

на правах рукописи

**Волкова Наталья Вячеславовна**

**ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДНК-ВАКЦИН ПРОТИВ  
ЛИХОРАДКИ МАРБУРГ**

1.5.3 – молекулярная биология

1.5.10 – вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Кольцово – 2021

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

**Научные руководители:** Щербаков Д.Н., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Казачинская Е.И., доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

**Официальные оппоненты:** Сергеев Артемий Александрович, доктор медицинских наук, глава Представительства Компании "Авва Фармасьютикалс ЛТД

Сергеева Мария Валерьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. в на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел.: +7(383)363-47-00.

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

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Непомнящих Т.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Вирус Марбург (MARV) вызывает у людей и приматов лихорадку Марбург – заболевание, характеризующееся тяжёлым течением, а также высоким уровнем летальности до 90% (Schuh A.J. et al., 2017). MARV занесен Всемирной Организацией Здравоохранения в список патогенов, требующих разработки вакцин (Qiu X. et al., 2014).

Отсутствие профилактических вакцин и терапевтических препаратов против заболевания, вызванного MARV – основная проблема, с которой сталкиваются врачи в очагах эпидемий и ученые, участвующие в исследовании этиологического агента этой болезни в лабораториях.

Получение вакцинных препаратов против лихорадки Марбург на основе инактивированного возбудителя не увенчалось успехом (Игнатьев Г.М. и др., 1991). В настоящее время ведутся работы по получению профилактических препаратов против заболевания, вызванного MARV, на основе репликонов вируса венесуэльского энцефалита лошадей, рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, модифицированного вируса осповакцины, аденовирусных векторов, вирусоподобных частиц и ДНК-конструкций (Волкова Н.В. и др., 2018). До клинических исследований (1 и 3 фазы испытаний) дошли вакцины на основе штамма Анкара вируса осповакцины, аденовирусного вектора, рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, а также ДНК-вакцины (Suschak J. et al., 2019).

Одним из перспективных направлений являются ДНК-вакцины, так как они просты в конструировании и производстве, а также безопасны для человека. Существенным преимуществом является стабильность препаратов на основе ДНК, что может быть важным фактором в странах Африки с жарким климатом и слабым развитием инфраструктуры. Кроме того, при ДНК-иммунизации происходит формирование иммунного ответа только на целевой белок, в отличие от препаратов на основе вирусных векторов, в случае которых иммунитет направлен также на сам вирусный вектор.

**Цель исследования:** Конструирование и исследование специфической активности экспериментальных ДНК-вакцин против лихорадки Марбург, включающих гены структурных белков GP, NP и VP40.

### **Задачи исследования:**

1. Провести дизайн и конструирование ДНК-вакцинных конструкций, включающих гены, кодирующие белки вируса Марбург и подтвердить экспрессию продуктов целевых генов.

2. Исследовать способность полученных ДНК-вакцинных конструкций стимулировать MARV-специфические ответы CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов у мышей линии Balb/c.

3. Провести сравнительное исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций и определить, какая из конструкций индуцирует наиболее высокие уровни MARV-специфические ответы CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов.

4. Изучить нейтрализующую активность сывороток крови животных, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями с использованием псевдовирусов и инактивированного MARV.

5. Исследовать протективность ДНК-вакцинных конструкций с использованием лабораторных животных.

### **Научная новизна и практическая ценность работы**

1. Впервые проведен дизайн ДНК-вакцинных конструкций pVAKS-2PM и pVAKS-3PM против лихорадки Марбург, включающих одновременно два структурных белка NP и VP40 и три белка NP, VP40 и GP MARV в качестве основы профилактической ДНК-вакцины.

2. Впервые показано, что трансфекция клеток HEK293T одновременно двумя ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM, и только одной плазмидой pVAKS-3PM приводит к формированию вирусоподобных частиц морфологически и иммунохимически схожих с нативным MARV.

3. Впервые в одном эксперименте при помощи методов Elispot и ICS проверена способность ДНК-вакцинных конструкций pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM индуцировать антиген-специфический CD4+ и CD8+Т-клеточный иммунный ответ у мышей Balb/c.

4. Показано, что трехкратная иммунизация морских свинок экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM обеспечивает формирование антител, нейтрализующих псевдовирусы, содержащие поверхностный гликопротеин MARV.

5. Показано, что трехкратная иммунизация морских свинок экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM обеспечивает защиту морских свинок от летальной дозы MARV при внутримышечном введении.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Трансфекция клеток HEK293T одновременно двумя ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM, и только одной плазмидой pVAKS-3PM приводит к формированию вирусоподобных частиц морфологически и иммунохимически схожих с нативным MARV.

2. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM, содержащая ген, кодирующий поверхностный гликопротеин MARV без муциноподобного

домена, при внутримышечной иммунизации морских свинок индуцирует наработку антител, обладающих нейтрализующей активностью против MARV.

3. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM, содержащая ген, кодирующий поверхностный гликопротеин MARV без муциноподобного домена, обеспечивает защиту морских свинок от летальной инфекции, вызванной MARV.

#### **Апробация результатов**

По результатам работы опубликовано 3 статьи в журналах из списка ВАК, рекомендованных для защиты диссертации и 8 тезисов. Результаты работы представлены на российских и международных конференциях: VI Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2019 (22-25 октября 2019 г., р.п. Кольцово); VI Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (30 октября-2 ноября 2019 г. г. Сочи.); VII Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2020 (р.п. Кольцово, 22-25 октября 2020 г).

#### **Личный вклад автора**

Все основные эксперименты, включая дизайн и конструирование ДНК-вакцинных конструкций pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM их наработку для иммунизации, а также иммунизацию лабораторных животных (морских свинок и мышей линии Balb/c) и забор крови для анализа выполнены автором лично. Автором лично были проведены обработка и анализ результатов, подготовка публикаций и выступления на конференциях.

Иммунохимический анализ сывороток животных выполнен совместно с зав. сектором гибридных технологий отдела биоинженерии Казачинской Е.И. Нарботку препаративного количества рекомбинантных белков для постановки ИФА автор выполнял совместно со старшим научным сотрудником отдела Ивановой А.В. Определение нейтрализующей активности сывороток животных на псевдовирусной системе выполнен совместно со стажером-исследователем Зыбкиной А.В.

