

УДК 578.2

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ633390>

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ГРИППА А/Н1N1pdm09, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ФРАГМЕНТ ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Ю.А. Дешева<sup>1,2</sup>, А.Р. Рекстин<sup>1</sup>, И.В. Майорова<sup>1</sup>, Н.В. Копылова<sup>1</sup>, О.С. Коптева<sup>1,2</sup>, Д.С. Петрачкова<sup>1</sup>, П.А. Кударь<sup>1</sup>, Т.С. Котомина<sup>1</sup>, А.С. Матушкина<sup>1</sup>, Г.Ф. Леонтьева<sup>1</sup>, Т.А. Крамская<sup>1</sup>, И.Н. Исакова-Сивак<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Для цитирования:** Дешева Ю.А., Рекстин А.Р., Майорова И.В., Копылова Н.В., Коптева О.С., Петрачкова Д.С., Кударь П.А., Котомина Т.С., Матушкина А.С., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Исакова-Сивак И.Н. Биологические свойства рекомбинантного вируса гриппа А/Н1N1pdm09, экспрессирующего фрагмент поверхностного белка *Streptococcus pneumoniae* // Медицинский академический журнал. 2024. Т. 24. № 4. С. 41–50. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ633390>

Рукопись получена: 10.06.2024

Рукопись одобрена: 07.09.2024

Опубликована online: 26.12.2024

**Обоснование.** Штаммы живой гриппозной вакцины могут служить перспективной системой доставки целевых антигенов в организм, поскольку такая вакцина вводится интраназально и стимулирует различные звенья иммунитета как к целевому патогену, так и к вирусу гриппа — актуальной инфекции, ежегодно наносящей существенный социально-экономический ущерб всем странам мира.

**Цель** — изучение биологических свойств рекомбинантного штамма живой гриппозной вакцины подтипа А/Н1N1pdm09, экспрессирующего фрагмент поверхностного белка *Streptococcus pneumoniae* Spr1875.

**Материалы и методы.** Рекомбинантный штамм живой гриппозной вакцины подтипа А/Н1N1pdm09, экспрессирующий фрагмент поверхностного белка *S. pneumoniae* Spr1875, размером 69 аминокислот в составе химерной молекулы гемагглютинина был подготовлен методом обратной генетики с использованием 8-плазмидной системы. Репродуктивную активность рекомбинантного вируса изучали в куриных эмбрионах. Изучение иммуногенности и защитной эффективности выполняли на мышах линии Balb/C.

**Результаты.** Рекомбинантный штамм вируса гриппа с гемагглютинином Н1-Spr-69 активно репродуцировался в куриных эмбрионах и сохранил температурочувствительный фенотип, характерный для вакцинных вирусов, при этом демонстрировал ограниченный рост в органах респираторного тракта мышей по сравнению с исходным вакцинным вирусом А/Н1N1pdm09. При интраназальном введении мышам рекомбинантный штамм Н1-Spr стимулировал выработку вирус-специфических сывороточных IgG антител на том же уровне, что и классический штамм живой гриппозной вакцины А/Н1N1pdm09, а также вызывал прирост IgG к пневмококковой вставке Spr1875. Несмотря на то что вариант А/Н1N1pdm09 более эффективно защищал мышей от потери веса при инфицировании адаптированными к мышам вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (Н1N1)pdm09, чем химерный вирус Н1-Spr, титры челлендж-вируса в легких мышей обеих вакцинных групп были статистически значимо снижены по сравнению с неиммунизированными животными.

**Заключение.** Полученные результаты показывают способность химерного рекомбинантного штамма Н1-Spr стимулировать выработку защитного иммунитета к вирусу гриппа.

**Ключевые слова:** живая гриппозная вакцина; рекомбинантный вирус гриппа; пандемический штамм А/Н1N1pdm09; *Streptococcus pneumoniae*.

## BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE RECOMBINANT INFLUENZA A/H1N1pdm09 VIRUS EXPRESSING A FRAGMENT OF THE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SURFACE PROTEIN

Yulia A. Desheva<sup>1,2</sup>, Andrey R. Rekstin<sup>1</sup>, Irina V. Mayorova<sup>1</sup>, Nina V. Kopylova<sup>1</sup>, Olga S. Kopteva<sup>1,2</sup>, Daria S. Petrachkova<sup>1</sup>, Polina A. Kudar<sup>1</sup>, Tatyana S. Kotomina<sup>1</sup>, Anastasia S. Matushkina<sup>1</sup>, Galina F. Leontieva<sup>1</sup>, Tatyana A. Kramskaya<sup>1</sup>, Irina N. Isakova-Sivak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

**For citation:** Desheva YuA, Rekstin AR, Mayorova IV, Kopylova NV, Kopteva OS, Petrachkova DS, Kudar PA, Kotomina TS, Matushkina AS, Leontieva GF, Kramskaya TA, Isakova-Sivak IN. Biological properties of the recombinant influenza A/H1N1pdm09 virus expressing a fragment of the *Streptococcus pneumoniae* surface protein. *Medical Academic Journal*. 2024;24(4):41–50. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ633390>

Received: 10.06.2024

Accepted: 07.09.2024

Published online: 26.12.2024

**BACKGROUND:** Live influenza vaccine strains may serve as a promising system for the delivery of target antigens to the body because such a vaccine is administered intranasally and stimulates multiple chains of immunity against both the target pathogen and the influenza virus, a serious infection that causes significant socioeconomic damage worldwide each year.

**AIM:** The study was aimed to evaluate the biological properties of a recombinant live influenza vaccine strain of subtype А/Н1N1pdm09 expressing a fragment of the *Streptococcus pneumoniae* Spr1875 surface protein.

### Список сокращений

ЖГВ — живая гриппозная вакцина; ЭИД<sub>50</sub> — 50 % эмбриональная инфекционная доза; НА — гемагглютинин.

**MATERIALS AND METHODS:** The A/H1N1pdm09 recombinant live influenza vaccine strain expressing a 69-amino-acid fragment of the *S. pneumoniae* surface protein Spr1875 as part of a chimeric hemagglutinin molecule was prepared by reverse genetics using an 8-plasmid system. The reproductive activity of the recombinant virus was studied in chicken embryos, whereas immunogenicity and protective efficiency were studied in Balb/C mice.

