

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АТТЕНУИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ИНТЕРЛЕЙКИН-1 β ЧЕЛОВЕКА

Е. А. Романовская-Романько , О. О. Ожерельева, М. А. Плотникова, А. С. Алтухов, М. А. Стукова

Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

Применение живых аттенуированных гриппозных векторов требует баланса между снижением вирулентности и сохранением иммуногенности. Один из возможных подходов для усиления иммуногенности и защитной эффективности таких аттенуированных штаммов — встраивание в геном вируса трансгенов, способных активировать врожденный и адаптивный иммунитет. Цель экспериментального исследования — сконструировать рекомбинантные аттенуированные вирусы гриппа, способные экспрессировать IL1 β человека, и провести сравнительный анализ их репликативных свойств, иммуностимулирующей активности и профиля безопасности *in vivo*. Рекомбинантные штаммы с различным положением трансгена получили методом обратной генетики, провели оценку их ростовых характеристик и уровня экспрессии трансгена. Активацию генов врожденного иммунитета изучали в культуре клеток A549 в ответ на заражение рекомбинантными штаммами. Аттенуированный фенотип подтверждали в модели мышей. В представленном исследовании были сконструированы и получены рекомбинантные аттенуированные вирусы гриппа, имеющие укороченный до 124 аминокислот белок NS1 и экспрессирующие IL1 β человека. Подтверждена способность рекомбинантных штаммов экспрессировать функционально активный IL1 β , показано усиление относительной экспрессии генов врожденного иммунитета (RIG-I, MDA5, OAS1), а также провоспалительных цитокинов (IL6 и TNF α) в ответ на инфицирование клеток рекомбинантными штаммами по сравнению с пустым вектором NS124. Так, экспрессия гена IL6 увеличивалась более чем в 10 раз ($p < 0,0001$), а гена TNF α — в 3–4 раза ($p < 0,0001$). В экспериментах *in vivo* был подтвержден аттенуированный фенотип полученных рекомбинантных штаммов, что свидетельствует о сохранении профиля безопасности наряду с усиленной иммуностимулирующей активностью.

Ключевые слова: вирус гриппа А, рекомбинантный гриппозный вектор, интерлейкин-1 бета, белок NS1

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 25-25-00939).

Вклад авторов: Е. А. Романовская-Романько — концепция, выполнение исследований, обработка материала, написание статьи; О. О. Ожерельева — обзор литературы, конструирование плазмид, выполнение исследований, статистическая обработка данных; М. А. Плотникова — выполнение исследований, статистическая обработка данных; А. С. Алтухов — выполнение исследований; М. А. Стукова — утверждение окончательного варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева (протокол № 07 от 23 апреля 2026 г.). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС, федеральными руководящими принципами и институциональной политикой ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева.

 **Для корреспонденции:** Екатерина Андреевна Романовская-Романько
ул. Профессора Попова, д. 15/17, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия; romromka@yandex.ru

Статья получена: 02.07.2026 **Статья принята к печати:** 28.07.2026 **Опубликована онлайн:** 17.08.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.044

Авторские права: © 2026 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE ATTENUATED RECOMBINANT INFLUENZA VIRUS STRAINS EXPRESSING HUMAN INTERLEUKIN 1 β

Romanovskaya-Romanko EA , Ozhereleva OO, Plotnikova MA, Altuhov AS, Stukova MA

Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

The use of live attenuated influenza vectors requires a balance between decreasing virulence and preserving immunogenicity. One possible approach to enhancing immunogenicity and protective efficacy of such attenuated strains is the integration of transgenes capable of activating the innate and adaptive immunity in the viral genome. The experimental study aimed to construct recombinant attenuated influenza viruses capable of expressing human IL1 β and conduct comparative analysis of their replication properties, immunostimulatory activity, and safety profile *in vivo*. Recombinant strains with different transgene localization were generated by the reverse genetics method; their growth characteristics and transgene expression levels were assessed. Activation of the innate immunity genes in response to infection with recombinant strains was assessed in the A549 cell culture. The attenuated phenotype was confirmed in the mouse model. In the reported study, recombinant attenuated influenza viruses having the NS1 protein truncated to 124 amino acids and expressing human IL1 β were constructed and produced. It was confirmed that recombinant strains could express the functionally active IL1 β ; the increase in relative expression of the innate immunity genes (RIG-I, MDA5, OAS1) and pro-inflammatory cytokines (IL6 and TNF α) in response to the infection of cells with recombinant strains compared to the empty vector NS124 was shown. Thus, the IL6 gene expression increased more than 10-fold ($p < 0.0001$) and that of the TNF α gene increased 3–4-fold ($p < 0.0001$). The attenuated phenotype of the recombinant strains produced was confirmed in *in vivo* experiments, which suggests preservation of the safety profile along with the enhanced immunostimulatory activity.

Keywords: influenza A virus, recombinant influenza vector, interleukin-1 beta, NS1 protein

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 25-25-00939).

Author contribution: Romanovskaya-Romanko EA — concept, testing, material processing, manuscript writing; Ozhereleva OO — literature review, constructing plasmids, testing, statistical data processing; Plotnikova MA — testing, statistical data processing; Altuhov AS — testing; Stukova MA — approval of the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation (protocol No. 07 dated April 23, 2026). Animals were kept under standard conditions in accordance with the Directive 2010/63/EC, federal guidelines, and the institutional policy of the Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation.

 **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko
Professora Popova, 15/17, St. Petersburg, 197022, Russia; romromka@yandex.ru

Received: 02.07.2026 **Accepted:** 28.07.2026 **Published online:** 17.08.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.044

Copyright: © 2026 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Применение живых аттенуированных гриппозных векторов требует тонкого баланса между снижением вирулентности штамма и сохранением его иммуногенности. Одним из возможных путей достижения этого баланса является направленное модулирование иммунного ответа за счет экспрессии иммуномодулирующих молекул в составе генома гриппозного вектора для усиления защитного ответа без снижения вирулентности штамма.

