

УДК 578.832.1: 57.085.23: 615.371: 616.993

Original Article

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А/Н5N1 ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АНТИГЕНЫ BRUCELLA SPP. (L7/L12, OMP16, OMP19, CU-ZN-SOD)***Есимбекова Н.Б.¹, Дуйсенбаев Б.Д.¹, Кераматдинова А.М.¹, Картбай Г.К.¹, Ершебулов З.Д.¹, Рыскельдинова Ш.Ж.², Абсатова Ж.С.²**¹ТОО «OtarBioPharm», Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, *nazym.esimbekova@mail.ru²ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский**АБСТРАКТ**

В работе представлены результаты оптимизации условий культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А/Н5N1 (NS1-транкированные), экспрессирующие антигены Brucella spp. (L7/L12, OMP16, OMP19, CU-ZN-SOD). В исследованиях использовали клеточные линии MDCK и Vero. Определено влияние инфицирующей дозы, температура инкубирования, продолжительность культивирования, а также влияние протеазы на уровень репродукции вируса. Установлено, что оптимальными условиями культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующие бруцеллезные антигены являются использование культуры клеток MDCK, инфицирующая доза 0,01 ТЦД₅₀/кл, температура инкубирования 34,0±0,5 °С, продолжительность культивирования 48 ч и добавление Trypsin-TPCK в концентрации 1,5 мкг/мл. При данных параметрах инфекционная активность вирусов достигала ≥7,83 lg ТЦД₅₀/мл, гемагглютинирующий титр – 1:128. Генетическая стабильность вирусных конструкций сохранялась на протяжении не менее 4 последовательных пассажей. Полученные результаты могут быть использованы при разработке и масштабировании технологии получения гриппозных векторных вакцин.

Ключевые слова: вирус гриппа А/Н5N1, рекомбинантные штаммы, культура клеток, оптимизация культивирования, инфекционная активность, гемагглютинирующая активность

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез относится к числу социально значимых зоонозных инфекций, сохраняющих эпидемиологическую актуальность во многих регионах мира [1,2]. Возбудители заболевания принадлежат к роду Brucella и характеризуются способностью к внутриклеточной персистенции в клетках мононуклеарно-фагоцитарной системы, что осложняет формирование стерильного иммунитета [3]. Наибольшее значение в патологии человека имеют Brucella melitensis, Brucella abortus и Brucella suis [4].

Несмотря на широкое применение живых аттенуированных вакцин в ветеринарной практике, лицензированная вакцина для профилактики бруцеллеза у человека до настоящего времени отсутствует [5]. Учитывая внутриклеточную природу инфекции, перспективными считаются вакцинные платформы, способные индуцировать выраженный Т-клеточный иммунный ответ [6].

В качестве векторной системы активно исследуются рекомбинантные штаммы вируса гриппа с модифицированным NS1-геном [7,8]. Транкированный NS1 снижает антагонизм вируса к интерфероновому ответу клетки-хозяина, обеспечивая аттенуацию при сохранении репликативной активности in vitro [9]. Это делает гриппозные векторы перспективной платформой для экспрессии протективных антигенов Brucella spp., включая белки L7/L12, Omp16, Omp19 и Cu-Zn-SOD.

Создание векторных вакцин на основе рекомбинантных вирусов гриппа требует разработки воспроизводимой технологии получения вирусных штаммов с прогнозируемыми показателями инфекционной активности, стабильной экспрессией целевого антигена и сохранением генетической конструкции при серийном пассировании. Уровень

репродукции вируса определяется совокупностью факторов культивирования, включая тип клеточной системы, величину инфицирующей дозы, температурный режим, продолжительность инкубирования и условия протеолитической активации гемагглютинина [10-12].

Оптимизация данных параметров является важным этапом разработки технологии получения рекомбинантных гриппозных векторов, предназначенных для создания вакцинных препаратов.

Цель настоящего исследования заключалась в оптимизации условий культивирования рекомбинантных NS1-транкированных штаммов вируса гриппа А/Н5N1, экспрессирующих антигены Brucella spp., для дальнейшего использования при разработке противобруцеллезной вакцины.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали рекомбинантные штаммы вируса гриппа, сконструированные на основе NS1-транкированного вектора: Flu-NS1-80-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-80-Omp16-H5N1, Flu-NS1-80-Omp19-H5N1 и Flu-NS1-80-Cu-Zn-SOD-H5N1.

Культивирование вирусов осуществляли на перевиваемых клеточных линиях MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) и Vero (African green monkey kidney). Клеточные культуры выращивали в бессывороточной среде OptiPro при температуре 34±0,5 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, до формирования монослоя с конfluence 80-90 %.

Инфицирование клеток проводили при дозах вируса от 0,1 до 0,00001 ТЦД₅₀ на клетку. После заражения культуры инкубировали до развития цитопатического эффекта

на уровне 80-85 %. Для высвобождения вирусных частиц культуральные флаконы подвергали однократному циклу замораживания при -40°C в течение 12 часов с последующим оттаиванием. Полученные супернатанты собирали и анализировали на стерильность, инфекционную и гемагглютинирующую активность.

Инфекционную активность вирусов определяли методом расчёта 50 % тканевой цитопатической дозы (ТЦД₅₀) по методу Рида-Менча с выражением результатов в lg ТЦД₅₀/мл. Гемагглютинирующую активность оценивали в реакции гемагглютинации с использованием 1 % суспензии эритроцитов. Титр определяли по максимальному разведению вирусосодержащего материала, вызывающему полную агглютинацию эритроцитов.

Для оценки влияния протеолитической активации в поддерживающую среду добавляли трипсин поджелудочной железы крупного рогатого скота в концентрации 0,5-2,0 мкг/мл, 0,25 % раствор Trypsin-EDTA, а также ТРСК-обработанный трипсин в концентрации 1,0-1,5 мкг/мл.

Влияние температурного режима и продолжительности культивирования исследовали при инкубировании инфицированных культур при температурах 30, 32, 34 и 36 $^{\circ}\text{C}$ в течение 24-96 часов.

