

Защита мышей от заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 с помощью иммунизации рекомбинантным аденовирусом, кодирующим консервативные антигены вируса гриппа A

Е. С. Седова*, Л. В. Верховская, Э. А. Артемова, Д. Н. Щербинин, А. А. Лысенко, И. А. Руднева, А. В. Ляшко, С. А. Алексеева, И. Б. Есмагамбетов, Т. А. Тимофеева, М. М. Шмаров

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

Грипп — высококонтагиозное заболевание, вызывающее ежегодные эпидемии и через неравные интервалы времени — пандемии. Источником вновь возникающих пандемических штаммов, как правило, являются птицы, а наибольшее беспокойство в настоящее время вызывают высокопатогенные вирусы гриппа птиц субтипа H7. **Цель работы:** оценить способность рекомбинантного аденовируса человека пятого серотипа, экспрессирующего гены высококонсервативных антигенов вируса гриппа A (ионного канала M2 и нуклеопротеина NP), обеспечивать защиту от заражения лабораторных мышей летальной дозой вируса гриппа птиц субтипа H7. Для достижения цели необходимо было адаптировать для размножения в легких мышей вирус гриппа A субтипа H7, охарактеризовать и с его помощью оценить защитные свойства рекомбинантного аденовируса. **Материалы и методы:** вирус гриппа птиц A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) был адаптирован для размножения в легких мышей путем многократного пассирования. Этот штамм был секвенирован и охарактеризован в реакции гемагглютинации, установлены его ЭИД₅₀ и ЛД₅₀ для лабораторных мышей. Для изучения защитных свойств рекомбинантного аденовируса мыши линии BALB/c были иммунизированы аденовирусом Ad5-tet-M2NP однократно интраназально и через 21 сутки после иммунизации заражены летальной дозой (5 ЛД₅₀) вируса гриппа птиц A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2). Уровень вирусывыделения из легких мышей был оценен на 3 и 6 сутки после заражения с помощью титрования гомогенатов легких на культуре клеток MDCK. Уровень специфических антител к вирусу гриппа птиц субтипа H7 определяли методом непрямого иммуноферментного анализа. **Результаты:** иммунизация мышей аденовирусом Ad5-tet-M2NP при наличии симптомов заболевания (снижение массы тела) обеспечила 100% выживаемость животных после заражения летальной дозой (5 ЛД₅₀) вируса гриппа птиц субтипа H7. Продемонстрирован высокий поствакцинальный уровень гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа птиц субтипа H7. Показано, что в легких мышей из группы, иммунизированной Ad5-tet-M2NP, уже к 6 суткам наблюдалось существенное снижение титра вируса гриппа птиц субтипа H7 по сравнению с контрольной группой. **Заключение:** рекомбинантный аденовирус Ad5-tet-M2NP может быть использован для создания потенциальной пандемической противогриппозной вакцины, в том числе и от вирусов гриппа птиц субтипа H7. **Ключевые слова:** вирус гриппа птиц субтипа H7; рекомбинантный аденовирус человека; противогриппозная вакцина; консервативные антигены вируса гриппа; иммунизация; выживаемость; поствакцинальный уровень гуморального иммунного ответа

Для цитирования: Седова ЕС, Верховская ЛВ, Артемова ЭА, Щербинин ДН, Лысенко АА, Руднева ИА, Ляшко АВ, Алексеева СА, Есмагамбетов ИБ, Тимофеева ТА, Шмаров ММ. Защита мышей от заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 с помощью иммунизации рекомбинантным аденовирусом, кодирующим консервативные антигены вируса гриппа A. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):60–67. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-60-67>
Контактное лицо: Седова Елена Сергеевна; sedova-es@yandex.ru

Protecting Mice from H7 Avian Influenza Virus by Immunisation with a Recombinant Adenovirus Encoding Influenza A Virus Conserved Antigens

E. S. Sedova*, L. V. Verkhovskaya, E. A. Artemova, D. N. Shcherbinin, A. A. Lysenko, I. A. Rudneva, A. V. Lyashko, S. A. Alekseeva, I. B. Esmagamбетov, T. A. Timofeeva, M. M. Shmarov

National Research Centre for Epidemiology and Microbiology
named after the honorary academician N. F. Gamaleya,
18 Gamalei St., Moscow 123098, Russian Federation

Influenza is a highly contagious disease that causes annual epidemics and occasional pandemics. Birds are believed to be the source of newly emerging pandemic strains, including highly pathogenic avian influenza viruses of the subtype H7. **The aim of the study:** to evaluate the ability of the recombinant human adenovirus, serotype 5,