**RESULTS:** The recombinant influenza virus strain with hemagglutinin H1-Spr-69 demonstrated active reproduction in chicken embryos and retained the temperature-sensitive phenotypic trait of vaccine viruses. However, its growth in the respiratory tract of mice was limited compared with the original A/H1N1pdm09 vaccine virus. Intranasal administration of the recombinant H1-Spr strain to mice resulted in stimulation of virus-specific serum IgG antibody production comparable to that induced by the classic live influenza A/H1N1pdm09 vaccine. Furthermore, this strain induced an increase in IgG antibodies against the pneumococcal insertion Spr1875. Although the A/H1N1pdm09 variant was more effective than the chimeric H1-Spr virus in preventing weight loss in mice infected with mouse-adapted influenza A/California/07/09 (H1N1)pdm09 virus, the titers of the challenge virus in the lungs of mice from both vaccine groups were significantly reduced compared with unvaccinated animals.

**CONCLUSIONS:** The results demonstrate the ability of the chimeric recombinant H1-Spr strain to stimulate protective immunity against influenza virus.

**Keywords:** live influenza vaccine; recombinant influenza virus; A/H1N1pdm09 pandemic strain; *Streptococcus pneumoniae*.

## Обоснование

Инфекция *Streptococcus pneumoniae* — наиболее частая причина постгриппозных осложнений [1]. Профилактику пневмококковых инфекций с 2007 г. успешно осуществляют с помощью многокомпонентных конъюгированных полисахаридных вакцин. Тем не менее серотипы пневмококков, не контролируемые вакцинами, начинают доминировать и вызывать заболевания, что требует постоянного повышения валентности пневмококковых вакцин [2]. Помимо бактериальных полисахаридов в качестве мишеней для разработки бактериальных вакцин используют такие факторы как защитные поверхностные белки бактерий, ферменты и адгезины [3, 4].

Для профилактики инфекций дыхательных путей желательно использовать мукозальные вакцины, введение которых обеспечивает формирование системного и местного иммунитета и позволяет быстро добиться резистентности к инфекции [5, 6]. В частности, штаммы живой гриппозной вакцины (ЖГВ) могут служить перспективной системой доставки целевых антигенов в организм, поскольку такая вакцина вводится интраназально и стимулирует различные звенья иммунитета как к целевому патогену, так и к вирусу гриппа — актуальной инфекции, ежегодно наносящей существенный социально-экономический ущерб всем странам мира [7].

В целях разработки мукозальной вакцины на основе ЖГВ и поверхностных факторов патогенности *S. pneumoniae* был подготовлен рекомбинантный штамм ЖГВ подтипа А/Н1N1pdm09, экспрессирующий фрагмент белка Spr1875, присоединенный гибким линкером к поверхностному белку вируса — гемагглютинину. Поверхностный белок *S. pneumoniae* Spr1875 (также известный как содержащий домен LysM) [8] является фактором вирулентности пневмококка. Было показано, что белок Spr1875 принимает участие во взаимодействии пневмококка с клетками

микроглии, таким образом, возможно, играя определенную роль в развитии пневмококкового менингита [4]. Spr1875 проявляет иммуногенные свойства и экспрессируется на поверхности множества штаммов, принадлежащих к разным серотипам [8]. Фрагмент Spr1875 (Spr-69), соответствующий 69 аминокислотам (от 94 до 162 в исходном белке), лишен участка, расположенного в С-концевой части молекулы, содержащего предполагаемые иммунодоминантные эпитопы, которые не связаны с иммунопротекцией [8].

**Цель работы** — изучение биологических свойств рекомбинантного штамма ЖГВ подтипа А/Н1N1pdm09, экспрессирующего фрагмент поверхностного белка *S. pneumoniae*.

## Материалы и методы

**Вирусы.** Рекомбинантный штамм вируса гриппа на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с поверхностными антигенами гемагглютинин (НА) и нейраминидаза от вируса гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1)pdm09, где молекула НА была модифицирована для экспрессии антигенного участка белка Spr1875 *S. pneumoniae*, был получен методом обратной генетики с использованием 8-плазмидной системы [9]. Вакцинный штамм ЖГВ А/17/Южная Африка/2013/01(H1N1)pdm09 с идентичным составом генома, но с немодифицированным НА, был использован в качестве контроля. Композиция генома анализируемых штаммов вирусов гриппа представлена в табл. 1.

Все вирусы были получены из коллекции отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Для экспериментального заражения лабораторных животных использовали пандемический вирус гриппа А/Калифорния/09/07 (H1N1)pdm09-МА (МА — mouse-adapted, адаптированный к мышам), любезно предоставленный за-

Состав генома штаммов вирусов гриппа  
Genome composition of influenza virus strains

Обозначение штамма вируса гриппа	Состав вирусных генов		
	гемагглютинин	нейраминидаза	PB2, PB1, PA, NP, M, NS
A/H1N1	A/Южная Африка/3626/13 (H1N1)pdm09	A/Южная Африка/3626/13 (H1N1)pdm09	A/Ленинград/134/17/57 (H2N2)
H1-SpR	H1-SpR-69	A/Южная Африка/3626/13 (H1N1)pdm09	A/Ленинград/134/17/57 (H2N2)

Таблица 2 / Table 2

Праймеры, используемые в исследовании участка гена гемагглютинина, содержащего бактериальный фрагмент Spr1875  
Primers used in the study of the hemagglutinin gene region containing the bacterial fragment Spr1875

Положение на геноме и направленность	Последовательность праймеров 5' → 3'	Длина фрагмента со вставкой Spr1875, п. н.	Длина фрагмента гемагглютинина A/H1N1 без вставки, п. н.
F-18	GCAACA AAAATGAAGGCAATACTA	429	183
R-174	TAGTTTCCCGTTATGCTTGTC		

ведущей лабораторией химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смординцева» Минздрава России, канд. биол. наук А.А. Штро. Все вирусы культивировали в развивающихся куриных эмбрионах.

**Молекулярно-генетический анализ.** Секвенирование модифицированного участка HA вирусов гриппа осуществляли с использованием автоматического капиллярного секвенатора ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США) и коммерческих наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1, согласно инструкциям производителя. Выделение вирусной РНК проводили при помощи набора MagJET™ Viral DNA and RNA Purification Kit (Thermo Scientific, США). Амплификацию генов перед секвенированием осуществляли одношаговым набором для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, США) с помощью праймеров, перечисленных в табл. 2.