Биологическую стабильность штаммов оценивали при четырёх последовательных пассажах на клетках MDCK с определением инфекционных титров на каждом пассаже. Генетическую стабильность анализировали методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с амплификацией фрагмента NS-гена. Полученные ампликоны визуализировали методом

электрофореза в агарозном геле.

Все эксперименты выполняли не менее чем в трёх независимых повторностях ($n \geq 3$). Результаты представляли в виде среднего значения (X) \pm стандартная ошибка среднего (m). Статистическую обработку данных проводили методами вариационной статистики; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор оптимальной клеточной линии для культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа

Для оценки эффективности репродукции рекомбинантных штаммов вирусов гриппа использовали перевиваемые клеточные линии Vero и MDCK. В качестве модельного штамма применяли рекомбинантный вирус Flu-NS1-80-L7/L12-H5N1. Культивирование проводили в бессывороточной среде OptiPro при температуре $34 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 до поражения монослоя на уровне 80-85 %.

После завершения инкубирования культуральные флаконы подвергали циклу замораживания при -40°C в течение 12 ч с последующим оттаиванием, после чего собирали вирусосодержащий материал для определения стерильности, инфекционной и гемагглютинирующей активности. Результаты сравнительной оценки представлены в таблице 1.

Полученные данные показали, что в клетках MDCK инфекционная активность вируса достигала $7,20 \pm 0,14$ lg ТЦД₅₀/мл, тогда как в культуре Vero она составляла $4,95 \pm 0,14$ lg ТЦД₅₀/мл. Кроме того, в клетках MDCK наблюда-

Таблица 1 – Репродукция рекомбинантного штамма Flu-NS1-80-L7/L12-H5N1 вируса гриппа в различных культурах клеток

Культура клеток	Длительность инкубирования, ч	Стерильность	Титр в РГА	Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /мл
Vero	72	Стерильна	1:4	$4,95 \pm 0,14$
MDCK	48	Стерильна	1:16	$7,20 \pm 0,14$

Таблица 2 – Влияние протеаз на репродукцию рекомбинантного штамма FLU-NS1-80-L7/L12-H5N1 вируса гриппа в культуре клеток MDCK

Наименование штамма	Протеаза	Концентрация фермента, мкг/мл	Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ , ($X \pm m$)	Титр в РГА
FLU-NS1-80-L7/L12-H5N1	Trypsin from bovine pancreas	2	$1,75 \pm 0,08$	1:2
		1,5	$1,75 \pm 0,14$	1:2
		1	$1,50 \pm 0,14$	1:0
		0,5	$1,25 \pm 0,14$	1:0
	0,25% Trypsin-EDTA	2	$2,75 \pm 0,16$	1:8
		1,5	$2,00 \pm 0,12$	1:4
		1	$2,25 \pm 0,14$	1:0
		0,5	$2,75 \pm 0,17$	1:0
	Trypsin-TPCK	1,5	$7,75 \pm 0,00$	1:64
		1	$5,25 \pm 0,16$	1:32

лось более быстрое развитие цитопатического эффекта и сокращение времени культивирования до 48 часов.

Таким образом, для дальнейших исследований в качестве оптимальной системы культивирования была выбрана культура клеток MDCK.

Влияние протеаз на репродукцию рекомбинантных штаммов вируса гриппа

Известно, что эффективная репликация вируса гриппа в клеточных культурах требует протеолитической активации гемагглютинина. Поэтому на следующем этапе было изучено влияние различных протеаз на уровень репродукции рекомбинантного вируса.

В экспериментах использовали Trypsin from bovine pancreas, 0,25 % Trypsin-EDTA и ТРСК-обработанный трипсин. Полученные результаты представлены в таблице 3 – Репродукция рекомбинантных штаммов

вируса гриппа с различными протеазами в культуре клеток MDCK.

таблице 2.

Анализ полученных данных показал, что применение ТРСК-трипсина обеспечивало наибольший уровень накопления вируса. При концентрации 1,5 мкг/мл инфекционная активность достигала 7,75 lg ТЦД₅₀/мл, а гемагглютинирующий титр составлял 1:64, что значительно превышало показатели при использовании других протеаз.

Для подтверждения полученных результатов аналогичный эксперимент был проведён с другими рекомбинантными штаммами вируса гриппа (таблица 3).

Полученные результаты показали, что использование ТРСК-трипсина в концентрации 1,5 мкг/мл обеспечивало более высокий уровень репродукции всех исследуемых вирусных конструкций по сравнению с Trypsin-EDTA.

Наименование штамма	Протеаза	Концентрация фермента, мкг/мл	Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ , (X±m)	Титр в РГА
FLU-NS1-80-OMP16-H5N1	0,25% Trypsin-EDTA	2	3,11 ± 0,25	1:4
	Trypsin-TPCK	1,5	6,28 ± 0,25	1:32
FLU-NS1-80-OMP19-H5N1	0,25% Trypsin-EDTA	2	3,2 ± 0,17	1:4
	Trypsin-TPCK	1,5	6,58 ± 0,14	1:32
FLU-NS1-80-Cu-Zn-Sod-H5N1	0,25% Trypsin-EDTA	2	2,87 ± 0,25	1:2
	Trypsin-TPCK	1,5	6,70 ± 0,17	1:64

Таблица 4 – Определение инфицирующей дозы рекомбинантных штаммов вируса гриппа

Наименование образца	Доза заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m)	Титр в РГА
FLU-NS1-80-L7/L12-H5N1	0,00001	2,12 ± 0,08	1:0
	0,0001	2,62 ± 0,17	1:2
	0,001	5,87 ± 0,17	1:16
	0,01	7,83 ± 0,08	1:128
	0,1	3,95 ± 0,25	1:8
FLU-NS1-80-OMP16-H5N1	0,00001	2,45 ± 0,17	1:0
	0,0001	3,03 ± 0,08	1:2
	0,001	4,28 ± 0,25	1:16
	0,01	6,58 ± 0,14	1:32
	0,1	3,70 ± 0,17	1:2
FLU-NS1-80-OMP19-H5N1	0,00001	1,70 ± 0,17	1:0
	0,0001	2,37 ± 0,08	1:2
	0,001	4,37 ± 0,17	1:32
	0,01	6,42 ± 0,08	1:32
	0,1	3,37 ± 0,25	1:4
FLU-NS1-80-Cu-Zn-Sod-H5N1	0,00001	1,45 ± 0,17	1:0
	0,0001	2,12 ± 0,17	1:2
	0,001	4,28 ± 0,08	1:32
	0,01	7,17 ± 0,08	1:64
	0,1	3,12 ± 0,08	1:4

Таким образом, добавление ТРСК-трипсина в поддерживающую среду является оптимальным условием для культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа в клетках MDCK.