Заражение морских свинок MARV и постановка вируснейтрализации на культуре клеток Vero проводилось в лаборатории 4-го уровня биобезопасности ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора старшим научным сотрудником отдела «Коллекции микроорганизмов» Зайковской А.В. и зав. отделом «Коллекции микроорганизмов» Пьянковым О.В. Анализ образцов с помощью электронной микроскопии выполнен зав. отделом «Микроскопических исследований» Тарановым О.С. и в.н.с. Зайцевым Б. Н. Анализ Т-клеточного ответа проводили

научные сотрудники отдела биоинженерии Старостина Е.В. и Боргоякова М.Б., а также стажер-исследователь Задорожным А.М. Синтез праймеров для создания ДНК-вакцинных конструкций выполнен к.б.н., зав. лабораторией синтетической биологии ИХБФМ СО РАН Шевелевым Г.Ю. Секвенирование плазмидной ДНК выполнено сотрудником ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. к.б.н. Бондарем А.А.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 127 страницах, включает 34 рисунка, 4 таблицы. Список литературы включает 174 источника.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Дизайн и конструирование ДНК-вакцинных конструкций, содержащих структурные белки GP NP и VP40 MARV

**Выбор генных вставок и вектора доставки.** Иммуногенность генетических вакцин зависит от состава генных вставок и выбора вектора доставки. Поэтому вначале работы необходимо было выбрать вектор, в составе которого будут клонированы целевые гены. В качестве акцепторного вектора использовали плазмиду pVAKS, разработанную для презентации ДНК-иммуногенов (Волкова Н.В. и др. 2020). В составе вектора отсутствуют последовательности из генома человека, что исключает возможную интеграцию плазмидной ДНК в хромосомы клеток человека.

Следующим шагом стал выбор генов, которые будут встроены в плазмиду pVAKS. В геноме филовирюсов выявлено семь открытых рамок трансляции, однако не все белки вируса обладают иммуногенными свойствами (рисунок 1).

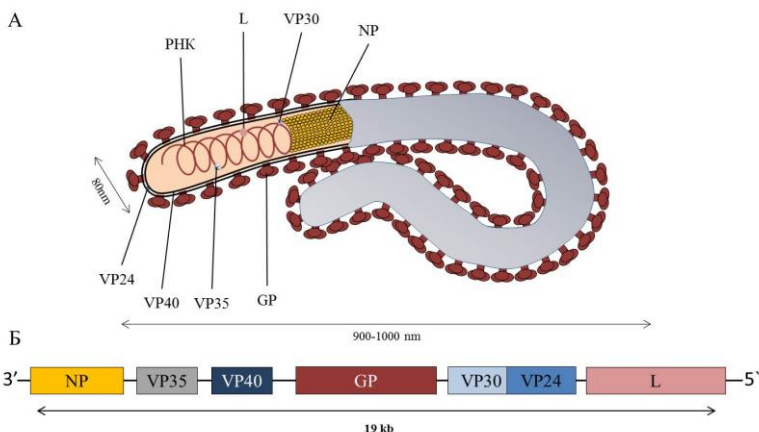


Рисунок 1. Генوم MARV.

А. Структура вируса MARV.

Б. Геном изображен в ориентации от 3' до 5'. Гены названы в честь белков, кодируемых каждым из них. В геноме MARV выявлено 7 открытых рамок трансляции: поверхностный гликопротеин GP, четыре белка нуклеокапсида – NP, VP30, VP35, РНК-зависимая РНК-полимераза L, два матричных белка VP40, VP24.

Согласно литературным данным гены, кодирующие структурные белки: поверхностный гликопротеин GP, нуклеопротеин NP и матричный белок VP40 несут основные антигенные детерминанты гуморального и клеточного иммунного ответа (Hevey M. et al, 1998; Riemenschneider J. et

al., 2003; Daddario S.M. et al., 2005; Daddario-DiCaprio K. M. et al., 2006; Geisbert T. W. et al., 2008; Swenson D.L. et al., 2008; Swenson D. L. et al., 2008; Geisbert T.W. et al., 2009; Geisbert T. W. et al., 2010; Dye J.M. et al., 2016). Именно эти гены были выбраны для создания ДНК-вакцинных конструкций.

**ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM.** В первую очередь была сконструирована ДНК-вакцинная конструкция, в составе которой содержится ген, кодирующий GP MARV. Выбор GP в качестве мишени очевиден, он является единственной мишенью защитных антител, поскольку GP является единственным вирусным белком на поверхности вириона и способствует проникновению вируса в клетки (Swenson D.L. et al., 2008; Geisbert T. W. et al., 2010; Dye J.M. et al., 2016; Milligan I.D. et al., 2016).

Картирование эпитопов GP, показало, что большое число эпитопов с которыми взаимодействуют антитела, расположены в муциноподобном домене (MLD) (Takada A. et al., 2001), но эти антитела не играют определяющую роль в защите, кроме того, показано, что антитела против MLD могут обуславливать антителзависимое усиление инфекции. Исследование специфичности репертуара антител выживших людей показало, что MLD, входящий в состав GP MARV (с 829 Glu по 1365 Pro), наименее важный регион для развития успешного гуморального иммунного ответа (Bornholdt Z.A. et al., 2016), поэтому было решено при конструировании ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-GPDM использовать последовательность GP без муциноподобного домена (GPDM) (рисунк 2).

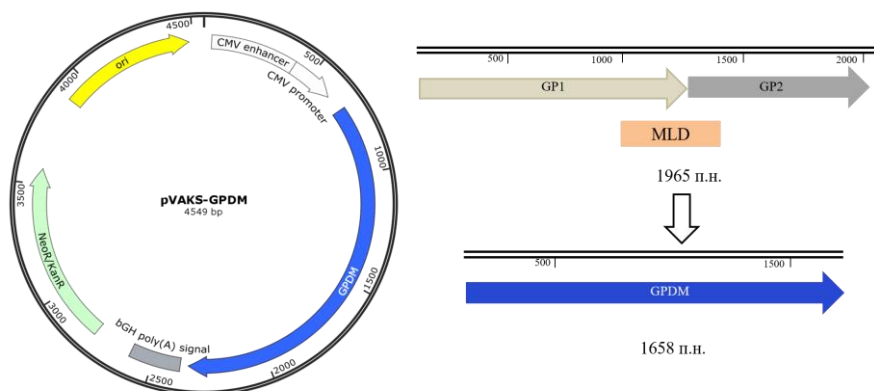


Рисунок 2. Структура ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-GPDM

**ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-2PM.** Для создания второй ДНК-вакцинной конструкции были использованы гены, кодирующие



структурные белки VP40 и NP MARV, соединенные пептидом P2A (рисунок 3). Выбор данных генов обусловлен тем, что VP40 и NP – это внутренние белки MARV, поэтому антитела к этим белкам не будут обладать вируснейтрализующей активностью, в данном случае защита обусловлена индукцией Т-клеточного иммунитета (Natesan M., 2016).

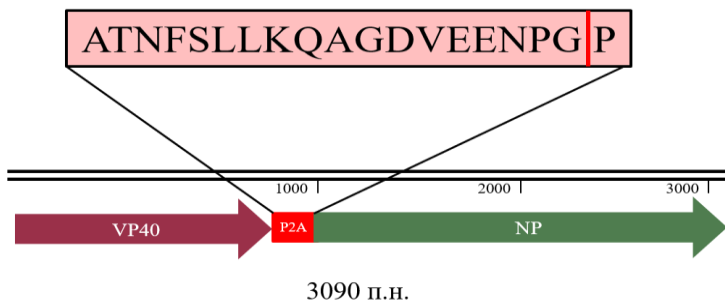


Рисунок 3. Структура ДНК-вакциной конструкции pVAKS-2PM

Использование P2A пептида обеспечивает одновременный синтез двух целевых белков в единой рамке считывания (рисунок 4).