Выделение амплифицированных фрагментов из агарозного геля после электрофоретического разделения проводили при помощи отечественных наборов для очистки ДНК (Диаэм, Россия). Множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программного обеспечения UGENE (Unipro, Россия) [10].

**Изучение ростовых характеристик химерных вирусов при различных температурах инкубации в куриных эмбрионах.** Для определения инфекционной активности предварительно выполняли

ряд десятикратных разведений исследуемого вирусного материала, которыми заражали развивающиеся куриные эмбрионы. Эмбрионы инкубировали при оптимальной (33 °С), пониженной (до 25 °С) или повышенной (38–40 °С) температуре в течение 48 (для 33–40 °С) или 120 (для 25 °С) ч. 50 % эмбриональную инфекционную дозу (ЭИД<sub>50</sub>) рассчитывали по методу Рида и Менча [11]. Инфекционную активность выражали в lgЭИД<sub>50</sub>/мл. К температурочувствительным (имеющим *ts*-фенотип) относили вирусы, титр которых при повышенной температуре был на ≥5,0 lgЭИД<sub>50</sub> ниже, чем при оптимальной температуре. Степень холодовой адаптации вирусов определяли по разнице показателей репродукции при оптимальной (32 °С) и субоптимальной (25 °С) температуре. Если разница титров при оптимальной и пониженной до 25 °С температуре не превышала 3,0 lgЭИД<sub>50</sub>, вирусы относили к холодоадаптированной группе (*ca*-фенотип).

**Иммунизация животных.** Группы из 20 мышей линии BALB/c, самки, средняя масса которых составляла 18 г, были интраназально иммунизированы химерным штаммом H1-SpR или классическим штаммом ЖГВ A/H1N1pdm09 в дозе 100 50 % мышинных инфекционных доз, что соответствовало 6,0 lgЭИД<sub>50</sub> каждого вируса на одно животное. Контрольные мыши получали 50 мкл фосфатно-буферного раствора. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом 14 дней. Эвтаназию проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных»<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях // Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы. Санкт-Петербург, 2012. 48 с.

**Определение репродукции вирусов в органах.** Для оценки вирусной репродукции на 3-и сутки после иммунизации у пяти мышей из группы забирали легкие и носовые ходы, которые затем гомогенизировали индивидуально в 1 мл холодного фосфатно-буферного раствора с помощью гомогенизатора TissueLyser LT (QIAGEN, США). Гомогенаты центрифугировали при 10 000 об/мин для удаления твердых примесей и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Инфекционный титр вирусов в пробах определяли титрованием на 10-дневных куриных эмбрионах и выражали в  $\text{lgЭИД}_{50}/\text{мл}$ . Вычисления проводили по методу Рида и Менча [11].

**Изучение иммуногенности.** Уровни сывороточных IgG антител к вирусу гриппа определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием 96-луночных планшетов с высокой сорбцией (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), предварительно покрытых 20 агглютинирующими единицами вируса А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09. Для выявления антител к пневмококковой вставке 96-луночные планшеты сенсibilizировали рекомбинантным пептидом PSP (2 мкг/мл), содержащим пептидную последовательность Spr1875. Белок PSP был любезно предоставлен отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ». Планшеты инкубировали в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ , а затем проводили иммуноферментный анализ [12]. За титр антител принимали величину, обратную конечному разведению сыворотки, дающему оптическую плотность при длине волны 490 нм, превышающую среднюю оптическую плотность в контрольных образцах более чем на 3 стандартных отклонения.

**Экспериментальное заражение животных.** Для оценки защитного действия иммунизации рекомбинантным штаммом против гриппозной

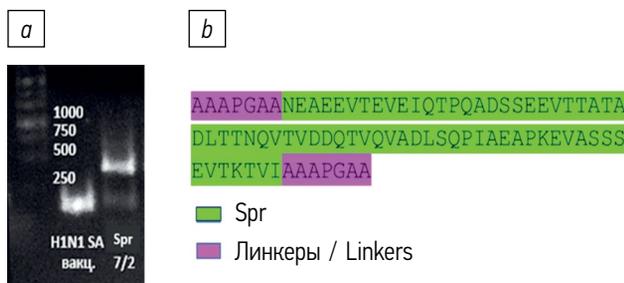
инфекции животным вводили интраназально адаптированный к мышам вирус гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09-МА в дозе  $3 \text{ lgЭИД}_{50}$  на 21-й день после повторной иммунизации. При изучении защитного действия иммунизации учитывали вес мышей на протяжении 8 дней после инфекции и определяли репродукцию инфекционного вируса в легких ( $n = 3$ ) на 3-й день после заражения по методике, описанной выше.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ GraphPad, а также программы Microsoft Excel. Для представления полученных данных использовали следующие показатели описательной статистики: среднее арифметическое  $m$ , стандартное отклонение  $\sigma$ , среднегеометрические титры. При сравнении выборок в случае невыполнения предпосылок о нормальности распределения зависимой переменной внутри каждой группы и однородности дисперсии применяли непараметрические критерии (Манна – Уитни). Проверяемые критериями нулевые гипотезы отвергали при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

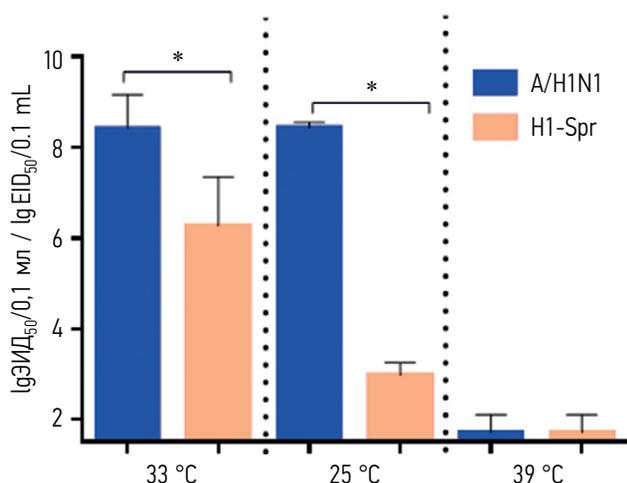
**Молекулярно-генетическая характеристика рекомбинантного штамма H1-Spr.** Рекомбинантный штамм H1-Spr, кодирующий фрагмент белка Spr1895 с N-конца молекулы гемагглютинина вируса гриппа, был получен методами обратной генетики и накоплен в развивающихся куриных эмбрионах. Для подтверждения наличия чужеродной вставки в химерном вирусе был проведен анализ с помощью полимеразной цепной реакции участка молекулы HA с последующим секвенированием амплифицированного фрагмента. На рис. 1 видно, что длина амплифицированного фрагмента штамма H1-Spr согласуется с длиной искомого фрагмента со вставкой Spr1895 (429 п. н.), при этом секвенирование подтвердило идентичность бактериальной вставки в молекуле HA.