Влияние инфицирующей дозы на репродукцию рекомбинантных штаммов вируса гриппа

Следующим этапом было исследование влияния инфицирующей дозы на накопление вируса в клеточной культуре. Инфицирование проводили в диапазоне доз от 0,1 до 0,00001 ТЦД₅₀/клетку. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

Анализ данных показал, что максимальное накопление вируса наблюдалось при инфицирующих дозах 0,01-0,001 ТЦД₅₀/клетку, при которых инфекционная активность достигала 6,42-7,83 lg ТЦД₅₀/мл, а гемагглютинирующий титр составлял 1:-1:128.

При более высоких дозах инфицирования (0,1 ТЦД₅₀/клетку) наблюдалось снижение уровня накопления ви-

руса, что может быть связано с быстрым разрушением клеточного монослоя.

Развитие цитопатического эффекта носило типичный для вируса гриппа характер и сопровождалось округлением клеток, вакуолизацией цитоплазмы, пикнозом ядер и последующей деструкцией клеточного пласта.

Влияние температуры инкубирования

В следующей серии экспериментов была исследована зависимость репродукции рекомбинантных вирусов от температуры культивирования. Инфицированные культуры клеток MDCK инкубировали при температурах 32, 34 и 36 °С. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Максимальные показатели инфекционной активности (6,42-7,83 lg ТЦД₅₀/мл) и гемагглютинирующего титра (1:32-1:128) были зарегистрированы при температуре 34 ± 0,5 °С. При отклонении температуры в сторону повышения или понижения наблюдалось снижение уровня накопления вируса.

Таким образом, температура 34 °С является оптимальной для культивирования исследуемых рекомбинантных вирусов гриппа в клетках MDCK.

Определение оптимальной продолжительности культивирования

Для определения оптимального срока культивирования инфицированные клетки инкубировали в течение 24, 48, 72 и 96 часов. Результаты представлены на рисунке 2.

Наибольшая инфекционная активность вируса наблюдалась через 48 часов инкубирования, после чего происходило постепенное снижение титра вируса. Аналогичная динамика отмечалась и для гемагглютинирующей активности.

Полученные данные свидетельствуют о том, что 48-часовое культивирование является оптимальным для получения максимального выхода вируса.

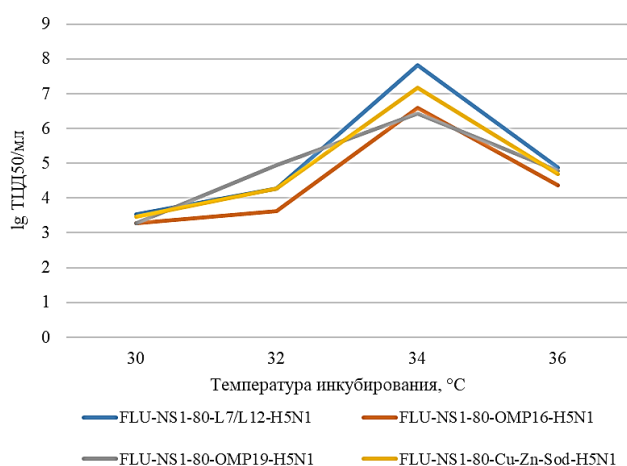


Рисунок 1 – Влияние температуры на репродукцию рекомбинантных штаммов вируса гриппа в MDCK

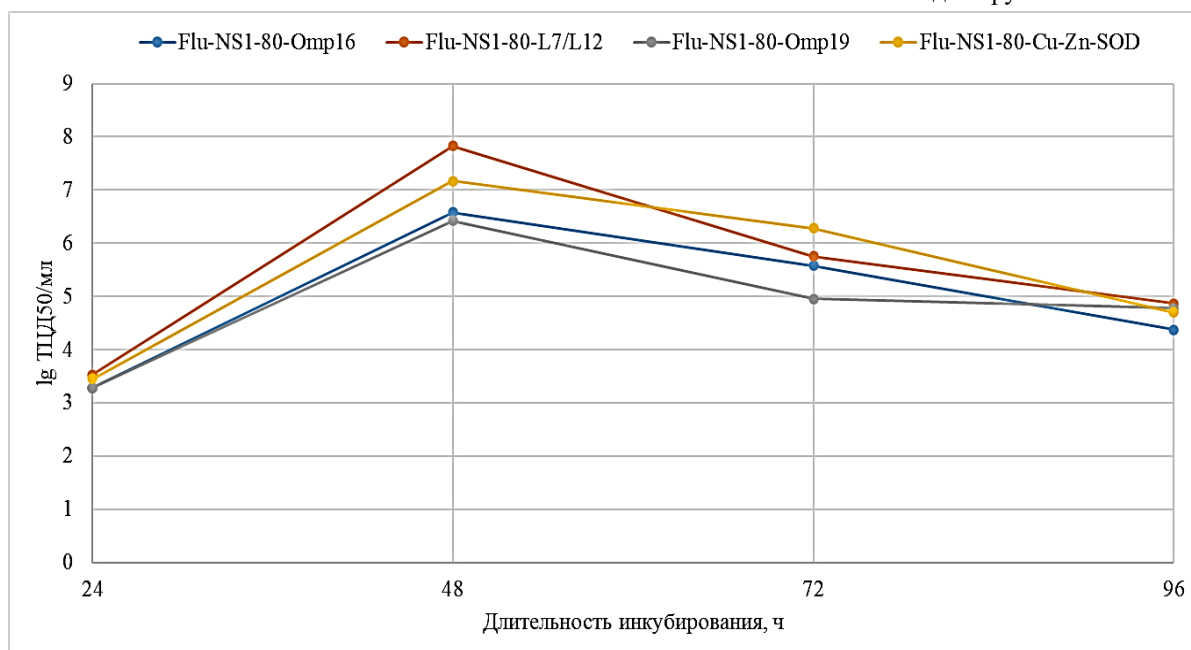


Рисунок 2 - Динамика инфекционной активности рекомбинантных штаммов вируса гриппа в культуре клеток MDCK при различной длительности инкубирования