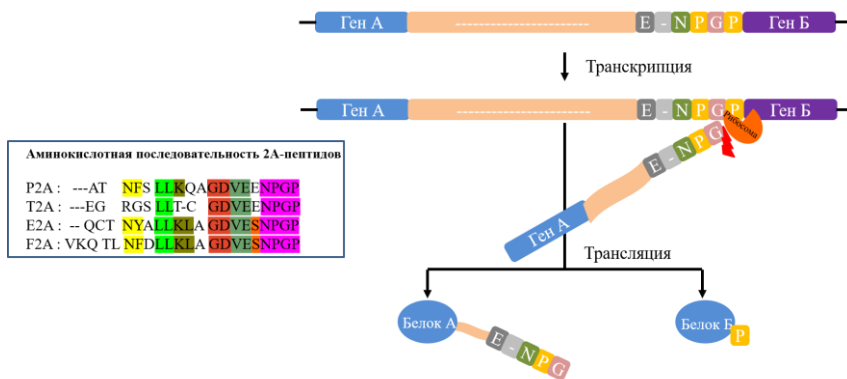


Рисунок 4. Принцип работы P2A пептида.

В целом, использование P2A-пептида приводит к относительно высоким уровням экспрессии белка по сравнению с другими стратегиями ко-экспрессии нескольких генов. Также преимуществом использования P2A-пептида является его небольшой размер, что снижает риск нарушения функции ко-экспрессируемых генов (Szymczak A. L. et al., 2004; Takahashi K. et al., 2007; Verrier J. D. et al. 2011; Geier M. et al., 2015; Wang Y. et al., 2015).

**ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-3PM.** Третья ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-3PM содержит гены, кодирующие три структурных белка MARV: VP40, NP и GPDM (рисунок 5).

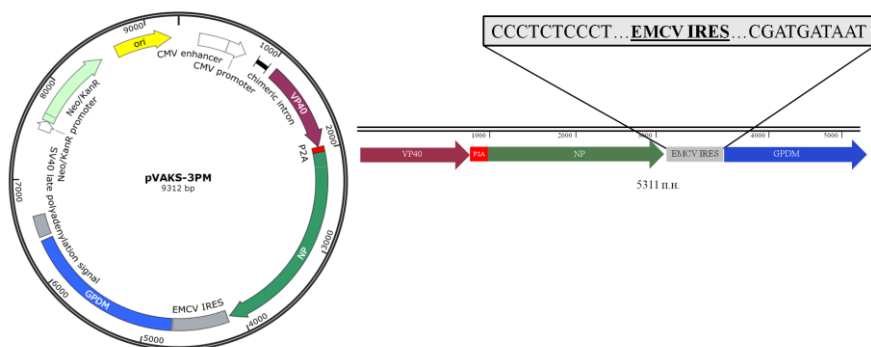


Рисунок 5. Структура ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-3PM

Информация о подобных конструкциях отсутствует в научных источниках. Существуют исследования, в которых использовали три структурных белка MARV, но они входили в состав разных плазмид. Суть данной разработки состоит в одновременном синтезе сразу трех структурных белков MARV. Расположение генов именно в такой последовательности: VP40-P2A-NP-IRES-GPDM связано с количеством данных структурных белков в нативном вирусе. Однако ген, кодирующий VP40 MARV, поместили на первое место, так как белок VP40 является основным белком ответственный за почкование вирусных частиц.

Для того чтобы обеспечить одновременный синтез трех целевых белков с единой матрицы в состав конструкции были введены следующие регуляторные элементы: последовательность пептида P2A между генами, кодирующие структурные VP40 и NP MARV и внутренний сайт посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита (IRES EMCV) между генами, кодирующие белки NP и GPDM MARV.

IRES EMCV представляет собой не кодирующий фрагмент РНК, известный своей способностью инициировать высокие уровни кэп-независимого синтеза белка в клетках млекопитающих (рисунок 6) (Barrett L.W, 2013).

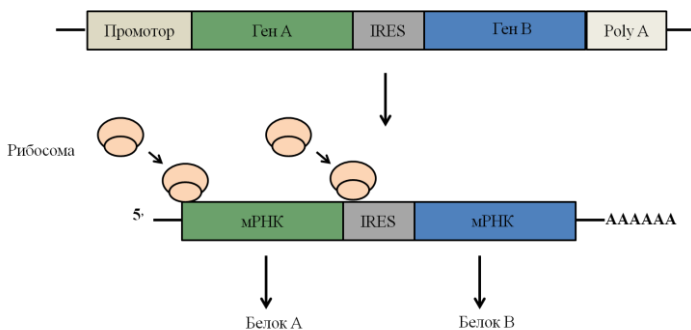


Рисунок 6. Принцип работы ECMV IRES

При таком механизме инициации рибосома связывается с мРНК непосредственно в районе IRES, которые чаще всего располагаются в 5'-НТО недалеко от сайта инициации трансляции, минуя стадии узнавания кэпа и сканирования (Barrett L.W, 2013).

### **Изучение экспрессии целевых генов в клетках НЕК293Т, трансфицированных полученными плазмидами**

Для оценки экспрессии целевых генов проводили трансфекцию клеток НЕК293Т рекомбинантными плазмидами рVAKS-GPDM и рVAKS-2PM одновременно и только плазмидой рVAKS-3PM с использованием липофектамина 3000 согласно инструкции производителя. Полученные препараты анализировали при помощи электронной микроскопии и вестерн-блота.

После ко-трансфекции плазмидами рVAKS-GPDM и рVAKS-2PM, и отдельно только плазмидой рVAKS-3PM, в клетках НЕК293Т происходит формирование VLPs. На вторые сутки после трансфекции наблюдалось округление клеток. Данный факт свидетельствует о синтезе GP MARV и его транспорте к цитоплазматической мембране. На третьи сутки наблюдалась массовая гибель клеток из-за почкования VLPs.

Микроскопические исследования показали формирование филоментоподобных структур в обоих вариантах (рисунок 7). В обоих вариантах трансфекции в плазмидах присутствует ген, кодирующий белок VP40 MARV так как он ответственный за выход вируса из клетки. VP40 необходим для стимулирования продукции VLPs из клеток-хозяев, а белки GP и NP вносят вклад в эффективное высвобождение VLPs из клетки (Timmins J. et al., 2001; Wenigenrath J. et al., 2010). Подобно EBOV, ко-экспрессия VP40 и GP MARV приводит к увеличению эффективности почкования VLPs (Swenson D.L. et al., 2004). Совместная экспрессия NP+VP40 также увеличивает эффективность почкования VLPs (Licata J.M. et al., 2004).

