммов A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) и

A/California/7/2009(H1N1). Их выравнивания были получены с помощью

специализированного веб-сервиса (<http://www.fludb.org/>) (Zhang et al.,

2017). Аминокислотная последовательность антигена вируса гриппа AgH3:

MKTIIALSYILCLVFAQ—TIVK TITNDQIEVTNATELVQSSSgsaPNDKPFQNVNRITYGASPRY
VKQNTLKLATGMRNgsagsaTQAAINQINGKLNRLIGKTNEKDHQIEKEFSEDEGR IQDLEKYVE
DTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDL TDS—EMNKL FERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACI
GSTRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFATSCFLLCVALLGFIMWACQKGN
IRCNICI

MKTIIALSYILCLVFAQ — консенсусная последовательность лидерного пептида, строчными буквами обозначены аминокислотные остатки, соответствуют линкерным пептидам. Последовательности искусственных генов, кодирующих иммуногены AgH1 и AgH3, были получены с помощью обратной транскрипции с помощью программы

GeneDesigner (Villalobos et al., 2012) на основе природных нуклеотидных последовательностей (NC_002017.1, EF473465.1, KM821341.1).

Анализ аминокислотных последовательностей белков M2 показал, что последовательность экспонированного фрагмента белка M2 высоко консервативна. Ген, кодирующий белок M2 (AgM2), был спроектирован на основе последовательности 7-го сегмента вируса A/Wisconsin/67/2005(H3N2) (EU100611.1).

Синтез и клонирование генов-мишеней

Спроектированные гены были синтезированы и клонированы в векторной плазмиде pcDNA3.1. В результате были сконструированы три рекомбинантные плазмиды: p-AgH1, p-AgH3 и p-AgM2.

Подтверждение экспрессии целевых генов AgH1, AgH3, AgM2

Экспрессию генов *AgH1*, *AgH3*, *AgM2* подтверждали с помощью ОТ-ПЦР по обнаружению соответствующих мРНК в клетках 293Т, трансфицированных ДНК-вакцинными конструкциями p-AgH1, p-AgH3 и p-AgM2. Полученные результаты свидетельствуют о наличии специфических мРНК в суммарных образцах РНК, выделенных из трансфицированных клеток и таким образом подтверждающих экспрессию целевых генов.

Иммуногенность ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих целевые антигены

Для иммунизации использовали самок мышей BALB/c весом 16-18 г. Все животные были разделены на семь групп по 8 мышей в каждой группе:

- AgH1 – мыши, иммунизированные ДНК-плазмидой p-AgH1;
- AgH3 – мыши, иммунизированные ДНК-плазмидой p-AgH3;
- AgM2 – мыши, иммунизированные ДНК-плазмидой p-AgM2;
- Ag(H1+H3+M2) – мыши, иммунизированные смесью p-AgH1, p-AgH3 и p-AgM2 ДНК-плазмид;
- Ag0 – иммунизированные пустой векторной плазмидой pcDNA3.1 (отрицательный контроль);
- Интактные – неиммунизированные мыши (отрицательный контроль);
- H1N1pdm09 – мыши, иммунизированные штаммом вируса гриппа A/California/07/2009(H1N1pdm09) (положительный контроль).

Мышей иммунизировали трижды с интервалом в две недели внутримышечными инъекциями по 100 мкг ДНК. Образцы крови и спленоциты были взяты через две недели после 3-й иммунизации. Образцы крови использовались для оценки В-клеточного ответа в ИФА,

спленоциты – для оценки Т-клеточного ответа с помощью методов IFN- γ -ELISpot.