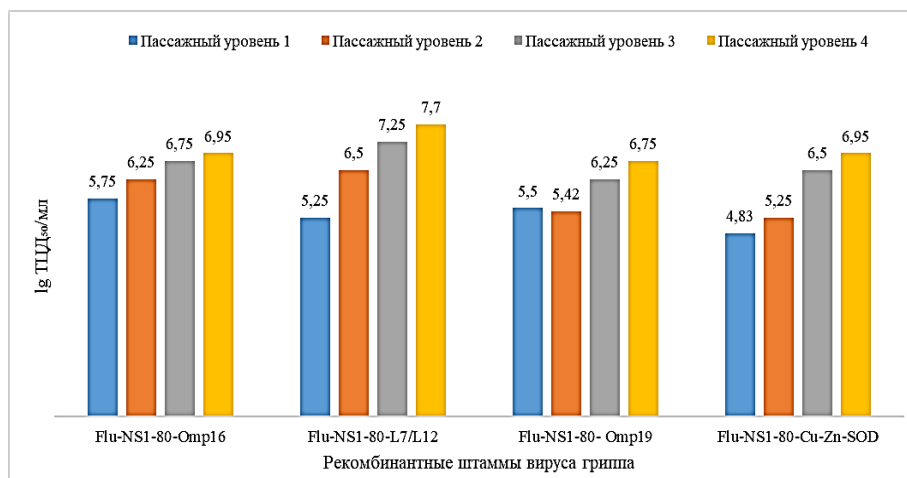


Рисунок 3 – Титр инфекционной активности вирусных конструкций при пассировании в культуре клеток MDCK

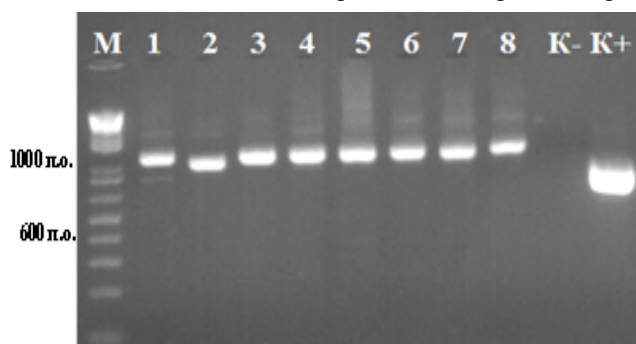
Стабильность рекомбинантных штаммов вируса гриппа при пассировании

Для оценки стабильности рекомбинантных штаммов вируса гриппа проводили последовательное пассирование в клетках MDCK с определением инфекционной и гемагглютинирующей активности на каждом пассаже. Результаты представлены на рисунке 3.

Полученные данные свидетельствуют о сохранении репродуктивной активности вирусных конструкций в процессе пассирования, что указывает на их адаптацию к клеточной системе культивирования. При этом гемагглютинирующая активность вирусов также сохранялась на стабильном уровне в ходе последовательных пассажей, что подтверждает стабильность фенотипических свойств вирусных конструкций.

Генетическую стабильность рекомбинантных штаммов вируса гриппа анализировали методом ОТ-ПЦР (рисунок 4).

Анализ амплифицированных фрагментов NS-гена показал, что их размеры соответствуют ожидаемым, что свидетельствует о сохранении структурной целостности гена в ходе пассирования. Следовательно, исследуемые рекомбинантные штаммы вируса гриппа демонстрируют стабильность генетического материала и поддерживают ре-



M - маркер, 1-пассаж: 1-Flu-NS1-80-Omp16, 2-Flu-NS1-80-L7/L12, 3-Flu-NS1-80-Omp19, 4-Flu-NS1-80-Cu-Zn-SOD; 4-пассаж: 5-Flu-NS1-80-Omp16, 6-Flu-NS1-80-L7/L12, 7-Flu-NS1-80-Omp19, 8-Flu-NS1-80-Cu-Zn-SOD; K+-A/PR/8/34 (H1N1), K--отрицательный контроль

Рисунок 4 – Генетическая стабильность вирусных конструкций после 1-го и 4-го пассажа в культуре клеток MDCK

продуктивные способности в культуре клеток MDCK на протяжении как минимум четырёх последовательных пассажей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что эффективность репродукции NS1-транскрибированных рекомбинантных штаммов вируса гриппа А определяется совокупностью технологических факторов, включая тип клеточного субстрата, условия протеолитической активации гемагглютинина, величину инфицирующей дозы, температурный режим и продолжительность культивирования [13, 14]. Оптимизация данных параметров имеет принципиальное значение для повышения выхода вируса и сохранения стабильности рекомбинантных конструкций.

В ходе исследования установлено, что культура клеток MDCK обеспечивает значительно более высокий уровень репродукции вируса по сравнению с клетками Vero ($7,20 \pm 0,14$ против $4,95 \pm 0,14$ lg TCID₅₀/мл). Подобное преимущество MDCK может быть связано с особенностями рецепторного аппарата данных клеток. Показано, что они экспрессируют значительное количество сиаловых кислот α 2,6-типа, являющихся основными рецепторами для вирусов гриппа человека [15]. Это способствует более эффективной адсорбции и проникновению вируса в клетку. Кроме того, клетки MDCK широко используются в промышленной технологии получения гриппозных вакцин, что подтверждает их высокую продуктивность и технологическую применимость [16, 17].