**Инфекционная активность вирусов гриппа в развивающихся куриных эмбрионах.** В результате титрования вирусов А/H1N1 и H1-Spr на куриных эмбрионах определена ЭИД<sub>50</sub> вируса гриппа. Полученные результаты представлены на рис. 2. Рекомбинантный штамм H1-Spr характеризуется сниженной репродукцией на куриных эмбрионах ( $5,5 \text{ lgЭИД}_{50}/\text{мл}$ ) по сравнению с вакцинным штаммом А/H1N1 ( $8,4 \text{ lgЭИД}_{50}/\text{мл}$ ), что указывает на влияние встроенного фрагмента на репликативные свойства рекомбинантного вируса гриппа. При этом оба изученных вируса характеризуются температурочувствительным фенотипом, свойственным



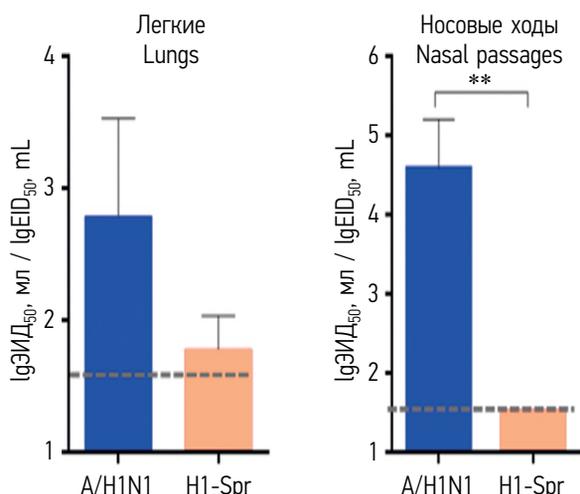
**Рис. 1.** Результаты молекулярно-генетического анализа H1-Spr: *a* — разделение амплифицированных фрагментов в агарозном геле; *b* — аминокислотная последовательность встроенного в гемагглютинин бактериального фрагмента

**Fig. 1.** Results of molecular genetic analysis of H1-Spr: *a*, separation of amplified fragments in agarose gel; *b*, amino acid sequence of the bacterial fragment integrated into hemagglutinin



**Рис. 2.** Репликативная активность штаммов вирусов гриппа в развивающихся куриных эмбрионах при различных температурах инкубации. \* $p < 0,05$

**Fig. 2.** Replication activity of influenza virus strains in developing chicken embryos at different incubation temperatures. \* $p < 0.05$



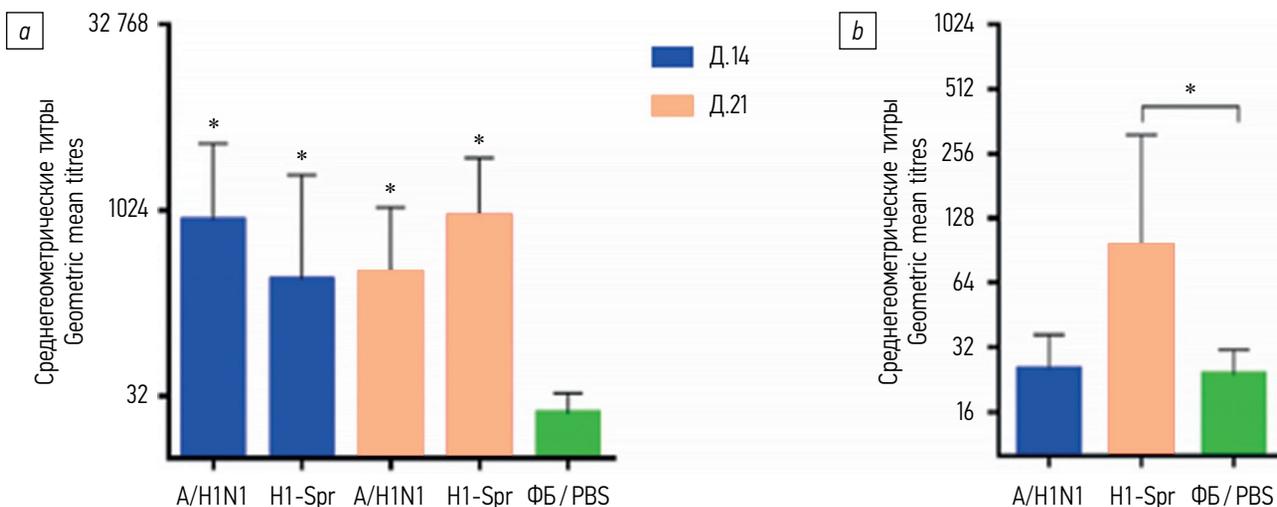
**Рис. 3.** Репродукция вакцинных вирусов гриппа в верхних и нижних дыхательных путях мышей ( $n = 5$  в группе). \*\* $p < 0,01$ . Пунктирной линией обозначен порог чувствительности метода

**Fig. 3.** Reproduction of influenza vaccine viruses in the upper and lower respiratory tract of mice ( $n = 5$  per group). \*\* $p < 0.01$ . The dotted line indicates the sensitivity threshold of the method

вакцинным штаммам ЖГВ, и холодоадаптированным фенотипом (рис. 2).