Аттенуированные штаммы вируса гриппа с модифицированным белком NS1 являются перспективной платформой для разработки живой гриппозной вакцины с широким спектром защитной эффективности, а также для создания векторов доставки целевых антигенов [1]. Вирусы с укороченным NS1-белком способны к эффективной репликации в производственных субстратах, обладая при этом аттенуированным фенотипом в иммунокомпетентных системах [2]. Аттенуация таких штаммов обусловлена тем, что вирусы с укороченным неструктурным белком NS1 не способны подавлять врожденный иммунный ответ хозяина, за счет утраты С-концевого эффекторного домена, опосредующего взаимодействие с клеточными факторами иммунной регуляции и процессинга мРНК [3]. Однако сохранение РНК-связывающего домена в N-концевом участке белка NS1 может обуславливать сохранение иммуносупрессивной активности таких вирусов за счет ограничения процессинга и созревания ключевых медиаторов инфламмасомо-зависимой сигнализации — интерлейкина-1 β (IL1 β) и интерлейкина 18 (IL18) [4]. Поскольку эти цитокины играют важнейшую роль в формировании эффективного иммунного ответа, в случае гриппозного штамма, имеющего белок NS1, укороченный до 124 аминокислот, может наблюдаться ограничение иммуностимулирующего потенциала такого штамма. В связи с этим дальнейшая оптимизация безопасности и иммуногенности таких гриппозных векторов является актуальной задачей.

Один из перспективных подходов к повышению иммуногенности аттенуированных штаммов — встраивание в вирусный геном дополнительных трансгенов, которые кодируют иммуномодулирующие факторы, способные обеспечить направленную активацию врожденного и адаптивного иммунного ответа.

Особый интерес в контексте усиления противогриппозного иммунного ответа представляют цитокины семейства интерлейкина-1, способные усиливать как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ при совместном интраназальном введении с антигеном [5]. Ранее было показано, что интраназальное введение IL1 β в комбинации с гриппозным антигеном индуцирует формирование Т-резидентных клеток памяти, которые играют ключевую роль в формировании перекрестной защиты против гетерологичных штаммов вируса гриппа [6]. Экспрессия биологически активной молекулы IL1 β рекомбинантным аттенуированным штаммом вируса гриппа может способствовать усилению специфического иммунного ответа на гриппозные антигены, обеспечивая эффективную защиту широкого спектра действия.

Цель исследования — сконструировать и получить рекомбинантные аттенуированные вирусы гриппа, имеющие укороченный до 124 аминокислот белок NS1 и экспрессирующие IL1 β человека, и провести сравнительный анализ их репликативных свойств, иммуностимулирующей активности и профиля безопасности *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмидные конструкции

Для сборки рекомбинантных штаммов были получены две различные по конструкции плазмиды, кодирующие последовательности химерного геномного сегмента NS, со вставкой последовательности активной формы IL1 β [7]. Для рекомбинантного штамма IL1b_2A_NS124 плазида была получена на основе ранее сконструированной плазмиды pHW-PR8-sF-NS [8]: последовательность IL1 β с сигнальным пептидом IgGк, синтезированная *de novo* («Евроген», Россия) была встроена в N-концевую часть химерного полипротеина, включавшего в себя транген, за которым следовали последовательности укороченного до 124 аминокислот NS1 и NS2/NEP, разделенные сайтами 2A, экспрессия NEP при этом обеспечивалась за счет сайта 2A без сплайсинга. Для рекомбинантного штамма NS124_SS_IL1b в плазмиде последовательность трансгена с сигнальным пептидом IgGк была вставлена после последовательности укороченного до 124 аминокислот белка NS1 через кассету перекрывающихся стоп-старт кодонов, обеспечивающих реинициацию трансляции. Плазмиды, кодирующие последовательности остальных внутренних и поверхностных белков вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR/8/34), были получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева».

Культуры клеток

Клетки MDCK (#FR-58; IRR, США) культивировали в среде АльфаMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки SC-biol («Биолот», Россия). Клетки A549 (CCL-185; ATCC, США) и HEK293 (ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева») культивировали в среде DMEM/F12 («Биолот», Россия) с добавлением 10% сыворотки SC-biol («Биолот», Россия).

Получение рекомбинантных вирусов

Рекомбинантные вирусные штаммы были получены методом трансфекции ко-культуры клеток MDCK/HEK293 набором из восьми плазмид, кодирующих геномные сегменты вируса гриппа. В качестве трансфекционного агента использовали реагент GenJect39 («Молекта», Россия). Последующие этапы пассирования рекомбинантных вирусных штаммов проводили в 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (ОАО «Птицефабрика Синявинская», пос. Приладожский, Россия) при температуре 34 °С. Гриппозный вектор (NS124), имеющий укороченный до 124 аминокислот белок NS1 без вставки трансгена, был получен из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России (лаборатория векторных вакцин).

Определение инфекционной активности

Инфекционную активность рекомбинантных вирусных штаммов определяли методом предельных разведений в системе РКЭ и культуре клеток MDCK [8]. Для определения 50%-й инфекционной дозы был использован метод Рида и Менча, титр выражали в log₁₀ ЭИД₅₀ (ТИД₅₀)/мл.

Определение длины химерного сегмента NS методом ОТ-ПЦР

Вирусную РНК выделяли набором реагентов RNeasy Mini Kit (Qiagen, Нидерланды). Генетический материал амплифицировали набором реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра («Биолабмикс», Россия) и праймеров, специфичных к сегменту NS [9]. Амплификацию проводили с использованием сенсорного термоциклера GenTier 96E PCR Cycler (TianLong, China). Анализ длины ПЦР-продукта проводили методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с использованием $\times 1$ TAE буфера.

Количественное определение IL1 β

Для получения образцов 10-дневные РКЭ (суточный монослой клеток MDCK) инфицировали рекомбинантными вирусными штаммами или пустым вектором NS124 в дозе 2×10^5 ЭИД₅₀ (1,0 ТИД₅₀/кл.), образцы отбирали через 48 ч (24 ч) инкубирования при температуре 34 °C (37 °C, 5% CO₂). Уровень IL1 β в пробах оценивали количественно методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора Interleukin-1 beta-EIA-BEST («Вектор-Бест», Россия).

Измерение биологической активности IL1 β

Биологическую активность IL1 β определяли методом клеточного пролиферационного теста, основанного на стимуляции пролиферации IL1-зависимой линии клеток D10.G4.1 в присутствии субоптимальной концентрации конканавалина А. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 и вносили в 96-луночные планшеты вместе с серийными разведениями стандартного образца (WHO IL1 β) и исследуемых проб. После инкубации в течение 72 ч при температуре 37 °C, 5% CO₂ пролиферацию оценивали по оптической плотности с использованием ХТТ-теста. Активность образцов рассчитывали по калибровочной кривой относительно международного стандарта и выражали в МЕ/мл.