Важную роль в репликации вируса гриппа играет протеолитическая активация гемагглютинина. В проведённых экспериментах наибольший уровень накопления вируса наблюдался при использовании ТРСК-обработанного трипсина в концентрации 1,5 мкг/мл. Известно, что расщепление предшественника гемагглютинина (HA0) на субъединицы HA1 и HA2 является необходимым условием формирования инфекционно активных вирионов [18]. ТРСК-трипсин обладает высокой специфичностью и обеспечивает селективную активацию гемагглютинина без значительной деградации других вирусных и клеточных белков. Менее специфичные протеазы могут приводить к частичной деструкции белковых структур вириона и снижению выхода полноценных вирусных частиц

[19]. Полученные результаты согласуются с данными исследований по культивированию аттенуированных штаммов вируса гриппа.

Существенное влияние на уровень накопления вируса оказывала величина инфицирующей дозы. Максимальные титры регистрировались при множественности инфицирования 0,01–0,001 ТЦД₅₀/клетку. Использование более высокой дозы (0,1 ТЦД₅₀/клетку) сопровождалось снижением выхода вируса, что может быть связано с эффектом сверхинфицирования клеточной культуры, при котором преждевременная гибель клеток препятствует прохождению нескольких циклов вирусной репликации [20]. При крайне низких дозах инфицирования наблюдалось замедление распространения инфекции и удлинение латентного периода [21]. Таким образом, указанный диапазон инфицирующей дозы обеспечивает оптимальный баланс между скоростью распространения вируса и сохранением жизнеспособности клеточного монослоя.

Температурный режим культивирования также существенно влиял на эффективность репродукции рекомбинантных вирусов. Максимальные значения инфекционной активности и гемагглютинирующего титра были зарегистрированы при температуре 34,0±0,5 °С. Данный результат согласуется с литературными данными о температурной адаптации вируса гриппа к условиям верхних дыхательных путей человека (33–34 °С), где происходит его естественная репликация [22]. Повышение температуры до 36 °С сопровождалось снижением вирусных титров, что может быть связано с изменением стабильности вирусных белков и усилением клеточных противовирусных механизмов. При снижении температуры до 30–32 °С вероятно замедление клеточного метаболизма и, как следствие, снижение скорости вирусной репликации [23].

Продолжительность культивирования также оказывала влияние на накопление вируса. Максимальный титр наблюдался через 48 часов, после чего происходило постепенное снижение инфекционной активности. Подобная динамика может быть связана с деградацией вирусных белков, накоплением дефектных интерферирующих частиц и разрушением клеточного монослоя при длительном культивировании [24].

Анализ результатов последовательного пассирования показал постепенное увеличение инфекционной активности вирусов от первого к четвертому пассажу, что свидетельствует об адаптации вирусных популяций к системе культивирования MDCK. Подобная тенденция ранее описана для различных рекомбинантных и аттенуированных штаммов вируса гриппа [25]. При этом результаты ОТ-ПЦР подтвердили сохранение размера фрагмента NS-гена, что свидетельствует о генетической стабильности вирусных конструкций в процессе пассирования [26].

Полученные результаты имеют практическое значение для разработки гриппозных векторных вакцин против бруцелллёза. Возбудитель заболевания *Brucella* spp. является внутриклеточным патогеном, элиминация которого требует формирования выраженного клеточного иммунного ответа Th1-типа [27]. В этом процессе ключевую роль играют активация CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, а также продукция IFN-γ, обеспечивающая активацию макрофагов и подавление внутриклеточной персистенции

бактерий [28].

Векторные системы на основе NS1-транскрибированных штаммов вируса гриппа представляют перспективную платформу для индукции клеточного иммунитета, поскольку способны к ограниченной внутриклеточной репликации и обеспечивают эффективную презентацию антигена по MHC-I пути [29]. Выбор антигенов Omp16, Omp19, Cu-Zn-SOD и L7/L12 обусловлен их консервативностью и доказанной иммуногенностью при инфекции *Brucella* spp. [30–32].

Таким образом, проведённая оптимизация условий культивирования создаёт технологическую основу для масштабируемого получения рекомбинантных гриппозных векторных конструкций, предназначенных для разработки вакцинных препаратов против бруцелллёза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённого исследования были оптимизированы условия культивирования рекомбинантных NS1-транскрибированных штаммов вируса гриппа A/H5N1, экспрессирующих антигены *Brucella* spp., в культуре клеток MDCK.

Установлено, что наиболее эффективная репродукция вируса достигается при инфицирующей дозе 0,01 ТЦД₅₀/клетку, температуре инкубирования 34 ± 0,5 °С, продолжительности культивирования 48 часов и добавлении ТРСК-трипсина в концентрации 1,5 мкг/мл.

При указанных условиях инфекционная активность вируса достигала ≥7,83 lg ТЦД₅₀/мл, а гемагглютинирующий титр составлял 1:128. Показано, что рекомбинантные вирусные конструкции сохраняют стабильные репродуктивные свойства при последовательном пассировании в клетках MDCK.

Полученные результаты могут служить технологической основой для разработки и масштабирования производства гриппозных векторных вакцин, предназначенных для профилактики бруцелллёза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа выполнена в рамках реализации научно-технической программы Министерства здравоохранения Республики Казахстан «Вакцина против бруцелллёза на основе геномных технологий» на 2024–2026 гг., ИРН BR25293294.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация, Есимбекова Н.Б., Ершебулов З.Д.; методология, Есимбекова Н.Б., Ершебулов З.Д.; статистический анализ Есимбекова Н.Б.; дизайн исследования, Есимбекова Н.Б., Ершебулов З.Д.; интерпретация данных, Дуйсенбаев Б.Д., Кераматдинова А.М., Картбай Г.К., Рыскельдинова Ш.Ж., Абсатова Ж.С.; подготовка первоначального варианта текста, Есимбекова Н.Б.; рецензирование и редактирование текста Ершебулов З.Д., Есимбекова Н.Б.; научное руководство, Ершебулов З.Д.