which expresses genes of influenza A highly conserved antigens (ion channel M2 and nucleoprotein NP), to provide protection to laboratory mice against infection with a lethal dose of avian influenza virus, subtype H7. To achieve this goal, it was necessary to adapt influenza A virus, subtype H7 for reproduction in the lungs of mice, to characterise it, and to use it for evaluation of the protective properties of the recombinant adenovirus. **Materials and methods:** avian influenza virus A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) was adapted for reproduction in the lungs of mice by repeated passages. The adapted strain was sequenced and assessed using hemagglutination test, EID_{50} and LD_{50} for laboratory mice. BALB/c mice were immunised once with Ad5-tet-M2NP adenovirus intranasally, and 21 days after the immunisation they were infected with a lethal dose (5 LD_{50}) of influenza virus A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) in order to assess the protective properties of the recombinant adenovirus. The level of viral shedding from the lungs of the infected mice was evaluated by titration of the lung homogenates in MDCK cell culture on days 3 and 6 after infection. The level of specific antibodies to H7 avian influenza virus was determined by indirect enzyme immunoassay. **Results:** the use of Ad5-tet-M2NP adenovirus for immunisation of the mice ensured 100% survival of the animals that had disease symptoms (weight loss) after their infection with the lethal dose (5 LD_{50}) of H7 avian influenza virus. The study demonstrated a high post-vaccination level of humoral immune response to H7 avian influenza virus. The virus titer decreased significantly by day 6 in the lungs of mice that had been immunised with Ad5-tet-M2NP compared to the control group. **Conclusion:** the Ad5-tet-M2NP recombinant adenovirus can be used to create a candidate pandemic influenza vaccine that would protect against avian influenza viruses, subtype H7, in particular.

Key words: H7 influenza A virus; recombinant human adenovirus; influenza vaccine; influenza virus conserved antigens; immunisation; survival; post-vaccination level of humoral immune response

For citation: Sedova ES, Verkhovskaya LV, Artemova EA, Shcherbinin DN, Lysenko AA, Rudneva IA, Lyashko AV, Alekseeva SA, Esmagambetov IB, Timofeeva TA, Shmarov MM. Protecting mice from H7 avian influenza virus by immunisation with a recombinant adenovirus encoding influenza A virus conserved antigens. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):60–67. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-60-67>

Corresponding author: Elena S. Sedova; sedova-es@yandex.ru

Грипп — высококонтагиозное заболевание, вызывающее ежегодные эпидемии по всему миру, а через неравные интервалы времени — пандемии. Самая масштабная пандемия вируса гриппа — «испанка» 1918 г. — унесла жизни более 50 млн человек [1]. Источником вновь возникающих штаммов, вызывающих пандемии, как правило, являются птицы, а также домашние свиньи, в организме которых возможна реассортация вирусов, циркулирующих как среди людей, так и среди птиц [2]. Так, источником вируса гриппа А H1N1, вызвавшего пандемию в 2009 г., стали свиньи, а пандемичный штамм был реассортантом, содержащим гены птичьего, человеческого и свиного вирусов [3]. Также источником возможной пандемии могут стать высокопатогенные вирусы гриппа птиц, случаи заражения людей которыми фиксируются с 1997 г. Начиная с 2003 г. регулярно сообщается о случаях заражения людей высокопатогенным вирусом гриппа птиц субтипа H5N1, и к 2019 г. зафиксирован 861 случай заражения человека, из которых летальным исходом закончились 455¹. Также большое беспокойство вызывает высокопатогенный вирус гриппа птиц субтипа H7N9, случаи заражения которым наблюдаются с 2013 г. Было зафиксировано 1569 лабораторно подтвержденных случаев заражения этим вирусом², из них 615 закончились летальным исходом³. Если высокопатогенные вирусы птиц в результате мутаций или реассортации приобретут способность передаваться от человека к человеку, это может привести к началу серьезной пандемии [4]. В связи с этим актуальным является разработка противогриппозных вакцин широкого спектра действия, способных защищать в том числе от высокопатогенных вирусов гриппа птиц.

Одной из возможных стратегий, позволяющих расширить спектр действия противогриппозных вакцин, является так называемая генетическая вакцинация с помощью плазмид или вирусных векторов, то есть введение генетического материала, обеспечивающего продукцию в организме целевых антигенов

патогена [5]. Генетические вакцины обеспечивают экспрессию генов белков патогена непосредственно в клетках организма, при этом структура целевых антигенов остается максимально близкой к их нативной структуре, что позволяет достичь иммунного ответа более широкого спектра действия [6]. Одним из наиболее популярных векторов для создания генетических вакцин является рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа. Рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа обеспечивает высокий уровень экспрессии целевого транскгена в клетке-мишени и способен трансдуцировать как делящиеся, так и постмитотические клетки. Аденовирусные векторы индуцируют высокие уровни как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. При этом ДНК аденовируса остается во внехромосомной форме. Подробные данные о структуре, физико-химических и биологических свойствах аденовируса человека пятого серотипа позволяют говорить о его безопасности для создания рекомбинантных вакцин [7].

Ранее нами был разработан рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа, экспрессирующий гены высококонсервативных антигенов вируса гриппа А (ионного канала M2 и нуклеопротеина NP) [8]. Было показано, что аденовирус Ad5-tet-M2NP защищает лабораторных мышей от заражения вирусами гриппа А человека, птиц и свиней субтипов H1N1, H3N2, H2N3, H5N2 и H9N2, вызывая формирование высокого уровня как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [9]. Однако отсутствовали данные по оценке возможного защитного действия против вируса гриппа птиц субтипа H7.