Результаты ИФА, представленные на рисунке 10, показали, что титры антител, индуцированные в группах мышей, иммунизированных каждой экспериментальной конструкцией отдельно от других, не отличались от титров, полученных в группе с отрицательным контролем Ag0 и группе с интактными животными. Более эффективной оказалась иммунизация в случае комбинации из ДНК-вакцин группы Ag(H1+H3+M2). В этом случае титры антител значительно превышали значения, наблюдаемые как в группе мышей (Ag0), иммунизированных векторной плазмидой в отрицательном контроле ($p < 0,035$), так и группе интактных животных ($p < 0,007$), а также в двух экспериментальных группах: AgH1 (H1N1) ($p < 0,0232$) и AgH3 (H3N2) ($p < 0,009$). В группе мышей, иммунизированных вирусом H1N1pdm09 (положительный контроль), ответ антител был самым высоким. В этом случае титры антител достоверно превышали значения, полученные во всех опытных и контрольных группах ($p < 0,0081$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что комбинация ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены, сконструированные из консервативных фрагментов стебля НА вируса гриппа H1N1 и H3N2, а также белка M2, могут индуцировать статистически значимый ответ антител к вирусу гриппа у иммунизированных мышей.

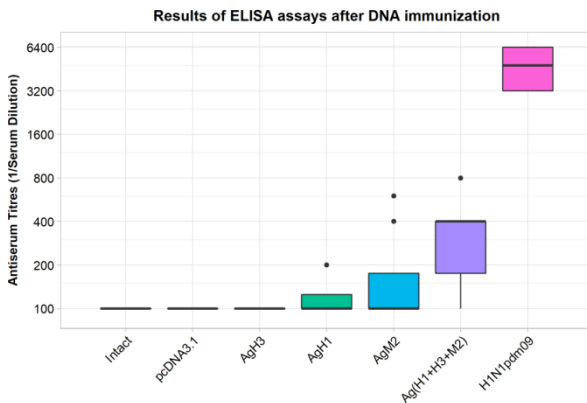


Рисунок 10. Титры сывороточных антител у мышей BALB/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими спроектированные антигены. AgH1 – мыши, иммунизированные ДНК-плазмидой p-AgH1; AgH3 – мыши, иммунизированные ДНК-плазмидой p-AgH3; AgM2 – мыши, иммунизированные ДНК-плазмидой p-AgM2; Ag(H1+H3+M2) – мыши, иммунизированные смесью ДНК-плазмид p-AgH1+p-AgH3+p-AgM2; pcDNA3.1 – мыши, иммунизированные

векторной плазмидой (отрицательный контроль); интактные – неиммунизированные мыши (отрицательный контроль); H1N1pdm09 – мыши, иммунизированные вирусом A/California/07/2009(H1N1pdm09) (положительный контроль)

Для оценки Т-клеточного ответа с помощью IFN- γ -ELISpot использовали спленоциты, выделенные из иммунизированных мышей, стимулированные смесью пептидов (таблица 1), которые были отобраны из последовательностей целевых антигенов (AgH1, AgH2 и AgM2) на основе предсказания их связывания с молекулами МНС I класса мышей BALB/c (H2-D^d, H2-L^d и H2-K^d). Предсказание пептидов проводилось с использованием программы NetMHC (Lundegaard et al., 2008) и веб-сервера NetMHCIIpan (Nielsen et al., 2008).

Таблица 1
Пептиды, выбранные для стимуляции спленоцитов в анализах IFN- γ -ELISpot

Пептиды в составе разработанных антигенов		
AgH1	AgH3	AgM2
KYVRSAKLR	LFERTKKQL	RGPSTEGVP
LYEKVKSQI	HDVYRDEAL	ETPIRNEWG
FYHKADNEA	RYVKQNTLK	LLTEVETPI
AKLRMVTGL	KPFQNVNRI	
SHGSANSSL	LENQHTIDL	
	KSGYKDWIL	
	IEVTNATEL	

