

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-110

ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ЭКСПРЕССИРУЕМОГО АДЕНОВИРУСНЫМ ВЕКТОРОМ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА ТИПА В ЗА СЧЕТ МОДИФИКАЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ДОМЕНА

ENHANCEMENT OF THE IMMUNOGENICITY OF INFLUENZA B VIRUS HEMAGGLUTININ EXPRESSED BY AN ADENOVIRAL VECTOR BY MODIFYING THE CYTOPLASMIC DOMAIN

К. А. Первокина, Е. Д. Авдонина, Э. А. Евграфова, Д. Н. Щербинин

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

K.A. Pervoykina, E.D. Avdonina, E.A. Yevgrafova, D.N. Shcherbinin

N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ uk-ru123@yandex.ru

Аннотация

Вирус гриппа типа В — социально значимый патоген, который часто вызывает осложнения у людей из групп риска. Несмотря на вакционопрофилактику, наблюдается высокая ежегодная заболеваемость, что свидетельствует о целесообразности разработки новых вакцин. В работе было решено объединить преимущества вирусоподобных частиц и аденоовирусной платформы, взяв в качестве антигена гемагглютинин дикого типа вируса гриппа B/Washington/02/2019.

Abstract

Influenza type B virus is a socially significant pathogen that often causes complications in people from risk groups. Despite vaccination, there is a high annual incidence, which indicates the feasibility of developing new vaccines. In the work, it was decided to combine the advantages of virus-like particles and the adenovirus platform, taking the wild-type hemagglutinin of the influenza B virus/Washington/02/2019 as an antigen.

Введение

Вирус гриппа типа В вызывает серьезное заболевание и частые осложнения у детей и пожилых людей [1]. Высокая ежегодная заболеваемость гриппом даже при наличии вакцин указывает на актуальность разработки новых профилактических средств.

Magnus A. G. Hoffmann с соавторами предложили перспективную технологию создания вакцин [2]. Авторы заменили цитоплазматическую часть S-антигена SARS-CoV2 на ESCRT- и ALIX-связывающую область (EABR), привлекающую компоненты эндосомального сортирующего комплекса, необходимого для транспорта (ESCRT), а также добавили EPM (мотив предотвращения эндоцитоза) для уменьшения эндоцитоза. Результаты показали, что такой антиген обладает большей иммуногенностью в сравнении с обычным S-антигеном. В нашей работе было решено применить эту технологию для увеличения иммуногенности рекомбинантного аденоовирусного вектора, экспрессирующего гемагглютинин (HA) вируса гриппа типа В.

Результаты

В качестве исходного гена HA для дальнейших модификаций был выбран гемагглютинин вируса гриппа B/Washington/02/2019 (рис. 1, а). Ген гемагглютинина дикого типа (HA-WT) был клонирован в членочную плазмиду pShuttle-CMV из набора AdEasy Adenoviral vector system (Stratagene, США) общелабораторными методами молекулярного клонирования. Таким образом была получена плазміда pShuttle-CMV-HA-WT. Рекомбинантный аденоовирус Ad5-HA-WT был получен согласно протоколу производителя.

Последовательность, способствующая самоорганизации VLP, создана *in silico*: часть цитоплазматического домена на С-конце HA заменили на последовательности EPM, глицин-сериновый линкер и EABR (см. рис. 1, б). Сборку последовательности проводили блочным методом как описано Lei Young и Qihan Dong [3] (см. рис. 1, в). Рекомбинантный аденоовирус Ad5-HA-VLP получен как описано выше.

В работе проведено сравнение двух вирусных векторов после интраназальной иммунизации лабораторных мышей Ad5-HA-WT и Ad5-HA-VLP в дозе 2×10^7 БОЕ/мышь в объеме 50 мкл. Контрольной группе мышей вводили PBS (рН 7,4). На 28-й день после аденоовирусной иммунизации отбирали сыворотки крови мышей и выявляли специфические антитела к HA методом ИФА (рис. 2).