Цель работы — оценить способность рекомбинантного аденовируса человека пятого серотипа, экспрессирующего гены высококонсервативных антигенов вируса гриппа А (ионного канала M2 и нуклеопротеина NP), обеспечивать защиту от заражения лабораторных мышей летальной дозой вируса гриппа птиц субтипа H7.

¹ Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2019. https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2019_06_24_tableH5N1.pdf?ua=1

² Monthly Risk Assessment Summary. https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/HAI_Risk_Assessment/en

³ Human infection with avian influenza A(H7N9) virus — China: Update. WHO; 2018. <https://www.who.int/csr/don/05-september-2018-ah7n9-china/en/>

Материалы и методы

Лабораторные животные. Для адаптации вируса гриппа к размножению в легких мышей использовали белых беспородных мышей с массой тела 10 г (Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России). Для оценки летальной дозы вируса гриппа использовали мышей линии BALB/c с массой тела 18–20 г, самки (Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России). Для проведения опытов по определению протективных и иммуногенных свойств рекомбинантного аденовируса использовали мышей линии BALB/c с массой тела 14–16 г, самки (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, Россия). Животных содержали в виварии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России в соответствии с действующими правилами⁴. Эвтаназию животных проводили в соответствии с Европейской Директивой 2010/63 с помощью углекислого газа [10].

Вирусы. Вирус гриппа птиц (вирусоносительная аллантаическая жидкость) A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) (GenBank № EU743253–EU743260) был предоставлен лабораторией молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН».

Вирус A/Chicken/NJ/294508-12/2004-CI (H7N2) был получен в результате однократного клонирования вируса A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2) в куриных эмбрионах методом предельных разведений. Для этого после заражения вирусом куриные эмбрионы инкубировали 48 ч при 37 °С, затем в течение ночи при 4 °С. Вирусоносительную аллантаическую жидкость из эмбрионов отбирали в стерильные пробирки и хранили при температуре минус 80 °С. Вирус A/Chicken/NJ/294508-12/2004-CI (H7N2) депонирован в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (подразделение Института вирусологии им. Д. И. Ивановского), под № 2889 (GenBank № MN400388–MN400395).

Адаптация вируса к размножению в легких мышей. Для получения адаптированного к репродукции вируса в легких белых беспородных мышей животных заражали интраназально вирусоносительной аллантаической жидкостью. Через 48 ч часть мышей была усыплена в атмосфере CO₂, другая часть — оставлена на выживание. Легкие усыпленных мышей гомогенизировали в 3 мл среды гидролизата лактальбумина без глутамина (ООО «Компания «ПанЭко», Россия) до образования однородной массы. Легочную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 835 г, супернатант использовали для следующего интраназального заражения мышей, а также для постановки реакции гемагглютинации с целью определения титра вируса в легких. После серии из 11 пассажей проводили клонирование вируса в куриных эмбрионах методом предельных разведений для получения однородной вирусной популяции.

Реакция гемагглютинации (РГА). Полученный вирус гриппа титровали в РГА. В лунках круглодонного планшета к серии двукратных разведений вируса гриппа в буферном растворе (0,15 М NaCl, 0,01 М Tris-HCl, pH 7,2) добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов. Смесь вируса гриппа и эритроцитов инкубировали при 4 °С в течение 20–30 мин. Титром вируса считали обратную величину последнего разведения, агглютинирующего эритроциты, и выражали его в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ) [11].

Определение 50% эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) вируса гриппа А на куриных эмбрионах. Для определения ЭИД₅₀ 10-суточные куриные эмбрионы заражали в ал-

лантаическую полость 10-кратными серийными разведениями вируса по 8 эмбрионов на разведение. После заражения вирусом куриные эмбрионы инкубировали 48 ч при 37 °С, затем в течение ночи при 4 °С. К аллантаической жидкости, собранной из каждого эмбриона, добавляли 1% суспензию куриных эритроцитов и оценивали гемагглютинацию как показатель присутствия вируса гриппа в пробе. Среднее значение ЭИД₅₀/мл вычисляли, пользуясь методом Рида и Менча [12].

Определение 50% летальной дозы (ЛД₅₀) вируса гриппа А для мышей. Для определения 50% летальной дозы (ЛД₅₀/мл) мышей линии BALB/c заражали интраназально под легким эфирным наркозом 50 мкл вируса, разведенного в 9, 27 и 81 раз (по 6 животных в каждой группе). В течение 14 сут оценивали изменение массы тела и выживаемость животных. Значение ЛД₅₀/мл вычисляли, используя метод Кербера в редакции Ашмарина [13].

Генетический анализ вирусов (полногеномное секвенирование) проводили согласно методике, описанной в [14]. Библиотека для секвенирования на платформе Illumina была приготовлена с помощью Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, США). Секвенирование было выполнено на платформе MiSeq (Illumina, США) с помощью реагента Kit v3 (600 циклов). Данные секвенирования были собраны *de novo* в программе CLC Genomics Workbench 8.5.1 s.

Получение рекомбинантного аденовируса. Рекомбинантный аденовирус Ad5-tet-M2NP, экспрессирующий гены консервативных антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина NP, был получен, как описано И. Б. Ермагамбетовым с соавт. [8]. В геном рекомбинантного аденовируса Ad5-tet-M2NP была введена генетическая конструкция, содержащая гены, кодирующие консенсусные между различными субтипам вируса гриппа А белки М2 и NP.