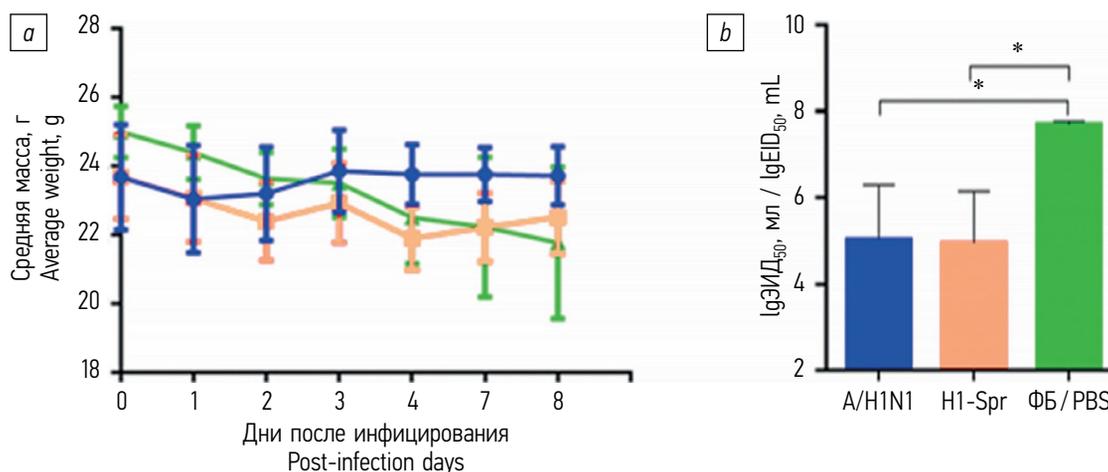
*Репродукция вакцинных штаммов на экспериментальных животных.* Результаты изучения репродуктивной активности вирусов в легких и носовых ходах мышей представлены на рис. 3. Рекомбинантный штамм H1-Spr демонстрировал сниженную репродукцию в легких и не репродуцировался в носовых ходах мышей по сравнению с классическим штаммом ЖГВ (рис. 3).

*Иммуногенность вакцинных штаммов в отношении вируса гриппа.* Несмотря на ограниченную репродукцию в дыхательных путях мышей, среднегеометрические титры сывороточных IgG к вирусу гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1) после иммунизации рекомбинантным вирусом H1-Spr и немодифицированным вакцинным штаммом статистически значимо отличались от этих показателей в контрольной группе через 14 и 28 дней после первой иммунизации (рис. 4, а).



**Рис. 4.** Результаты изучения иммуногенности: а — сывороточные IgG к целому вирусу А/Южная Африка/3626/13 (H1N1), иммуноферментный анализ ( $n = 5$  в группе) на 14 и 28-й день после первой дозы вакцины; б — сывороточные IgG к рекомбинантному белку PSP на 14-й день после первой иммунизации. \* $p < 0,05$  в сравнении с неиммунизированными животными (ФБ)

**Fig. 4.** Results of the immunogenicity study: а, serum IgG to the whole virus A/South Africa/3626/13 (H1N1), enzyme-linked immunosorbent assay ( $n = 5$  per group) on Day 14 and Day 28 after the first vaccination; б, serum IgG to the recombinant PSP protein on Day 14 after the first vaccination. \* $p < 0.05$  compared with unvaccinated animals (PBS)



**Рис. 5.** Результаты изучения защитного действия иммунизации рекомбинантным вирусом H1-Spr: *a* — динамика изменения средней массы тела мышей после экспериментального заражения ( $n = 10$ ); *b* — репродукция заражающего вируса А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09-МА в легких мышей на 3-й день после экспериментального заражения ( $n = 3$ ). ФБ — неиммунизированные животные

**Fig. 5.** Results of the study of the protective effect of immunization with the recombinant H1-Spr virus: *a*, changes in the average weight of mice after experimental infection ( $n = 10$ ); *b*, reproduction of the infecting virus A/California/07/09 (H1N1)pdm09-MA in the lungs of mice on Day 3 after experimental infection ( $n = 3$ ). PBS, unvaccinated animals

Через 14 дней после первой иммунизации в крови мышей обнаружено статистически значимое повышение IgG к рекомбинантному белку PSP (рис. 4, *b*) по сравнению с контрольной группой.

На рис. 5 представлены результаты изучения защитного действия иммунизации против заражения вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09-МА через 14 дней после повторной иммунизации. По представленным данным видно, что мыши в контрольной группе, получившие фосфатно-буферный раствор, с первого дня наблюдения демонстрировали снижение веса, который продолжали терять в конце периода наблюдения. Иммунизация вакцинным штаммом А/Н1N1 приводила к положительной динамике увеличения веса после второго дня наблюдений, выход на плато начался с 3-го дня, когда вес перестал существенно увеличиваться или уменьшаться. Для группы H1-Spr тенденция была менее четкой, зафиксировано уменьшение веса мышей со второго по четвертый день, после чего наблюдалась положительная динамика увеличения веса до конца периода наблюдения. В группе животных, получивших фосфатно-буферный раствор (ФБ), наблюдали наиболее высокую репродукцию заражающего вируса в легких — до  $10^{7.7}$  ЭИД<sub>50</sub>/мл, при этом в группах, иммунизированных вакцинным штаммом А/Н1N1 и рекомбинантным вирусом H1-Spr, показано статистически значимое снижение титров инфекционного вируса по сравнению с неиммунизированными животными до  $10^{4.9}$  и  $10^{5.0}$  ЭИД<sub>50</sub>/мл соответственно.

## Заключение

Таким образом, в настоящей работе впервые были изучены биологические свойства рекомбинантного штамма вируса гриппа на основе ЖГВ подтипа А/Н1N1pdm09, экспрессирующего фрагмент белка *S. pneumoniae* Spr1875. Рекомбинантный штамм способен к росту в развивающихся куриных эмбрионах и сохранил температурочувствительный фенотип, характерный для вакцинных вирусов. На мышях химерная вакцина с гемагглютинином H1-Spr-69 демонстрировала ограниченную репродуктивную активность по сравнению с исходным вакцинным вирусом А/Н1N1, несмотря на это рекомбинантный штамм H1-Spr стимулировал выработку вирус-специфических сывороточных IgG антител на том же уровне, что и классический штамм ЖГВ А/Н1N1pdm09, а также вызывал прирост IgG к участку вставки пневмококкового белка. Вакцинный штамм А/Н1N1 более эффективно защищал мышей от инфекции адаптированным к мышам вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 по сравнению с химерным вирусом H1-Spr. При экспериментальном инфицировании показано статистически значимое снижение титров инфекционного вируса в группах мышей, иммунизированных вакцинным штаммом А/Н1N1pdm09 и рекомбинантным вирусом H1-Spr-69, по сравнению с неиммунизированными животными. В работе отсутствуют данные о формировании подклассов антител к бактериальному антигену, что является ограничением. Однако в раннее опубликованном исследовании, посвященном защитному действию

