

КОТОМИНА

Татьяна Сергеевна

**ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ГРИППА КАК
ПЛАТФОРМА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЕКТОРНЫХ
ВАКЦИН НА МОДЕЛИ РЕСПИРАТОРНО-
СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА**

1.5.10 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины»

Научный руководитель: доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
Исакова-Сивак Ирина Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, заведующая лабораторией клеточной инженерии отдела молекулярной вирусологии и противовирусных препаратов подразделения института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
Масалова Ольга Владимировна

доктор медицинских наук, заведующая лабораторией разработки методов генной терапии центра постгеномных технологий ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
Богословская Елена Владимировна

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Защита диссертации состоится 24 октября 2023 г. в 13 часов 00 минут на заседании Диссертационного совета Д 21.1.017.01, созданного на базе ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава РФ по адресу: 197376, РФ, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17, тел. (812) 499 15 04, e-mail: sovet@influenza.spb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава РФ и на сайте <https://www.influenza.spb.ru/>
Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 21.1.017.01
кандидат биологических наук

Амосова. И.В.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Разработка эффективных и безопасных вакцин против широкого спектра инфекционных заболеваний, наносящих существенный социально-экономический ущерб, как в развитых, так и в развивающихся странах, остается одним из приоритетных направлений исследований в настоящее время. Вакцинация населения является экономически оправданной мерой общественного здравоохранения [Rodrigues and Plotkin, 2020]. По экспертным оценкам, благодаря использованию вакцин удается ежегодно избежать около 6 млн. смертей [Ehreth, 2003]. С помощью вакцинации удалось ограничить распространение таких серьезных заболеваний как корь, эпидемический паротит, краснуха, гепатит В, оспа, полиомиелит, желтая лихорадка. Вакцины против новой коронавирусной инфекции, вызвавшей пандемию COVID-19, также позволили спасти миллионы жизней во всем мире [Shao et al., 2022]. Однако попытки создания вакцин классическими общепринятыми методами против возбудителей малярии, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса герпеса, лихорадки денге, вирусных гепатитов, а также ряда острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), не увенчались успехом. Новые альтернативные технологии создания вакцин сфокусированы на целенаправленной стимуляции иммунного ответа против конкретного, наиболее иммуногенного вирусного антигена, при этом правильную презентацию нужного антигена клеткам иммунной системы могут обеспечить векторные системы доставки чужеродного генетического материала в клетки-мишени [Liu, 2010]. Благодаря включению в состав векторных вакцин чужеродных антигенов может стимулироваться как гуморальное, так и клеточное звено иммунного ответа к целевому патогену, что снижает тяжесть заболевания, а также формирует иммунологическую память организма на заданный антиген [Pollard and Bijker, 2021]. К настоящему моменту большое число различных вирусов уже были изучены в качестве векторов, например, вирусы семейств Poxviridae, Adenoviridae, Togaviridae, Picornaviridae, Herpesviridae и др. [Sasso et al., 2020; Vrba et al., 2020]. Несмотря на достоинства, у этих платформ имеются определенные недостатки, которые ограничивают универсальность их использования. Например, к некоторым вирусным векторам выявляется предрасполагающий иммунитет, что препятствует индукции иммунного ответа к чужеродному антигену в составе векторной вакцины [Lasaga and Ertl, 2009]. Для создания векторной вакцины против различных возбудителей ОРВИ перспективными вирусными векторами являются аттенуированные вирусы гриппа, которые имеют ряд преимуществ перед другими вирусами. Во-первых, данные вирусы в составе живой гриппозной вакцины (ЖГВ) стимулируют выработку гуморального и клеточного иммунного ответа без использования адьювантов, и уже многие годы их используют в качестве эффективного средства профилактики сезонного гриппа. Во-вторых, обладают удобным способом введения и выпускаются в виде назального спрея. В-третьих, антигенными свойствами вируса гриппа легко манипулировать, тем самым решая проблему предрасполагающего иммунитета у населения. В-четвертых, для подготовки штаммов ЖГВ разработана обратная-генетическая система, позволяющая в короткий срок получать рекомбинантные вакцинные вирусы при помощи стандартных генно-инженерных методов. Благодаря уникальной высокой антигенной изменчивости и особенностям эпидемиологии вируса гриппа А, возможно создание иммуногенных векторных конструкций на основе ЖГВ, которые будут стимулировать как иммунитет к целевому антигену, так и поддерживать иммунологическую память к высококонсервативным антигенам вируса гриппа А. В настоящее время существует налаженное производство ЖГВ как в России, так и в зарубежных странах, а также отработаны ежегодные кампании по вакцинации населения.

Включение в состав такой вакцины иммуногенных компонентов других возбудителей ОРВИ позволит проводить сочетанную иммунизацию против ОРВИ различной этиологии, при этом не требуя дополнительных затрат на производство вакцины. Учитывая постоянную циркуляцию в популяции сезонных возбудителей ОРВИ, а также периодическое появление новых респираторных вирусов с пандемическим потенциалом, разработка безопасных и эффективных комбинированных векторных вакцин является актуальным и своевременным исследованием.

Степень разработанности темы исследования. В рамках данного исследования в качестве вируса-мишени для создания векторной вакцины на основе холодаадаптированного вируса гриппа был выбран респираторно-синцитиальный вирус (РСВ). Респираторно-синцитиальная инфекция сопровождается тяжелыми пневмониями и бронхолитами. По экспертным оценкам в 2019 году около 3,6 млн детей в возрасте от 0 до 5 лет погибло в мире по причине РСВ и примерно 1,4 млн из них это дети в возрасте от 0 до 6 месяцев [Li et al., 2022]. На протяжении многих десятилетий предпринимались попытки создания эффективной и безопасной вакцины против РСВ, используя разные подходы, включая классические и инновационные. Так, в 60-х годах были проведены крупномасштабные испытания формалин-инактивированной вакцины против РСВ (ФИ-РСВ) на детях с участием разных возрастных групп. В последующий за вакцинацией зимний период (1966-67) в группе, получившей ФИ-РСВ, 80% детей заболели РС инфекцией, двое младенцев погибли [Kim et al., 1969]. В этой связи к новым вакцинам от РС инфекции предъявляются особые требования к безопасности, включающие обязательное доказательство отсутствия вакцин-индуцируемого усиления заболевания при последующем контакте привитого с РС вирусом. В 80-х годах под руководством Н.П.Лещинской разрабатывали живую аттенуированную вакцину путем холодовой адаптации РС вируса. При проведении клинических испытаний этой вакцины не был достигнут баланс между достаточным уровнем аттенуации и высокой иммуногенностью, и при этом РСВ-специфические антитела циркулировали у привитых лиц непродолжительное время [Лещинская, 1982].

В настоящее время разрабатываются рекомбинантные белковые РС вакцины, вакцины на основе вирусоподобных частиц или субъединичные вакцины, включающие белок слияния F РС вируса, а также белок прикрепления G, к которым могут вырабатываться нейтрализующие антитела. Трудоемкость производственного процесса, высокая стоимость и необходимость использования адъювантов значительно снижают возможности широкого использования данных технологий. Преодолеть эти трудности можно с использованием подходящих вирусных векторов для доставки ключевых иммуногенных эпитопов РСВ в клетки-мишени. Впервые ученые из Государственного Университета штата Джорджия (Атланта, США) сконструировали рекомбинантный вирус гриппа, в гемагглютинин которого был интегрирован фрагмент F₂₄₃₋₂₉₄ РС вируса [Lee et al., 2015]. В состав этой полиэпитопной кассеты входит антигенный сайт II белка F РС вируса, и интраназальная иммунизация мышей приводила к выработке нейтрализующих анти-РСВ антител, защищая животных от РС-индуцированной бронхопневмонии. Этой же группой ученых была подготовлена аналогичная вакцина, экспрессирующая G белок РСВ в составе молекулы гемагглютинина (HA) вируса гриппа, которая также показала защитный потенциал в отношении РС инфекции в экспериментах на мышах [Jung et al., 2020]. Однако указанные экспериментальные вакцинные кандидаты были созданы на основе штамма A/PR/8/34 (H1N1), не несущего дополнительных маркеров аттенуации, что не позволяет рекомендовать их для тестирования конечной вакцины на людях. Более перспективной стратегией конструирования

рекомбинантных векторных вакцин является использование штаммов лицензированной ЖГВ в качестве вирусных векторов.

Помимо индукции нейтрализующих антител, важным звеном защитного иммунного ответа против вирусных инфекций является цитотоксический $CD8^+$ Т-клеточный иммунный ответ [Schmidt and Varga, 2018]. В то время как В-клетки и антитела обычно распознают эпитопы, которые находятся в составе поверхностных белков вируса, Т клетки могут распознавать эпитопы не только поверхностных, но и внутренних белков вирионов, которые по своей природе являются более консервативными среди антигенно-удаленных вариантов вирусов. Для РС вируса описан феномен усиления инфекции при избыточной индукции системных $CD8^+$ Т-клеток памяти, специфичных эпитопу M2₈₂ РСВ, что указывает на необходимость соблюдения осторожности при разработке вакцин против РСВ на основе Т-клеток [Schmidt et al., 2018]. Важно отметить, что Schmidt с соавт. продемонстрировали, что иммунизация эпитопом M2₈₂ РСВ, доставленным непосредственно в ткани легких с использованием рекомбинантного вируса гриппа, приводила к образованию локализованных в легких РСВ-специфических $CD8^+$ Т-клеток памяти (тканерезидентных Т-клеток памяти, tissue resident memory, T_{RM}), связанных со снижением иммунопатологии после заражения РС вирусом [Schmidt et al., 2018]. Известно, что живые гриппозные вакцины, в отличие от инактивированных, способны вызывать образование субпопуляции T_{RM} клеток, которые локализуются в тканях респираторного тракта и при последующем контакте с патогенном немедленно активируют эффекторные функции и в кратчайшие сроки останавливают распространение инфекции непосредственно в очаге её возникновения [Zens et al., 2016]. Соответственно, при разработке векторных вакцин на основе аттенуированных вирусов гриппа, направленных на индукцию Т-клеточного ответа к целевому патогену, необходимо оценить способность рекомбинантных вирусов гриппа вызывать образование субпопуляций T_{RM} клеток, специфичных как к эпитопам вируса гриппа, так и к встроенным Т-клеточным эпитопам другого вируса.

Цель данного исследования – разработка подходов к созданию векторных вакцин на основе холодаадаптированного штамма вируса гриппа, направленных на защиту против других респираторных вирусов, на примере респираторно-синцитиального вируса. Для достижения указанной цели были определены следующие **задачи**:

1. Провести анализ В- и Т-клеточных эпитопов, входящих в состав белков респираторно-синцитиального вируса, и смоделировать полиэпитопные кассеты РСВ для интегрирования в геном аттенуированного вируса гриппа;
2. Разработать стратегии встраивания чужеродной генетической информации в геном вакцинного вируса гриппа с сохранением функциональной активности белков вируса-вектора;
3. Сконструировать рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ, кодирующие полиэпитопные кассеты РСВ, и изучить их генетическую стабильность и фенотипические свойства в системе *in vitro*;
4. Оценить иммуногенность и протективную активность рекомбинантных векторных вакцин в отношении вируса гриппа и в отношении РС вируса в эксперименте на мышах;
5. Дать оценку показателям иммунного статуса и гистопатологических изменений в структуре легочной ткани у иммунизированных сконструированными рекомбинантными вакцинными штаммами мышей после заражения РС вирусом, в сравнении с состоянием ФИ-РСВ-индуцированной легочной патологии