Сравнение Т-клеточного ответа в различных группах иммунизированных мышей показало, что иммунизация комбинацией ДНК-вакцин Ag(H1+H3+M2) индуцировала самый высокий специфический Т-клеточный ответ, сравнимый с таковым в положительном контроле. В других экспериментальных группах уровень Т-клеточной иммунной реакции был низким и не превышал уровня значений в группах с отрицательным контролем – (pcDNA3.1) и Ag0. Статистический анализ полученных результатов показал, что значимые результаты наблюдались только в двух группах: у животных, иммунизированных комбинацией ДНК-вакцин ($p < 0,05$), и группе животных, иммунизированных вакцинным штаммом A/California/07/2009(H1N1pdm09) ($p < 0,0038$) (рис. 8). Таким образом, исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих целевые В-клеточные иммуногены, показало, что спроектированные конструкции способны индуцировать у иммунизированных мышей иммунные ответы как антител, так и CD8+ Т-лимфоцитов, однако только в случае их комбинированного применения. Поскольку каждая вакцинная конструкция в отдельности оказалась

слабоиммуногенной, можно предположить, что в случае их комбинированного применения они могут оказывать взаимную помощь, вызывая синергическое действие в отношении индукции антител и Т-лимфоцитов.

Оценка кросс-протективной активности мышей, иммунизированных разработанными ДНК-конструкциями, от последующей летальной дозы вирусами гриппа H3N2 или H1N1, равной 10 ЛД₅₀

Способность ДНК-плазмид индуцировать перекрестный защитный иммунитет изучалась на двух штаммах вируса гриппа: A/California/4/2009(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2), принадлежащих к двум различным подтипам. Мы использовали смертельную дозу вируса, равную 10 ЛД₅₀.

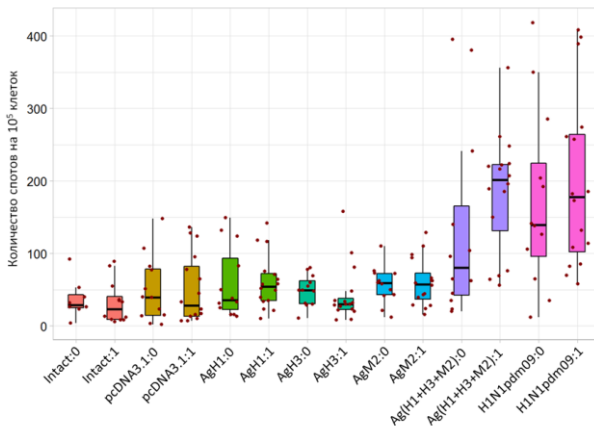


Рисунок 11. Результаты исследования количества IFN- γ -продуцирующих клеток в реакции IFN γ -ELISpot у мышей линии BALB/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими целевые иммуногены. Различными цветами выделены результаты, полученные для различных экспериментальных и контрольных групп животных. Обозначение групп то же, что и на рис. 10. Цифра «0» в обозначении группы обозначает спонтанный уровень IFN- γ -продуцирующих клеток без добавления пептидов, а цифра «1» – количество IFN- γ -продуцирующих клеток в ответ на стимуляцию специфическими пептидами. Статистический анализ полученных результатов проведен с помощью однонаправленного теста Уэлча (среднее значение выборки А больше среднего значения выборки В), с FDR-коррекцией

Защитное действие разработанных ДНК-вакцинных конструкций было изучено при интраназальном заражении летальной дозой вируса (10 ЛД₅₀). В данном эксперименте мы использовали только группу мышей,

иммунизированных смесью трех ДНК-вакцинных конструкций (p-AgH1, p-AgH3 и p-AgM2). Мышей, иммунизированных индивидуальными плазмидами, не анализировали, поскольку было обнаружено, что только комбинация разработанных ДНК-вакцин индуцирует статистически значимый иммунный ответ. Мышей заражали через 14 дней после 3-й иммунизации одним из двух адаптированных к мышам штаммов вируса гриппа: либо A/California/4/2009(H1N1pdm09), либо A/Aichi/2/68(H3N2).