Необходимо отметить, что в образцах клеток, трансфицированных только плазмидой pVAKS-3PM наблюдались лишь отдельные филоментоподобные структуры, формирование VLPs происходило не так интенсивно, как в случае ко-трансфекцией плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM (рис. 7Б). Возможно, не столь интенсивное формирование VLPs связано с тем, что плазмида pVAKS-3PM больше по размеру, чем pVAKS-GPDM или pVAKS-2PM.

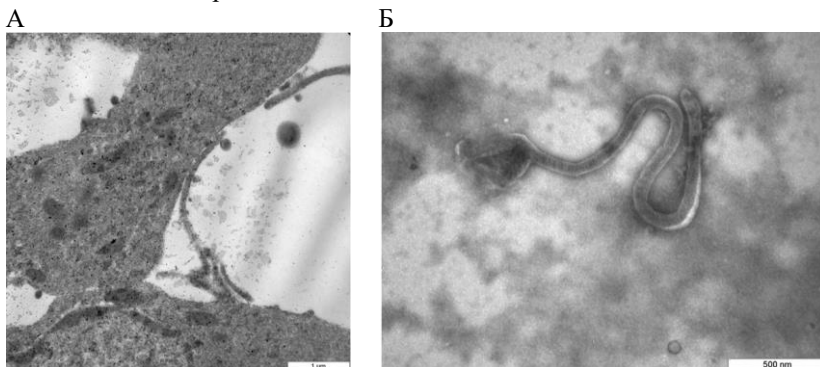


Рисунок 7. Электронная микрофотография VLPs

А. Формирование VLPs при ко-трансфекции клеток HEK293T плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM.

Б. Формирование VLPs при ко-трансфекции клеток HEK293T плазмидой pVAKS-3PM

Электронные микрофотографии выполнены Б. Н. Зайцевым и О. С. Тарановым, отдел микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Отдельно изучали культуральную среду на наличие VLPs. Размер частиц найденных в супернатанте типичен для MARV диаметром 90-100 нм и длиной до 1 микрометра (рис. 8).

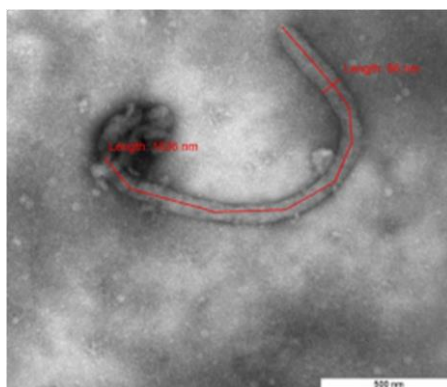


Рисунок 8. Электронная микрофотография VLPs

Характерной особенностью VLPs являлось значительное, по сравнению с типичным для нативного вируса, снижение электронной плотности внутренней части VLPs, соответствующей расположению вирусного генома. Результаты проведенного исследования показывают, что морфология вирусоподобных частиц в культуре клеток HEK293T не отличается от морфологии MARV.

Параллельно микроскопии проводился анализ лизатов трансфицированных клеток HEK293T с помощью вестерн-блота. Лизаты клеток HEK293T, ко-трансфицированных ДНК-вакцинными плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM, и отдельно плазмидой pVAKS-3PM разделяли в полиакриламидном геле с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Выявление специфических целевых белков осуществляли с использованием сыворотки человека, переболевшего MARV (Никифоров В.В., 1994) (рисунок 9).

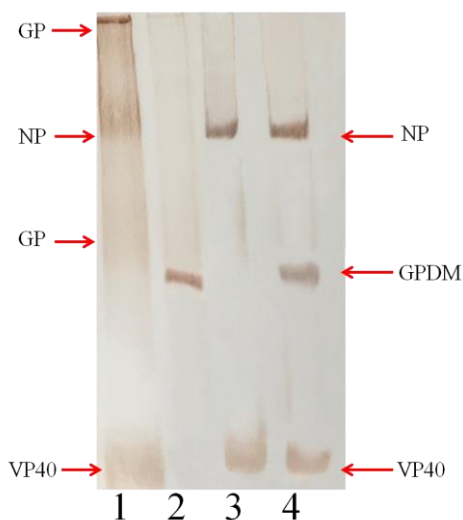


Рисунок 9. Вестерн-блот анализ продуктов экспрессии генов, кодирующих структурные белки VP40, NP и GPDM MARV

- 1-инактивированный препарат MARV;
- 2-лизат клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-GPDM;
- 3-лизат клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-2PM;
- 4-лизат клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-3PM.

Было показано, что на дорожках, соответствующих трансфицированным плазмидами клеткам, детектируются специфические фрагменты белков, что подтверждает их синтез в клетке, направляемый целевыми ДНК-вакцинными конструкциями.

Так в лизате клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-GPDM (дорожка 2) был выявлен продукт с подвижностью, соответствующей расчетной для GPDM. В отличие от нативного поверхностного гликопротеина GPDM не разделяется на две субъединицы, так как сайты протеолиза и гликозилирования были сконцентрированы в удаленном MLD. В лизате клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-2PM (дорожка 3) было выявлено два продукта совпадающих по подвижности с белками VP40 и NP. В лизате клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-3PM (дорожка 4) было выявлено все три структурных белка MARV. В качестве контроля использовали инактивированный MARV (дорожка 1).

### Исследование способности полученных ДНК-вакцинных конструкций стимулировать гуморальный и Т-клеточный иммунные ответы у мышей линии Balb/c

**Иммунизация мышей линии Balb/c ДНК-вакцинными конструкциями.** В качестве животных для исследования гуморального и Т-клеточного иммунных ответов в работе использовали мышей линии Balb/c. Общая схема иммунизации животных представлена на рисунке 10.

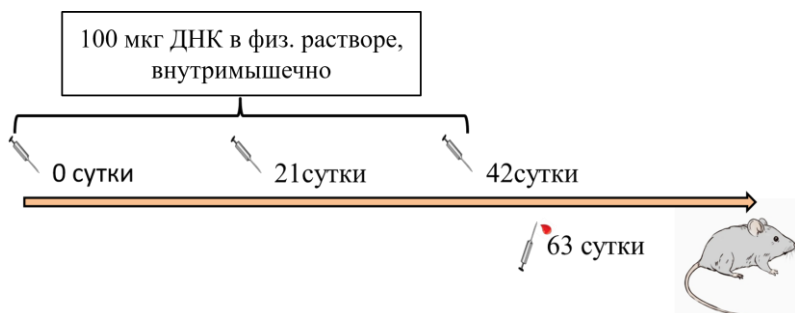


Рисунок 10. Схема иммунизации мышей линии Balb/c полученными ДНК-вакцинными конструкциями. Иммунизацию проводили трехкратно с интервалом в 3 недели. Доза на 1 животное составила по 100 мкг. Забор крови и селезенки проводили на 63 сутки.