Научная новизна

1. На примере респираторно-синцитиального вируса разработан комплексный подход к выбору В- и Т-клеточных эпитопов для включения в состав векторной вакцины на основе штамма ЖГВ.
2. Впервые холодоадаптированные штаммы вируса гриппа использованы в качестве вектора для доставки чужеродных антигенов в клетки-мишени. Апробированы три стратегии по встраиванию целевых генетических конструкций в гены гемагглютинаина, нейраминидазы и неструктурного белка NS1 вируса гриппа.
3. Доказано, что химерные аттенуированные вирусы гриппа, несущие дополнительные антигены другого вируса, сохраняют способность к активной репликации в основных системах культивирования. Встраивание чужеродной генетической информации в гены НА, NA и NS1 вакцинного штамма ЖГВ не нарушает температурочувствительный фенотип вируса – наиболее важную характеристику, связанную с безвредностью вакцины для привитых.
4. Впервые продемонстрировано отсутствие негативного влияния встроенных чужеродных эпитопов РСВ на иммуногенные и протективные свойства рекомбинантных вакцинных штаммов в отношении вируса гриппа.
5. Впервые для конструирования векторной вакцины была использована полиэпитопная Т-клеточная кассета, включающая отдельные иммуногенные эпитопы M2-1 белка РС вируса, а не полноразмерный белок M2-1. Доказано, что иммунизация вакцинными кандидатами ЖГВ-РСВ приводит к образованию РСВ-специфических CD8⁺ Т клеток, обладающих выраженной цитотоксической активностью в отношении целевого эпитопа *in vivo*.
6. Впервые показана способность РСВ эпитоп-специфических CD8⁺ Т клеток, образованных в ответ на иммунизацию векторной вакциной, в кратчайшие сроки элиминировать РС вирус из организма инфицированных мышей, при этом не вызывая развития бронхолегочной патологии, свойственной формалин-инактивированной РСВ вакцине.
7. Впервые показано, что иммунизация Т-клеточной векторной вакциной, не реплицирующейся в тканях легких, вызывает образование тканерезидентных Т клеток памяти (tissue-resident memory T cells, T_{RM}) к встроенному иммунодоминантному CD8⁺ Т-клеточному эпитопу; при этом также увеличивается соответствующая популяция T_{RM} клеток, специфичных вирусу гриппа.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Настоящее исследование направлено на разработку универсальной платформы для создания комбинированных вакцинных препаратов против различных возбудителей ОРВИ. В качестве такой платформы для создания векторных вакцин используются аттенуированные вирусы гриппа, широко применяемые в качестве живых гриппозных вакцин во всем мире. В работе в качестве proof-of-concept впервые в мире была сконструирована панель рекомбинантных штаммов холодоадаптированного вируса гриппа, несущих перспективные В- и Т-клеточные эпитопы респираторно-синцитиального вируса, который вызывает пневмонии и бронхиолиты у людей разных возрастов. Уже около 60 лет проводят исследования по созданию вакцины против РС вируса с применением различных стратегий. Однако, несмотря на то, что большое количество вакцинных кандидатов находятся на разных этапах углубленных доклинических и клинических исследований, долгое время ни один из вариантов не мог получить разрешение на применение в практике здравоохранения. В 2023 году FDA (Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством

пищевых продуктов и медикаментов США) одобрило субъединичные вакцины Aгexvu (GlaxoSmithKline, Великобритания) и Abyrsvo (RSVpreF) (Pfizer, США) для профилактики РС инфекции у людей старше 60 лет.

Разработанный в диссертационном исследовании комплексный подход к выбору иммуногенных эпитопов респираторных вирусов и их инкорпорированию в геном вакцинного штамма ЖГВ открывает перспективы создания векторных вакцин против любых циркулирующих или вновь возникающих респираторных вирусов человека. В частности, фундаментальные принципы конструирования векторных вакцин, сформулированные в диссертационном исследовании, были применены для создания бивалентной векторной вакцины от гриппа и новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, вызвавшей пандемию COVID-19 в 2020 году [Isakova-Sivak et al., 2022].

Методология и методы исследования

Настоящее исследование было организовано в соответствии с системой методов и технических приемов в рамках современной вирусологии и иммунологии. В качестве объекта исследования выступает ряд рекомбинантных аттенуированных вирусов гриппа, кодирующих В- и Т-клеточные эпитопы РСВ. Работа выполнена с использованием комплекса биоинформационных, молекулярно-генетических, генно-инженерных, вирусологических и иммунологических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. На примере респираторно-синцитиального вируса показана принципиальная возможность создания поливалентных векторных вакцин против различных респираторных вирусов путем инкорпорирования потенциальных В- и Т-клеточных эпитопов целевых вирусов в различные участки генома вакцинного штамма живой гриппозной вакцины.

2. В геноме вакцинного штамма ЖГВ могут быть закодированы полиэпитопные кассеты целевых вирусов размером более 65 а.о. без нарушения основных биологических свойств вакцинных вирусов гриппа, таких как репликативная активность в стандартных системах культивирования, чувствительность к повышенным температурам инкубации (*ts* фенотип), безвредность для лабораторных животных, а также иммуногенность и защитная эффективность в отношении гриппозной инфекции.

3. Перспективной стратегией для конструирования векторных вакцин против РСВ является инкорпорирование ключевых Т-клеточных эпитопов РС вируса в геном аттенуированного вируса гриппа. Интраназальная вакцинация мышей такими вакцинами вызывает индукцию высоких уровней эпитоп-специфических CD8⁺ Т клеток с выраженной цитотоксической активностью, которые обеспечивают защиту иммунизированных мышей от заражения естественной РСВ инфекцией, при этом не вызывая развития бронхолегочной патологии, свойственной формалин-инактивированной вакцине против РСВ.

Личный вклад автора

На основе анализа эпитопов РСВ из базы данных Immune Epitope Database (IEDB), проведенного Кореньковым Д.А. совместно с автором, были отобраны полиэпитопные кассеты для включения в состав векторной вакцины на основе холодоадаптированного штамма ЖГВ. С использованием методов обратной генетики автор лично получила все рекомбинантные вирусы гриппа, кодирующие в своем геноме отобранные фрагменты РСВ, а также провела анализ экспрессии встроенных эпитопов РСВ и оценку фенотипических свойств химерных вирусов в системе *in vitro*. Оценка иммуногенности и протективной активности векторных вакцин в экспериментах на мышах была проведена автором совместно с к.б.н. Кореньковым Д.А., Матюшенко В.А., а также коллективом исследователей под

руководством профессора Sang-Moo Kang (Государственный университет штата Джорджия, Атланта, США). Автор лично обработала все полученные экспериментальные данные, интерпретировала результаты исследований и провела сравнение с данными, описанными в литературе.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность диссертационного исследования основана на оценке результатов, полученных при проведении серии повторяемых экспериментов. При обработке данных использовали статистические методы и критерии в программном обеспечении Statistica (StatSoft Power Solutions, Inc.) и GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc).

Результаты диссертационного исследования были представлены на 8 российских и крупнейших международных конференциях медико-биологического и вирусологического профиля: «OPTIONS IX for the Control of Influenza» (г. Чикаго, США, 2016), «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (г. Санкт-Петербург, РФ, 2016), «2nd International meeting on respiratory pathogens» (г. Сингапур, респ. Сингапур, 2017), «Influenza 2018» (г. Оксфорд, Великобритания, 2018), «OPTIONS X for the Control of Influenza» (г. Сингапур, респ. Сингапур, 2019), «The 1st ISIRV International Influenza Vaccine Meeting - Immunological Assays and Correlates of Protection for Next Generation Influenza Vaccines», (г. Сиена, Италия, 2019), «XII Ежегодный Всероссийский интернет-конгресс по инфекционным болезням с международным участием» (г. Москва, 2020) и «IV Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике»» (г. Санкт-Петербург, 2023).

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликовано 16 печатных работ, из которых 6 научных статей, входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus, и 8 тезисов докладов на отечественных и международных научных конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа содержит введение, основную часть, включающую обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и приложения. Работа изложена на 161 странице машинописного текста. Включает 4 таблицы и 30 рисунков. Список цитируемой литературы включает 376 источника, из них 4 отечественных.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмидные ДНК. Гены, кодирующие внутренние белки штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), были ранее клонированы в вектор для обратной генетики вируса гриппа рCIPolISapIT [Isakova-Sivak et al., 2011]. Для конструирования экспериментальных вакцинных штаммов использовали гены гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) потенциально пандемического штамма А/Anhui/1/2013 (H7N9), закодированные в векторе рCIPolISapIT [Stepanova et al., 2019].

Клеточные линии. В работе использовали клеточную линию из эпидермоидной карциномы гортани человека HEp-2 (ATCC CCL 23), приобретенную в ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург, РФ), клеточную линию из эпителия почки собаки MDCK (ATCC CCL-34) и клеточную культуру из клетки почки африканской зеленой мартышки Vero (ATCC CCL-81).

Вирусы. В работе использовали штамм A2 респираторно-синцитиального вируса из коллекции штаммов вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморозина» Минздрава РФ. Патогенный для мышей вирус гриппа A/Shanghai/2/2013 (H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A (H7N9-PR8) был предоставлен Центром по контролю за заболеваемостью (CDC, Атланта, США).

Гены, кодирующие эпитопы РСВ. Генетические конструкции, соответствующие целевым антигенам РСВ-F (аминокислотные остатки 243-294) и РСВ-M2-1 (аминокислотные остатки 70-101 и 114-146), были химически синтезированы и клонированы в вектор pAL2-T компанией «Евроген» (Москва, Россия).

Пептиды. M2-1₈₂₋₉₀ (SYIGSINNI) и M2-1₁₂₆₋₁₄₅ (RVYNTVISYIESNRKNNKQT) M2-1 белка РС вируса были химически синтезированы ООО «Альмабион» (Воронеж, Россия).

Животные. В экспериментах использовали самок мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель либо из филиала питомника «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Столбовая, Московская область, РФ), либо из питомника Charles River Laboratories (Уилмингтон, США). Все этапы *in vivo* экспериментов были согласованы с локальным этическим Комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/19 от 25.04.2019) и институциональным Комитетом по уходу и использованию животных государственного университета штата Джорджия IACUC (Атланта, США).

Конструирование химерных генов вируса гриппа осуществляли с использованием стандартных методов генной инженерии, включающих полимеразную цепную реакцию (ПЦР), внесение сайтов рестрикции с помощью перекрывающейся (*overlap*) ПЦР, рестрикцию, лигирование, трансформацию бактерий *E.coli* плазмидной ДНК. Нуклеотидные последовательности всех генов подтверждали с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 3130xl (Applied Biosystems, США) и набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1.

Рекомбинантные вирусы гриппа получали методом электропорации культуры клеток Vero набором плазмид, несущих все заданные гены вируса, с использованием электропоратора Neon® (Invitrogen, США) в режиме двух импульсов 1150 В по 20 мс. Жизнеспособные вирусы гриппа накапливались в 10-11 дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) при оптимальной температуре инкубации 33°C.

Оценку генетической стабильности вставок в составе экспериментальных вакцинных штаммов проводили путем последовательного культивирования (до 5-10 пассажей) в системе РКЭ. Анализ нуклеотидных последовательностей генов, содержащих вставки эпитопов РСВ, проводили методом секвенирования ДНК по Сэнгеру с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 3130xl (Applied Biosystems, США) и набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1.

Оценку экспрессии встроенного нейтрализующего эпитопа РСВ F₂₄₃₋₂₉₄ проводили с помощью Вестерн-блот анализа. Электрофоретическое разделение белков вакцинных кандидатов проводили в 12% SDS-ПААГ с последующим переносом образцов на поверхность нитроцеллюлозной мембраны. После этапа блокировки неспецифических сайтов связывания мембраны инкубировали с препаратом моноклональных антител Паливизумаб (MedImmune Inc., США), распознающих искомый антигенный сайт F белка РСВ. Образование иммунных комплексов определяли с помощью добавления вторичных козьих антител против человеческого IgG, меченных пероксидазой хрена (Sigma, США), и субстрата DAB (Sigma, США).

Оценку фенотипических свойств исследуемых вирусов проводили в двух системах: РКЭ и культуре клеток MDCK. Оценку чувствительности вирусов к репродукции при

различных температурах инкубации (*ts/ca* фенотип) оценивали путем их титрования в РКЭ при 33, 26, 38°C. Длительность инкубации вирусов составляла 48 часов для температур 33 и 38°C и 6 суток – для 26°C. Титры вирусов рассчитывали по методу Рида и Мэнча и определяли 50% эмбриональную инфекционную дозу, которую выражали в \log_{10} ЭИД₅₀/мл. Вирус считали температурочувствительным, если разница в титрах при оптимальной и повышенной температурах была не ниже 5,0 \log_{10} ЭИД₅₀. Вирус считали холодоадаптированным, если инфекционный титр при 26°C был ниже такового при оптимальной температуре 33°C не более чем на 3,0 \log_{10} ЭИД₅₀.

