

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-198

## КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А/Н5НХ

### AN INTEGRATED APPROACH TO OBTAINING AND CHARACTERIZING GLYCOPROTEINS OF CIRCULATING A/H5NX INFLUENZA VIRUS VARIANTS

Э. В. Дубровская<sup>1,2</sup>, Г. С. Онхонова<sup>2</sup>, И. Р. Иматдинов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

E. V. Dubrovskaya<sup>1,2</sup>, G. S. Onkhonova<sup>2</sup>, I. R. Imatdinov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University

<sup>2</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo

✉ dubrovskaya\_jev@vector.nsc.ru

#### Аннотация

За последние годы вирус высокопатогенного гриппа птиц был обнаружен на территориях всех континентов. По состоянию на июль 2025 г. зафиксировано более 100 случаев заражения людей [1, 2], тысячи инфицированных животных, гибель скота и птицы [3]. Ввиду возрастающих эпидемиологических рисков в рамках данного исследования разработан подход, позволяющий быстро получить и изучить функциональные гликопротеины циркулирующих вариантов вируса гриппа птиц.

#### Abstract

In recent years, the highly pathogenic avian influenza virus has been detected across all continents. As of July 2025, over 100 human cases [1, 2], thousands of infected animals, and deaths of livestock and poultry have been recorded [3]. Due to increasing epidemiological risks, this study presents an approach for rapid isolation and analysis of functional glycoproteins from circulating avian influenza virus variants.

Вирус высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП), ранее циркулирующий преимущественно в популяциях птиц, все чаще выявляется у диких и домашних животных [3] и становится причиной спорадических случаев инфицирования людей, зачастую характеризующихся тяжелыми клиническими проявлениями. На июль 2025 г. особенно напряженная эпизоотическая обстановка наблюдается на территориях Северной Америки и Юго-Восточной Азии. Ввиду того, что вирус гриппа А/Н5Нх переносится в основном водоплавающими перелетными птицами, миграционные пути которых пролегают через весь евразийский материк, не исключена вероятность заноса и распространения вируса ВПГП среди птиц и млекопитающих в Российской Федерации. В связи с этим существует необходимость изучения антигенных и молекулярно-биологических свойств циркулирующих и вновь возникающих вариантов вируса гриппа А/Н5Нх. Проведению исследований препятствуют значительные различия нуклеотидных последовательностей 4-го и 6-го сегментов генома актуальных вариантов вируса гриппа А/Н5Нх, изолированных с территорий Российской Федерации, Северной Америки и Юго-Восточной Азии. Для преодоления этого ограничения разработан комплексный подход, направленный на получение генов НА и НА циркулирующих вариантов вируса гриппа А/Н5Нх методами генной инженерии, с последующим изучением их свойств посредством экспонирования функциональных гликопротеинов на поверхности ВПЧ.

Разработанный подход включает в себя четыре этапа: 1) биоинформационический анализ и дизайн генетических конструкций; 2) мутагенез и клонирование синтетических генов, кодирующих гликопротеины циркулирующих вариантов вируса гриппа А/Н5Нх; 3) псевдотипирование репликационно-дефектных вирусов функциональными гликопротеинами — гемагглютинином (НА) и нейраминидазой (НА); 4) изучение антигенных и молекулярно-биологических свойств экспонированных вирусных гликопротеинов с использованием серологических, вирусологических и биофизических методов.

Задачей первого этапа являлся анализ последовательностей НА и НА разных вариантов вируса гриппа А/Н5Нх с использованием комплекса биоинформационических методов, позволяющих выявить замены, отсутствующие в прототипных экспрессирующих конструкциях. После дизайна генетических конструкций и подбора олигонуклеотидных праймеров проводили сайт-направленный мутагенез с целью получения модифицированных фрагментов генов 4-го и 6-го сегментов циркулирующих вариантов вируса ВПГП. Бесшовная сборка фрагментов генов после мутагенеза осуществляли методом ПЦР с перекрывающимися концами. Полученные синтетические

гены клонированы с использованием классических генно-инженерных методов в акцепторном экспрессирующем плазмидном векторе. Корректность нуклеотидных последовательностей подтверждали методами рестрикционного анализа и секвенирования по Сэнгеру. Наработанные плазмидные конструкции использовали для псевдотипирования лентивирусных ВПЧ и рекомбинантного вируса везикулярного стоматита rVSV\_dG\_mNeonGreen. Функциональную активность экспонированных гликопротеинов подтверждали с использованием пермиссивной культуры клеток (MDCK и HEK293T) — инфекционные титры псевдотипированных ВПЧ составили от  $4,16(\pm 0,21) \times 10^6$  ФОЕ/мл до  $9,23 (\pm 0,36) \times 10^6$  ФОЕ/мл. Псевдотипированные вирусные частицы использовали для постановки РГА, РТГА и реакции вируснейтрализации с сыворотками крови животных, в том числе полученными на антигены вируса гриппа штамм A/chicken/Astrakhan/2171-1/2020 (H5N8). Гемагглютинирующие титры псевдотипированных ВПЧ варьировались от 640 до 2560 ГАЕ/мл. Охарактеризованные псевдотипированные ВПЧ использованы для изучения рецепторной специфичности ( $\alpha 2,6$  и/или  $\alpha 2,3$ ) полученных гемагглютининов вариантов вируса гриппа A/H5Nx методом бислойной интерферометрии.

Таким образом, предложенный комплексный подход нацелен на безопасное и ускоренное исследование молекулярно-биологических и антигенных свойств воспроизведенных гликопротеинов вирусов гриппа А и В. Результаты исследований вирусных гликопротеинов (или отдельных мутаций в них) позволяют прогнозировать потенциальные риски для обеспечения биологической безопасности населения при (1) заносе и распространении новых вариантов вируса ВПГП, (2) возникновении ключевых мутаций в циркулирующих субтипах, (3) преодолении межвидовых барьеров, а также (4) исследовать вируснейтрализующие свойства сывороток, полученных в ходе исследования кандидатных вакциновых препаратов против гриппа A/H5Nx.

### **Литература**

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Обновленная совместная оценка общественного здравоохранения ФАО/ВОЗ/WOAH недавних случаев заражения вирусом гриппа А(H5) у животных и людей // Всемирная организация здравоохранения. URL: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/avian-influenza/avian-a-h5n1-virus> (дата обращения: 21.07.2025).
2. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Сообщения о вспышках заболеваний // Всемирная организация здравоохранения. URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases-outbreak-news> (дата обращения: 21.07.2025).
3. Capelastegui F., Goldhill D. H. H5N1 2.3.4.4b: a Review of Mammalian Adaptations and Risk of Pandemic Emergence // J. General Virol. 2025. Vol. 106, No. 6.