Количественная оценка инфицированных клеток

Определение доли инфицированных клеток проводили методом проточной цитометрии. Суточный монослой клеток A549 заражали рекомбинантными штаммами или пустым вектором в дозе 1,0 ТИД₅₀/кл. в трех независимых повторах для каждого вируса и инкубировали в течение 20 ч в среде, содержащей 2% сыворотки. В качестве отрицательного контроля использовали незараженные клетки (КК). Количество зараженных клеток в процентах считали с помощью проточного цитометра, окрашивая клетки набором Zombie Aqua Fixable Viability Kit и FITC-мечеными антителами к NP вируса гриппа. Сбор данных осуществляли на проточном цитометре CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter, США), анализ проводили с использованием программного обеспечения Kaluza Analysis v2 (Beckman Coulter, США).

Иммунофлуоресценция

Клетки MDCK заражали рекомбинантными штаммами или пустым вектором в дозе 1,0 ТИД₅₀/клетку и инкубировали в течение 20 ч в среде, содержащей 2% сыворотки. Для детекции белка NS1 вируса гриппа А в пермобилизованных Triton X-100 клетках использовали

поликлональную сыворотку мыши и конъюгат goat-anti mouse Alexa488 (Abcam, Великобритания). Визуализацию клеток методом флуоресцентной микроскопии проводили с использованием Cytell Imaging System (Image Solutions, Великобритания).

Оценка экспрессии методом ОТ-ПЦР

Для оценки экспрессии генов врожденного иммунного ответа суточный монослой клеток A549 заражали рекомбинантными вирусными штаммами или пустым вектором в дозе 1,0 ТИД₅₀/кл. (по четыре повтора). Через 24 ч из клеток проводили экстракцию тотальной РНК с использованием набора ExtractRNA («Евроген», Россия). РНК обрабатывали ДНКазой, не содержащей РНКазы RQ1 (Promega, США). Реакцию ОТ проводили с использованием 1 мкг РНК, 0,5 мкг праймеров oligo-dT16 (DNA synthesis, Россия) и набора RNAscribe RT (BioLabMix, Россия). Для проведения ПЦР использовали набор BioMaster HS-ПЦР (BioLabMix, Россия) и последовательности праймеров и зондов, разработанные ранее [10]. Значения Ct были нормализованы по отношению к гену GAPDH (ген домашнего хозяйства). Относительную экспрессию рассчитывали методом $\Delta\Delta Ct$, принимая за единицу экспрессию целевых генов в незараженных клетках.

Лабораторные животные

Самки нелинейных мышей CD1 в возрасте 6–8 недель были приобретены в питомнике лабораторных животных «Рапполово» (Филиал НИЦ «Курчатовский институт» ПИЯФ ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область, Россия).

Безопасность рекомбинантных векторов при интраназальном введении мышам

Вирусные штаммы вводили мышам интраназально под легкой эфирной анестезией в объеме 30 мкл с использованием механического дозатора. Рекомбинантные штаммы и пустой вектор вводили животным в дозе 5,5 log₁₀ ЭИД₅₀, вирус A/Puerto Rico/8/34, обладающий полноразмерным геном NS (PR8 wt), — в дозе 3,5 log₁₀ ЭИД₅₀.

Статистическая обработка

Статистический анализ и графическая визуализация были выполнены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (С.О.). Для межгруппового сравнения использовали дисперсионный анализ с последующим применением теста множественного сравнения Тьюки или непараметрического теста Краскела–Уоллиса, как указано в подписях к рисункам. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование и характеристика аттенуированных гриппозных вирусов, экспрессирующих IL1 β человека

Рекомбинантные штаммы вируса гриппа, экспрессирующие IL1 β , были получены на основе штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), содержащего укороченный до 124 аминокислот