Оценка репликации, иммуногенности и протективной активности вакцинных кандидатов в экспериментах на мышах. Мышей иммунизировали интраназально исследуемыми вакцинными вирусами в дозе \log_{10} ЭИД₅₀/50 мкл, двукратно с интервалом 21 день. Спустя 3 и 6 суток у части мышей собирали носовые ходы и легкие для оценки активности вирусной репродукции вакцин. Для оценки безопасности исследуемых векторных вакцин была введена дополнительная группа мышей, привитых внутримышечно формалин-инактивированным РС вирусом (ФИ-РСВ), эмульгированным в алюм-адьюванте, в дозе 2 мкг, двукратно с интервалом 2 недели. Через 3 недели после второй иммунизации проводили забор проб крови из ретроорбитального синуса для оценки гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и постановки реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

T-клеточный иммунный ответ на введение вакцинных кандидатов выявляли с использованием двух тестов: метод проточной цитометрии (уровни вирус/эпитоп-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток) и метод ЦТЛ *in vivo* (цитотоксическая активность Т-лимфоцитов в живом организме). В первом случае у животных забирали селезенки и/или ткани легких, из которых выделяли лимфоциты, которые затем стимулировали *in vitro* заданным антигеном. Последующая окраска клеток мечеными антителами к поверхностным антигенам лимфоцитов, а также внутриклеточное окрашивание цитокинов (ИФН- γ и ФНО α) позволяла определить пропорцию вирус/эпитоп-специфических Т клеток у иммунизированных мышей. Для оценки функциональной активности CD8⁺ Т клеток иммунизированным животным вводили внутривенно смесь из сингенных спленоцитов, объединяющую равные пропорции клеток, нагруженных вирусом гриппа, нагруженных РСВ-специфическими пептидами, либо контрольных, не нагруженных вирусными антигенами, при этом каждая популяция была мечена определенной концентрацией красителя карбоксифлуоресцеин сукцинимидил эфира (CFSE). На следующие сутки у мышей забирали селезенки и оценивали количество CFSE-меченых спленоцитов при помощи проточного цитофлуориметра. Снижение пропорции клеток, нагруженных антигеном, к контрольным клеткам служило мерой оценки цитотоксического действия CD8⁺ Т клеток в организме иммунизированных мышей.

Для оценки протективной активности вакцин в отношении вируса гриппа иммунизированных мышей заражали интраназально вирулентным вирусом H7N9-PR8 в дозе 10⁵ ЭИД₅₀/50мкл. Спустя три дня у животных собирали носовые ходы и лёгкие для определения титра вируса в тканях. Для оценки эффективности вакцин в отношении РС инфекции мышей заражали РСВ интраназально в дозе 2×10⁵ БОЕ/50 мкл. На 5 сутки у мышей собирали бронхоальвеолярные смывы (БАЛ), легкие, селезенки и кровь для оценки вирусной нагрузки, иммунного ответа к РСВ и проведения гистологических исследований.

Гистологическое исследование биоптатов легких у иммунизированных мышей анализировали после РСВ челленджа по методике Albert с соавт [Albert et al., 2011]. Легкие фиксировали в 10% растворе формальдегида не менее 48 часов. Далее биоптаты помещали в

кассеты и осуществляли проводку по спиртам восходящей крепости до заключения в парафиновые блоки. С блоков изготавливали 5 мкм гистологические срезы, которые окрашивали различными красителями: гематоксилином и эозином, гематоксилином и конго красным, реактивом Шиффа, а также комбинацией конго красного, гематоксилина Карацци и альцианового синего. Изображение срезов было получено с помощью светового микроскопа (Zeiss Axiovert 100, Германия) при 100 кратном увеличении камерой (Canon 30D, Япония).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения GraphPadPrizm 5. Для сравнения данных использовали U-критерий Манна-Уитни, односторонний дисперсионный анализ ANOVA с привлечением критерия Тьюки, односторонний и двусторонний дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Холма-Сидака. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Отбор полиэпитопных кассет РС вируса для создания векторных вакцин

Настоящее исследование было направлено на обоснование перспективности использования вакцинных штаммов лицензированной ЖГВ в качестве вирусного вектора для создания вакцин против других респираторных вирусных инфекций. В качестве proof-of-concept проводили конструирование экспериментальных векторных вакцин против РСВ с направленной индукцией В- и/или Т-клеточного ответа к РС вирусу, для чего выбирали наиболее иммунодоминантные эпитопы, иммуногенность и протективную активность которых можно было оценить на животной модели, в частности, на мышах линии BALB/c – наиболее чувствительных к РС инфекции [van Erp et al., 2019].

С помощью методов био- и иммуноинформатики были отобраны эпитопы РСВ для дизайна векторной вакцины на основе аттенуированного вируса гриппа. Для анализа использовали исходные аминокислотные последовательности десяти белков штамма РСВ-А, взятые из базы данных UniProt (<https://beta.uniprot.org/>). В каталоге Immune Epitope Database (IEDB, <https://www.iedb.org/>) для каждого белка были количественно проанализированы экспериментально установленные человеческие В- и Т-клеточные, а также мышинные Т-клеточные эпитопы для линий BALB/c (H2d) и C57BL/6J (H2b). Согласно полученным результатам, большинство предсказанных эпитопов относилось к гликопротеину G, фьюжн-пептиду F и M-2 белку РСВ. Несмотря на то, что G белок содержит большое количество В- и Т-клеточных эпитопов, из-за вариабельности и значительного количества сайтов O-гликозилирования его включение в состав векторной вакцины нежелательно. Таким образом, в рамках данного исследования эпитопы F и M2-1 белков РСВ были выбраны в составе кассет для создания векторной вакцины.

Дизайн эпитопной кассеты был оптимизирован таким образом, чтобы были выполнены несколько условий. Первое условие: включение в кассету как минимум двух МНС I и одного МНС II рестрицированных эпитопов РСВ. Второе условие: кассеты состоят из нескольких эпитопов, содержащих перекрывающиеся между собой сегменты, что позволяет уменьшить размер встраиваемой кассеты в выбранный вектор. Третье условие: для каждой кассеты подобраны фланкирующие последовательности из 12 аминокислот, которые опосредуют эффективный процессинг эпитопа, включая его внутриклеточный транспорт и корректную презентацию на молекулах МНС. Четвертое условие: выбранные Т-клеточные кассеты должны быть проанализированы на отсутствие неоантигенов, в отношении которых механизмы толерантности иммунной системы хозяина оказываются неэффективны.

Согласно этим условиям, были отобраны В- и Т-клеточные эпитопы, которые были объединены в две кассеты для встраивания в геном вируса гриппа (Таблица 1).

Выбор первой кассеты был основан на опубликованных ранее результатах исследования: иммунизация мышей векторной вакциной на основе вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), несущей кассету 1 в составе гена Н1, стимулировала выработку нейтрализующих антител к РСВ и успешно защищала животных от РС инфекции [Lee et al., 2015]. Эта полиэпитопная кассета состоит из фрагмента F₂₄₃₋₂₉₄, в состав которого входит антигенный сайт II белка F РС вируса. С этим сайтом связываются моноклональные антитела Паливизумаб, и включение данного фрагмента должно индуцировать выработку нейтрализующих антител к РСВ. Кроме этого, для усиления иммуногенности в кассету №1 были включены экспериментально подтвержденные Т-клеточные эпитопы РСВ.

Вторая кассета была нацелена на активацию преимущественно цитотоксических Т лимфоцитов при вакцинации. Кассета №2 представлена эпитопами в составе М2-1 белка РСВ (нуклеотидный фрагмент 70–101 (32 аминокислоты) и нуклеотидный фрагмент 114–146 (33 аминокислоты). В состав кассеты входит иммунодоминантный эпитоп М2-1 (82-90), который ранее способствует развитию ЦТЛ-иммунитета к РСВ у мышей [Vallbracht et al., 2007].

С использованием алгоритмов NetMHCpan и NetMHCIIpan в IEDB было показано, что обе отобранные кассеты не содержат неоэпитопов, презентруемых МНС I и МНС II.

Таблица 1 – Содержание иммунодоминантных эпитопов РСВ в отобранных кассетах

Белковый фрагмент РСВ (а.о.)	Номер эпитопа в базе данных IEDB	Позиция	Последовательность	Иммунный ответ у мышей, H-2(d) гаплотип		
				МНС I	МНС II	В-клеточный
Кассета № 1						
F (243-294)	48002	265-277	PITNDQKKLMSNN	—	+	—
	57525	255-278	SELLSLNDMPITND QKKLMSNNV	—	+	+
	59873	275-288	SNNVQIVRQQSYSI	—	+	—
	67389	249-257	TYMLTNSEL	+	—	—
	67390	249-258	TYMLTNSELL	+	—	—
Кассета № 2						
M2-1 (70-101+114-146)	62576	82-90	SYIGSINNI	+	—	—
	72120	127-135	VYNTVISYI	+	—	—
	225967	126-145	RVYNTVISYIESNR KNNKQT	—	+	—

2.2. Создание и изучение *in vitro* и *in vivo* рекомбинантных векторных вакцин, экспрессирующих фрагмент РСВ-F₂₄₃₋₂₉₄

Фрагмент РСВ-F₂₄₃₋₂₉₄ был клонирован между сигнальным пептидом и субъединицей HA1 молекулы гемагглютинаина вируса гриппа подтипа H7 с использованием либо AAAPGAA линкера, либо GGGGSGGGGS линкера (Рисунок 1А). Химерные гены HA+А-РСВ и HA+G-РСВ встраивали в специализированный вектор рCIPolISapIT, приспособленный для получения вирусов гриппа методами обратной генетики. Плазмиды, кодирующие гены внутренних белков донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, а также плазида,

кодирующая нейраминидазу подтипа N9, были подготовлены до начала исследования [Isakova-Sivak et al., 2011]. После трансфекции клеток Vero заданным набором плазмид полученные химерные вирусы ЖГВ+НА/PCB были накоплены в системе РКЭ. Два рекомбинантных вируса отличались гибким линкером между фрагментом PCB-F₂₄₃₋₂₉₄ и субъединицей HA1 гемагглютинаина (Рисунок 1А). Вакцинным кандидатам были присвоены названия ЖГВ-НА+А-PCB (линкер AAAPGAA) и ЖГВ-НА+G-PCB (линкер GGGGSGGGGS). Вставка сохранялась в составе гена НА экспериментальных вакцинных штаммов на протяжении 10 последовательных пассажей в РКЭ.