комбинированной вирус-бактериальной вакцины на основе ЖГВ и рекомбинантных полипептидов стрептококков группы В, было показано, что интраназальное введение мышам бактериальных полипептидов вызывало преимущественно формирование IgG2a к фрагменту иммунодоминантного белка стрептококков группы В (Р6), но при введении смеси ЖГВ и бактериальных полипептидов среди антител к Р6 преобладали IgG1 [13]. При этом в группе мышей, иммунизированных комбинированной вирус-бактериальной вакциной, наблюдалась наиболее выраженная защита против постгриппозной бактериальной пневмонии по сравнению с мышами из других вакцинных групп [13]. Необходимы дальнейшие исследования для определения факторов адаптивного иммунитета, необходимых для эффективной вакцинопрофилактики постгриппозной пневмококковой пневмонии, включая подклассы антител к бактериальным антигенам в составе вирусного вектора.

Вирусы гриппа стали перспективными кандидатами для создания рекомбинантных вакцин после того, как были разработаны системы обратной генетики для сборки вирусов с минус-нитевым РНК геномом [14]. Холодоадаптированные вирусы гриппа, применяемые в качестве вакцинных штаммов для ЖГВ, — безопасные и эффективные кандидаты для создания векторных вакцин [7]. Особого внимания заслуживает то, что при использовании вирусных векторов гриппа можно индуцировать иммунитет не только против чужеродных антигенов, но и против вируса гриппа, используемого в качестве основы вакцины. Поскольку в репликации вируса гриппа нет цикла ДНК, отсутствует риск интеграции вирусных последовательностей в геном иммунизированных реципиентов. Помимо этого, высокая антигенная изменчивость вирусов гриппа, приводящая к возникновению множества антигенных вариантов, позволяет избегать влияния предсуществующего иммунитета к вирусному вектору у вакцинируемых. И наконец, химерные вирусы гриппа при интраназальном введении способны вызывать локальный иммунный ответ, который важен при инфицировании патогенами, проникающими через верхние дыхательные пути.

Одно из возможных ограничений векторов вируса гриппа — небольшая емкость генома. Возможность получения стабильных вирусов гриппа, содержащих вставки длиной более 1000 нуклеотидов, — вопрос, требующий дальнейшего исследования [15]. Вставка фрагментов чужеродных генов в сегменты генов *NA*, *NS1* или полимеразных субъединиц может приводить к снижению аттенуации/репликации [14]. В нашем случае бактериальный фрагмент был

встроен в молекулу гемагглютинина, но это также привело к снижению репродукции рекомбинантного вируса при инкубации как при оптимальной, так и при пониженной температуре. Ранее были изучены два рекомбинантных вируса (H7-ScaAB-85 и H7-ScaAB-141) на основе вакцинного штамма ЖГВ А/Ануи/1/2013 (H7N9) [9] с рекомбинантным НА, включающим фрагмент липопротеина ScaAB *Streptococcus agalactiae*. Несмотря на то что все внутренние и неструктурные белки рекомбинантных штаммов принадлежали холодоадаптированному штамму-донору А/Ленинград/134/17/57(H2N2), внедрение чужеродных бактериальных антигенов в НА вакцинного штамма 17/H7N9 независимо от размера вставки пептида приводило к потере холодоадаптированного фенотипа [9]. Известно, что за адаптацию к пониженной температуре отвечают гены полимеразного комплекса вируса гриппа [16]. Мы предположили, что выявленное в настоящей работе снижение репродуктивной активности при оптимальной и пониженной температуре может быть связано с конформационными изменениями НА, которые могут стерически препятствовать присоединению химерных вирусов к рецепторам на чувствительных клетках, тем самым уменьшая множественность инфекции. Это предположение требует проверки и проведения дальнейших исследований.

### Дополнительная информация

**Источник финансирования.** Работа выполнена за счет бюджетных средств ФГБНУ «ИЭМ» в рамках темы НИР FGWG-2022-0001.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Этический комитет.** Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ», протокол № 1/21 от 28 января 2021 г.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Наибольший вклад распределен следующим образом: *Ю.А. Дешева* — план исследования, анализ полученных данных, написание текста, внесение окончательной правки; *И.Н. Исакова-Сивак* — разработка рекомбинантных вирусов, редактирование текста; *А.Р. Рекстин*, *И.В. Майорова*, *Н.В. Копылова* — постановка экспериментов на мышах; *Д.С. Петрачкова* — сбор и обработка материалов, обзор литературы, правки; *А.С. Матушкина* — разработка рекомбинантных вирусов; *Г.Ф. Леонтьева*, *Т.А. Крамская*,

О.С. Коптева, Т.С. Котомина — молекулярно-генетический анализ; П.А. Кударь — постановка серологических тестов.

### Additional information

**Funding source.** The work was carried out at the expense of budgetary funds of the Institute of Experimental Medicine within the framework of the research topic FGWG-2022-0001.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Ethics approval.** The work was approved by the local ethics committee of the Institute of Experimental Medicine, Protocol No. 1/21 dated January 28, 2021.

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Personal contribution of each author: *Yu.A. Desheva*, designed the study, analyzed the data, wrote the manuscript, and made final corrections; *I.N. Isakova-Sivak*, developed recombinant viruses and edited the text; *A.R. Rekstin*, *I.V. Mayorova*, and *N.V. Kopylova*, performed experiments on mice; *D.S. Petrachkova*, collected and processed materials, reviewed literature, and edited the text; *A.S. Matushkina*, developed recombinant viruses; *G.F. Leontieva*, *T.A. Kramskaya*, *O.S. Kopteva*, and *T.S. Kotomina*, conducted a molecular genetic analysis; *P.A. Kudar*, performed serological tests.