Все авторы ознакомились с опубликованной версией рукописи и согласились с ней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. The new global map of human brucellosis. // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 6(2). – P. 91–99. DOI: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6
2. Corbel M.J. Brucellosis in humans and animals. – Geneva: World Health Organization, 2006. – 102 p.
3. Gorvel J.P., Moreno E. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. // *Veterinary Microbiology*. – 2002. – Vol. 90(1–4). – P. 281–297. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00237-0
4. Whatmore A.M. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2009. – Vol. 9(6). – P. 1168–1184. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.0015.
5. Whatmore A.M., Davison N.J., Cloeckaert A. Brucella melitensis, a truly “global” pathogen. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 13(6). – P. 848–851. DOI: 10.3201/eid1306.061072
6. Oliveira S.C., Splitter G. Cellular immunological responses to Brucella abortus infection. // *Microbes and Infection*. – 1995. – Vol. 7(5–6). – P. 55–59. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.11.011
7. Richt J.A., Garcia-Sastre A. Attenuated influenza viruses with truncated NS1 as vaccine vectors. // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27(45). – P. 4414–4418. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.028
8. Hale B.G., Randall R.E., Ortín J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. // *Journal of General Virology*. – 2008. – Vol. 89(10). – P. 2359–2376. DOI: 10.1099/vir.0.2008/004606-0
9. Talon J., Salvatore M., O’Neill R. Activation of interferon regulatory factor 3 in response to influenza A virus infection: role of viral NS1 protein. // *Journal of General Virology*. – 2000. – Vol. 81(12). – P. 2939–2947. DOI: 10.1099/0022-1317-81-12-2939
10. Govorkova E.A., Webster R.G. Receptors and tropism of influenza virus. // *Virology*. – 2012. – Vol. 258(1). – P. 122–131. DOI: 10.1016/S0042-6822(99)00066-3
11. Matlin K.S., Reggio H., Helenius A., Simons K. Infectious entry pathway of influenza virus in mammalian cells. // *Journal of Cell Biology*. – 1981. – Vol. 91(3). – P. 601–613. DOI: 10.1083/jcb.91.3.601
12. Lazarowitz S.G., Choppin P.W. Role of proteolytic cleavages in infectivity of influenza viruses. // *Virology*. – 1975. – Vol. 68(2). – P. 440–454. DOI: 10.1016/0042-6822(75)90385-5
13. Chen A., Poh S. L., Dietzsch C., Roethl E., Yan M. L., Ng S. K. Serum-free microcarrier based production of replication-deficient influenza vaccine candidate virus lacking NS1 using Vero cells // *BMC Biotechnology*. – 2011. – Vol. 11. – Article 81. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-81>
14. Wressnigg N., Shurygina A., Wolff T., Redlberger-Fritz M., Popow-Kraupp T. Influenza B mutant viruses with truncated NS1 proteins grow efficiently in Vero cells and are immunogenic in mice // *Journal of General Virology*. – 2009. – Vol. 90. – P. 366–374. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.006122-0>
15. Hatakeyama S., Sakai-Tagawa Y., Kiso M., Goto H., Kawakami C., Mitamura K., Sugaya N., Suzuki Y., Kawaoka Y. Enhanced expression of an α 2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to neuraminidase inhibitor // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – Vol. 43. – No. 8. – P. 4139–4146. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4139-4146.2005>
16. Byrd-Leotis L., Jia N., Matsumoto Y., Lu D., Kawaoka Y., Steinhauer D. A., Cummings R. D. Sialylated and sulfated N-glycans in MDCK and engineered MDCK cells for influenza virus studies // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – Article 12757. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16605-5>
17. Liu J., Shi X., Schwartz R., Kemble G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – No. 46. – P. 6460–6463. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.024>
18. Takada K., Kida Y., Watanabe S., Watanabe T. Influenza B viruses are more susceptible to high temperatures than influenza A viruses // *npj Viruses*. – 2024. – Vol. 2. – Article 65. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44298-024-00077-7>
19. Mehle A., Doudna J. A. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans // *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. – 2009. – Vol. 106. – No. 50. – P. 21312–21316. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0911915106>
20. Steinhauer D. A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus // *Virology*. – 1999. – Vol. 258. – No. 1. – P. 1–20. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9716>
21. Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blödorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment // *Virology*. – 1975. – Vol. 68. – No. 2. – P. 426–439. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90284-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90284-6)
22. Baccam P., Beauchemin C., Macken C. A., Hayden F. G., Perelson A. S. Kinetics of influenza A virus infection in humans // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – No. 15. – P. 7590–7599. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01623-05>
23. Heldt F. S., Kupke S. Y., Dorl S., Reichl U., Frensing T. Single-cell analysis and stochastic modelling unveil large cell-to-cell variability in influenza A virus infection // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – Article 8938. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms9938>
24. Matrosovich M., Matrosovich T., Garten W., Klenk H.-D. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays // *Virology Journal*. – 2006. – Vol. 3. – Article 63. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-63>
25. Kittel C., Sereinig S., Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Wolkerstorfer A., Katinger H., Egorov A. Serum-free microcarrier based production of replication-deficient influenza vaccine candidate virus lacking NS1 using Vero cells // *BMC Biotechnology*. – 2011. – Vol. 11. – Article 81. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-81>
26. Solórzano A., Webby R. J., Lager K. M., Janke B. H.,

García-Sastre A., Richt J. A. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – No. 12. – P. 7535–7543. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7535-7543.2005>

27. González D., Marchesini M., Roset M. S., Giambartolomei G. H. Cell-mediated immune response in experimental brucellosis: role of Th1 cytokines // *Clinical & Developmental Immunology*. – 2011. – Article ID 998293. DOI: <https://doi.org/10.1155/2011/998293>

28. Ko J., Splitter G. A. Molecular host-pathogen interactions in brucellosis: role of T lymphocytes and IFN- γ in controlling *Brucella* infection // *Microbes and Infection*. – 2003. – Vol. 5. – No. 3. – P. 321–327. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00039-1)

29. Park J., Steel J., Lowen A. C., et al. Attenuated influenza A viruses lacking NS1 as vaccine vectors: induction of cellular immune responses // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – No. 12. – P. 2165–2171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.041>

30. Pasquevich K. A., Estein S. M., Comerci D. J. *Brucella* outer membrane proteins Omp16 and Omp19 are protective antigens that induce Th1-type immune responses // *Infection and Immunity*. – 2009. – Vol. 77. – No. 3. – P. 1220–1230. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.01162-08>

31. Haag A. F., Tsolis R. M. The Cu-Zn superoxide dismutase of *Brucella* spp.: role in virulence and immune evasion // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – Article 1867. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01867>

32. Oliveira S. C., Splitter G. A. Ribosomal protein L7/L12 of *Brucella*: a potent inducer of T-cell-mediated immunity // *Infection and Immunity*. – 1995. – Vol. 63. – No. 7. – P. 2929–2935. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.63.7.2929-2935.1995>

REFERENCES

1. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianou E. V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(2):91–99. DOI: [10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6).