В эксперименте было сформировано четыре группы животных: 1. Иммунизированные ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-GPDM (N=10); 2. Иммунизированные ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-2PM (N=10); 3. Иммунизированные ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-3PM (N=10). В качестве отрицательного контроля для иммунизации мышей (N=6) использовали физиологический раствор.

**Анализ титров специфических антител сывороток крови мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями.** Одним из важных этапов в создании вакцины является проверка наличия специфических антител иммунизированных животных. Для исследования специфической активности антител, синтезируемых в ответ на иммунизацию ДНК-вакцинными конструкциями, через 63 сутки после третьей иммунизации у мышей была отобрана кровь из ретроорбитального синуса (рисунок 10). В качестве антигенов для анализа титров специфических антител мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM в ИФА использовали: 1. Инактивированный препарат MARV и EBOV; 2. Рекомбинантные белки: GP MARV и EBOV, NP MARV и VP40 MARV полученные в прокариотической системе экспрессии *E. coli* (препараты получены совместно с к.б.н. Ивановой А.В.); 3. VLPs MARV и EBOV на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита в эукариотической системе на культуре клеток HEK293T (препарат предоставлен стажером-исследователем отдела биоинженерии Зыбкиной А.В.). Результаты ИФА представлены в таблице 1.

---

Таблица 1. Результаты исследования гуморального иммунного ответа мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями

№ п/п	ДНК-вакцинная конструкция	Обратные титры антител						
		Инакт. MARV	Рек. GPDM	Рек. NP	Рек. VP40	VLPs (полнораз. GP- MARV)	VLPs (GP DM MARV)	Контроль антиген (-)
1	pVAKS- GPDM	463±97,12	519±80,88	89±3,81	89±3,81	426±91,65	463±78,10	60±4,37
2	pVAKS– 2PM	599±94,28	86±4,08	319±26,66	626±61,09	87±4,16	62±6,71	60±3,81
3	pVAKS– 3PM	486±53,79	486±42,54	279±16,33	499±33,33	506±32,66	466±42,16	60±3,81
4	pVAKS	61±3,84	61±4,08	60±3,81	60±4,37	63±4,08	56±6,23	60±3,81

Примечания: **инакт. MARV** - сконцентрированный и очищенный из суспензии инфицированной культуры клеток *Vero* инактивированный препарат, **рек.** – рекомбинантный белок; **VLPs** – вирусоподобные частицы на основе вируса везикулярного стоматита, экспонирующие белок GP MARV; **GP MD MARV** - белок GP без муциноподобного домена. **Контроль антиген (-)** – вирусоподобные частицы на основе вируса везикулярного стоматита, экспонирующие белок GP EBOV, рекомбинантные белки GP, NP и VP40 EBOV. Антигены (инакт. MARV и рек. белки) использованы в концентрации 1мкг/мл (100 нг/лунка). VLPs (в разведении 1/100 из очищенного препарата с физическим титром 10<sup>6</sup>). Для подавления неспецифического сигнала связывания антител с рекомбинантными белками, сыворотки крови иммунизированных животных истощали лизатом *E.coli*. Титр антител определяли при средней арифметической значения ОП (при трехкратном повторе титрования) с учетом фона системы значение ОП = 0,15; положительным считали значение ОП в два раза и более выше ОП фона системы.



Показано, что сыворотки крови мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакциной конструкции pVAKS-GPDM, содержат антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV, очищенного рекомбинантного белка GPDM MARV, а также VLPs MARV в титре 1/400. Сыворотки животных из этой группы взаимодействовали с очищенными рекомбинантными белками VP40 и NP MARV на уровне фонового значения в титре от 1/100.

Сыворотки крови мышей, иммунизированных ДНК-вакциной конструкцией pVAKS-2PM, содержат антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV, очищенных рекомбинантных белков VP40 и NP MARV в титрах 1/200. Сыворотки животных из этой группы взаимодействовали с очищенным рекомбинантным белком GPDM и VLPs MARV на уровне фонового значения в титре от 1/100.

В то же время у группы мышей после иммунизации ДНК-вакциной конструкцией pVAKS-3PM, были найдены антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV, очищенных рекомбинантных белков GPDM, VP40 и NP MARV, а также VLPs MARV в титрах от 1/200 до 1/400.

Порядок титров антител сопоставим с опубликованными ранее данными (Grant-Klein R.J. et al., 2012). Наибольшие титры специфических антител вырабатывается у мышей линии Balb/c иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM. Поэтому для исследования Т-клеточного иммунного ответа использовали ДНК-вакцинные конструкции pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM.

### **Сравнительное исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций и выбор иммуногена, который индуцирует наиболее высокие уровни MARV-специфических ответов CD4+ и CD8+**

IFN $\gamma$  является одним из параметров для создания успешной вакцины против заболеваний, вызываемыми филовирусами, поэтому в нашем исследовании интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN $\gamma$ . Определение количества CD4+ и CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN $\gamma$ , была изучена с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов после *in vitro* стимуляции спленоцитов, выделенных у иммунизированных животных, смесью синтетических пептидов, соответствующих эпитопам MARV. Последовательности пептидов являются точными копиями последовательностей эпитопов, входящих в состав целевых иммуногенов.

Результаты исследования Т-клеточного ответа у мышей линии Balb/c, иммунизированных конструкциями, представлены на рисунке 11.

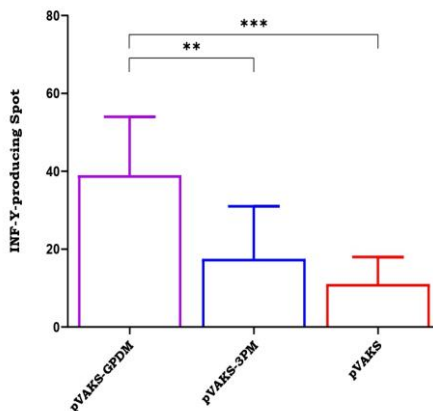


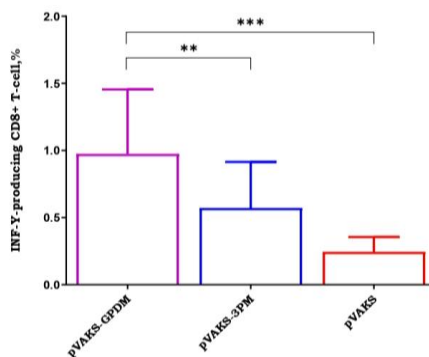
Рисунок 11. Результаты исследования количества  $\text{INF-}\gamma$  продуцирующих клеток в реакции  $\text{INF-}\gamma$ -ELISpot у мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями

Иммунизация животных ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-GPDM индуцировала наиболее высокий специфический Т-клеточный ответ, по сравнению с другими конструкциями и группой мышей, иммунизированных физиологическим раствором. В группах мышей иммунизированных pVAKS-2PM и pVAKS-3PM конструкциями уровень Т-клеточного иммунного ответа был ниже. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью не параметрического теста Mann Whitney. Статистически значимые различия ( $p < 0.01$ ) найдены при сравнении групп «pVAKS-GPDM» и «Контроль», «pVAKS-GPDM» и «pVAKS-3PM».