### Список литературы

1. Bello S., Mincholé E., Fandos S., et al. Inflammatory response in mixed viral-bacterial community-acquired pneumonia // *BMC Pulm Med*. 2014. Vol. 14. P. 123. doi: 10.1186/1471-2466-14-123
2. Chalmers J.D., Campling J., Dicker A., et al. A systematic review of the burden of vaccine preventable pneumococcal disease in UK adults // *BMC Pulm Med*. 2016. Vol. 16, N 1. P. 77. doi: 10.1186/s12890-016-0242-0
3. Suvorov A., Dukhovlinov I., Leontieva G., et al. Chimeric protein PSPF, a potential vaccine for prevention *Streptococcus* // *Vaccines and Vaccination*. 2015. Vol. 6, N 6. P. 304. doi: 10.4172/2157-7560.1000304
4. Peppoloni S., Colombari B., Beninati C., et al. The Spr1875 protein confers resistance to the microglia-mediated killing of *Streptococcus pneumoniae* // *Microb Pathog*. 2013. Vol. 59. P. 42–47. doi: 10.1016/j.micpath.2013.04.002
5. Kramskaya T., Leontieva G., Desheva Y., et al. Combined immunization with attenuated live influenza vaccine and chimeric pneumococcal recombinant protein improves the outcome of virus-bacterial infection in mice // *Plos One*. 2019. Vol. 14, N 9. P. e0222148. doi: 10.1371/journal.pone.0222148
6. Rekstin A.R., Desheva J.A., Kiseleva I.V., Isakova-Sivak I.N. Early protection against influenza by pandemic live attenuated influ-

- enza vaccines // *Medical academic journal*. 2019. Vol. 19, N 3. P. 37–46. doi: 10.17816/MAJ19337-46
7. Isakova-Sivak I., Tretiak T., Rudenko L. Cold-adapted influenza viruses as a promising platform for viral-vector vaccines // *Expert Rev Vaccines*. 2016. Vol. 15, N 10. P. 1241–1243. doi: 10.1080/14760584.2016.1208088
8. Cardaci A., Papasergi S., Midiri A., et al. Protective activity of *Streptococcus pneumoniae* Spr1875 protein fragments identified using a phage displayed genomic library // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, N 5. P. e36588. doi: 10.1371/journal.pone.0036588
9. Smolonogina T.A., Isakova-Sivak I.N., Kotomina T.S., et al. Generation of a vaccine against group B streptococcal infection on the basis of cold-adapted influenza A virus // *Mol Genet Microbiol Virol*. 2019. Vol. 34, N 1. P. 25–34. doi: 10.3103/S0891416819010087
10. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28, N 8. P. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
11. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *Am J Epidemiol*. 1938. Vol. 27, N 3. P. 493–497. doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A118408
12. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays // *J Clin Microbiol*. 1999. Vol. 37, N 4. P. 937–943. doi: 10.1128/JCM.37.4.937-943.1999
13. Desheva Y.A., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., et al. Prevention of influenza A (H7N9) and bacterial infections in mice using intranasal immunization with live influenza vaccine and the group B streptococcus recombinant polypeptides // *Virology (Auckl)*. 2017. Vol. 8. P. 1178122X17710949. doi: 10.1177/1178122X17710949
14. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids // *Proc Natl Acad Sci*. 2000. Vol. 97, N 11. P. 6108–6113. doi: 10.1073/pnas.100133697
15. Gerlach T., Elbahesh H., Saletti G., Rimmelzwaan G.F. Recombinant influenza A viruses as vaccine vectors // *Expert Rev Vaccines*. 2019. Vol. 18, N 4. P. 379–392. doi: 10.1080/14760584.2019.1582338
16. Kiseleva I., Dubrovina I., Fedorova E., et al. Genetic stability of live attenuated vaccines against potentially pandemic influenza viruses // *Vaccine*. 2015. Vol. 33, N 49. P. 7008–7014. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.050

### References

1. Bello S, Mincholé E, Fandos S, et al. Inflammatory response in mixed viral-bacterial community-acquired pneumonia. *BMC Pulm Med*. 2014;14:123. doi: 10.1186/1471-2466-14-123
2. Chalmers JD, Campling J, Dicker A, et al. A systematic review of the burden of vaccine preventable pneumococcal disease in UK adults. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):77. doi: 10.1186/s12890-016-0242-0
3. Suvorov A, Dukhovlinov I, Leontieva G, et al. Chimeric protein PSPF, a potential vaccine for prevention *Streptococcus*. *Vaccines and Vaccination*. 2015;6(6):304. doi: 10.4172/2157-7560.1000304
4. Peppoloni S, Colombari B, Beninati C, et al. The Spr1875 protein confers resistance to the microglia-mediated killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog*. 2013;59:42–47. doi: 10.1016/j.micpath.2013.04.002

5. Kramskaya T, Leontieva G, Desheva Y, et al. Combined immunization with attenuated live influenza vaccine and chimeric pneumococcal recombinant protein improves the outcome of virus-bacterial infection in mice. *Plos One*. 2019;14(9):e0222148. doi: 10.1371/journal.pone.0222148
6. Rekstin AR, Desheva JA, Kiseleva IV, Isakova-Sivak IN. Early protection against influenza by pandemic live attenuated influenza vaccines. *Medical Academic Journal*. 2019;19(3):37–46. doi: 10.17816/MAJ19337-46
7. Isakova-Sivak I, Tretiak T, Rudenko L. Cold-adapted influenza viruses as a promising platform for viral-vector vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(10):1241–1243. doi: 10.1080/14760584.2016.1208088
8. Cardaci A, Papisergi S, Midiri A, et al. Protective activity of *Streptococcus pneumoniae* Spr1875 protein fragments identified using a phage displayed genomic library. *PLoS One*. 2012;7(5):e36588. doi: 10.1371/journal.pone.0036588
9. Smolonogina TA, Isakova-Sivak IN, Kotomina TS, et al. Generation of a vaccine against group B streptococcal infection on the basis of cold-adapted influenza A virus. *Mol Genet Microbiol Virol*. 2019;34(1):25–34. doi: 10.3103/S0891416819010087
10. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M; UGENE team. Uni-pro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
11. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol*. 1938;27(3):493–497. doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A118408
12. Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol*. 1999;37(4):937–943. doi: 10.1128/JCM.37.4.937-943.1999
13. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(11):6108–6113. doi: 10.1073/pnas.100133697
14. Desheva YA, Leontieva GF, Kramskaya TA, et al. Prevention of influenza A (H7N9) and bacterial infections in mice using intranasal immunization with live influenza vaccine and the group B streptococcus recombinant polypeptides. *Virology (Auckl)*. 2017;8:1178122X17710949. doi: 10.1177/1178122X17710949
15. Gerlach T, Elbahesh H, Saletti G, Rimmelzwaan GF. Recombinant influenza A viruses as vaccine vectors. *Expert Rev Vaccines*. 2019;18(4):379–392. doi: 10.1080/14760584.2019.1582338
16. Kiseleva I, Dubrovina I, Fedorova E, et al. Genetic stability of live attenuated vaccines against potentially pandemic influenza viruses. *Vaccine*. 2015;33(49):7008–7014. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.050