Иммунизация животных. Мыши были разделены на группы (по 22 особи в группе) и иммунизированы однократно интраназально Ad5-tet-M2NP в дозе 10⁸ БОЕ/мышь. Контрольной группе вводили фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,4).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Через 28 сут после иммунизации у шести мышей из каждой группы отбирали образцы крови для дальнейшего получения сыворотки и определения титра IgG к вирусу гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) методом непрямого ИФА. Сыворотки прогревали при 56 °С в течение 30 мин для инактивации белков комплемента. В качестве антигена использовали сконцентрированный в сахарозе вирус гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). Сорбционную дозу антигена определяли способом «шахматного титрования» в реакции с контрольными сыворотками [15]. В реакции использовали антивидовые антитела к мышинным IgG, конъюгированные с пероксидазой (Merck, Германия), и ТМВ-индикаторную смесь. Оптическую плотность окрашенного продукта измеряли на планшетном фотометре iEMS Rider MF (Thermo LabSystem, США) при длине волны 450 нм.

Заражение животных. Через 21 сут после иммунизации мышам под легким эфирным наркозом интраназально вводили 5 ЛД₅₀ вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) в объеме 50 мкл. Выживаемость и изменение массы тела мышей оценивали в течение 14 сут после заражения.

Определение титра вируса гриппа А в легких мышей. Через 3 и 6 сут после заражения гриппом А по три особи из каждой группы животных были усыплены в атмосфере CO₂, у них были извлечены легкие, из которых были получены гомоген-

⁴ ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание).

наты согласно протоколу Viruses Case Study для FastPrep-24™ (MP Biomedical, США). После центрифугирования гомогенатов в течение 1 мин при 10000 g полученный супернатант использовали для получения десятикратных разведений, которыми заражали клетки MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells), Коллекция клеточных культур лаборатории культур тканей (подразделение Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России). Заражение проводили в бессывороточной среде DMEM с добавлением трипсина в концентрации 1 мкг/мл. Через 2 сут отбирали клеточную среду и оценивали в ней присутствие вируса в реакции агглютинации [11]. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [12]. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную РГА, и выражали в логарифмах 50% тканевой цитопатической дозы вируса (lg ТЦД₅₀).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов ИФА проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (to-way analysis of variance, ANOVA), значений титров антител — с помощью двухстороннего *t*-критерия Стьюдента. Статистическую обработку выживаемости животных проводили с помощью критерия Гехана–Бреслоу–Вилкоксона. Расчеты были выполнены с использованием приложения GraphPad Prism 5.

Результаты и обсуждение

Получение вируса гриппа птиц субтипа H7, адаптированного для размножения в легких мышей. Для адаптации вируса гриппа птиц A/Chicken/NJ/294598-12/2004-CI (H7N2) к размножению в легочной ткани мышей было проведено его многократное пассирование в легких лабораторных мышей. После клонирования в куриных эмбрионах полученный адаптированный вариант вируса был обозначен как A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) и депонирован в Государственную коллекцию вирусов (подразделение Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России) под № 2890. Было проведено полногеномное секвенирование, и полученные сиквенсы были депонированы в GenBank под № MN400380–MN400387.

Полученный вирус гриппа птиц субтипа H7 был протитрован в РГА, гемагглютинирующий титр вируса составил 512 ГАЕ. Инфекционность вируса определяли на куриных эмбрионах, ЭИД₅₀/мл составила 5,62×10¹⁰.

Определение 50% летальной дозы для вируса гриппа птиц субтипа H7, адаптированного для размножения в легких мышей. Определение ЛД₅₀ вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) для лабораторных мышей проводили путем введения животным вируса, разведенного в 9, 27 и 81 раз. В течение 14 сут после заражения фиксировали гибель животных и изменение их средней массы тела (табл. 1).

Как видно из данных таблицы 1, адаптированный для размножения в легких мышей вирус способен вызывать заболевание и гибель животных, причем этот эффект является дозозависимым. Титр вируса гриппа ЛД₅₀/мл был рассчитан по методу Кербера в редакции Ашмарина [13] и составил 3,9×10².

Определение уровня антител к вирусу гриппа птиц субтипа H7 в сыворотках крови мышей, иммунизированных аденовирусом Ad5-tet-M2NP. Для определения уровня антител к вирусу гриппа птиц субтипа H7 мышей линии BALB/c иммунизировали аденовирусом Ad5-tet-M2NP интраназально однократно. В качестве контрольной использовалась группа мышей, которым вводили фосфатно-солевой буферный раствор. Полученные через 21 сут после иммунизации сыворотки крови анализировали на наличие специфических IgG-антител к вирусу гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) методом непрямого ИФА (рис. 1).

В сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-tet-M2NP, был определен высокий уровень IgG к вирусу гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). При этом средний геометрический титр (СГТ) в группе, иммунизированной Ad5-tet-M2NP, составил 28735 и был достоверно выше, чем в контрольной группе (СГТ < 800, *p* < 0,05). Полученные данные свидетельствуют об индукции гуморального иммунного ответа в организме животного после интраназального введения рекомбинантного аденовируса Ad5-tet-M2NP.