Иммунизация животных ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-GPDM индуцировала наиболее высокий специфический Т-клеточный ответ, по сравнению с группой мышей, иммунизированных исходным вектором pVAKS и pVAKS-3PM.

Способность  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-клеток экспрессировать  $\text{INF-}\gamma$  была также протестирована с помощью ICS после стимуляции спленоцитов *in vitro*, собранных у иммунизированных мышей. Мы наблюдали, что все группы мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, развивали MARV-специфические  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-клеточные ответы. В группе мышей, иммунизированных рекомбинантной плазмидой pVAKS-GPDM уровни Т-лимфоцитов, продуцирующих  $\text{INF-}\gamma$ , были значительно выше, чем в контрольной группе, которым вводили pVAKS и pVAKS-3PM (рисунок 12А и Б).

А



Б

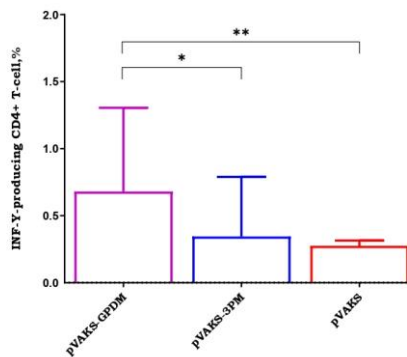


Рисунок 12. Продукция  $\text{INF}\gamma$

А.  $\text{CD4}^+$  Т-лимфоцитами. %  $\text{INF}\gamma$ - продуцирующих  $\text{CD4}^+$  Т-лимфоцитов (от общего числа  $\text{CD4}^+$  Т-клеток) показан на оси Y. Название групп иммунизированных животных отображены на оси X.

Б.  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитами. %  $\text{INF}\gamma$ - продуцирующих  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитов (от общего числа  $\text{CD8}^+$  Т-клеток) показан на оси Y. Название групп иммунизированных животных отображены на оси X.

Таким образом, показано, что конструкции ДНК-вакцинные конструкции, содержащие в своем составе структурные белки MARV, индуцировали  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-клеточные ответы после иммунизации мышей Balb/c. Также полученные данные позволяют говорить о том, что экспрессируемые в составе ДНК-вакцинных конструкций иммуногены проходят правильный процессинг в АПК и обеспечивают презентацию освободившихся в результате процессинга эпитопов Т-лимфоцитам.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1. Данные обработаны статистически и представлены как медиана с диапазоном вариации. Достоверность рассчитывалась с использованием непараметрического критерия сравнения выборок U-критерия Манна-Уитни. Для подтверждения различия провели односторонний дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса.

Статистически значимые различия ( $p < 0.01$ ) найдены при сравнении групп «pVAKS-GPDM» и «Контроль», «pVAKS-GPDM» и «pVAKS-3PM».

В рамках работы проведено сравнительное исследование иммуногенности сконструированных ДНК-вакцинных конструкций и показано, что наиболее высокие титры вирус-специфических антител и

ответы  $IFN\gamma$ -продуцирующих  $CD4+$  и  $CD8+$  Т-лимфоцитов наблюдаются в группе животных, иммунизированных ДНК-вакциной конструкцией pVAKS-GPDM. Поэтому исследование протективных свойств вакцины проводилось с использованием плазмиды pVAKS-GPDM.

### **Иммунизация лабораторных животных (морских свинок) ДНК-вакциной pVAKS-GPDM и сбор образцов**

*Иммунизация морских свинок ДНК-вакциной pVAKS-GPDM.* В качестве животных для исследования протективности и иммуногенности pVAKS-GPDM использовали морских свинок породы Агути.

В эксперименте по оценке эффективности ДНК-вакцины pVAKS-GPDM были иммунизированы 30 морских свинок: экспериментальная группа, иммунизированная ДНК-вакциной pVAKS-GPDM (N=15) и контрольная группа, иммунизированная вектором pVAKS (N=15). Морские свинки были иммунизированы трехкратно с интервалом в 3 недели, дозой 600 мкг на 1 животное, внутримышечно (рисунок 13).

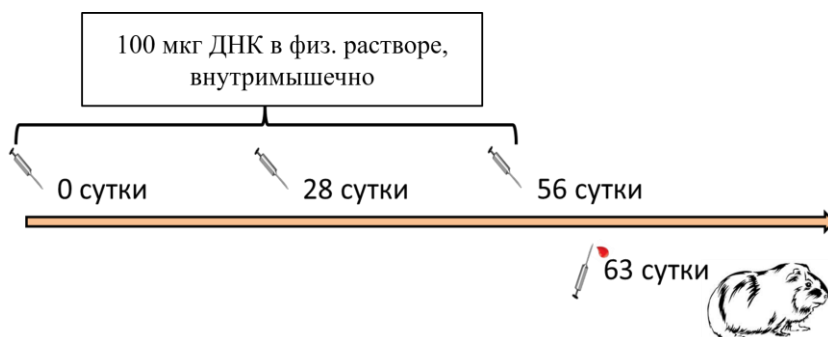


Рисунок 13. Схема иммунизации морских свинок ДНК-вакциной pVAKS-GPDM. Иммунизацию проводили 3-х кратно с интервалом в 3 недели. Доза на 1 животное для экспериментальной (pVAKS-GPVM) и контрольной групп (pVAKS) составила по 600 мкг. Забор крови проводили пункцией из сердца на 63 сутки

*Анализ титров специфических антител сывороток крови морских свинок, иммунизированных ДНК-вакциной pVAKS-GPDM.* В качестве антигенов для анализа титров специфических антител морских свинок, иммунизированных ДНК-вакциной pVAKS-GPDM для проведения ИФА использовали антигены, использованные для анализа специфических антител у иммунизированных мышей.

Для исследования специфической активности антител, синтезируемых в ответ на иммунизацию экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM, через 63 сутки после третьей иммунизации у 8 из 15 морских свинок был отобран образец крови пункцией сердца.

Показано, что сыворотки крови морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной, содержат антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV (в титрах от 1/200 до 1600), очищенного рекомбинантного белка GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/6400), VLPs MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200) и VLPs GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200) (рисунок 14). В качестве отрицательного контроля были использованы нативный инактивированный EBOV, рекомбинантный аналог GP EBOV, а также VLPs EBOV. Сыворотки крови морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной, взаимодействовали с отрицательным контролем на уровне титра 1/100.