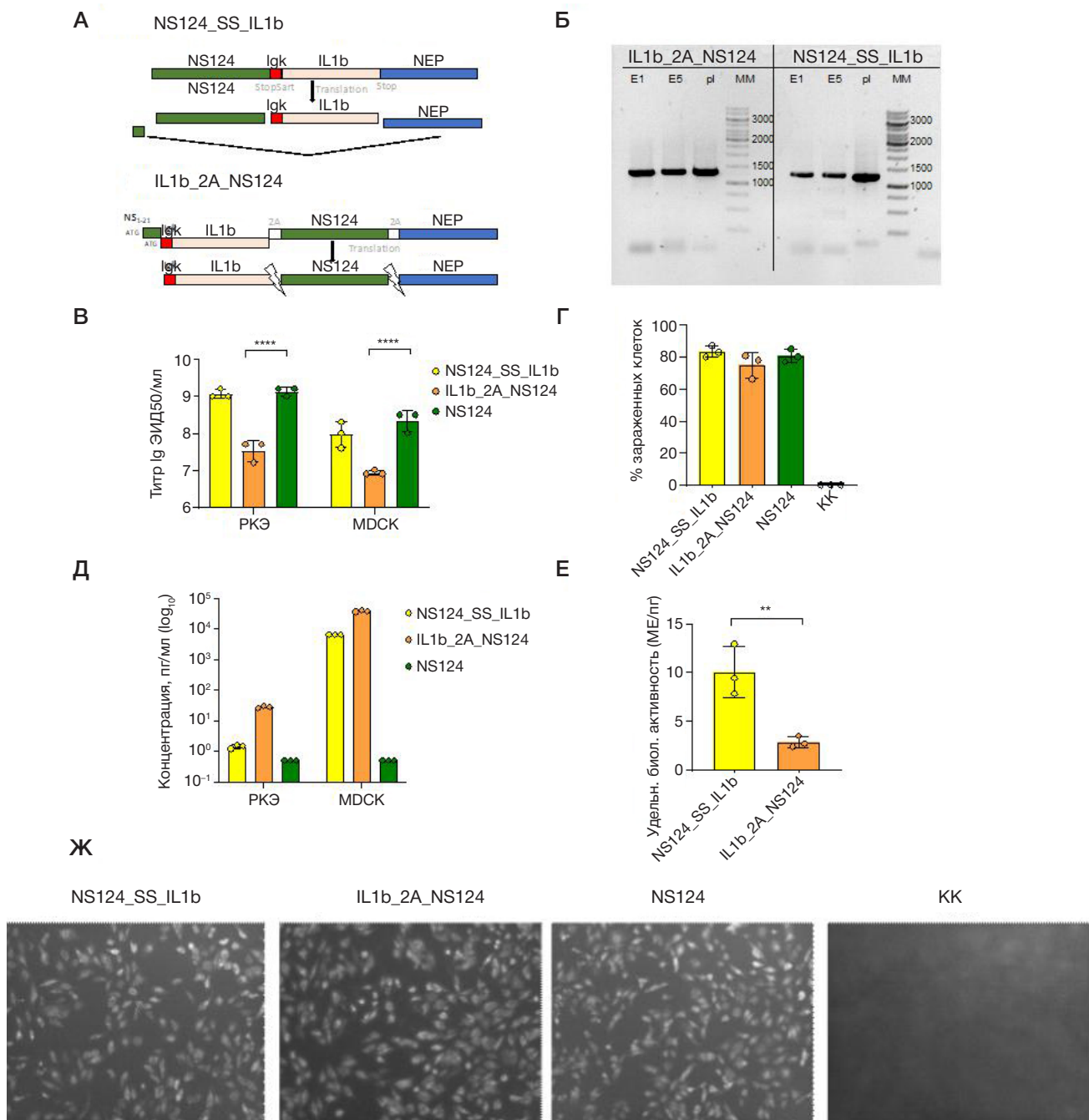


Рис. 1. Конструирование и характеристика рекомбинантных вирусов гриппа А, экспрессирующих IL1β. **А.** Схемы геномных конструкций химерного геномного сегмента NS рекомбинантных вирусов IL1b_2A_NS124 и NS124_SS_IL1b. **Б.** Электрофореграмма продуктов амплификации геномного сегмента NS рекомбинантных штаммов. MM — маркер молекулярного веса; E1 — первый эмбриональный пассаж; E5 — пятый эмбриональный пассаж; pl — контрольная плазмида. **В.** Репродуктивные свойства рекомбинантных вирусных штаммов в системе 10-дневных РКЭ и культуре клеток MDCK. Представлены результаты оценки инфекционной активности пятого эмбрионального пассажа, средний титр log₁₀ЭИД₅₀ (ТИД₅₀) ± С.О. **Г.** Эффективность инфицирования клеток A549 рекомбинантными вирусными штаммами. Представлен средний процент инфицированных клеток для трех повторов ± С.О. **Д.** Количественное определение уровня IL1β в аллантоисной жидкости и клеточном супернатанте клеток MDCK, зараженных рекомбинантными вирусными штаммами, методом ИФА. **Е.** Удельная биологическая активность IL1β. Расчетное количество биологически активной формы IL1β, определенной в пролиферативном тесте с использованием репортерной системы HEK-Blue IL1β, в перерасчете на 1 пг IL1β, детектируемого методом ИФА. **Ж.** Репрезентативные изображения клеток A549, полученные методом флуоресцентной микроскопии. Серым цветом показаны результаты окрашивания белка NS1, выявленного с использованием Alexa Fluor 488 (488/509 нм). Увеличение ×40.

белок NS1 [11]. Для сборки вирусов использовали два варианта плазмиды, кодирующие модифицированный ген NS. В первом случае последовательность трансгена была вставлена после последовательности, кодирующей первые 124 аминокислоты белка NS1 вируса гриппа (NS124_SS_IL1b). Во втором варианте последовательность трансгена с сигнальным пептидом IgGk была вставлена перед последовательностью, кодирующей вирусный белок NS124, и была отделена от него сайтом 2A,

обеспечивающим ко-трансляционное разделение белков (IL1b_2A_NS124) (рис. 1А).

Для оценки генетической стабильности сохранения гетерологичной вставки в геномном сегменте NS рекомбинантные вирусные штаммы культивировали на протяжении пяти последовательных пассажей в системе РКЭ и оценивали стабильность сохранения вставки трансгена методом ОТ-ПЦР. Оба вирусных вектора были генетически стабильны, результаты ОТ-ПЦР