2. Corbel M. J. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: World Health Organization; 2006. 102 p.

3. Gorvel J. P., Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*. 2002;90(1–4):281–297. DOI: [10.1016/S0378-1135\(02\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00237-0).

4. Whatmore A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol*. 2009;9(6):1168–1184. DOI: [10.1016/j.meegid.2009.07.001](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.001).

5. Whatmore A. M., Davison N. J., Cloeckaert A. *Brucella melitensis*, a truly “global” pathogen. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(6):848–851. DOI: [10.3201/eid1306.061072](https://doi.org/10.3201/eid1306.061072).

6. Oliveira S. C., Splitter G. Cellular immunological responses to *Brucella abortus* infection. *Microbes Infect*. 2005;7(5–6):55–59. DOI: [10.1016/j.micinf.2005.11.011](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.11.011).

7. Richt J. A., Garcia-Sastre A. Attenuated influenza viruses with truncated NS1 as vaccine vectors. *Vaccine*. 2009;27(45):4414–4418. DOI: [10.1016/j.vaccine.2009.07.028](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.028).

vaccine.2009.07.028.

8. Hale B. G., Randall R. E., Ortín J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*. 2008;89(10):2359–2376. DOI: [10.1099/vir.0.2008/004606-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004606-0).

9. Talon J., Salvatore M., O’Neill R. E. Activation of interferon regulatory factor 3 in response to influenza A virus infection: role of viral NS1 protein. *J Gen Virol*. 2000;81(12):2939–2947. DOI: [10.1099/0022-1317-81-12-2939](https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-2939).

10. Govorkova E. A., Webster R. G. Receptors and tropism of influenza virus. *Virology*. 1999;258(1):122–131. DOI: [10.1016/S0042-6822\(99\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(99)00066-3).

11. Matlin K. S., Reggio H., Helenius A., Simons K. Infectious entry pathway of influenza virus in mammalian cells. *J Cell Biol*. 1981;91(3):601–613. DOI: [10.1083/jcb.91.3.601](https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.601).

12. Lazarowitz S. G., Choppin P. W. Role of proteolytic cleavage in infectivity of influenza viruses. *Virology*. 1975;68(2):440–454. DOI: [10.1016/0042-6822\(75\)90285-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90285-8).

13. Chen A., Poh S. L., Dietzsch C., Roethl E., Yan M. L., Ng S. K. Serum-free microcarrier based production of replication-deficient influenza vaccine candidate virus lacking NS1 using Vero cells. *BMC Biotechnol*. 2011; 11:81. DOI: [10.1186/1472-6750-11-81](https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-81).

14. Wressnigg N., Shurygina A., Wolff T., Redlberger-Fritz M., Popow-Kraupp T. Influenza B mutant viruses with truncated NS1 proteins grow efficiently in Vero cells and are immunogenic in mice. *J Gen Virol*. 2009; 90:366–374. DOI: [10.1099/vir.0.006122-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.006122-0).

15. Hatakeyama S., Sakai-Tagawa Y., Kiso M., Goto H., Kawakami C., Mitamura K., Sugaya N., Suzuki Y., Kawaoka Y. Enhanced expression of an α 2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):4139–4146. DOI: [10.1128/JCM.43.8.4139-4146.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4139-4146.2005).

16. Byrd-Leotis L., Jia N., Matsumoto Y., Lu D., Kawaoka Y., Steinhauer D. A., Cummings R. D. Sialylated and sulfated N-glycans in MDCK and engineered MDCK cells for influenza virus studies. *Sci Rep*. 2022; 12:12757. DOI: [10.1038/s41598-022-16605-5](https://doi.org/10.1038/s41598-022-16605-5).

17. Liu J., Shi X., Schwartz R., Kemble G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine*. 2009;27(46):6460–6463. DOI: [10.1016/j.vaccine.2009.06.024](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.024).

18. Takada K., Kida Y., Watanabe S., Watanabe T. Influenza B viruses are more susceptible to high temperatures than influenza A viruses. *npj Viruses*. 2024; 2:65. DOI: [10.1038/s44298-024-00077-7](https://doi.org/10.1038/s44298-024-00077-7).

19. Mehle A., Doudna J. A. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(50):21312–21316. DOI: [10.1073/pnas.0911915106](https://doi.org/10.1073/pnas.0911915106).

20. Steinhauer D. A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*. 1999;258(1):1–20. DOI: [10.1006/viro.1999.9716](https://doi.org/10.1006/viro.1999.9716).

21. Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blödmern J. Activation

of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*. 1975;68(2):426–439. DOI: 10.1016/0042-6822(75)90284-6.

22. Baccam P., Beauchemin C., Macken C. A., Hayden F. G., Perelson A. S. Kinetics of influenza A virus infection in humans. *J Virol*. 2006;80(15):7590–7599. DOI: 10.1128/JVI.01623-05.

23. Heldt F. S., Kupke S. Y., Dorl S., Reichl U., Frensing T. Single-cell analysis and stochastic modelling unveil large cell-to-cell variability in influenza A virus infection. *Nat Commun*. 2015; 6:8938. DOI: 10.1038/ncomms9938.

24. Matrosovich M., Matrosovich T., Garten W., Klenk H.-D. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J*. 2006; 3:63. DOI: 10.1186/1743-422X-3-63.

25. Kittel C., Sereinig S., Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Wolkerstorfer A., Katinger H., Egorov A. Serum-free microcarrier based production of replication-deficient influenza vaccine candidate virus lacking NS1 using Vero cells. *BMC Biotechnol*. 2011; 11:81. DOI: 10.1186/1472-6750-11-81.

26. Solórzano A., Webby R. J., Lager K. M., Janke B. H., García-Sastre A., Richt J. A. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J Virol*. 2005;79(12):7535–7543. DOI: 10.1128/JVI.79.12.7535-7543.2005.