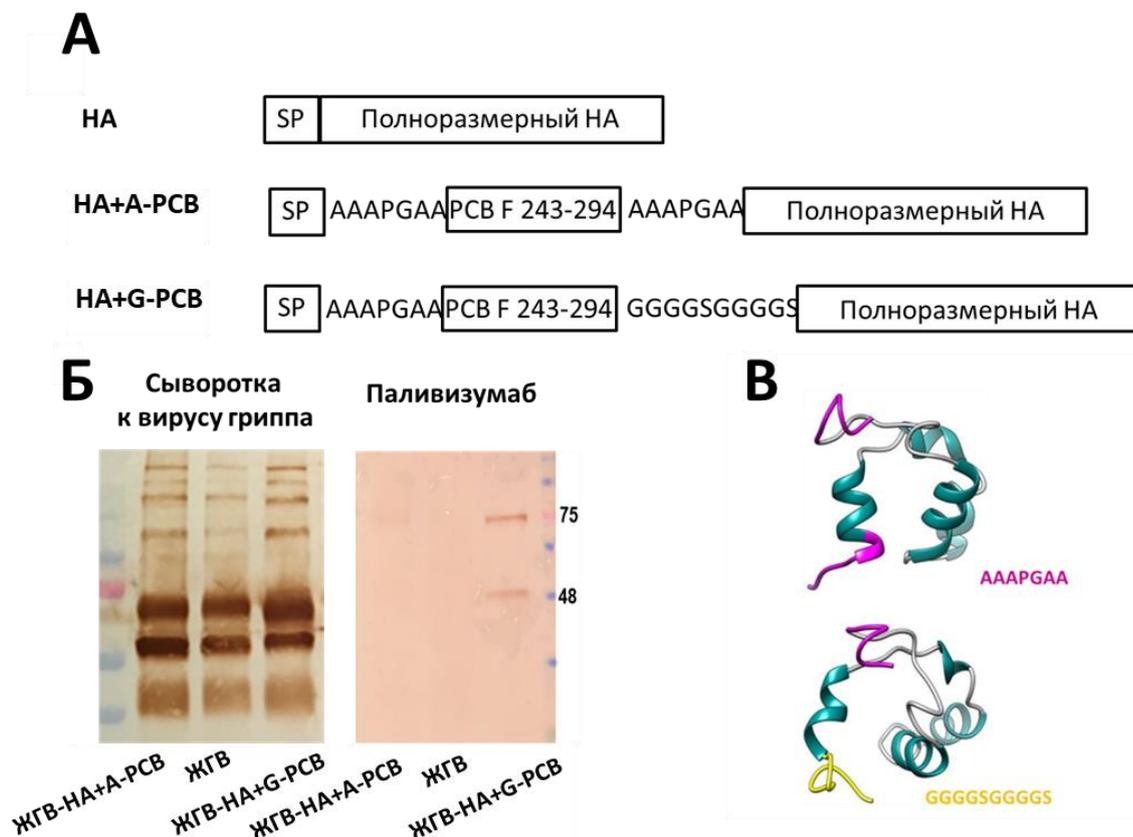


Рисунок 1 – Получение рекомбинантных векторных вакцин ЖГВ-НА+А-PCB и ЖГВ-НА+G-PCB и оценка уровня экспрессии эпитопов PCB векторными вакцинами. **А.** Схематичное представление конструкций НА+PCB-F₂₄₃₋₂₉₄ с разными линкерами **Б.** Результаты Вестерн-блот анализа химерных вирусов ЖГВ+НА/PCB с использованием поликлональной сыворотки к вирусу гриппа и моноклональных антител Паливизумаб. **В.** 3D моделирование конструкций PCB-F₂₄₃₋₂₉₄+линкер с помощью алгоритма i-TASSER.

Для доказательства того, что вставка PCB-F₂₄₃₋₂₉₄ действительно экспрессируется в составе молекулы гемагглютинаина НА, был проведен Вестерн-блот анализ с моноклональными антителами Паливизумаб. Важно отметить, что два специфических бэнда, реагирующие с этим антителом, были обнаружены только в вирусе ЖГВ-НА+G-PCB и соответствовали HA1 субъединице (~ 55 кДа) и предшественнику гемагглютинаина HA0 (~ 75 кДа) вируса гриппа, что позволяет предположить, что эпитоп PCB действительно экспрессируется вместе с белком НА вируса гриппа (Рисунок 1Б). Эти полосы были малозаметными в группе ЖГВ-НА+А-PCB. Таким образом, линкер между эпитопом PCB и субъединицей HA1 гемагглютинаина вируса гриппа играет важную роль в процессе пространственной укладки химерного белка.

Для предсказания трехмерной структуры для фрагментов РСВ-F₂₄₃₋₂₉₄ с линкерами использовался алгоритм i-TASSER. Согласно проведенному анализу, α -спираль в районе 52-60 аминокислотных остатков (а.о.) в составе РСВ-F+A-линкер влияла на скручивание остатков аланина (Ala) в конструкциях. Следовательно, уменьшение длины гибкой части линкера может негативно повлиять на презентацию вставки РСВ на поверхности вириона (Рисунок 1В). С другой стороны, этот эффект не наблюдали для конструкции НА+G-РСВ, в которой присутствовал G линкер, благодаря которому обеспечивалась наилучшая гибкость встраиваемой конструкции.

При комплексном изучении биологических свойств вакцинные кандидаты сравнивали с контрольным вирусом Н7N9-ЖГВ, который служит вирусным вектором в настоящем исследовании. Оба химерных штамма ЖГВ-РСВ эффективно репродуцировались при оптимальной температуре 33°C (титры 9,0; 8,9 и 8,9 \log_{10} ЭИД₅₀/мл для Н7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+A-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ, соответственно) и пониженной температуре 26°C (титры 7,1; 6,3 и 6,1 \log_{10} ЭИД₅₀/мл для Н7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+A-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ, соответственно), что указывает на сохранность холодаадаптированного фенотипа у вакцинного штамма ЖГВ при модификации гена НА. Помимо этого, вакцинные кандидаты проявляли температурочувствительный фенотип, практически не реплицируясь при 38°C (Рисунок 2А). Дополнительно оценивали репликативную активность полученных рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ в культуре клеток MDCK: оба варианта характеризовались высокими инфекционными титрами в культуре клеток, сравнимыми с вектором Н7N9-ЖГВ (титры 7,7; 8,1 и 8,3 \log_{10} ЭИД₅₀/мл для Н7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+A-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ, соответственно) (Рисунок 2Б). Таким образом, было установлено, что чужеродная вставка в составе молекулы НА вакцинного штамма ЖГВ не влияла на ростовые свойства вирусов в системе *in vitro*.

Оба вакцинных кандидата были способны реплицироваться в верхних дыхательных путях мышей BALB/c после интраназальной иммунизации (Рисунок 2В). Важно отметить, что оба химерных вируса, как и вектор Н7N9-ЖГВ, были аттенуированы для мышей, поскольку инфекционный вирус не выделялся из легких иммунизированных мышей на 3 сутки после иммунизации.

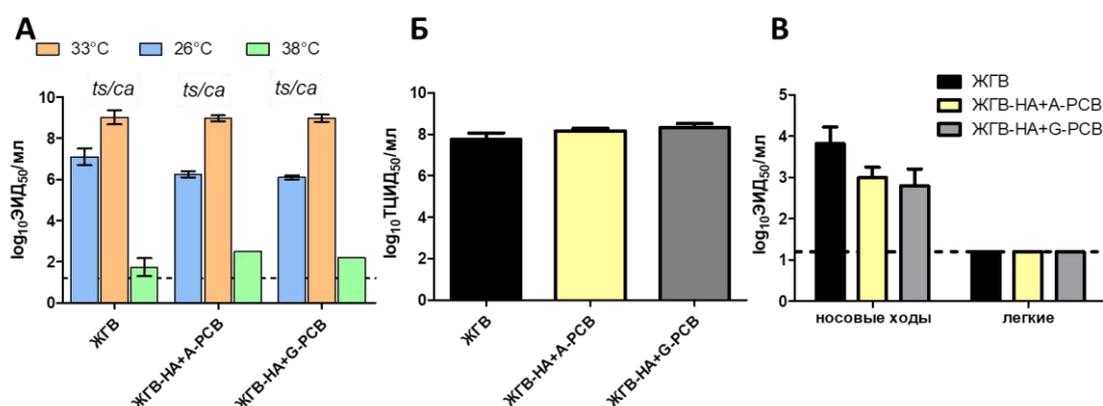


Рисунок 2 – Ростовые характеристики рекомбинантных вирусов в системе *in vitro* и *in vivo*. **А.** Инфекционный титр в развивающихся куриных эмбрионах при разной температуре инкубации (33°C, 26°C, 38°C). **Б.** Титр вируса в культуре клеток MDCK при оптимальной температуре инкубации 33°C. **В.** Титр вакцинного вируса в верхних дыхательных путях (носовые ходы) и нижних дыхательных путях (легкие) мышей на 3 сутки после иммунизации (n=5). *ts* - температурочувствительный фенотип, *ca* - холодаадаптированный фенотип.

Иммунизация мышей векторными вакцинами проводила к выработке специфических IgG антител к вирусу гриппа, сопоставимых с вектором Н7N9-ЖГВ (Рисунок 3А). На третьи сутки после заражения вирулентным вирусом гриппа у иммунизированных мышей не наблюдали репродукцию вируса в легких (Рисунок 3Б). Таким образом, мыши из групп Н7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ были полностью защищены от размножения вирулентного гомологичного штамма вируса гриппа в легких, в отличие от группы PBS, где вирулентный вирус размножился до высокого титра ($4,4 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл) (Рисунок 3В). Следовательно, экспериментальные рекомбинантные вакцинные штаммы сохранили способность индуцировать полноценный защитный иммунитет в отношении гриппозной инфекции.

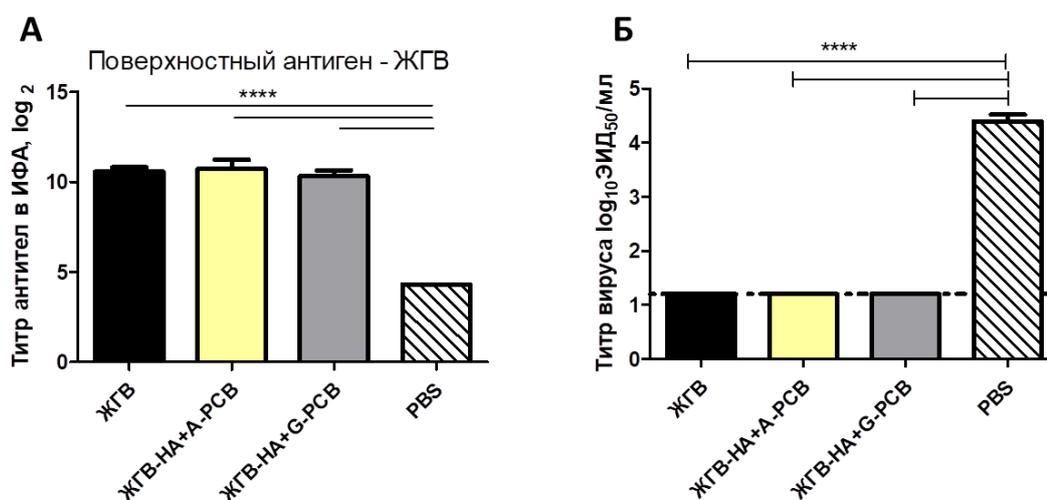


Рисунок 3 – Анализ свойств рекомбинантных вирусов ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ при иммунизации мышей BALB/c. **А.** Титры вирус-специфических IgG антител к вирусу гриппа в сыворотках крови мышей, собранных через 3 недели после второй иммунизации (n=5). **Б.** Титр вирулентного вируса гриппа Н7N9-PR8 на 3 сутки после экспериментального заражения (челленджа) иммунизированных мышей (n=5). Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. ****p<0,0001.

Сывороточные IgG антитела к цельному РС вирусу, которые вырабатывались через 3 недели после второй иммунизации, оценивали с помощью ИФА. Вакцинация векторными вакцинами практически не вызвала образования IgG антител к РСВ, в отличие от ФИ-РСВ: значение ОП₄₅₀ при анализе сывороток крови в разведении 1:10 было в 4 раза выше для группы ФИ-РСВ по сравнению с группами ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ, которые были сравнимы с группой PBS (Рисунок 4А).

Защитную эффективность вакцин в отношении РС вируса оценивали по уровню репликации вируса в тканях легких на 5 сутки после заражения мышей РСВ штаммом А2. Иммунизация ФИ-РСВ полностью защитила мышей от репликации РС вируса в легких, тогда как иммунизация векторными вакцинами не смогла предотвратить развитие РС инфекции (Рисунок 4Б). Несмотря на то, что статистически достоверной разницы между векторными вакцинами по уровню репликации РСВ в легких мышей после челленджа не было зафиксировано, достоверную разницу между значениями титра вируса наблюдали в группе ЖГВ-НА+G-РСВ по сравнению с PBS.