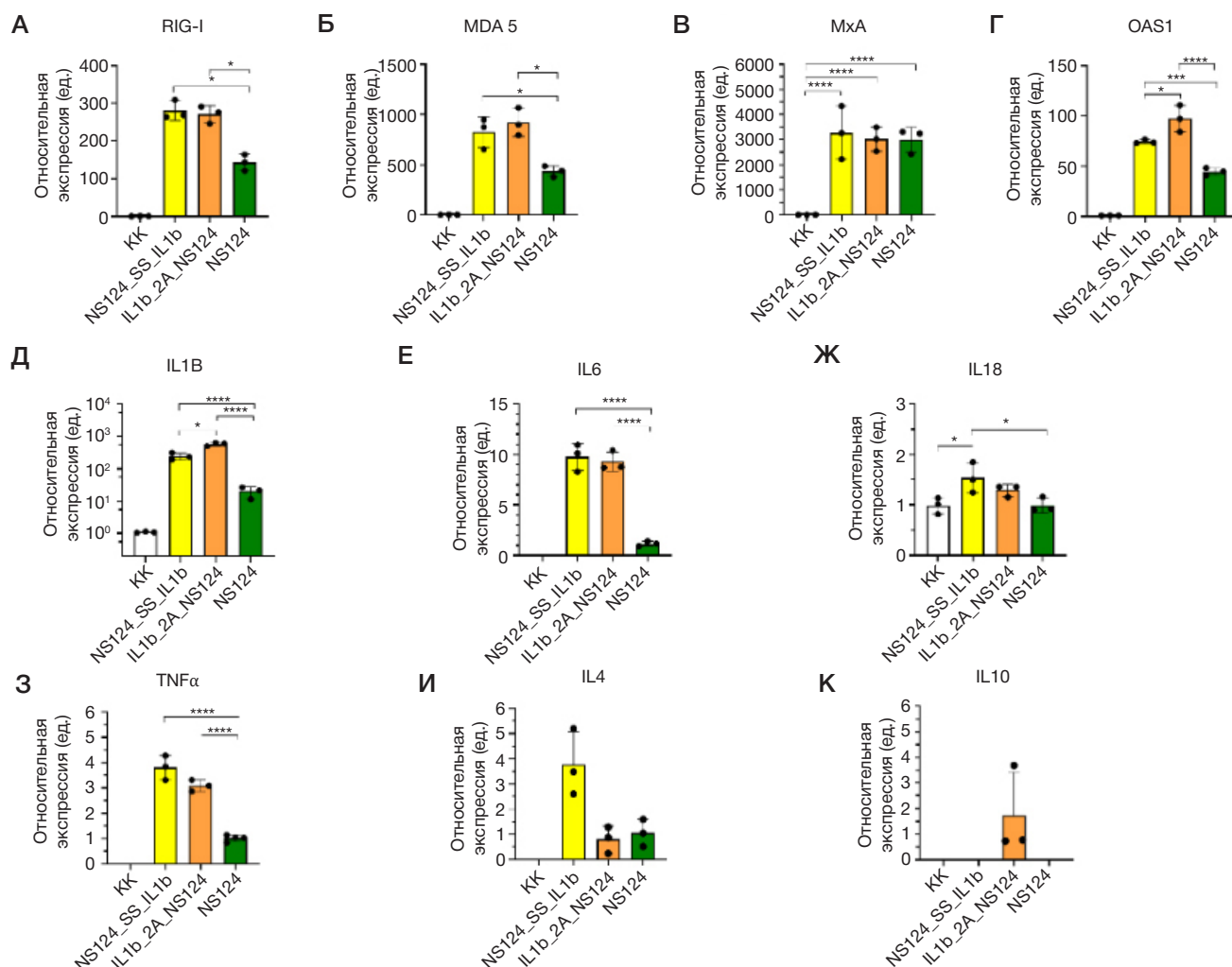


Рис. 2. Активация экспрессии внутриклеточных сенсоров (А, Б), противовирусных белков (В, Г) и цитокинов (Д–К) в клетках А549 в ответ на заражение рекомбинантными штаммами вируса гриппа, экспрессирующими IL1β. Относительная экспрессия матричной РНК (мРНК) представлена в виде средних значений для трех биологических повторов (столбики) и индивидуальных значений для каждого измерения (точки). Для оценки статистической значимости различий в нормализованных значениях ΔC_t использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Тьюки — для множественных сравнений (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$)

демонстрировали соответствие длины геномного сегмента NS рекомбинантных штаммов контрольным плазмидам на всех пассажах (рис. 1Б).

Репродуктивная активность рекомбинантных штаммов в системе РКЭ и на культуре клеток MDCK была сходна. Ростевые характеристики штамма NS124_SS_IL1b не отличались от показателей исходного гриппозного штамма с укороченным белком NS1, не несущего трансген, инфекционный титр достигал $8,0 (9,0) \log_{10}$ ТИД₅₀ (ЭИД₅₀)/мл и был достоверно выше (на $1-1,5 \log_{10}$), чем у рекомбинантного штамма IL1b_2A_NS124, экспрессирующего IL1β перед белком NS1 (рис. 1В). При этом способность инфицировать перmissive культуру у обоих рекомбинантных штаммов была сопоставима и не отличалась от исходного вируса без вставки. При заражении клеточного моноклона штаммами NS124_SS_IL1b, IL1b_2A_NS124 и NS124 в дозе 1,0 инфекционных единиц на клетку, доля зараженных клеток составила $83 \pm 3,5\%$, $75 \pm 8,0\%$ и $81 \pm 4,0\%$ соответственно (рис. 1Г).

Экспрессию цитокина определяли количественно с помощью ИФА в аллантоисной жидкости и супернатанте зараженных клеток MDCK. Экспрессия IL1β на культуре клеток и в эмбрионах была многократно выше для штамма IL1b_2A_NS124 ($38\,000 \pm 2000$ пг/мл; $28,0 \pm 2,0$ пг/мл), чем у штамма NS124_SS_IL1b (6400 ± 51 пг/мл; $1,4 \pm 0,21$ пг/мл)

(рис. 1Д). Для интерлейкин-содержащих проб аллантоиса была определена удельная биологическая активность цитокина с помощью репортерной системы HEK-Blue IL1β. Для штамма NS124_SS_IL1b доля биологически активной формы была выше ($10,0 \pm 2,61$ ME/пг), чем для IL1b_2A_NS124, у которого она составляла $2,8 \pm 0,56$ ME/пг (рис. 1Е). Тем не менее, общее количество биологически активной формы IL1β было выше у штамма IL1b_2A_NS124, по сравнению с NS124_SS_IL1b.

Методом иммунофлуоресценции было продемонстрировано, что вставка трансгена перед последовательностью белка NS1 у штамма IL1b_2A_NS124 не препятствовала экспрессии вирусного белка NS1 в зараженных клетках (рис. 1Ж).

Активация генов врожденного иммунного ответа рекомбинантными штаммами

Для рекомбинантных штаммов, экспрессирующих IL1β человека, на клетках линии А549 была проведена оценка активации экспрессии генов внутриклеточных сенсоров RIG-I и MDA5, противовирусных белков MxA и OAS1 и цитокинов IL1β, IL6, IL18, TNFα, IL4 и IL10 в ответ на инфицирование по сравнению с исходным гриппозным вектором, не имеющим вставки трансгена.