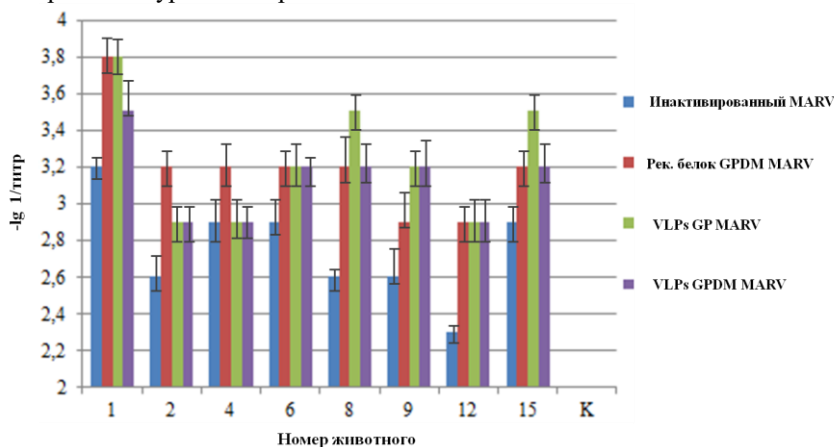


Рисунок 14. Результаты исследования наличия специфических антител сывороток крови морских свинок, иммунизированных ДНК-вакциной pVAKS-GPVM с помощью ИФА. Обозначения: К-контроль: инактивированный EBOV, рекомбинантный аналог GP EBOV, а также VLPs EBOV.

Несмотря на разницу в уровне взаимодействия антител сывороток крови иммунизированных животных с антигенами, полученные значения лежат в одном диапазоне. Наиболее высокий уровень антител был выявлен у животного №1 1/6400 при использовании в качестве антигена рекомбинантного белок GPDM и VLPs GP MARV. Наиболее низкий уровень антител был выявлен у животного №12 1/800 при взаимодействии с антигенами: рекомбинантный белок GP, VLPs GPDM и GP MARV.

**Определение нейтрализующей активности антител сывороток крови морских свинок, иммунизированных ДНК-вакциной pVAKS-GPDM.** В настоящее время общепринятым считается, что успешная вакцина должна вызывать наработку нейтрализующих антител NAb. Они

являются маркерами иммунитета против повторного заражения после того, как острая инфекция была устранена. NAbs играют важную роль в элиминации вируса, они являются ключевым иммунным фактором для защиты от вирусных заболеваний. Вирус-специфические NAbs, которые появляются либо в результате естественной инфекции, либо вакцинации, обладают способностью блокировать вирусную инфекцию. Для людей, у которых в ходе перенесенной болезни выработались вируснейтрализующие антитела, наблюдается защита в случае повторного контакта с вирусом.

Полученные после иммунизации ДНК-вакциной pVAKS-GPDM сыворотки морских свинок были проверены на способность нейтрализовать псевдовirusы rVSVΔG-GPM. Титры NAbs (IC50), выявленные при помощи псевдовиральной системы, находились в пределах от 1/32 до 1/256 (рисунок 15).

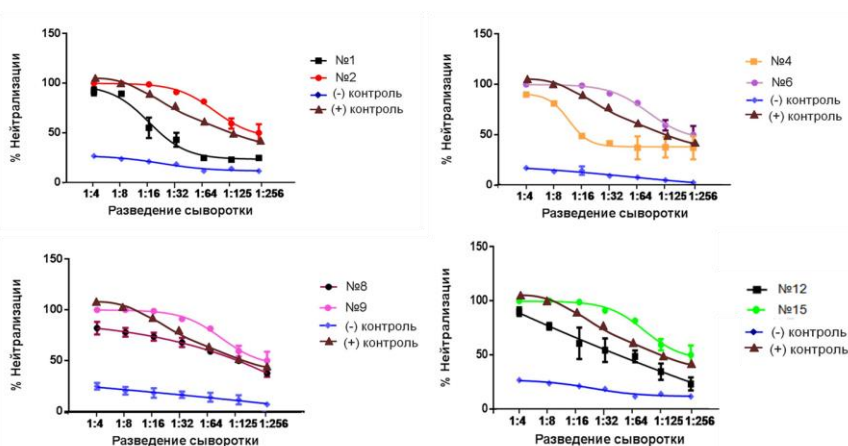


Рисунок 15. Титры нейтрализующих антител (IC50) выявленные при помощи псевдовиральной системы. Кровь для анализа была взята у 8 из 15 животных. В качестве отрицательного контроля была взята сыворотка крови неиммунизированной морской свинки. В качестве положительного контроля была использована сыворотка крови гипериммунной морской свинки.

Наиболее высокий титр NAbs (IC50) выявлен у животных №8 и №9 в разведении 1:256, а наиболее низкий титр NAbs (IC50) выявлен у животных №1, 4 в разведении 1:16 (рисунок 15).

Анализируя данные по наличию специфических антител сывороток морских свинок, иммунизированных ДНК-вакциной pVAKS-GPDM и их нейтрализующей активности на псевдовиральной системе можно отметить, что наличие специфических антител не всегда говорит о том, что данные

антитела являются нейтрализующими. Так, например сыворотка животного №1 показала достаточно высокий уровень специфических антител к различным антигенам (рисунок 14), однако в реакции нейтрализации данная сыворотка показала наименьший титр NAbs.

**Оценка протективной активности экспериментальной ДНК-вакцины pVAKS-GPDM.** Финальным этапом работы стало исследование протективной эффективности ДНК-вакцины pVAKS-GPDM. На 28-е сутки от третьей иммунизации морские свинки подвергались внутрибрюшинному заражению с предварительно определенной летальной дозой MARV для морских свинок. На 8-9 сутки животные из контрольной группы погибли. Животные из экспериментальной группы, иммунизированные ДНК-вакциной выжили, при внутрибрюшинном инфицировании летальной дозой вируса (рисунок 16).

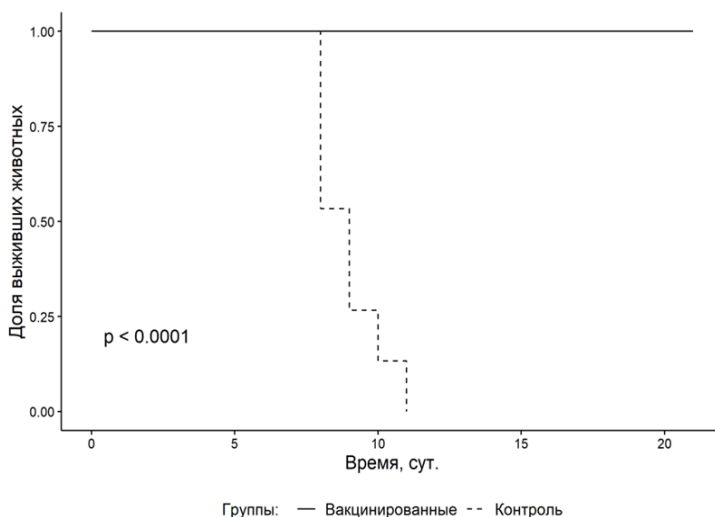


Рисунок 16. Выживаемость морских свинок, трехкратно иммунизированных внутримышечно экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM против заболевания, вызываемого MARV. В качестве контрольных животных были использованы морские свинки, трехкратно иммунизированные вектором pVAKS внутримышечно.