Защита мышей, иммунизированных Ad5-tet-M2NP, от заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7. Для изучения защитного действия аденовируса Ad5-tet-M2NP однократно

Таблица 1. Число выживших животных и их средняя масса тела при титровании вируса гриппа птиц субтипа H7
Table 1. The number of animals who survived and their average weight at the time of titration of avian influenza virus, subtype H7

Разведение, раз Dilution, times	Показатель Parameter	Оценка гибели и клинического состояния животных на ... сут Death rate and assessment of the animals' clinical condition on day...									
		0	1	2	3	6	8	9	10	13	14
9	Мыши, шт. Mice, number	6	6	6	4	0	0	0	0	0	0
	Средняя масса тела, г Average body weight, g	20,1	20,0	18,6	17,2	-	-	-	-	-	-
27	Мыши, шт. Mice, number	6	6	6	6	5	3	2	1	1	1
	Средняя масса тела, г Average body weight, g	19,5	19,9	18,2	17,6	15,2	14,8	14,8	14,8	16,4	16,9
81	Мыши, шт. Mice, number	6	6	6	6	5	5	5	5	5	5
	Средняя масса тела, г Average body weight, g	19,9	19,8	18,0	17,3	15,6	17	17,2	17,3	18,4	18,5
Контрольная группа Control group	Мыши, шт. Mice, number	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Средняя масса тела, г Average body weight, g	19,9	19,9	20,0	20,0	20,0	19,9	19,8	20,0	19,9	20,0

Примечание. «-» не применимо.
Note. - not applicable.

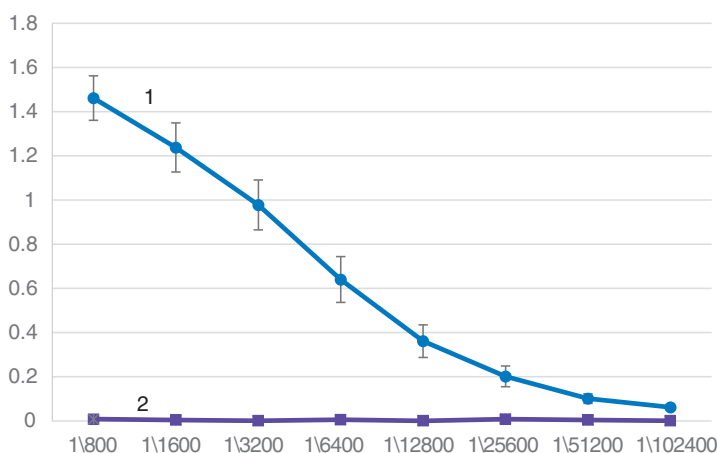


Рис. 1. Уровень антител к вирусу гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) в сыворотках крови мышей, иммунизированных аденовирусом Ad5-tet-M2NP. Ось ординат — оптическая плотность (OD); ось абсцисс — разведение сыворотки. (1) опытная группа; (2) контрольная группа. Значения OD опытной группы достоверно выше контрольной, $p < 0,001$.

Fig. 1. The level of antibodies to influenza virus A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) in the sera of mice immunised with Ad5-tet-M2NP adenovirus. Y axis—optical density (OD); X axis—serum dilution. (1) experimental group; (2) control group. The OD values of the experimental group were significantly higher than those of the control group ($p < 0.001$).