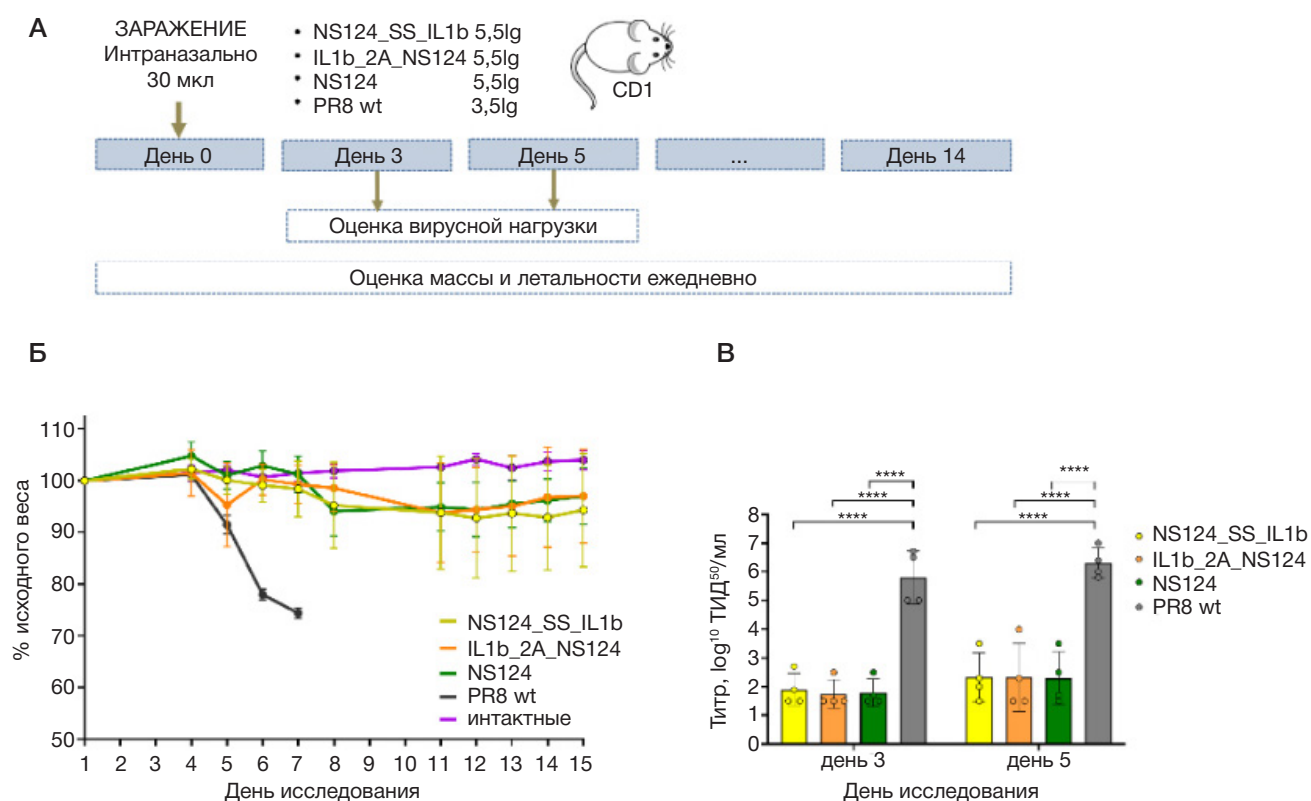


Рис. 3. Оценка безопасности рекомбинантных гриппозных штаммов, экспрессирующих IL1 β , при интраназальном введении мышам. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Динамика массы тела животных ($n = 5$ в группе) после интраназального введения рекомбинантных вирусов. **В.** Оценка вирусной нагрузки в тканях легких мышей на 3-й и 5-й дни после интраназального введения рекомбинантных вирусных штаммов, экспрессирующих IL1 β . Столбики обозначают среднее значение показателя для группы ($n = 4$) $\pm$ С.О., точки — индивидуальные значения показателя для каждого животного. Для оценки статистической значимости различий среднegrupповых значений использовали двухфакторный дисперсионный анализ, тест Даннета — для множественных сравнений с группой контроля PR8 wt (**** — $p < 0,0001$).

В целом рекомбинантные гриппозные штаммы IL1b_2A_NS124 и NS124_SS_IL1b демонстрировали схожие транскрипционные профили практически по всем исследованным генам. При этом данные профили статистически значимо отличались от таковых, индуцируемых пустым вектором NS124 (рис. 2).

Инфицирование рекомбинантными конструкциями сопровождалось повышением экспрессии IL1 β , уровень которого превышал контрольные значения более чем в 100 раз. Была также показана выраженная индукция экспрессии гена IL6 (повышение более чем в 10 раз) и гена TNF α (повышение в 3–4 раза) на достоверно более высоком уровне, чем при заражении клеток пустым вектором NS124.

Инфицирование клеток обоими рекомбинантными штаммами, так же как и пустым вектором, приводило к индукции экспрессии IL4. Уровень мРНК IL4 в случае штамма NS124_SS_IL1b был выше, однако статистически значимых отличий от двух других штаммов показано не было. Транскрипт IL10 был обнаружен только в случае заражения клеток рекомбинантным штаммом IL1b_2A_NS124.

При анализе компонентов системы распознавания патогенов в ответ на инфицирование клеток обоими рекомбинантными штаммами показано статистически значимое повышение уровней мРНК внутриклеточных сенсоров RIG-I и MDA5 относительно пустого вектора, что может указывать на усиление сигнальных путей, инициирующих врожденный противовирусный ответ.

В отношении интерферон-стимулируемых генов (ISG) было показано, что все гриппозные штаммы, независимо от наличия трансгена, активировали экспрессию генов MxA и OAS1, что согласуется с известной способностью вирусов гриппа с укороченным белком NS1 индуцировать

интерфероновый ответ. Для штаммов, несущих вставку IL1 β , показан достоверно более высокий уровень относительной экспрессии гена OAS1. В то время как уровень активации гена MxA не зависел от наличия в геноме вируса вставки, кодирующей IL1 β , и был сопоставим для всех вирусных штаммов.

Безопасность рекомбинантных гриппозных штаммов при интраназальном введении мышам

Поскольку сконструированные рекомбинантные векторы, экспрессирующие IL1 β , потенциально могут быть использованы для разработки вакцинных препаратов, одним из основных параметров являются их безопасность и сохранение аттенуированного фенотипа, обусловленного укорочением белка NS1 до 124 аминокислот. В связи с этим была проанализирована безопасность рекомбинантных штаммов по таким показателям, как снижение массы тела, летальность и вирусыведение инфекционного вируса из респираторного тракта животных (рис. 3А).

У животных, получивших оба рекомбинантных штамма, показано незначительное снижение массы тела, сопоставимое с показателями в группе животных, получивших пустой вектор (рис. 3Б). Летальность не была зафиксирована ни в одной из групп животных, получивших штаммы с укороченным NS1-белком, в то время как в группе вируса дикого типа к 7-му дню исследования летальность составила 100%. Уровень репликации рекомбинантных штаммов в тканях легких был низкий, сопоставимый с показателями для пустого вектора. Инфекционный титр вируса для обоих штаммов был достоверно ниже (в 10^4 раз) по сравнению с вирусом гриппа дикого типа (рис. 3В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе были сконструированы рекомбинантные вирусы гриппа на основе аттенуированного вируса с укороченным белком NS1, экспрессирующие IL1 β человека, отличающиеся локализацией трансгена. Показано, что встраивание трансгена в геном вируса приводит к дополнительной активации генов врожденного иммунного ответа, а положение вставки относительно открытой рамки считывания белка NS1 влияет на репродуктивные свойства штамма и уровень экспрессии целевого белка. При этом оба штамма сохраняли аттенуированный фенотип, поскольку экспрессия IL1 β не компенсировала дефект белка NS1 в подавлении иммунного ответа хозяина.