Защитная способность ДНК-вакцинных конструкций была изучена в четырех группах животных, включая:

- Ag(H1+H3+M2) – мыши, иммунизированные комбинацией ДНК-плазмид p-AgH1+p-AgH3+p-AgM2 (75 мкг/мышь каждой плазмиды);
- H1N1 – мыши, иммунизированные вирусом A/California/07/2009(H1N1pdm09) (положительный контроль);
- H3N2 – мыши, иммунизированные вирусом A/Aichi/2/68(H3N2) (положительный контроль);
- pDNA3.1 – мыши, иммунизированные пустой векторной плазмидой pDNA3.1 (отрицательный контроль) (200 мкг / мышь).

Интактные мыши были использованы для контроля летальных доз вирусов.

Рисунок 12 суммирует данные о выживаемости. Полученные результаты показали, что статистически значимый защитный эффект от летальной дозы вируса A/California/4/2009(H1N1pdm09) был зарегистрирован в двух случаях – в группе мышей, иммунизированных вирусом A/California/07/2009(H1N1pdm09) ($p = 0,00037$, рис. 9B), и в группе мышей, иммунизированных комбинацией ДНК-плазмид Ag(H1+H3+M2) ($p = 0,0001$, рис. 9A). Коэффициент выживаемости в группе H1N1 составил 87,5 %, а в группе Ag(H1+H3+M2) – 58,3 %. В группе иммунизированных вирусом A/Aichi/2/68(H3N2) все животные погибли (рис. 9C); статистически значимых отличий от кривых в группе с отрицательным контролем (pDNA3.1) не было.

В случае летального заражения вирусом A/Aichi/2/68(H3N2) протективный эффект был зарегистрирован у животных, иммунизированных вирусом A/Aichi/2/68(H3N2) (все 8 животных выжили (рис. 9F), $p < 0,0001$), и у животных, иммунизированных смесью ДНК-вакцин (4 из 8 мышей выжили (рис. 21D) $p = 0,027$). В группах, иммунизированных либо пустой векторной плазмидой, либо вирусом гриппа H1N1, все животные погибли через 7-8 дней после заражения (рис. 9E). Таким образом, наши результаты показывают, что иммунизация мышей с помощью комбинации ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены, разработанные с использованием двух вариантов стебля HA и консервативного белка M2, стимулировали

перекрестный защитный иммунитет против сезонных штаммов вируса гриппа – A/Aichi/2/68(H3N2) и A/California/4/2009(H1N1pdm09).

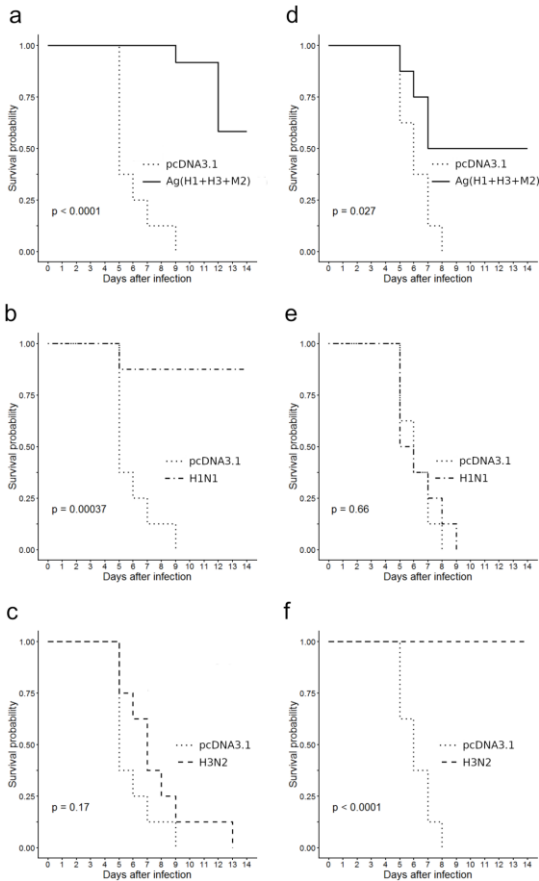


Рисунок 12. Выживаемость иммунизированных мышей после летального заражения мышей патогенными вирусами гриппа А по сравнению с отрицательным контролем (pcDNA3.1). (А, В, С) – заражение вирусом A/California/4/09(H1N1pdm09); (D, E, F) – заражение вирусом A/Aichi/2/68(H3N2). Анализ выживаемости проводился с помощью анализа Каплана-Мейера, кривые выживаемости сравнивались с помощью длиннорангового теста (тест Mantel-Haenszel)