### Информация об авторах / Information about the authors

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия  
*Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia*

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия  
*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

Юлия Андреевна Дешева — д-р мед. наук, профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий; ведущий научный сотрудник отдела вирусологии. ORCID: 0000-0001-9794-3520; eLibrary SPIN: 4881-3786; e-mail: desheva@mail.ru

Yulia A. Desheva, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor of the Department of Fundamental Problems in Medicine and Medical Technologies; Leading Research Associate of the Department of Virology. ORCID: 0000-0001-9794-3520; eLibrary SPIN: 4881-3786; e-mail: desheva@mail.ru

Ольга Сергеевна Коптева — научный сотрудник научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины»; аспирант. ORCID: 0000-0002-2645-3433; eLibrary SPIN: 7630-3067; e-mail: olga.s.kopteva@yandex.ru

Olga S. Kopteva, Research Associate at the world-class scientific center “Center for Personalized Medicine”; postgraduate student. ORCID: 0000-0002-2645-3433; eLibrary SPIN: 7630-3067; e-mail: olga.s.kopteva@yandex.ru

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия  
*Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia*

Андрей Роевлович Рекстин — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии. ORCID: 0000-0003-2156-1635; eLibrary SPIN: 5359-1516; e-mail: arekstin@yandex.ru

Andrey R. Rekstin, Cand. Sci. (Biology), Leading Research Associate of the Department of Virology. ORCID: 0000-0003-2156-1635; eLibrary SPIN: 5359-1516; e-mail: arekstin@yandex.ru

Ирина Владимировна Майорова — лаборант-исследователь отдела общей вирусологии. ORCID: 0009-0009-5130-5000; e-mail: mayorovairina0248@gmail.com

Irina V. Mayorova, Research Technician of the Department of Virology. ORCID: 0009-0009-5130-5000; e-mail: mayorovairina0248@gmail.com

Нина Вадимовна Копылова — лаборант-исследователь отдела общей вирусологии. ORCID: 0009-0004-1963-0333; e-mail: KNINA5485@gmail.com

Nina V. Kopylova, Research Technician of the Department of Virology. ORCID: 0009-0004-1963-0333; e-mail: KNINA5485@gmail.com

## Информация об авторах / Information about the authors

*Дарья Сергеевна Петрачкова* — лаборант-исследователь отдела общей вирусологии.  
ORCID: 0009-0004-0045-4886;  
eLibrary SPIN: 8464-2810;  
e-mail: ya.dashook@ya.ru

*Полина Андреевна Кударь* — младший научный сотрудник научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины».  
ORCID: 0000-0002-3342-5828;  
eLibrary SPIN: 9211-0537;  
e-mail: polina6226@mail.ru

*Татьяна Сергеевна Котомина* — научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева.  
ORCID: 0000-0001-9999-089X;  
eLibrary SPIN: 7613-9715;  
e-mail: tstretiak@gmail.com

*Анастасия Сергеевна Матушкина* — научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева.  
ORCID: 0000-0002-9045-0683;  
eLibrary SPIN: 5437-8402;  
e-mail: anastasiia.evsina@gmail.com

*Галина Федоровна Леонтьева* — канд. биол. наук, старший научный сотрудник научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины», старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии.  
ORCID: 0000-0002-9876-6594;  
eLibrary SPIN: 5204-9252;  
e-mail: galeonte@yandex.ru

*Татьяна Анатольевна Крамская* — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии.  
ORCID: 0000-0002-9408-6647;  
eLibrary SPIN: 4529-3260;  
e-mail: Tatyana.kramskaya@gmail.com

*Ирина Николаевна Исакова-Сивак* — д-р биол. наук, заведующая лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева.  
ORCID: 0000-0002-2801-1508;  
eLibrary SPIN: 3469-3600;  
e-mail: isakova.sivak@iemsbp.ru

*Daria S. Petrachkova*, Research Technician of the Department of Virology.  
ORCID: 0009-0004-0045-4886;  
eLibrary SPIN: 8464-2810;  
e-mail: ya.dashook@ya.ru

*Polina A. Kudar*, Junior Research Associate at the world-class scientific center “Center for Personalized Medicine”.  
ORCID: 0000-0002-3342-5828;  
eLibrary SPIN: 9211-0537;  
e-mail: polina6226@mail.ru

*Tatyana S. Kotomina*, Research Associate at the Laboratory of Immunology and Prevention of Viral Infections of the A.A. Smorodintsev Virology Department.  
ORCID: 0000-0001-9999-089X;  
eLibrary SPIN: 7613-9715;  
e-mail: tstretiak@gmail.com

*Anastasia S. Matushkina*, Research Associate at the A.A. Smorodintsev Virology Department.  
ORCID: 0000-0002-9045-0683;  
eLibrary SPIN: 5437-8402;  
e-mail: anastasiia.evsina@gmail.com

*Galina F. Leontieva*, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Associate at the world-class scientific center “Center for Personalized Medicine”, Senior Research Associate at the Department of Molecular Microbiology.  
ORCID: 0000-0002-9876-6594;  
eLibrary SPIN: 5204-9252;  
e-mail: galeonte@yandex.ru

*Tatyana A. Kramskaya*, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Associate in the Department of Molecular Microbiology.  
ORCID: 0000-0002-9408-6647;  
eLibrary SPIN: 4529-3260;  
e-mail: Tatyana.kramskaya@gmail.com

*Irina N. Isakova-Sivak*, Dr. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Prevention of Viral Infections of the A.A. Smorodintsev Virology Department.  
ORCID: 0000-0002-2801-1508;  
eLibrary SPIN: 3469-3600;  
e-mail: isakova.sivak@iemsbp.ru

## ✉ Контактное лицо / Corresponding author

*Дарья Сергеевна Петрачкова / Daria S. Petrachkova*

Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12  
Address: 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia  
E-mail: ya.dashook@ya.ru