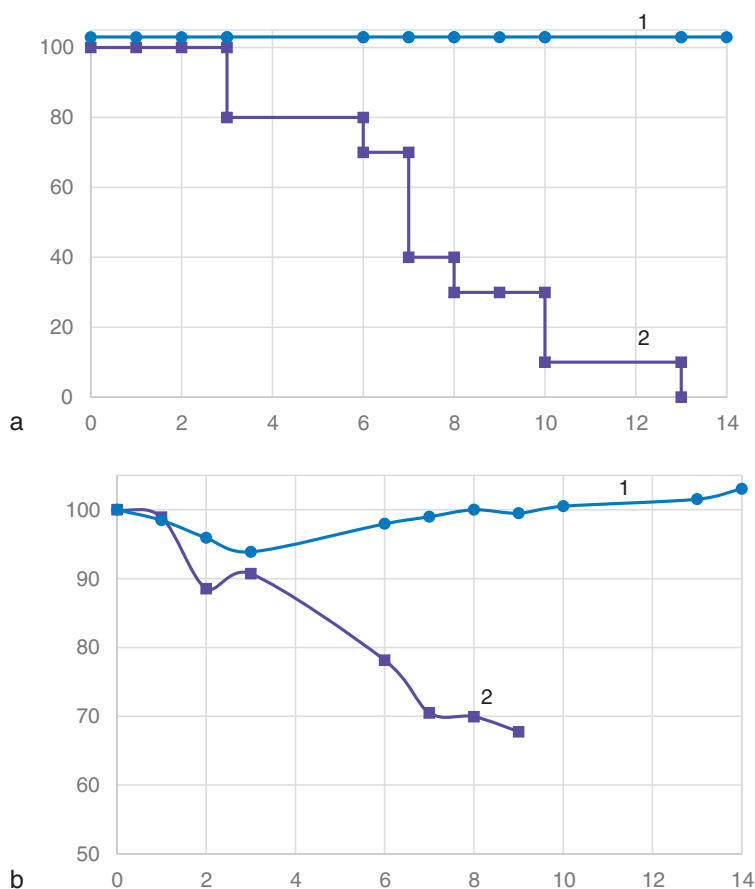


Рис. 2. Защитные свойства иммунизации мышей рекомбинантным аденовирусом Ad5-tet-M2NP от заражения 5 LD₅₀ вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). а — динамика выживаемости. Ось ординат — количество выживших животных, %; ось абсцисс — продолжительность, сут. б — динамика снижения массы тела. Ось ординат — изменение массы тела животных, % от исходной; ось абсцисс — продолжительность, сут. (1) опытная группа; (2) контрольная группа. Достоверная разница между выживаемостью в опытной и контрольной группах $p < 0,0001$, между изменением массы тела в опытной и контрольной группах $p < 0,05$.

Fig. 2. Protective effect of mice immunisation with Ad5-tet-M2NP recombinant adenovirus from infection with 5 LD₅₀ of influenza virus A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). а—survival rate. Y axis—the number of animals who survived, %; X axis—time period, days. б—weight loss. Y axis—body weight change, % of the initial weight; X axis—time period, days. (1) experimental group; (2) control group. There were statistically significant differences between the survival rates in the experimental and control groups ($p < 0.0001$) and between weight changes in the experimental and control groups ($p < 0.05$).

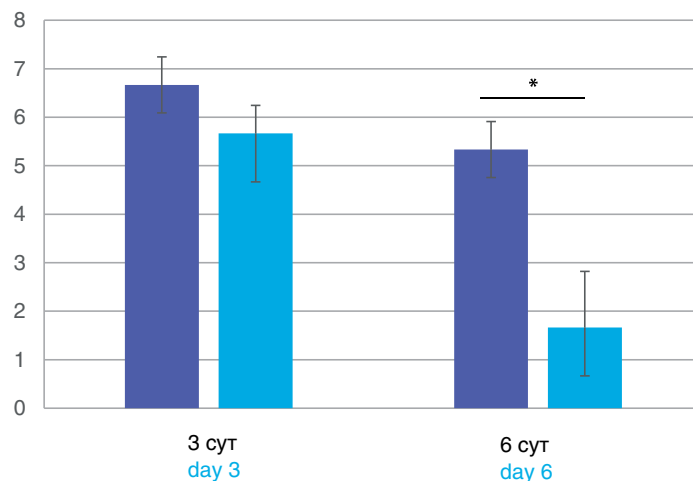


Рис. 3. Титры вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) (среднее значение Ig(TCID₅₀)) в легких мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-tet-M2NP, после заражения вирусом гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). (■) контрольная группа; (■) опытная группа. * $p < 0,05$.

Fig. 3. A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) virus titres (mean Ig(TCID₅₀)) in the lungs of mice immunised with Ad5-tet-M2NP, which were determined after infection of the animals with influenza A virus (H7N2). (■) control group; (■) experimental group. * $p < 0.05$.

интраназально иммунизированных животных заражали 5 ЛД₅₀ вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). После заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 мыши, иммунизированные Ad5-tet-M2NP, продемонстрировали 100% выживаемость, однако наблюдалось незначительное снижение массы тела (менее чем на 10%). При этом в контрольной группе наблюдалась гибель 100% мышей в течение 13 сут и снижение массы тела более чем на 30% (рис. 2).

Таким образом, иммунизация рекомбинантным аденовирусом Ad5-tet-M2NP обеспечивает защиту мышей от заражения летальной дозой вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2).

Оценка накопления вируса в легких мышей, иммунизированных Ad5-tet-M2NP, после заражения животных вирусом гриппа птиц субтипа H7. Через 28 сут после иммунизации мышей интраназально под эфирным наркозом заражали вирусами гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) в дозе 5 ЛД₅₀ на животное. Через 3 и 6 сут после заражения животных усыпляли в атмосфере CO₂ и оценивали накопление вируса гриппа в легких животных по величине титра вируса гриппа на культуре клеток MDCK (рис. 3).

Показано, что средний Ig титра вируса гриппа A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) на 3 сут после заражения в легких контрольной группы мышей составил 6,67, а на 6 сут — 5,67. При этом средний Ig титра вируса A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) в легких иммунизированных мышей составил на 3 сут 5,33, а на 6 сут — 1,66. Таким образом, на 3 сут после заражения вирусом гриппа птиц субтипа H7 уровни накопления вируса гриппа в легких иммунизированных животных опытной и контрольной групп не имели достоверных различий, тогда как на 6 сут после заражения уровень накопления вируса гриппа в легких мышей опытной группы был достоверно ниже уровня накопления вируса гриппа в легких мышей контрольной группы ($p < 0,05$).