Чтобы понять причины, лежащие в основе полученных результатов, мы также исследовали гуморальный и Т-клеточный ответы у иммунизированных животных. Результаты исследований В-клеточного ответа, представленные в таблице 2, показывают, что иммунизация смесью

ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие целевые антигены, индуцировала антитела как к A/Aichi/2/68(H3N2), так и к A/California/07/2009(H1N1pdm09) штаммам вируса гриппа. Антитела, распознающие A/Aichi/2/68 и A/California/07/09(H1N1pdm09), были обнаружены у всех восьми мышей, иммунизированных комбинацией ДНК-плазмид (p-AgH1 + p-AgH3 + p-AgM2).

Таблица 2.

Титры антител против вируса гриппа, оцененные с помощью ELISA в сыворотках иммунизированных мышей

Антиген / Количество мышей / Обратный титр в ИФА против A/California/07/09 (H1N1pdm09)												
Ag(H1+H3+M2)								H1N1	H3N2	pcDNA3.1		
1	2	3	4	5	6	7	8	1	1	1	2	3
1600	1600	1600	1600	3200	3200	3200	3200	12800	3200	200	200	200
Антиген / Количество мышей / Обратный титр в ИФА против A/Aichi/02/68(H3N2)												
Ag(H1+H3+M2)								H1N1	H3N2	pcDNA3.1		
1	2	3	4	5	6	7	8	1	1	1	2	3
1600	3200	1600	3200	6400	6400	3200	6400	6400	12800	200	400	400

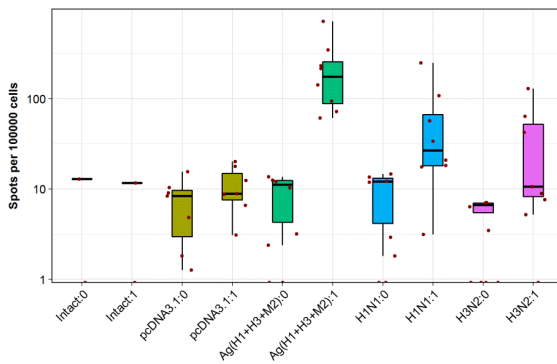


Рисунок 13. Оценка клеточного ответа у иммунизированных мышей с помощью метода IFN-γ-ELISpot. Различными цветами обозначены результаты, наблюдаемые в разных экспериментальных и контрольных группах. «0» в названии группы

соответствует спонтанной секреции IFN- γ , «1» соответствует секреции IFN- γ , стимулированной антигенными пептидами. Подсчет клеток представлен в логарифмической шкале