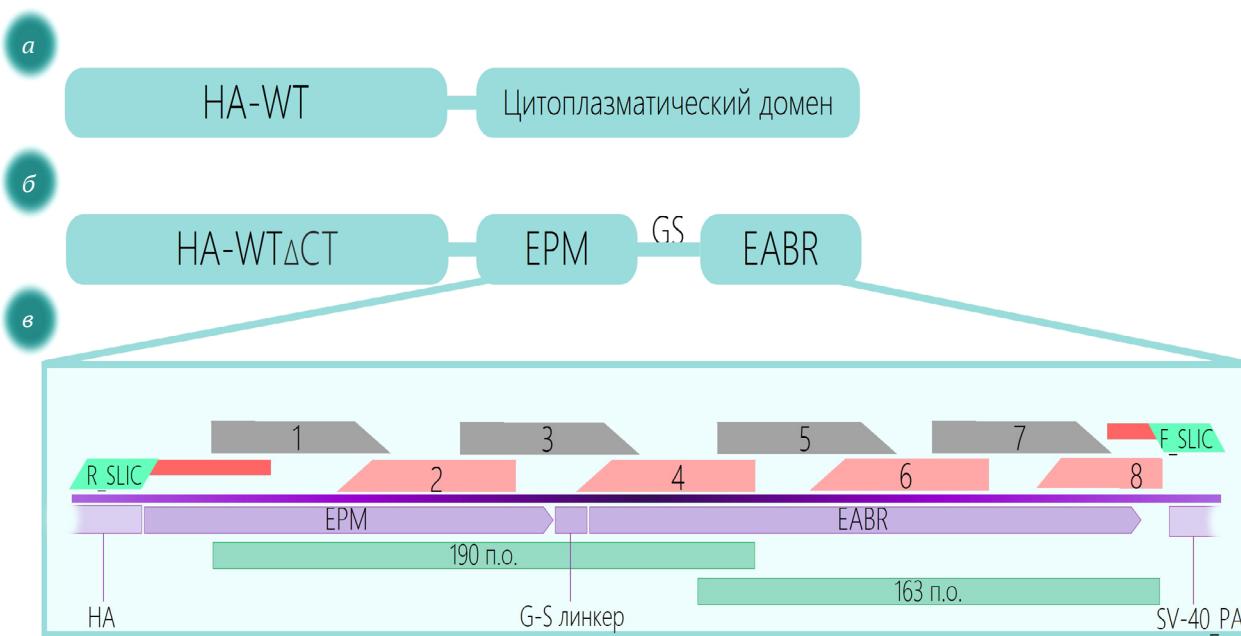


Рис. 1. Схематичное изображение НА дикого типа (а) и с делетированным цитоплазматическим доменом (НА-WTΔCT) (б). Схема получения нуклеотидной последовательности химерного НА с новым цитоплазматическим доменом путем объединения нуклеотидных блоков 190 и 163 п. о., полученных с помощью амплификации четырех праймеров (в).