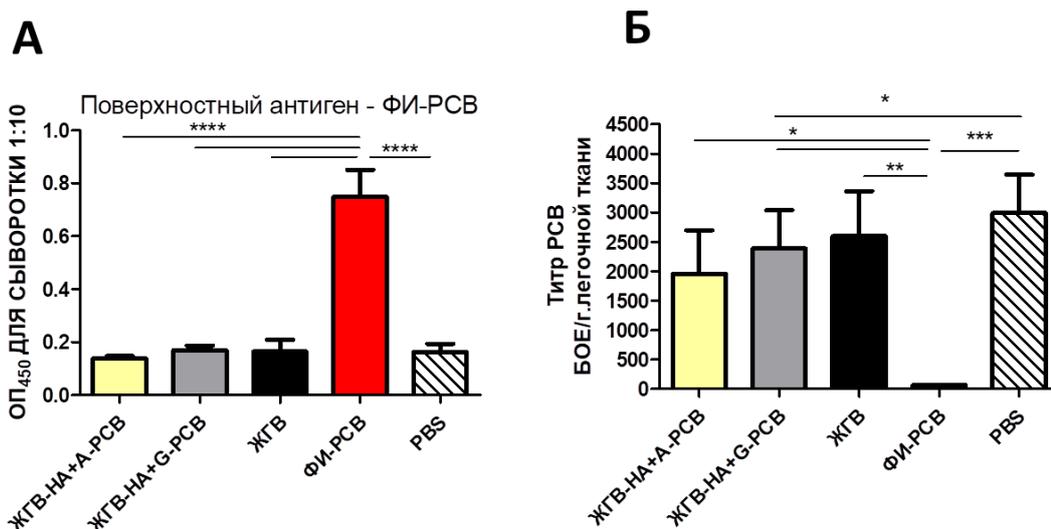


Рисунок 4 – Иммуногенность и протективная активность рекомбинантных штаммов ЖГВ-НА+А-PCВ и ЖГВ-НА+G-PCВ в отношении PCВ. **А.** Значение оптической плотности образцов сывороток крови в ИФА с цельным PCВ (n=5). **Б.** Титр PC вируса в легких мышей на 5-е сутки после заражения PCВ (n=5). Данные анализировали с использованием одностороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

Для оценки защитной эффективности и безопасности векторных вакцин ЖГВ-НА+А-PCВ и ЖГВ-НА+G-PCВ проводили гистопатологическую оценку состояния легочной ткани у иммунизированных мышей на 5-й день после заражения PC вирусом. Несмотря на полную защиту в отношении PC вируса, в группе ФИ-PCВ наблюдали серьезные иммунопатологические изменения легочной ткани (Рисунок 5А). Именно в этой группе мышей легкие имели признаки тяжелых повреждений эпителия и высокий уровень интерстициально-альвеолярного инфильтрата (Рисунок 5Б). О наличии слизи в просвете бронхов судили по степени окрашивания среза альциановым синим, и она присутствовала только в группе ФИ-PCВ (Рисунок 5А). В целом изменения в легочной ткани в группе ФИ-PCВ характеризовались лимфогистиоцитарной инфильтрацией, специфичной для вирусной инфекции. У мышей, иммунизированных ФИ-PCВ, наблюдали неравномерное утолщение альвеолярных перегородок из-за пролиферации и гипертрофии пневмоцитов 2 типа в сочетании с незрелыми многослойными телами. В итоге, гистопатологическая оценка сегментов легких мышей после заражения PCВ показала высокую степень защиты в группах, иммунизированных векторными вакцинами ЖГВ-НА+А-PCВ и ЖГВ-НА+G-PCВ (Рисунок 5Б). Оценка состояния эпителия бронхов мышей выявила, что в группе ЖГВ-НА+G-PCВ степень повреждения была достоверно ниже по сравнению с группой ЖГВ, тогда как для вакцинного варианта ЖГВ-НА+А-PCВ достоверной разницы выявлено не было (Рисунок 5Б). Эти результаты показывают, что включение нейтрализующего эпитопа PCВ-F₂₄₃₋₂₉₄ в субъединицу HA1 гриппа через (GGGS)₂ линкер может оказывать положительный эффект для защиты от PCВ по сравнению с конструкцией, включающей целевой иммуногенный эпитоп через AAAPGAA линкер.

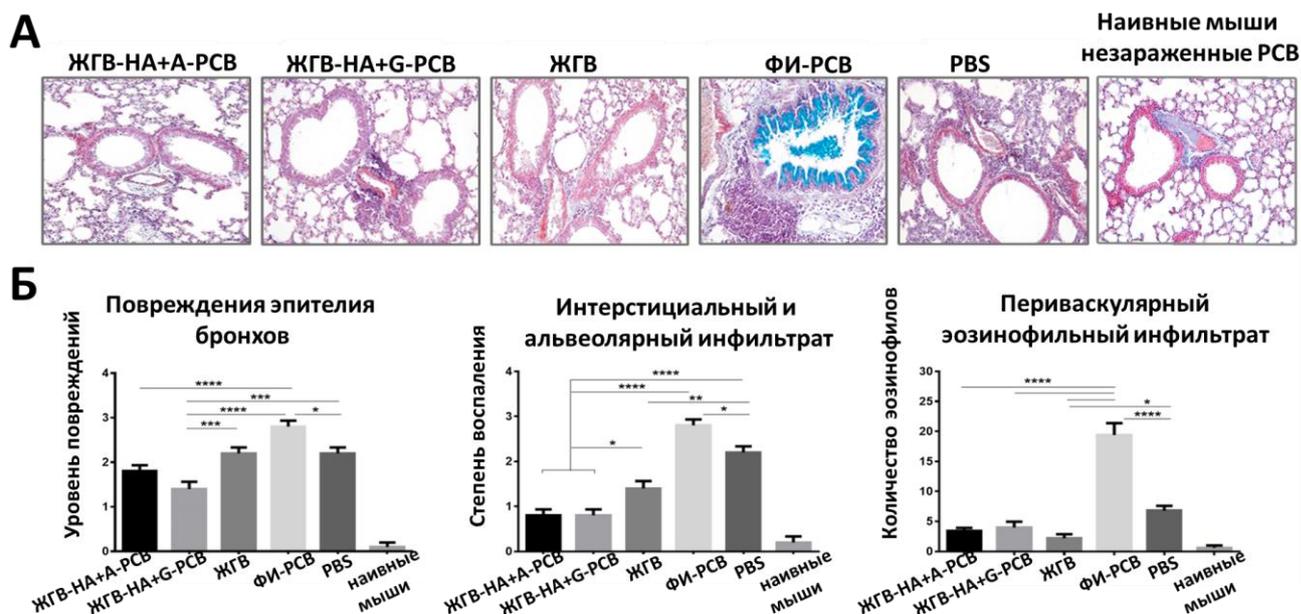


Рисунок 5 – Гистопатологические изменения легочной ткани у иммунизированных мышей (n=5) после заражения РС вирусом. **А.** Снимки срезов легких, окрашенных красителями конго красным, гематоксилином, альциановым синим. **Б.** Количественный анализ степени повреждения легочной ткани, оценки степени воспаления и содержания эозинофильного инфильтрата. Данные проанализированы с использованием одностороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

2.3. Создание и изучение *in vitro* и *in vivo* рекомбинантных векторных вакцин, экспрессирующих Т-клеточные эпитопы РСВ

Векторные вакцинные варианты содержали поверхностные гены НА и NA от вируса A/Anhui/1/2013 (H7N9) и оставшиеся 6 генов – от донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Оба вакцинных кандидата кодировали Т-клеточную кассету РСВ, состоящую из фрагментов M2-1 (70–101 и 114–146) РСВ, а также сайт саморасщепления P2A тешовируса на N-конце и стоп-кодон на С-конце. В первом вакцинном варианте этот фрагмент кодировался с С-конца нейраминидазы N9 таким образом, чтобы полноразмерная НА включалась в состав новой образованной вирусной частицы, а расщепленная кассета РСВ претерпевала независимый процессинг внутри инфицированной клетки (Рисунок 6А).

Второй вакцинный кандидат был сконструирован путем усечения рамки считывания NS1 белка с С-конца до 126 а.о., за которым следовала Т-клеточная кассета РСВ (Рисунок 6Б). Предыдущие исследования продемонстрировали, что укорочение полипептидной цепи белка NS1 до 126 а.о. позволяет получить аттенуированные и иммуногенные вирусы гриппа [Egorov et al., 1998]. Конструкция была смоделирована таким образом, чтобы в процессе посттрансляционных модификаций химерного белка NS1/РСВ в инфицированных клетках происходил независимый процессинг эпитопов РСВ по эндогенному пути презентации.

Генетическую стабильность изучали на основании анализа пяти дополнительных последовательных пассажей в РКЭ и последующим секвенированием генома рекомбинантных вакцинных штаммов. Оба вакцинных варианта демонстрировали генетическую стабильность РСВ вставки в генах NA и NS1.

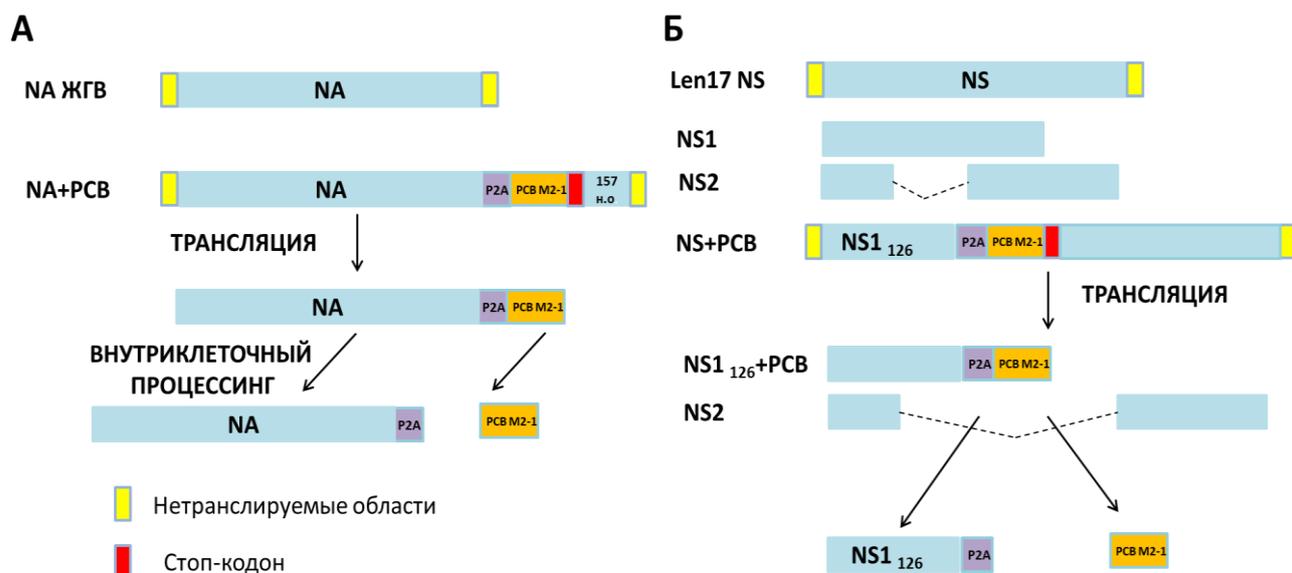


Рисунок 6 – Схема строения нативных и химерных генов NA и NS1 вируса гриппа со вставкой полиэпитопной кассеты РСВ. **А.** Модифицированный ген NA/PCBV (штамм А/17/Anhui/2013/61). **Б.** Модифицированный ген NS1/PCBV (штамм А/Ленинград/134/17/57). Сайт саморасщепления P2A способствует посттрансляционному отщеплению полиэпитопной кассеты РСВ внутри инфицированной клетки.

Обе векторные вакцины репродуцировались при 33°C на одном уровне с вектором H7N9-ЖГВ, указывая на то, что встраивание чужеродного генетического материала РСВ в гены NA и NS1 вируса гриппа не влияло на репродуктивную способность вакцинных вирусов в обеих системах культивирования при оптимальной температуре инкубации (Рисунок 7 А, Б). Оба вакцинных кандидата ЖГВ-PCBV не реплицировались при 38°C (Рисунок 7А), сохраняя *ts* фенотип, свойственный вектору H7N9-ЖГВ. Однако оба вакцинных кандидата существенно слабее репродуцировались при пониженной температуре 26°C по сравнению с классическим вакцинным штаммом ЖГВ (титры 7,1; 4,5 и 4,8 \log_{10} ЭИД₅₀/мл для H7N9-ЖГВ, ЖГВ+NA/PCBV и ЖГВ+NS1/PCBV, соответственно), что указывает на ослабление холодаадаптированного фенотипа вакцинного вируса при соответствующей модификации генов NA и NS1. Однако ослабление *ca* фенотипа не влияет на безопасность ЖГВ, так как аттенуация вакцинных вирусов связана только с их *ts* фенотипом [Maassab et al., 1982; Wareing et al., 2001].