Оба полученных рекомбинантных штамма были генетически стабильны, что является важным параметром для производственных штаммов, однако различались по ростовым характеристикам. Штамм NS124_SS_IL1b сохранял ростовые характеристики, сопоставимые с пустым вектором, в то время как репликативные свойства штамма IL1b_2A_NS124 были ниже на 1,0–1,5 $\log_{10}$. Снижение ростовых свойств штамма IL1b_2A_NS124 может быть обусловлено ко-трансляционной экспрессией трансгена, поскольку в данной конструкции синтез IL1 β и белка NS1 происходит как единый полипротеин с последующим расщеплением по сайту 2A, что может создавать стерические препятствия или влиять на кинетику сборки вирионов. При этом было показано, что встраивание трансгена не препятствовало инфицированию перmissive клеток, а также не снижало уровня экспрессии самого белка NS1.

Показано, что порядок встраивания трансгена в геном гриппозного вектора имеет важное значение для уровня экспрессии последнего [12]. Более высокий уровень продукции IL1 β был показан для штамма IL1b_2A_NS124. Полученные результаты могут объясняться тем, что в конструкции штамма IL1b_2A_NS124 трансген располагается перед последовательностью белка NS1, в результате чего может обеспечиваться его более эффективная трансляция, обусловленная ранним доступом к рибосоме и отсутствием вторичных структур, связанных с вирусной РНК. Несмотря на то что удельная биологическая активность IL1 β (МЕ/пг) была выше в случае штамма NS124_SS_IL1b, общее количество функционально активного цитокина было больше для штамма IL1b_2A_NS124. Это позволяет предположить, что положение вставки трансгена может влиять не только на количественную продукцию белка, но и на посттрансляционные модификации и процессинг зрелой формы IL1 β [8].

Анализ уровня экспрессии генов врожденного иммунного ответа на клетках A549 в ответ на инфицирование рекомбинантными штаммами показал качественно схожие профили активации для обеих конструкций, которые при этом достоверно отличались от показателей, в ответ на инфицирование пустым вектором NS124. Инфицирование клеток рекомбинантными штаммами NS124_SS_IL1b и IL1b_2A_NS124 приводило к повышению уровней мРНК внутриклеточных сенсоров RIG-I и MDA5, что согласуется с концепцией перекрестного взаимодействия между воспалительными сигнальными путями и системой распознавания патогенов. Активация RIG-I/MDA5 пути может усиливать положительную

обратную связь, улучшающую способность клеток детектировать генетический материал вируса и инициировать каскад интерфероновой ответа [13]. Активация экспрессии интерферон-стимулируемых генов в ответ на заражение рекомбинантными штаммами, экспрессирующими IL1 β , и пустым вектором NS124, была различна. Так, все штаммы, в том числе и пустой вектор, активировали экспрессию MxA на сопоставимом уровне, что отражает известную способность вирусов с укороченным белком NS1 индуцировать интерфероновый ответ. Уровень экспрессии OAS1 был достоверно выше для конструкций, экспрессирующих IL1 β . Данное отличие демонстрирует, что IL1 β способен избирательно модулировать определенные ветви ISG-ответа, возможно через сигнальные пути, ассоциированные с NF- κ B или MAPK, которые являются мишенями для сигналинга рецептора IL1 [14]. Дополнительное усиление экспрессии OAS1 может иметь физиологическое значение, поскольку белок OAS1 непосредственно участвует в деградации вирусной РНК через активацию рибонуклеазы L, что может более эффективно ограничивать репликацию вируса на ранних стадиях инфекции, обеспечивая вирусу аттенуированный фенотип [15].

Поскольку IL1 β является не только иммуностимулятором, но и пирогенным фактором, необходимо было оценить сохранение аттенуированного фенотипа рекомбинантных штаммов с целью определения возможности их использования в качестве живых вакцинных штаммов. В ходе исследования было показано, что встраивание IL1 β в качестве трансгена в гриппозный вектор NS124 не нарушает аттенуированный фенотип, обусловленный делецией белка NS1. В респираторном тракте мышей оба рекомбинантных штамма NS124_SS_IL1b и IL1b_2A_NS124 демонстрировали низкий уровень репликации, схожий с пустым вектором и достоверно более низкий, чем у вируса дикого типа. Несмотря на ограниченную репликацию, обусловленную делецией NS1, добавление IL1 β , как показано в экспериментах *in vivo*, потенцирует активацию врожденного иммунитета, это позволяет предположить, что даже при низкой вирусной нагрузке экспрессия трансгена может обеспечить усиление адаптивного иммунного ответа без повышения реактогенности, ассоциированной с высокой репликацией живых вирусов. Для подтверждения данного предположения будут проведены исследования иммуногенности и протективной активности рекомбинантных штаммов *in vivo*. В целом, полученные нами данные согласуются с более ранними исследованиями, показавшими эффективность встраивания цитокинов (IL15, IL2 или CXCL10) в геном вируса гриппа с целью усиления иммуногенности [16–18].

ВЫВОДЫ

Полученные данные свидетельствуют, что встраивание иммуномодулирующей молекулы IL1 β в геном аттенуированного вируса гриппа способно модулировать врожденный иммунный ответ и является возможной стратегией для создания живых вакцинных кандидатов с усиленной иммуногенностью без ущерба для их безопасного профиля. Однако в силу ограничений модели *in vitro* для определения клинической значимости и безопасности данного подхода необходима его дальнейшая апробация на животных моделях с оценкой воспроизводимости эффекта.