27. González D., Marchesini M., Roset M. S., Giambartolomei G. H. Cell-mediated immune response in experimental brucellosis: role of Th1 cytokines. *Clin Dev Immunol*. 2011; 2011:998293. DOI: 10.1155/2011/998293.

28. Ko J., Splitter G. A. Molecular host-pathogen interactions in brucellosis: role of T lymphocytes and IFN- γ in controlling *Brucella* infection. *Microbes Infect*. 2003;5(3):321–327. DOI: 10.1016/S1286-4579(03)00039-1.

29. Park J., Steel J., Lowen A. C., et al. Attenuated influenza A viruses lacking NS1 as vaccine vectors: induction of cellular immune responses. *Vaccine*. 2012;30(12):2165–2171. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.01.041.

30. Pasquevich K. A., Estein S. M., Comerci D. J. *Brucella* outer membrane proteins Omp16 and Omp19 are protective antigens that induce Th1-type immune responses. *Infect Immun*. 2009;77(3):1220–1230. DOI: 10.1128/IAI.01162-08.

31. Haag A. F., Tsolis R. M. The Cu-Zn superoxide dismutase of *Brucella* spp.: role in virulence and immune evasion. *Front Microbiol*. 2016; 7:1867. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01867.

32. Oliveira S. C., Splitter G. A. Ribosomal protein L7/L12 of *Brucella*: a potent inducer of T-cell-mediated immunity. *Infect Immun*. 1995;63(7):2929–2935. DOI: 10.1128/IAI.63.7.2929-2935.1995.

ӨЖ 578.832.1: 57.085.23: 615.371: 616.993

BRUCELLA SPP. АНТИГЕНДЕРІН (L7/L12, OMP16, OMP19, CU-ZN-SOD) ЭКСПРЕССИЯЛАЙТЫН А/Н5N1 ТҮМАУ ВИРУСЫНЫҢ РЕКОМБИНАНТТЫ ШТАММДАРЫН ӨСІРУ ЖАҒДАЙЛАРЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ***Есимбекова Н.Б.¹, Дуйсенбаев Б.Д.¹, Кераматдинова А.М.¹, Картбай Г.К.¹, Ершебулов З.Д.¹, Рыскельдинова Ш.Ж.², Абсатова Ж.С.²**¹ЖШС «OtarBioPharm», Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейск қалашығы, *nazym.esimbekova@mail.ru²ЖШС «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты», Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейск қалашығы**ТҮЙІН**

Зерттеуде NS1-транкирленген, Brucella spp. (L7/L12, OMP16, OMP19, CU-ZN-SOD) антигендерін экспрессиялайтын А/Н5N1 вирусының рекомбинантты штаммдарын культивациялау жағдайларын оңтайландыру нәтижелері ұсынылды. Жұмыста MDCK және Vero клеткалық өсінділері қолданылды. Инфекция дозасының, инкубация температурасының, культивация ұзақтығының, сондай-ақ протеазаның вирус репродукциясына әсері анықталды.

А/Н5N1 вирусының бруцеллез антигендерін экспрессиялайтын рекомбинантты штаммдарын культивациялау үшін оңтайлы жағдайлар ретінде MDCK клеткалық өсіндісін қолдану, инфекция дозасы 0,01 ТЦД_{50/клетка}, инкубация температурасы 34,0±0,5 °С, культивация ұзақтығы 48 сағат және Trypsin-TPCK концентрациясы 1,5–2,0 мкг/мл болып табылды. Осы параметрлерде вирус инфекциялық белсенділігі ≥5,75 lg ТЦД_{50/мл}-ге жетті, гемагглютинация титрі – 1:32 болды. Вирустық конструкциялардың генетикалық тұрақтылығы кемінде 4 пассажға дейін сақталды.

Алынған нәтижелер грипп векторлы вакциналарын әзірлеу және өндірісін масштабтау технологиясын жасауда қолданылуы мүмкін.

Түйінді сөздер: А/Н5N1 вирусы, рекомбинантты штаммдар, клеткалық өсінді, культивацияны оңтайландыру, инфекциялық белсенділік, гемагглютинация белсенділігі.

UDC 578.832.1: 57.085.23: 615.371: 616.993

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR RECOMBINANT INFLUENZA A/H5N1 STRAINS EXPRESSING BRUCELLA SPP. ANTIGENS (L7/L12, OMP16, OMP19, CU-ZN-SOD)**Yesimbekova N.B.¹, Duisenbayev B.D.¹, Keramatdinova A.M.¹, Kartbay G.K.¹, Yershebulov Z.D.¹, Ryskeldinova Sh.Zh.², Absatova Zh.S.²**¹LLP «OtarBioPharm», Zhambyl Region, Korday District, Gvardeyskiy Settlement, *nazym.esimbekova@mail.ru²LLP «Research Institute of Biological Safety Problems», Zhambyl Region, Korday District, Gvardeyskiy Settlement**ABSTRACT**

The study presents the results of optimizing cultivation conditions for recombinant influenza A/H5N1 strains (NS1-truncated) expressing Brucella spp. antigens (L7/L12, OMP16, OMP19, CU-ZN-SOD). MDCK and Vero cell lines were used in the experiments. The effects of the infectious dose, incubation temperature, cultivation duration, as well as the effect of protease on viral replication, were determined.

It was found that the optimal conditions for cultivating recombinant influenza A strains expressing Brucella antigens are the use of MDCK cell culture, an infectious dose of 0.01 TCID₅₀/cell, an incubation temperature of 34.0±0.5 °C, a cultivation period of 48 hours, and addition of Trypsin-TPCK at a concentration of 1.5–2.0 µg/mL. Under these conditions, viral infectivity reached ≥5.75 log TCID₅₀/mL, and the hemagglutination titer was 1:32. The genetic stability of the viral constructs was maintained for at least four consecutive passages.

The obtained results can be used in the development and scale-up of influenza vector vaccine production technology.

Keywords: Influenza A/H5N1 virus, recombinant strains, cell culture, cultivation optimization, infectivity, hemagglutination activity.