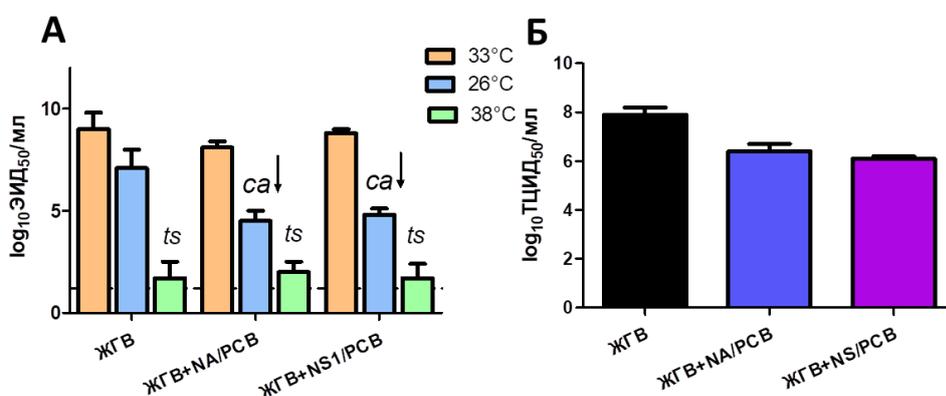


Рисунок 7 – Ростовые характеристики рекомбинантных вирусов в системе *in vitro*. **А.** Инфекционный титр в РКЭ при разной температуре инкубации. **Б.** Титр вируса в культуре клеток MDCK при оптимальной температуре инкубации 33°C.

Группы мышей BALB/c (n=5) интраназально иммунизировали вакцинными кандидатами ЖГВ, ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB в дозе $6,0 \log_{10}$ ЭИД₅₀, и на третьи сутки оценивали репликацию вирусов в носовые ходы и легких. Рекомбинантные вакцинные штаммы, также как и вектор ЖГВ, не выделялись из тканей легких мышей (Рисунок 8А), подтверждая аттенуированный фенотип вирусов. Кроме того, было показано, что вариант ЖГВ+NS1/PCB не реплицируется в носовых ходах (Рисунок 8А), тогда как степень репродукции варианта ЖГВ+NA/PCB в носовых ходах была сравнима с вектором Н7N9-ЖГВ (Рисунок 8А) (титры 3; 2,2 и 1,2 \log_{10} ЭИД₅₀/мл для ЖГВ, ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB соответственно).

Несмотря на то, что обе векторные вакцины реплицировались по-разному в респираторном тракте мышей, двукратная иммунизация животных индуцировала высокие уровни IgG антител к цельному вирусу гриппа, сопоставимые с вектором Н7N9-ЖГВ (Рисунок 8Б). У иммунизированных мышей вирулентный вирус Н7N9-PR8 не размножался в легких, в отличие от группы контроля PBS (Рисунок 8В).

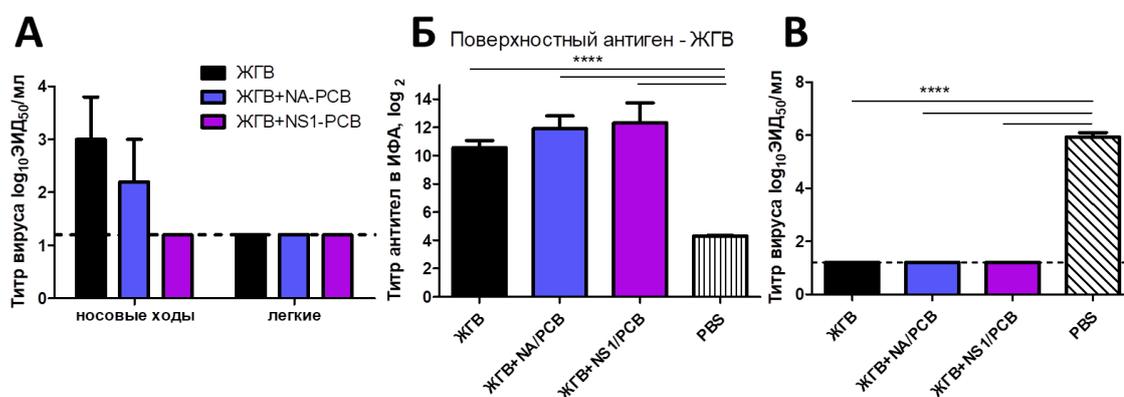


Рисунок 8 – Изучение репродуктивных свойств экспериментальных вакцинных штаммов в верхнем и нижнем отделах респираторного тракта мышей. Иммуногенность и защитная эффективность вакцин в отношении вируса гриппа: **А.** Титры вирусов в носовых ходах и легких мышей BALB/c спустя 3 дня после интраназального введения в дозе 10^6 ЭИД₅₀. **Б.** Уровни сывороточных IgG антител к вирусу гриппа через 3 недели после второй иммунизации **В.** Репродукция вирулентного вируса гриппа Н7N9-PR8 в носовых ходах и легких у мышей на 3 день после челленджа. Данные проанализированы с использованием одностороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки (**** $p < 0,0001$).

Оба экспериментальных вакцинных штамма ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB индуцировали выработку значительных уровней M2-1₈₂₋₉₀-специфических CD8⁺ Т-клеток в селезенках мышей после иммунизации. Спленциты, выделенные у иммунизированных мышей спустя три недели после второй иммунизации, стимулировали цельновирioнной ЖГВ, либо пептидом M2-1₈₂₋₉₀. Методом внутриклеточного окрашивания цитокинов было установлено, что количество ИФН- γ^+ M2-1₈₂₋₉₀-специфических CD8⁺ Т клеток было высоким и статистически не различалось в группах ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB (Рисунок 9А). Стимуляцию спленцитов цельным вирусом гриппа проводили с целью оценки влияния предложенных модификаций вируса-вектора на его способность вызывать грипп-специфический цитотоксический иммунный ответ. Иммунизация векторными вакцинами приводила к образованию выраженного специфического иммунного ответа к вирусу гриппа в обеих группах ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB, который был сопоставим с группой Н7N9-ЖГВ (Рисунок 9Б), что указывает на отсутствие негативного влияния чужеродной вставки на

стимуляцию Т-клеточного иммунитета к вирусу гриппа. В случае, когда стимуляцию выделенных спленоцитов проводили раствором ДМСО, не содержащем пептидов и цельных вирусов, ожидаемо не фиксировали активность $CD8^+$ Т-клеток (Рисунок 9В).

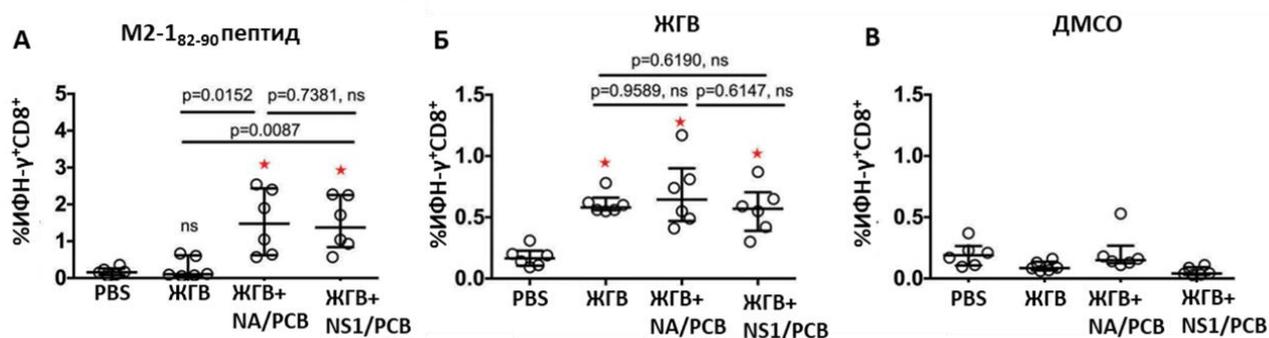


Рисунок 9 – Уровни ИФН- γ^+ $CD8^+$ Т-клеток у иммунизированных мышей при стимуляции спленоцитов (n=6), собранных спустя 21 день после второй иммунизации, РСВ пептидом M2-1₈₂₋₉₀ и цельным вирусом гриппа **А**. Стимуляция пептидом M2-1₈₂₋₉₀. **Б**. Стимуляция цельным вирусом гриппа (штамм ЖГВ). **В**. Стимуляция ДМСО. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (указаны значения *p* с применением теста Манна-Уитни (U-критерий)). ns – различия недостоверны ($p \geq 0,05$). Красными звездочками указаны значимые различия в уровнях ИФН- γ^+ $CD8^+$ Т клеток по сравнению с группой PBS.

Дополнительно был оценен уровень цитотоксической активности РСВ-специфических ЦТЛ, стимулированных иммунизацией экспериментальными вакцинными штаммами ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV, с использованием метода ЦТЛ *in vivo*. Согласно результатам анализа, высокая специфическая активность ЦТЛ в отношении клеток-мишеней, нагруженных пептидом РСВ M2-1₈₂₋₉₀, наблюдалась в обеих группах мышей, иммунизированных векторными вакцинными штаммами ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV по сравнению с группой ЖГВ (Рисунок 10А).

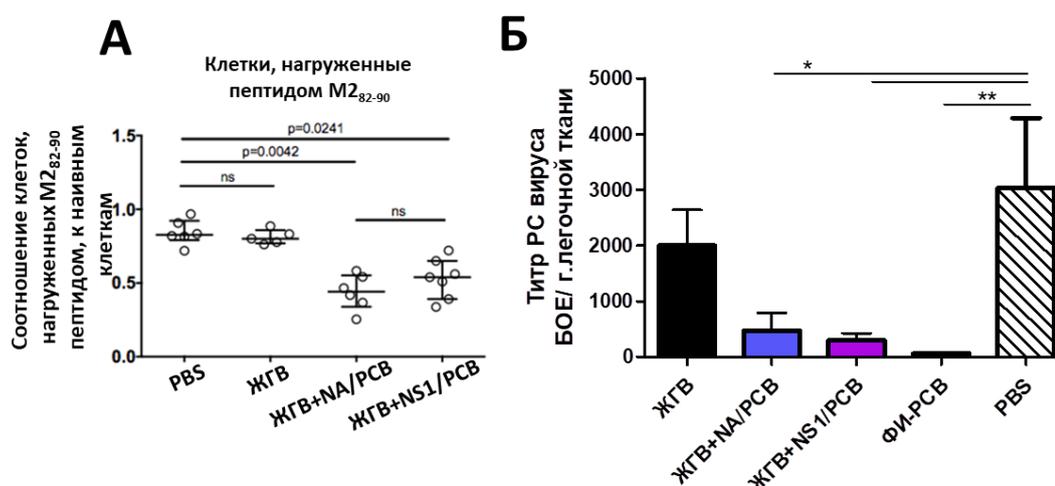


Рисунок 10 – Иммуногенность и защитная эффективность вакцин в отношении РСВ. **А**. Оценка функциональной активности ЦТЛ у иммунизированных мышей (n=5-6). Соотношение спленоцитов, нагруженных M2-1₈₂₋₉₀ пептидом, к контрольным клеткам. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (указаны значения *p* с применением теста Манна-Уитни (U-критерий)). ns – различия недостоверны ($p \geq 0,05$). **Б**. Репликация штамма РСВ A2 в легких иммунизированных мышей на 5-е сутки после челленджа РСВ (n=5). Данные проанализированы с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Холма-Сидака (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

При проведении исследований по изучению защитной эффективности и безопасности экспериментальных вакцинных штаммов была добавлена дополнительная контрольная группа – мыши, которым вводили вакцинный препарат в виде ФИ-PCB. Через 5 дней после заражения иммунизированных мышей штаммом РСВ А2 вирус реплицировался на незначительном уровне в обеих группах векторных вакцин ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB, в отличие от групп PBS и ЖГВ. В группе ФИ-PCB вирус методом бляшек не обнаруживался в легких (Рисунок 10Б).