Литература

- Zhang H, Wang L, An Y, Chen Z. The applications of live attenuated influenza a virus with modified NS1 gene. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2025; 36 (1): 102471.
- García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*. 1998; 252 (2): 324–30.
- Zhang H, Floyd K, Fang Z, Hoffmann FA, Lee A, Froggatt HM, et al. Mucosal vaccination in mice provides protection from diverse respiratory threats. *Science*. 2026; eaea1260.
- Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol*. 2005; 86 (Pt 1): 185–95.
- Gwinn WM, Kirwan SM, Wang SH, Ashcraft KA, Sparks NL, Doil CR, et al. Effective induction of protective systemic immunity with nasally administered vaccines adjuvanted with IL-1. *Vaccine*. 2010; 28 (42): 6901–14.
- Lapiente D, Ruzsics Z, Thirion C, Tenbusch M. Evaluation of adenovirus 19a as a novel vector for mucosal vaccination against influenza A viruses. *Vaccine*. 2018; 36 (19): 2712–20.
- Hailey KL, Li S, Andersen MD, Roy M, Woods VLJ, Jennings PA. Pro-interleukin (IL)-1beta shares a core region of stability as compared with mature IL-1beta while maintaining a distinctly different configurational landscape: a comparative hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry study. *J Biol Chem*. 2009; 284 (38): 26137–48.
- Pulkina A, Vasilyev K, Muzhikyan A, Sergeeva M, Romanovskaya-Romanko E, Shurygina AP, et al. IgGκ Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (14).
- Dittmann M, Hoffmann HH, Scull MA, Gilmore RH, Bell KL, Ciancanelli M, et al. A serpin shapes the extracellular environment to prevent influenza a virus maturation. *Cell [Internet]*. 2015; 160 (4): 631–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.040>.
- Oleinik V, Plotnikova M, Yolshin N, Romanovskaya-Romanko E. Development and approbation of a quantitative PCR system for studying the expression of endosomal receptors and cytosolic nucleic acid sensors in mice. *Med Acad journal*. 2025; 1 (1): 90–100.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (11): 6108–13.
- Yildiz S, El Zahed SS, Villalón-Letelier F, Wang Q, Yelleswarapu S, Dawodu G, et al. Re-engineering segment 8 facilitates generation of a versatile live-attenuated influenza A virus vector platform for secretory protein delivery. *J Virol*. 2026; 100 (5): e0034726.
- Gaudino M, Lion A, Sagné E, Nagamine B, Oliva J, Terrier O, et al. The Activation of the RIG-I/MDA5 Signaling Pathway upon Influenza D Virus Infection Impairs the Pulmonary Proinflammatory Response Triggered by *Mycoplasma bovis* Superinfection. *J Virol*. 2023; 97 (2): e0142322.
- Lin CC, Kuo CT, Cheng CY, Wu CY, Lee CW, Hsieh HL, et al. IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal*. 2009; 21 (11): 1652–62.
- Harioudh MK, Perez J, Chong Z, Nair S, So L, McCormick KD, et al. Oligoadenylate synthetase 1 displays dual antiviral mechanisms in driving translational shutdown and protecting interferon production. *Immunity*. 2024; 57 (3): 446–461.e7.
- van Rikxoort M, Michaelis M, Wolschek M, Muster T, Egorov A, Seipelt J, et al. Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36506.
- Ozhireleva O, Mustafaeva A, Pulkina A, Plotnikova M, Shuklina M, Shurygina AP, et al. A CXCL10-Expressing Influenza Vector Induces Robust Adaptive Immunity Despite Strong Attenuation. *Pharmaceutics*. 2026; 18 (6).
- Kittel C, Ferko B, Kurz M, Voglauer R, Sereinig S, Romanova J, et al. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol*. 2005; 79 (16): 10672–7.
- Zhang H, Wang L, An Y, Chen Z. The applications of live attenuated influenza a virus with modified NS1 gene. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2025; 36 (1): 102471.
- García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*. 1998; 252 (2): 324–30.
- Zhang H, Floyd K, Fang Z, Hoffmann FA, Lee A, Froggatt HM, et al. Mucosal vaccination in mice provides protection from diverse respiratory threats. *Science*. 2026; eaea1260.
- Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol*. 2005; 86 (Pt 1): 185–95.
- Gwinn WM, Kirwan SM, Wang SH, Ashcraft KA, Sparks NL, Doil CR, et al. Effective induction of protective systemic immunity with nasally administered vaccines adjuvanted with IL-1. *Vaccine*. 2010; 28 (42): 6901–14.
- Lapiente D, Ruzsics Z, Thirion C, Tenbusch M. Evaluation of adenovirus 19a as a novel vector for mucosal vaccination against influenza A viruses. *Vaccine*. 2018; 36 (19): 2712–20.
- Hailey KL, Li S, Andersen MD, Roy M, Woods VLJ, Jennings PA. Pro-interleukin (IL)-1beta shares a core region of stability as compared with mature IL-1beta while maintaining a distinctly different configurational landscape: a comparative hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry study. *J Biol Chem*. 2009; 284 (38): 26137–48.
- Pulkina A, Vasilyev K, Muzhikyan A, Sergeeva M, Romanovskaya-Romanko E, Shurygina AP, et al. IgGκ Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (14).
- Dittmann M, Hoffmann HH, Scull MA, Gilmore RH, Bell KL, Ciancanelli M, et al. A serpin shapes the extracellular environment to prevent influenza a virus maturation. *Cell [Internet]*. 2015; 160 (4): 631–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.040>.
- Oleinik V, Plotnikova M, Yolshin N, Romanovskaya-Romanko E. Development and approbation of a quantitative PCR system for studying the expression of endosomal receptors and cytosolic nucleic acid sensors in mice. *Med Acad journal*. 2025; 1 (1): 90–100.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (11): 6108–13.
- Yildiz S, El Zahed SS, Villalón-Letelier F, Wang Q, Yelleswarapu S, Dawodu G, et al. Re-engineering segment 8 facilitates generation of a versatile live-attenuated influenza A virus vector platform for secretory protein delivery. *J Virol*. 2026; 100 (5): e0034726.
- Gaudino M, Lion A, Sagné E, Nagamine B, Oliva J, Terrier O, et al. The Activation of the RIG-I/MDA5 Signaling Pathway upon Influenza D Virus Infection Impairs the Pulmonary Proinflammatory Response Triggered by *Mycoplasma bovis* Superinfection. *J Virol*. 2023; 97 (2): e0142322.
- Lin CC, Kuo CT, Cheng CY, Wu CY, Lee CW, Hsieh HL, et al. IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal*. 2009; 21 (11): 1652–62.
- Harioudh MK, Perez J, Chong Z, Nair S, So L, McCormick KD, et al. Oligoadenylate synthetase 1 displays dual antiviral mechanisms

- in driving translational shutdown and protecting interferon production. *Immunity*. 2024; 57 (3): 446–461.e7.
16. van Rikxoort M, Michaelis M, Wolschek M, Muster T, Egorov A, Seipelt J, et al. Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36506.
17. Ozhereleva O, Mustafaeva A, Pulkina A, Plotnikova M, Shuklina M, Shurygina AP, et al. A CXCL10-Expressing Influenza Vector Induces Robust Adaptive Immunity Despite Strong Attenuation. *Pharmaceutics*. 2026; 18 (6).
18. Kittel C, Ferko B, Kurz M, Voglauer R, Sereinig S, Romanova J, et al. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol*. 2005; 79 (16): 10672–7.