Заключение

В результате проведенной работы был адаптирован к размножению в легких мышей вирус гриппа птиц A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2). Геном вируса был секвениро-

ван, вирус был охарактеризован. Гемагглютинирующий титр вируса A/Chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2) составил 512 ГАЕ, ЭИД₅₀/мл — $5,62 \times 10^{10}$, ЛД₅₀/мл для лабораторных мышей — $3,9 \times 10^2$. Полученный вирус был использован для оценки защитных свойств рекомбинантного аденовируса человека пятого серотипа Ad5-tet-M2NP, экспрессирующего гены антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина NP.

Показано, что рекомбинантный аденовирус Ad5-tet-M2NP при иммунизации лабораторных мышей способен вызывать формирование гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа птиц субтипа H7, а также обеспечивать защиту от гибели при заражении летальной дозой (5 ЛД₅₀) вируса гриппа птиц субтипа H7. Иммунизация не защищала животных от проявления симптомов заболевания (снижение массы тела), однако по сравнению с контрольной группой они проявлялись существенно менее выражено. Иммунизация обеспечивала 100% выживаемость животных после заражения летальной дозой (5 ЛД₅₀) вируса гриппа птиц субтипа H7. Оценка накопления вируса гриппа в легких иммунизированных и не иммунизированных животных на культуре клеток MDCK показала, что в легких мышей из группы, иммунизированной Ad5-tet-M2NP, как и в легких мышей из контрольной группы, на 3 сутки после заражения наблюдался высокий уровень накопления вируса гриппа птиц субтипа H7 (титр 6,67 Ig(TCID₅₀)) для контрольной группы и 5,33 Ig(TCID₅₀)) для опытной). Однако уже к 6 суткам произошло существенное снижение уровня вируса гриппа птиц субтипа H7 в легких иммунизированных мышей (до титра 1,66 Ig(TCID₅₀)) по сравнению с контрольной группой (титр 5,67 Ig(TCID₅₀)).

Рекомбинантный аденовирус Ad5-tet-M2NP может быть использован для создания потенциальной пандемической противогриппозной вакцины широкого спектра действия, в том числе и от вирусов гриппа птиц субтипа H7. Подобная вакцина может обеспечить протекание заболевания в легкой форме, а уменьшение вирусывыделения из легких снизит скорость распространения инфекции среди населения. Применение вакцины широкого спектра действия позволит существенно снизить уровень заболеваемости, смертности и уменьшить экономические затраты во время возможной пандемии.

Вклад авторов. **Е. С. Седова** — сбор и интерпретация результатов работы, статистическая обработка данных, написание текста; **Л. В. Верховская** — сбор и систематизация данных, оценка уровня антител в сыворотках крови мышей методом ИФА; **Э. А. Артемова** — проведение иммунизации животных, отбора образцов крови и легких; **Д. Н. Щербинин** — получение рекомбинантного аденовируса, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ; **А. А. Лысенко** — наращивание рекомбинантного аденовируса в препаративных количествах, доработка текста; **И. А. Руднева** — проведение работ, связанных с адаптацией вируса гриппа птиц к размножению в легких лабораторных мышей и получением его характеристик; **А. В. Ляшко** — проведение работ, связанных с адаптацией вируса гриппа птиц к размножению в легких лабораторных мышей и получением его характеристик; **С. А. Алексеева** — работа с культурой клеток MDCK, интерпретация результатов исследования, доработка текста; **И. Б. Есмагамбетов** — получение рекомбинантного аденовируса; **Т. А. Тимофеева** — проведение работ, связанных с адаптацией вируса гриппа птиц к размножению в легких лабораторных мышей и получением его характеристик, планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, интерпретация результатов исследования; **М. М. Шмаров** — идея, концепция и дизайн исследования, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. **Elena S. Sedova**—data collection, interpretation of research results, writing the text; **Lyudmila V. Verkhovskaya**—data collection and systematisation, determination of the antibody level in the mice blood serum by ELISA; **Elina A. Artemova**—immunisation of animals, sampling of blood and lungs; **Dmitry N. Shcherbinin**—production of the recombinant adenovirus, consultation on the implementation of individual stages of experimental work; **Andrey A. Lysenko**—propagation of the recombinant adenovirus in preparative quantities, revising the text; **Irina A. Rudneva**—adaptation of avian influenza virus for reproduction in the lungs of laboratory mice and its characterisation; **Aleksandr V. Lyashko**—adaptation of avian influenza virus for reproduction in the lungs of laboratory mice and its characterisation; **Svetlana A. Alekseeva**—work with MDCK cell culture, interpretation of research results, revising the text; **Ilias B. Esmagambetov**—production of the recombinant adenovirus; **Tatyana A. Timofeeva**—adaptation of avian influenza virus for reproduction in the lungs of laboratory mice and its characterisation, research planning, consultation on the implementation of individual stages of experimental work, interpretation of research results; **Maksim M. Shmarov**—idea, research concept and design, approval of the final version for publication.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки. Коллектив авторов выражает благодарность доктору биологических наук А. С. Гамбарян, руководителю лаборатории молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» за любезно предоставленный штамм вируса гриппа птиц A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2).