По окончании эксперимента, на 21 сутки, был проведен забор крови пункцией из сердца у выживших животных для анализа нейтрализующей активности с использованием натурального MARV (таблица 2).

Таблица 2 Результаты анализа нейтрализующей активности сывороток иммунизированных животных

<b>№ животного</b>	<b>Титры антител (антиген инактивированный MARV)</b>	<b>Титры антител (антиген рекомбинантный аналог GP MARV)</b>	<b>Результаты нейтрализации MARV на культуре клеток (разведение сыворотки) *</b>
1	1:1600	1:6400	1/40
2	1:400	1:1600	1/40
4	1:800	1:1600	1/40
6	1:800	1:1600	1/40
8	1:400	1:1600	1/20
9	1:400	1:800	1/40
12	1:200	1:800	1/20
15	1:800	1:1600	1/20
Контроль	<100	<100	0

\* разведение сыворотки, при котором количество БОЕ не менее чем в два раза меньше, чем в контроле.

Таким образом, на основе полученных данных можно сделать вывод, экспериментальная ДНК-вакцина pVAKS-GPDM, при внутримышечной иммунизации способна индуцировать наработку антител специфичных в отношении GP MARV, обладающих нейтрализующей активностью в отношении к нативному MARV.



## ВЫВОДЫ

1. Получены ДНК-вакцинные конструкции pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM, кодирующие структурные белки GPDM, VP40 и NP MARV. Показано, что трансфекция клеток плазмидой pVAKS-2PM за счет использования P2A-пептида обеспечивает синтез двух белков VP40 и NP, а плазмидой pVAKS-3PM за счет использования P2A-пептида и EMCV IRES обеспечивает синтез трех белков VP40, NP и GPDM.
2. Исследование иммуногенности полученных ДНК-вакцинных конструкций на мышах Balb/c показало, что все ДНК-конструкции индуцируют вирус-специфические ответы как антител, так и Т-лимфоцитов. Наиболее высокие уровни MARV-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов индуцирует ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM.
3. Показано, что сыворотки крови морских свинок, иммунизированных ДНК-вакциной pVAKS-GPDM, содержат антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV (в титрах от 1/200 до 1/1600) и очищенного рекомбинантного белка GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/6400), VLPs GP MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200) и VLPs GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200).
4. Показано, что ДНК-вакцина pVAKS-GPDM при внутримышечной иммунизации морских свинок способна индуцировать выработку антител, обладающих вируснейтрализующей активностью. Титры нейтрализующих вирус антител, выявленные при помощи псевдовиральной системы, содержащей GP MARV, находились в пределах от 1/32 до 1/256, а при использовании нативного MARV вирус нейтрализующая активность находится в пределах от 1/20 до 1/40.
5. Показано, что ДНК-вакцина pVAKS-GPDM, содержащая ген, кодирующий GPDM MARV, обеспечивает защиту морских свинок от летальной инфекции, вызванной MARV.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Волкова Н.В.**, Казачинская Е.И., Щербаков Д.Н. Экспериментальные вакцины для профилактики геморрагической лихорадки Марбург и биомодели для изучения ее патогенеза Проблемы особо опасных инфекций. Вып. 3. 2018. С. 8-15.
2. **Volkova N.V.**, Ryankov O. V., Ivanova A. V., Isaeva A. A., Zybkina A. V., Kazachinskaya E. I., Shcherbakov D.N. Prototype of a DNA Vaccine against Marburg Virus. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. Vol. 10. 2020. P. 487-491.
3. **Волкова Н.В.**, Иванова А.В., Исаева А.А., Полежаева О.А., Зайковская А.В., Щербаков Д.Н., Казачинская Е.И. Получение рекомбинантных антигенов для проведения серологической диагностики лихорадки Марбург. Проблемы особо опасных инфекций. Вып. 4. 2020. С. 47-52.

### Тезисы на всероссийских и международных конференциях

1. **Волкова Н.В.** Получение панели рекомбинантных антигенов - компонентов для разработки серологической диагностики лихорадки Марбург. VI Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2019 (р.п. Кольцово, 22-25 октября 2019 г.). С. 456-459.
2. **Волкова Н.В.**, Исаева А.А., Пьянков О.В., Чепурнов А.А., Казачинской Е.И., Щербаков Д.Н. Получение ДНК-иммуногена, обеспечивающего защиту морских свинок от летальной дозы вируса Марбург VI Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (г. Сочи, 30 октября-2 ноября 2019 г.). С. 53-54.
3. **Волкова Н.В.**, Иванова А.В., Чепурнов А.А., Казачинская Е.И. Получение и характеристика некоторых рекомбинантных белков вируса Марбург VI Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (г. Сочи, 30 октября-2 ноября 2019 г.). С. 52-53.
4. Чепурнов А.А. **Волкова Н.В.** Иванова А.В. Казачинская Е.И. Зайковская А.В. Щербаков Д.Н. Кононова Ю.В. Шестопалов А.М. Разработка набора реагентов для иммуноферментного тестирования сывороток крови свиней на антитела, специфичные к Эболавирусу Заир и Марбургвирусу. VI Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием

- «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (г. Сочи, 30 октября-2 ноября 2019 г.). С. 243-244.
5. Щербаков Д.Н., Исаева А.А., Зыбкина А.В., **Волкова Н.В.**, Иванова А.В., Казачинская Е.И., Пьянков О.В., Зайковская А.В., Таранов О.С., Щербакова Н.С. Рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие сборку филовирусных вирусоподобных частиц. VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (OpenBio-2019) / АНО "Инновационный центр Кольцово". Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2019. С. 411-414.
  6. **Волкова Н.В.**, Исаева А.А., Таранов О.С., Щербаков Д.Н. Рекомбинантная плазида, обеспечивающая сборку вирусоподобных частиц вируса Марбург. VII Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2020 (р.п. Кольцово, 22-25 октября 2020 г).
  7. **Волкова Н.В.**, Исаева А.А., Таранов О.С., Щербаков Д.Н. ДНК-вакцина против вируса Марбург, содержащая основные антигены патогена. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасности - 2020» (г. Москва, 6-8 октября 2020). С. 202.
  8. **Волкова Н.В.**, Исаева А.А., Старостина Е.В., Задорожный А.М., Беленькая С.В., Антонец Д.В., Кочнева Г.В., Карпенко Л.И., Арипов В.С., Казачинская Е.И., Щербаков Д.Н. Разработка ДНК-вакцины, индуцирующей CD4+ и CD8+ клеточный ответ специфический в отношении вируса Марбург. XIII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (г. Москва, 24–26 мая 2021 г). С. 39-40.