Было также обнаружено, что комбинация ДНК-вакцин индуцирует высокие уровни Т-клеток, продуцирующих IFN- γ , в ответ на стимуляцию специфическими пептидами в реакции IFN- γ -ELISpot (рис. 13). Только спленоциты мышей из группы Ag (H1 + H3 + M2) продемонстрировали статистически значимую индукцию антиген-специфической секреции IFN- γ , по сравнению как с мышами из отрицательной контрольной группы, так и с животными, иммунизированными живыми вирусами. Более высокая секреция IFN- γ , наблюдаемая в последнем случае, может быть объяснена неполным соответствием между пептидами, выбранными из искусственных антигенов AgH1, AgH3 и AgM2 для стимуляции спленоцитов, и аминокислотными последовательностями вирусных антигенов.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что как гуморальный, так и клеточный иммунные ответы способствовали перекрестной защите от летальной инфекции штаммами A/California/4/09(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2) мышей, иммунизированных смесью плазмид pAgH1, pAgH3 и pAgM2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Грипп – заразное острое респираторное заболевание, вызываемое вирусами гриппа. Ежегодные сезонные вспышки гриппа во всем мире поражают 5-15% населения и вызывают значительную смертность среди групп риска, а также наносят большой экономический ущерб. Чтобы ослабить воздействие гриппа, существуют эффективные профилактические вакцины против гриппа, изготовленные из эпидемически значимых аттенуированных живых или инактивированных штаммов вирусов, но высокая варибельность вирусов гриппа позволяет им избегать ранее существовавший иммунитет, и, следовательно, чтобы соответствовать фактическим циркулирующим штаммам, состав вакцины против гриппа приходится менять каждые 2 или 3 года. Таким образом, разработка универсальной противогриппозной вакцины, способной вызывать защитный иммунитет против максимально широкого круга штаммов вируса гриппа, привлекает все большее внимание.

Данная диссертационная работа посвящена исследованию искусственных вакцинных конструкций, спроектированных с использованием консервативных последовательностей белков вируса гриппа для индукции перекрестного Т- и В-клеточного иммунитета против вируса гриппа А на примере двух сезонных штаммов A/Aichi/2/68(H3N2) и A/California/4/2009(H1N1pdm09).

Для создания Т-клеточных вакцинных конструкций использовался подход, основанный на компьютерном дизайне искусственных полиэпитопных белков-антигенов, в состав которых вошли консервативные Т-клеточные эпитопы (как CTL, так и Th), локализованные в последовательностях всех основных белков вируса гриппа (PA, PB1, PB2, HA, NA, M1, NP, NS1 и NS2). С использованием двух методов была подтверждена экспрессия целевых генов в составе ДНК-вакцинных конструкций на уровне мРНК и белка. Далее исследовали перекрестную защиту (cross protection) против двух штаммов вируса гриппа, A/California/4/2009(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2), относящимися к двум разным подтипам, у мышей BALB/c, иммунизированных смесью ДНК-вакцинных конструкций р-Ub-muTAg и р-LP-muTAg-LAMP. Полученные результаты свидетельствуют о том, что комбинация двух искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов в составе ДНК-вакцины способна индуцировать у мышей перекрестный протективный иммунитет в отличие от иммунизации живыми вакцинными штаммами.

Для индукции кросс-протективных антител и цитотоксических Т-лимфоцитов были сконструированы вакцинные конструкции с использованием консервативных фрагментов стебля гемагглютинаина и консервативного белка M2 вируса гриппа А (AgH1, AgH3 и AgM2). В целом полученные результаты показали, что спроектированные ДНК-вакцинные конструкции обеспечивают экспрессию целевых генов, при совместной иммунизации мышей линии BALB/c индуцируют ответы специфических антител и CTLs, а также обеспечивают защиту животных от заражения двумя исследуемыми штаммами. При этом антитела взаимодействовали как с H1N1, так и H3N2 вирусными антигенами в ИФА, а ответы CTLs в группе мышей, иммунизированных смесью целевых ДНК-вакцинных конструкций, достоверно превышали ответы в группах животных, иммунизированных вакцинными штаммами A/California/07/09(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2).

Полученные генно-инженерные конструкции, как нами было показано, обладают противовирусным действием, что, в свою очередь, позволяет их рассматривать в качестве кандидатов при разработке вакцин в будущем.

ВЫВОДЫ

1. Получены ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие последовательности искусственных Т- и В-клеточных иммуногенов для разработки универсальной вакцины против вируса гриппа:
 - а) В-клеточные иммуногены (AgH1, AgH3 и AgM2) спроектированы на основе консервативных фрагментов стебля гемагглютинаина вируса

гриппа двух субтипов H1N1 и H3N2 соответственно, а также на основе консервативного вирусного белка M2;

б) Т-клеточные иммуногены (Ub-mTAg, Ub-hTAg, LP-mTAg-LAMP и LP-hTAg-LAMP) спроектированы с использованием консервативных Т-клеточных эпитопов (как CTL, так и Th), идентифицированных в белках HA, NA, M1, NP, PA, PB1 и PB2 вируса гриппа.