Сравнительное гистопатологическое исследование препаратов легких мышей, собранных на 5 день после заражения РСВ, выявило наличие типовых изменений перибронхиолярной и периваскулярной зон, а также альвеолярного интерстиция, ателектаза и эмфиземы, которые в разной степени варьировали в разных группах (Рисунок 11А). В обеих группах векторных вакцин ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB повреждение бронхиального эпителия было минимальным, как и признаки альвеолярно-интерстициальной клеточной инфильтрации (Рисунок 11Б). В группе ФИ-PCB наблюдалась гиперпродукция слизи в бронхах и бронхиолах, бронхиолоэктазы, перибронхиальная инфильтрация и периваскулярная мононуклеарная инфильтрация и инфильтрация эозинофильными лейкоцитами (включения в цитоплазме, окрашенные красителем конго красным). Патологические изменения, описанные в группе ФИ-PCB, не фиксировали в остальных экспериментальных группах векторных вакцин. В целом, гистопатологическая оценка срезов легких мышей, инфицированных РСВ, выявила отсутствие иммунопатологии в группах ЖГВ-PCB, при этом кандидат ЖГВ+NA/PCB продемонстрировал более высокую степень защиты, чем ЖГВ+NS1/PCB (Рисунок 11Б).

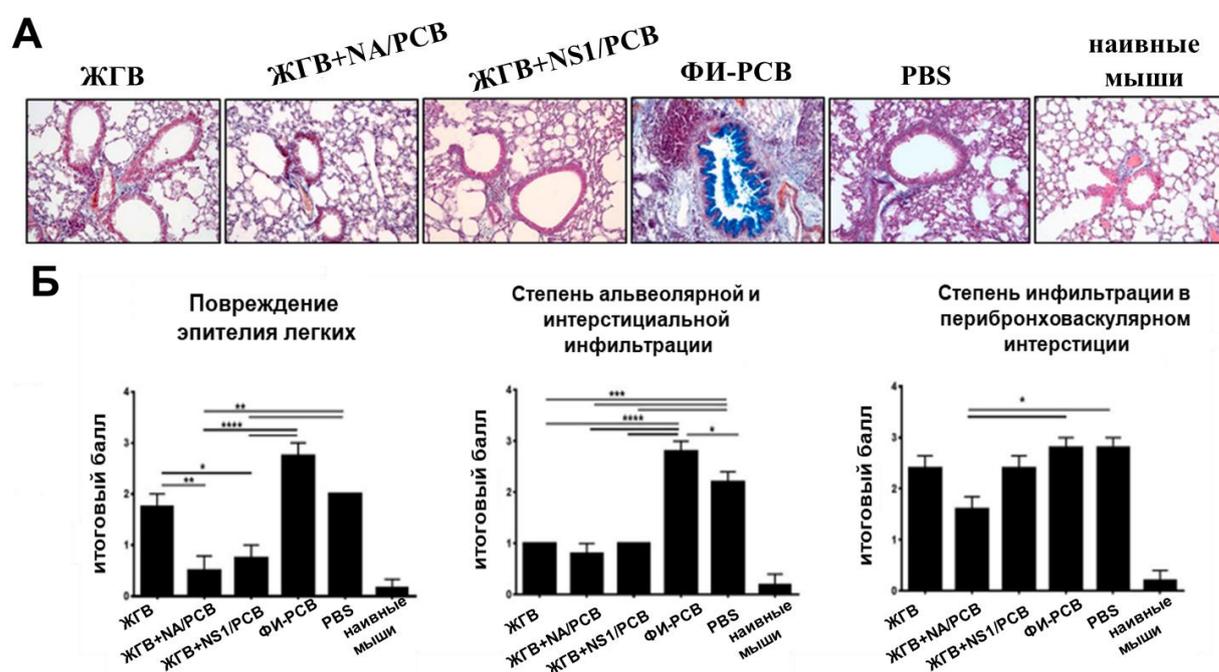


Рисунок 11 – Гистопатологические изменения легочной ткани у иммунизированных мышей после заражения РС вирусом. **А.** Снимки срезов легких, одновременно окрашенных конго красным, гематоксилином и альциановым синим. **Б.** Степень патологических изменений. Для каждого гистологического среза независимый гистолог оценивал степень эпителиального повреждения или воспаления и присваивал значения в баллах от 0 до 3 (где 0 – минимальная степень повреждения, 3 – максимальная). Количество срезов для каждого легкого $n=5$. Данные проанализированы с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Холма-Сидака ($*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$).

Для установления механизма защиты векторных вакцин определяли пропорцию T_{RM} клеток среди эффекторных Т клеток памяти (T_{EM}) в легких мышей на 7-е сутки после второй иммунизации. В пуле ИФН- γ^+ $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток с фенотипом $CD44^+CD62L^-$ оценивали вклад субпопуляции T_{RM} клеток, экспрессирующих маркеры $CD69$ и $CD103$ [Liu et al., 2018].

Подавляющее большинство грипп-специфических эффекторных $CD4^+$ Т-клеток обладали T_{RM} $CD69^+CD103^-$ фенотипом (Рисунок 12А). Большинство грипп-специфических эффекторных $CD8^+$ Т-клеток памяти в группах ЖГВ, ЖГВ+НА/РСВ и ЖГВ+НС1/РСВ обладали T_{RM} $CD69^+CD103^+$ фенотипом, при этом более высокий уровень экспрессии $CD103$ наблюдался в группах ЖГВ+НА/РСВ и ЖГВ+НС1/РСВ по сравнению с ЖГВ (Рисунок 12А).

Уровни грипп-специфических T_{RM} $CD8^+$ Т-клеток с фенотипом $CD69^+CD103^+$ были выше в группах ЖГВ+НА/РСВ и ЖГВ+НС1/РСВ, чем в группе ЖГВ (Рисунок 12А). В группе ЖГВ+НА/РСВ на долю грипп-специфических $CD8^+$ T_{RM} приходилось ~55% клеток, а в группе ЖГВ+НС1/РСВ ~40%.

Тем не менее, уровни РСВ-M2₈₂ эпитоп-специфических T_{RM} $CD8^+$ клеток были идентичны в обеих группах ЖГВ+НА/РСВ и ЖГВ+НС1/РСВ (Рисунок 12Б). Стоит отметить, что только у 65–70% РСВ-специфических T_{EM} $CD8^+$ Т-клеток экспрессировался маркер $CD69$, в то время как почти все грипп-специфические $CD8^+$ Т-клетки экспрессировали данный маркер (Рисунок 12А, Б).

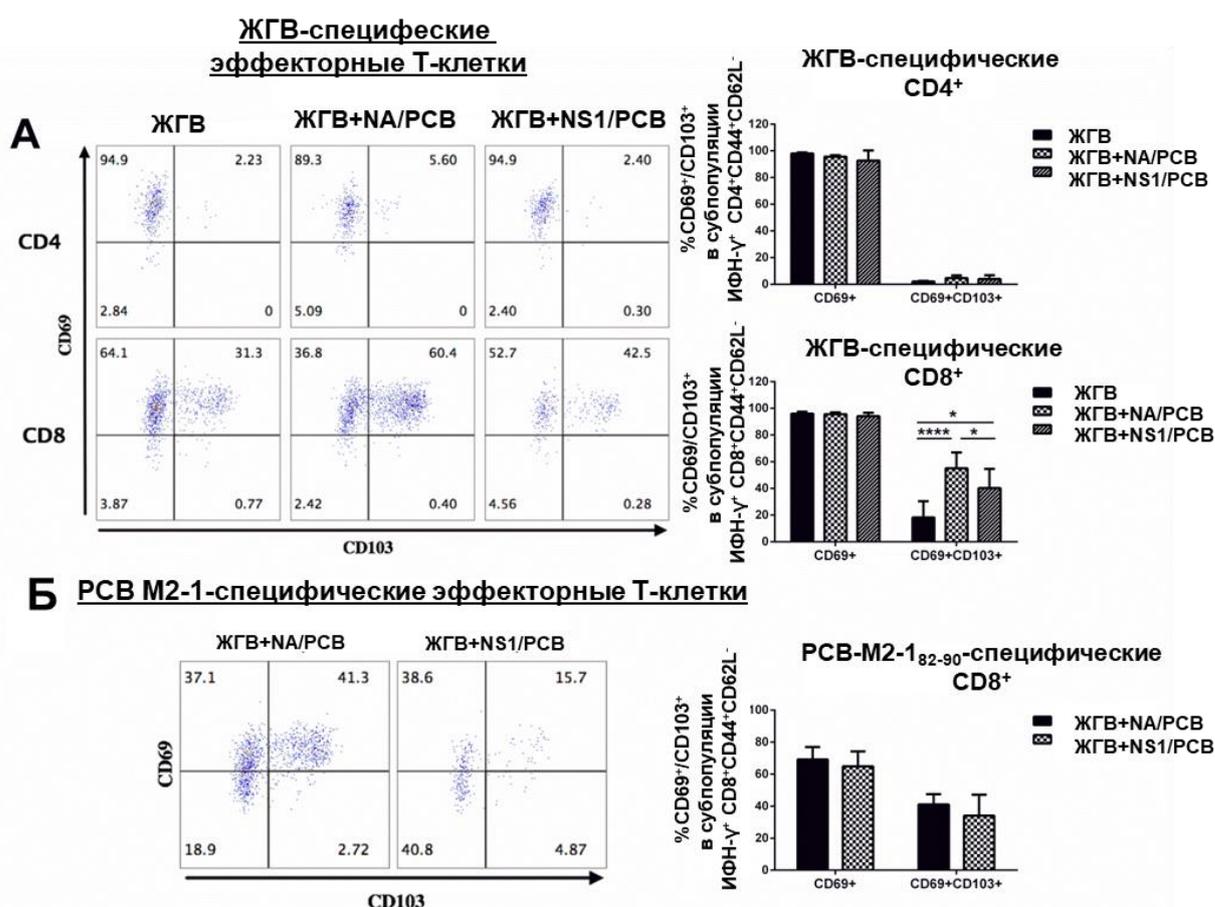


Рисунок 12 – Доля Т клеток с маркерами T_{RM} среди грипп-специфических и РСВ-M2₈₂-эпитоп-специфических эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти в легких мышей, иммунизированных векторными вакцинами ЖГВ-РСВ. А. Доля грипп-специфических $CD69^+CD103^+$ T_{RM} клеток среди $CD44^+CD62L^-$ эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т клеток. Б. Доля РСВ-M2₈₂-эпитоп-специфических $CD69^+CD103^+$ T_{RM} клеток среди $CD44^+CD62L^-$ эффекторных $CD8^+$ Т клеток. Данные проанализированы с помощью двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Холма-Сидака (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании оценивалась перспективность использования живой холодаадаптированной гриппозной вакцины в качестве вектора для адресной доставки генов РС вируса в клетки-мишени. На основании сформулированных критериев отбора эпитопов РСВ были подобраны две полиэпитопные кассеты: первая для активации преимущественно В-клеточного иммунного ответа, а вторая – для активации Т-клеточного иммунитета. Разработаны три стратегии, предполагающие генно-инженерные модификации генов НА, NA, либо NS1 вакцинного штамма живой гриппозной вакцины.

Методами обратной генетики получены четыре жизнеспособных вакцинных кандидата ЖГВ-РСВ, два из которых экспрессировали фрагмент РСВ F₂₄₃₋₂₉₄ в составе химерной молекулы НА либо через гибкий линкер AAAPGAA, либо через линкер (GGGGS)₂, а два других кодировали полиэпитопную Т-клеточную кассету РСВ M2-1 (70-101+114-146) либо в гене NA, либо в гене усеченного до 126 а.к. белка NS1. На основании Вестерн-блот анализа установлено, что использование гибкого линкера (GGGGS)₂ в конструкциях с химерными молекулами НА обеспечивая корректную презентацию встроенного эпитопа на поверхности вирусной частицы, в отличие от AAAPGAA линкера.