Прямые праймеры окрашены серым, обратные — розовым

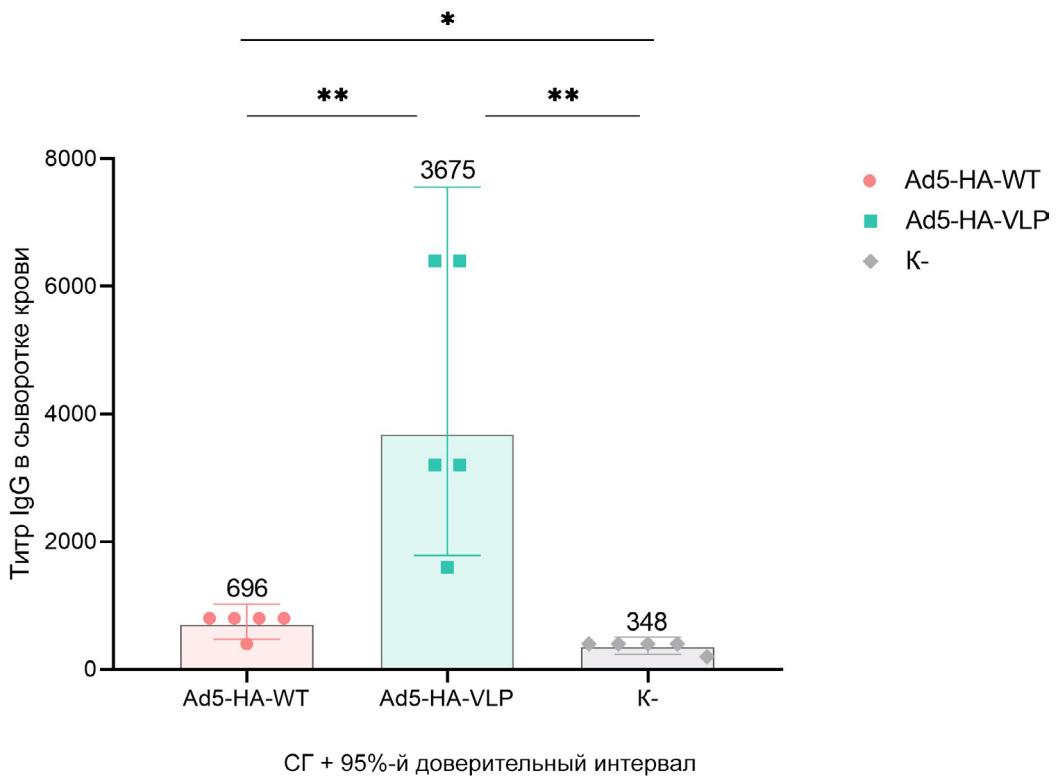


Рис. 2. Оценка титров специфических антител к НА в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными адено-вирусами. К- — отрицательный контроль. Столбцы обозначают медиану каждой из групп ($n = 5$). Группы иммунизировали Ad5-HA-WT и Ad5-HA-VLP, сравнивали с помощью непараметрических U-тестов Манна — Уитни. Показано геометрическое среднее титра (ГСТ) и 95%-й доверительный интервал (ДИ) для каждой из групп. Минимальный уровень значимости — $p < 0,05$

Согласно полученным данным, обе конструкции индуцируют выработку специфических антител, однако в группе, иммунизированной Ad5-HA-VLP, наблюдается более высокий титр антител (геометрическое среднее титра (ГСТ): 3676; 95%-й доверительный интервал (ДИ) 1789–7552) в сравнении с группой, иммунизированной Ad5-HA-WT (ГСТ: 696; 95%-й ДИ 474–1023). Методом РТГА выявлено, что Ad5-HA-VLP индуцирует более высокие титры гемагглютинирующих антител (ГСТ 42; 95%-й ДИ 16–113) в сравнении с Ad5-HA-WT (ГСТ 16; 95%-й ДИ 6–46) ($p < 0,05$).

Таким образом, добавление к НА вируса гриппа типа В последовательностей, способствующих образованию самоорганизующихся VLP, достоверно увеличивает иммуногенность антигена в составе аденоовирусного вектора при интраназальной иммунизации в сравнении с рекомбинантным аденоовирусом, несущим дикий тип НА. Далее в работе планируется изучение влияния полученных конструкций на протективность аденоовирусных векторов, а также изучение клеточного иммунного ответа.

Литература

1. Gaitonde D., Moore F., Morgan M. Influenza: Diagnosis and Treatment // Am. Fam. Physician. 2019. Vol. 100 (12). P. 751–758.
2. Hoffmann M., Yang Z., Huey-Tubman K. et al. ESCRT recruitment to SARS-CoV-2 spike induces virus-like particles that improve mRNA vaccines // Cell. 2023. Vol. 186 (11). P. 2380–2391.
3. Young L., Dong Q. Two-step total gene synthesis method // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32 (7). P. 59–65.