2. Доказано, что полученные ДНК-вакцинные конструкции обеспечивают экспрессию искусственных генов в эукариотических клетках.
3. Показано, что иммунизация мышей BALB/c ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими искусственные В- и Т-клеточные иммуногены, приводит к активации вирус-специфического клеточного и гуморального иммунного ответа.
4. Впервые установлено, что иммунизация мышей BALB/c комбинациями ДНК-вакцинных конструкций обеспечивает частичную перекрестную защиту животных от заражения двумя сезонными штаммами вируса гриппа A/California/4/09(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2). Выяснено, что при иммунизации мышей комбинацией ДНК-плазмид, кодирующих Т-клеточные иммуногены, протективный эффект достигал 37,5 % при заражении животных как вирусом A/California/4/09(H1N1pdm09), так и вирусом A/Aichi/2/68(H3N2). Иммунизация животных комбинацией ДНК-плазмид, кодирующих В-клеточные иммуногены, обеспечивала 58,3 % защиту от заражения вирусом A/California/4/09(H1N1pdm09) и 50 % защиту от заражения вирусом A/Aichi/2/68(H3N2).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. 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*. – 2020. – V. 8. – № 3. – Art. no. 448.
2. Bazhan S.I., Antonets D.V., **Starostina E.V.**, Ilyicheva T.N., Kaplina O.N., Marchenko V.Y., Volkova O.Y., Bakulina A.Y., Karpenko L.I. In silico design of influenza a virus artificial epitope-based T-cell antigens and the evaluation of their immunogenicity in mice // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2020. DOI: 10.1080/07391102.2020.1845978.
3. **Старостина Е.В.**, Каплина О.Н., Карпенко Л.И., Дудко С.Г., Бажан С.И. Исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены вируса гриппа.// *Российский иммунологический журнал*. – 2020. – Т. 22. – № 2-2. – С. 1024-1026.

Тезисы на всероссийских и международных конференциях

4. **Starostina E.V.**, Antonets D.V., Ilyicheva T.N., Kaplina O.N., Karpenko L.I., Bazhan S.I. Immunogenicity of DNA vaccines carrying artificial genes encoding fragments of influenza A virus hemagglutinin stem and M2 protein» тезисы для опубликования в рамках 4th International Conference «Perspective technologies of vaccination and immunotherapy» (October 27-29 2020 On-line).
5. **Старостина Е.В.**, Каплина О.Н., Карпенко Л.И., Дудко С.Г., Антонец Д.В., Бажан С.И. Оценка иммуногенных и протективных свойств полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов против вируса гриппа А // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (OpenBio – 2019): Сборник тезисов (22–25 октября 2019 г., наукоград Кольцово, Россия). – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2019. – С. 629-633.
6. **Старостина Е.В.**, Федотова С.А., Дудко С.Г., Антонец Д.В., Каплина О.Н., Карпенко Л.И., Бажан С.И. Исследование специфической активности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих консервативные фрагменты стебля гемагглютинина и белок М2 вируса гриппа // V Международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (OpenBio – 2018): Сборник тезисов (23–25 октября 2018 г., наукоград Кольцово, Россия). – С. 94-97.
7. **Старостина Е.В.**, Федотова С.А., Дудко С.Г., Антонец Д.В., Каплина О.Н., Карпенко Л.И., Бажан С.И. Исследование Т-клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных универсальной ДНК-вакциной против вируса гриппа // Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики: Сборник тезисов межрегиональной научно-практической конференции с международным участием (17-18 октября 2018 г., Екатеринбург, Россия). – ИД Юника, 2018. – С. 94-95.