Иммунизация мышей линии BALB/c показала, что все вакцинные кандидаты ЖГВ-РСВ сохранили иммуногенность и протективную активность в отношении вируса гриппа. Таким образом, не были нарушены функциональные свойства модифицированных вирусных белков вектора.

Кандидаты со вставкой фрагмента РСВ F₂₄₃₋₂₉₄ в молекуле НА продемонстрировали низкую иммуногенность в отношении РС вируса, и иммунизированные мыши не были защищены от репликации РС вируса в легких после челленджа. Однако иммунизация данными вакцинами обеспечивала снижение развития легочной патологии у мышей на фоне РС инфекции, что может указывать на защитную роль Т-клеточного иммунитета, формируемого в ответ на иммунизацию, поскольку фрагмент РСВ F₂₄₃₋₂₉₄ также включает CD4 и CD8 Т-клеточные эпитопы РСВ.

В рамках данного исследования было показано, что сконструированные рекомбинантные штаммы ЖГВ-РСВ, несущие иммунодоминантные Т-клеточные эпитопы РСВ, способны вызывать сбалансированный клеточно-опосредованный иммунный ответ в легких и обеспечивают надежную защиту как от гриппа, так и от РСВ, не вызывая патологических изменений в тканях легких. Вектор ЖГВ обеспечивает доставку эпитопов РСВ к месту проникновения вируса и правильную презентацию чужеродных эпитопов иммунной системе организма. Это первое доказательство того, что вакцинация на основе вектора ЖГВ может вызывать надежный локализованный в легких Т-клеточный иммунитет к внесенному Т-клеточному эпитопу чужеродного патогена, не изменяя иммуногенности самого вирусного вектора.

По результатам исследования можно заключить, что применение холодаадаптированного вируса гриппа в качестве вирусного вектора способствует корректной доставке чужеродных эпитопов в клетки-мишени и их презентации клеткам иммунной системы. Соответственно, холодаадаптированные вирусы гриппа являются перспективной платформой для дальнейшей разработки вакцин не только против РСВ, но и против других респираторных патогенов. В частности, фундаментальные основы конструирования векторных вакцин, разработанные в диссертационном исследовании, были применены для создания бивалентной векторной вакцины от гриппа и новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, вызвавшей пандемию COVID-19 в 2020 году [Isakova-Sivak et al., 2022].

Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации

Полученные в настоящем исследовании результаты носят преимущественно фундаментальный характер, поскольку для изучения тонких механизмов реализации иммунного ответа при иммунизации векторными вакцинами в экспериментальной модели (на мышах) были сконструированы вакцинные прототипы, несущие иммунодоминантные Т-клеточные эпитопы, презентруемые на молекулах МНС мышей гаплотипа H-2(d). На основании результатов, полученных в данной работе, ведутся разработки других векторных вакцин на основе ЖГВ, где в качестве вставки используются фрагменты вирусных и бактериальных белков, способных формировать защитный иммунитет в отношении целевого патогена. При этом дизайн Т-клеточных каскет, включаемых в состав векторной вакцины, основывается как на степени иммуногенности целевых эпитопов, так и на данных о частотах HLA-аллелей, встречающихся в российской популяции, для обеспечения максимальной иммуногенности новых вакцин среди всех жителей нашей страны.

ВЫВОДЫ

1. Обоснованы критерии отбора перспективных иммуногенных В- и Т-клеточных эпитопов РСВ для встраивания в геном холодоадаптированного вируса гриппа. Продемонстрирована возможность конструирования векторных вакцин против РСВ на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), при этом кодирование полиэпитопных каскет в генах НА, NA или NS1 вируса гриппа не нарушает основные биологические характеристики вакцинных штаммов ЖГВ.
2. Рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ, кодирующие отобранные полиэпитопные каскеты РСВ в своем геноме, являются генетически стабильными и сохраняют высокую иммуногенность и протективную активность в отношении вируса гриппа, свойственные классическим штаммам ЖГВ.
3. Встраивание фрагмента РСВ F₂₄₃₋₂₉₄ в молекулу НА вируса гриппа является недостаточным для индукции защитных уровней РСВ-специфических антител у мышей, однако иммунизация таким химерным вирусом препятствует развитию РС-индуцированной легочной патологии.
4. Рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ, кодирующие полиэпитопную Т-клеточную каскету РСВ M2-1 (70-101+114-146), индуцируют развитие устойчивого, полностью функционального РСВ-специфического системного и локального CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа, который обеспечивает защиту иммунизированных животных от размножения РС вируса в легких.
5. Иммунизация животных сконструированными рекомбинантными вакцинными штаммами ЖГВ, экспрессирующими дополнительные эпитопы РСВ, не вызывает вакцин-индуцированную иммунопатологию после заражения РСВ, характерную для формалин-инактивированной РСВ вакцины.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

(жирным шрифтом отмечены публикации в рецензируемых изданиях: рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования)

СТАТЬИ

1. Isakova-Sivak I. Cold-adapted influenza viruses as a promising platform for viral-vector vaccines / Isakova-Sivak I, Tretiak T, Rudenko L. // **Expert Review of Vaccines**.- 2016.- Vol.15.- №10.- P.1241-1243.
2. Isakova-Sivak IN. Analysis of Immune Epitopes of Respiratory Syncytial Virus for Designing of Vected Vaccines Based on Influenza Virus Platform / Isakova-Sivak IN, Korenkov DA, Fedorova EA, Tretiak TS, Matyushenko VA, Smolonogina TA, Rudenko LG // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**.- 2016.- Vol.161.- №4.- P.533-537.
3. Федорова, Е.А. Моделирование пространственной структуры химерных конструкций на основе гемагглютинаина вирусов гриппа подтипов H2, H7, H9 и эпитопа 243-294 F-гликопротеина респираторно-синцитиального вируса./ Е.А. Федорова, И.Н. Исакова-Сивак, Т.С. Третьяк // Eurasian Scientific Association 2015.Т.11 С. – С. 50-53
4. Kotomina T. Live attenuated influenza vaccine viral vector induces functional cytotoxic T-cell immune response against foreign CD8⁺ T-cell epitopes inserted into NA and NS1 genes using the 2A self-cleavage site / Kotomina T, Korenkov D, Matyushenko V, Prokopenko P, Rudenko L, Isakova-Sivak I // **Human Vaccines and Immunotherapeutics**.- 2018.- Vol.14.- №12.- P.2964-2970.
5. Kotomina T. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both pathogens without inflammatory disease / Kotomina T, Isakova-Sivak I, Matyushenko V, Kim KH, Lee Y, Jung YJ, Kang SM, Rudenko L // **Antiviral Research**.- 2019.- Vol.168. P.9-17.
6. Matyushenko V. Conserved T-cell epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) delivered by recombinant live attenuated influenza vaccine viruses efficiently induce RSV-specific lung-localized memory T cells and augment influenza-specific resident memory T-cell responses / Matyushenko V, Kotomina T, Kudryavtsev I, Mezhenkaya D, Prokopenko P, Matushkina A, Sivak K, Muzhikyan A, Rudenko L, Isakova-Sivak I // **Antiviral Research**.- 2020.- Vol.182.- P.104864/
7. Kotomina T. Neutralizing epitope of fusion protein of respiratory syncytial virus embedded in the HA molecule of LAIV virus is not sufficient to prevent RS virus pulmonary replication but ameliorates lung pathology following RSV infection in mice / Kotomina T., Isakova-Sivak I., Stepanova E., Mezhenkaya D., Matyushenko V., Prokopenko P., Sivak K., Kiseleva I., Rudenko L // **The Open Microbiology Journal**.- 2020.- Vol.14.- №1.- P.147-156.
8. Анализ ростовых характеристик векторных вакцин против респираторно-синцитиального вируса / Т.С. Третьяк, И.Н. Исакова-Сивак, Д.А. Кореньков, и др. // Медицинский Академический журнал// 2016. - Т.16 – 4. - С.171-172.

ТЕЗИСЫ

1. T Tretiak, I Isakova-Sivak, D Korenkov et al., Development of live attenuated influenza vaccine expressing several epitopes of respiratory syncytial virus/ Options IX for the control of influenza// Chicago, USA, 2016 – P. 300.
2. Третьяк Т.С., Исакова-Сивак И.Н., Кореньков Д.А., Смолоногина Т.А., Руденко Л.Г. Анализ ростовых характеристик векторных вакцин против респираторно-синцитиального вируса/ Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия – СПб- 2016 г.
3. Live attenuated influenza vaccine viral vector carrying CD8⁺ T-cell epitopes of respiratory syncytial virus is safe and protects mice against RSV / T. Kotomina, I. Isakova-Sivak, D. Korenkov et al. // Influenza 2018. – Oxford, UK, 2018 – P.12.

4. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both infections without inflammatory disease / T. Kotomina, I. Isakova-Sivak, V. Matyushenko et al // Options X for the control of influenza. – Singapore, Singapore, 2019 – P. 352.
5. Attenuated influenza virus is a promising viral vector for multivalent vaccine against acute respiratory viral infections / V. Matyushenko, I. Isakova-Sivak, D. Korenkov, T. Kotomina et al. // 2nd International meeting on respiratory pathogens – Singapore, 2018.
6. CTL in vivo assay to assess CD8 T-cell responses to foreign CTL epitopes inserted in LAIV viral vector / I. Isakova-Sivak, T. Kotomina, V. Matyushenko, et al. // The 1st ISIRV International Influenza Vaccine Meeting - Immunological Assays and Correlates of Protection for Next Generation Influenza Vaccines, Siena, Italy, 2019.
7. Котомина Т.С., Формирование резидентных Т-клеток памяти у мышей при вакцинации рекомбинантной векторной вакциной для комбинированной защиты против вируса гриппа и респираторно-синцитиального вируса / Котомина Т.С., Матюшенко В.А., Кудрявцев И.В. и др. // Инфекционные болезни в современном мире: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика, Сборник трудов XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Под ред. В.И. Покровского. Москва, 2020. С.110.
8. Котомина Т.С., Холодоадаптированные вирусы гриппа как платформа для создания векторной вакцины от респираторно-синцитиального вируса / Котомина Т.С., Матюшенко В.А., Меженская Д.А. и др. // Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 13–14 апреля 2023 г. – СПб. : ПОЛИТЕХПРЕСС, 2023. – С.50-51.

БЛАГОДАРНОСТИ

Искренне благодарю д.б.н., член-корреспондента РАН Исакову-Сивак И.Н. за активное участие в работе, неоценимую помощь и опыт, переданный в ходе выполнения всех разделов работы. Особую признательность выражаю руководителю отдела вирусологии им. А.А.Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» д.м.н., профессору, заслуженному деятелю науки РФ Руденко Л.Г. за предоставленную возможность работать над интересными научными задачами и представлять результаты исследования на международных научных мероприятиях. Также хочу поблагодарить сотрудников отдела вирусологии им. А.А.Смородинцева: к.б.н. Коренькова Д.А., к.б.н. Степанову Е.А., к.б.н. Меженскую Д.А., к.б.н. Донину С.А., Матюшенко В.А., Прокопенко П.И., Матушкину А.С. за помощь в выполнении различных этапов диссертационного исследования. Также выражаю благодарность заведующему лабораторией отдела иммунологии ФГБНУ «ИЭМ» к.б.н. Кудрявцеву И.В. за помощь в проведении иммунологических исследований. Хочу выразить признательность коллективу д.б.н. Сивака К.В. за помощь в проведении гистопатологических исследований. Выражаю особую благодарность профессору Государственного Университета штата Джорджия (Атланта, США) Sang-Moo Kang и его коллективу (особенно PhD Ki-Hye Kim; PhD Youri Lee, PhD Yu-Jin Jung) за помощь в освоении методов работы с респираторно-синцитиальным вирусом, за активное участие в совместных исследованиях и обсуждение полученных результатов.

Выражаю особую благодарность д.б.н. Егорову А.Ю., д.м.н. Дешевой Ю.А. и д.м.н. Львову Н.И. за конструктивную критику и ценные комментарии, которые позволили улучшить стилистику изложения материалов и результатов диссертационного исследования.