Acknowledgements. The study was performed without external funding. The authors are grateful to A. S. Gambaryan, Head of the Laboratory of Molecular Biology of Influenza Viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Products of the Russian Academy of Sciences for providing avian influenza virus A/Chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Pavia A. One hundred years after the 1918 pandemic: new concepts for preparing for influenza pandemics. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(4):365–71. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000564>
2. Monto AS, Fukuda K. Lessons from influenza pandemics of the last 100 years. *Clin Infect Dis.* 2019;pii:ciz803. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz803>
3. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Blish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 2009;325(5937):197–201. <https://doi.org/10.1126/science.1176225>
4. Sutton TC. The pandemic threat of emerging H5 and H7 avian influenza viruses. *Viruses.* 2018;10(9):pii:E461. <https://doi.org/10.3390/v10090461>
5. Ertl HC. Viral vectors as vaccine carriers. *Curr Opin Virol.* 2016;21:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.06.001>
6. Шмаров ММ, Седова ЕС, Верховская ЛВ, Руднева ИА, Богачева ЕА, Барыкова ЮА и др. Индукция протективного гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа при иммунизации рекомбинантными аденовирусными векторами, экспрессирующими гемагглютинин вируса гриппа H5. *Acta Naturae.* 2010;2(1):119–26. [Shmarov MM, Sedova ES, Verkhovskaya LV, Rudneva IA, Bogacheva EA, Barykova YuA, et al. Induction of a protective heterosubtypic immune response against the influenza virus by using recombinant adenoviral vectors expressing hemagglutinin of the influenza H5 virus. *Acta Naturae.* 2010;2(1):111–8] <https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-1-111-118>
7. Zhang C, Zhou D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(8):2064–74. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1165908>
8. Есмагамбетов ИБ, Седова ЕС, Щербинин ДН, Лысенко АА, Гарас МН, Шмаров ММ, Логунов ДЮ. Конструирование рекомбинантного аденовируса человека, экспрессирующего гены консервативных антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2014;(2):22–8. [Esmagambetov IB, Sedova ES, Shcherbinin DN, Lysenko AA, Garas MN, Shmarov MM, Logunov DY. Construction of recombinant adenoviral vector expressing genes of the conservative influenza proteins M2 and nucleoprotein. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2014;(2):22–8 (In Russ.)]
9. Tutykhina I, Esmagambetov I, Bagaev A, Pichugin A, Lysenko A, Shcherbinin D, et al. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
10. Рыбакова АВ, Макарова МН. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. *Международный вестник ветеринарии.* 2015;(2):96–107. [Rybakova AV, Makarova MN. Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European Directive 2010/63. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine.* 2015;(2):96–107 (In Russ.)]
11. Шубладзе АК, Гайдамович СЯ. *Краткий курс практической вирусологии.* 2-е изд. М.: Медгиз; 1954. [Shublazde AK, Gaydamovich SYa. *A short course of practical virology.* 2nd ed. Moscow: Medgiz; 1954 (In Russ.)]
12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology.* 1938;27(3):493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
13. Ашмарин ИП. Вычисление ЕД50 при малом числе подопытных животных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 1959;30(2):102–8. [Ashma-

- rin IP. Calculation of ED50 in a small number of experimental animals. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 1959;30(2):102–8 (In Russ.)]
14. Voronina OL, Ryzhova NN, Aksenova EI, Kunda MS, Sharapova NE, Fedyakina IT, et al. Genetic features of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8), isolated from the European part of the Russian Federation. *Infect Genet Evol*. 2018;63:144–50. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.022>
15. Crowther JR. Titration of reagents. In: Crowther JR. *The ELISA Guidebook*. Methods in Molecular Biology, vol. 149. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2001. P. 83–113. <https://doi.org/10.1385/1592590497>

Об авторах / Authors

Седова Елена Сергеевна, канд. биол. наук. *Elena S. Sedova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Верховская Людмила Викторовна, канд. биол. наук. *Lyudmila V. Verkhovskaya*, Cand. Sci. (Biol.). **SPIN-код РИНЦ:** 5529-5909, **ResearcherID:** F-8268-2014

Артемова Элина Алексеевна. *Elina A. Artemova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7081-0311>

Щербинин Дмитрий Николаевич, канд. биол. наук. *Dmitry N. Shcherbinin*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Лысенко Андрей Александрович, канд. биол. наук. *Andrey A. Lysenko*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0230-1822>

Руднева Ирина Александровна, канд. биол. наук. *Irina A. Rudneva*, Cand. Sci. (Biol.)

Ляшко Александр Викторович. *Aleksandr V. Lyaschko*

Алексеева Светлана Викторовна, канд. биол. наук. *Svetlana V. Alekseeva*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7435-2891>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, канд. биол. наук. *Ilias B. Esmagambetov*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Тимофеева Татьяна Анатольевна, канд. биол. наук. *Tatyana A. Timofeeva*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Шмаров Максим Михайлович, д-р биол. наук. *Maksim M. Shmarov*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Статья поступила 08.11.2019

После доработки 03.02.2020

Принята к печати 14.02.2020

Article was received 8 November 2019

Revised 3 February 2020

Accepted 14 February 2020