

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение  
«Институт экспериментальной медицины»

---

*На правах рукописи*

КОТОМИНА  
Татьяна Сергеевна

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

1.5.10 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ  
*на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук*

Научный руководитель:  
Д.б.н., чл.-корр. РАН  
И.Н. ИСАКОВА-СИВАК

Санкт-Петербург  
2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ .....	12
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Типы противовирусных вакцин .....	12
1.2. Вирусные векторы .....	13
1.2.1. Наиболее распространенные вирусные векторы .....	13
1.2.2. Использование вирусов гриппа в качестве вирусного вектора .....	17
1.3. Респираторно-синцитиальный вирус .....	19
1.3.1. Общая характеристика .....	19
1.3.2. Роль белков РСВ в его жизненном цикле .....	20
1.3.2.1. Белки F, G, SH .....	20
1.3.2.2. Белки L, P, N, M2-1 .....	22
1.3.2.3. Белки NS1, NS2, M2-2 .....	23
1.3.3. Штаммы РСВ .....	24
1.3.3.1. РСВ Long .....	24
1.3.3.2. РСВ A2 .....	24
1.3.3.3. РСВ Line 19 .....	25
1.3.3.4. РСВ CH-18537 .....	25
1.3.3.5. РСВ Мемфис-37 .....	25
1.3.4. Патогенез РС инфекции .....	25
1.3.4.1. Нейтрофилы .....	26
1.3.4.2. Натуральные киллеры .....	26
1.3.4.3. Дендритные клетки .....	26
1.3.4.4. Макрофаги и моноциты .....	27
1.3.4.5. Популяции Т-хелперов .....	27
1.3.4.6. Механизмы формирования иммунологической памяти к респираторным вирусным инфекциям .....	29
1.4. Прототипы вакцин против РСВ .....	32
1.4.1. История создания вакцин против РСВ .....	33
1.4.2. Современные подходы к разработке вакцин против РСВ .....	34
1.4.2.1. Вакцины на основе вирусоподобных частиц .....	34
1.4.2.2. Векторные вакцины .....	36
1.4.2.3. Живая аттенуированная вакцина .....	38
1.4.2.4. Субъединичные вакцины .....	40
1.5. Заключение к обзору литературы .....	41
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	43
2.1. Материалы исследования .....	43
2.2. Методы исследования .....	44
2.2.1 Методы обратной генетики .....	44
2.2.2 Вестерн блот анализ .....	46
2.2.3 Вирусологические методы .....	47
2.2.4 Методы работы с экспериментальными животными .....	49
2.2.5. Иммунологические методы .....	50
2.2.6. Гистологические методы исследования .....	55

2.2.7. Методы статистического анализа результатов исследования .....	55
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	57
3.1. Отбор полиэпитопных кассет РС вируса для создания векторных вакцин .....	57
3.2. Конструирование рекомбинантных векторных вакцин, экспрессирующих фрагмент РСВ-F <sub>243-294</sub> .....	61
3.2.1. Получение рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ и изучение экспрессии эпитопов РСВ.....	61
3.2.2. Изучение репродукции рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ в системе <i>in vitro</i> .....	63
3.2.3. Оценка репродукции рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ в системе <i>in vivo</i> . Иммуногенность и защитная эффективность в отношении вируса гриппа .....	64
3.2.4. Иммуногенность и защитная эффективность рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ в отношении РСВ .....	66
3.3. Конструирование рекомбинантных штаммов, кодирующих Т-клеточные эпитопы РСВ.....	69
3.3.1. Получение химерных вирусов гриппа, экспрессирующих Т-клеточные эпитопы РСВ .....	69
3.3.2. Оценка репликативных свойств рекомбинантных штаммов ЖГВ-РСВ .....	70
3.3.3. Иммуногенность и защитная эффективность рекомбинантных штаммов ЖГВ-РСВ в отношении вируса гриппа.....	72
3.3.4. Иммуногенность и защитная эффективность рекомбинантных вакцинных штаммов в отношении РСВ.....	73
3.3.4.1. Оценка защитной эффективности рекомбинантных вакцинных штаммов, кодирующих Т-клеточные эпитопы РСВ, в отношении РС инфекции (эксперимент №1).....	74
3.3.4.2. Оценка иммуногенности и эффективности рекомбинантных вакцинных штаммов, кодирующих Т-клеточные эпитопы РСВ, в отношении РС инфекции (эксперимент №2).....	81
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	94
ВЫВОДЫ .....	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....	146
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 .....	158

## ВВЕДЕНИЕ

**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 [278]. По экспертным оценкам, благодаря использованию вакцин удастся ежегодно избежать около 6 млн. смертей [82]. 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 [313]. 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 [194]. 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 [265]. К настоящему моменту большое число различных вирусов уже были изучены в качестве векторов, например, вирусы семейств *Poxviridae*, *Adenoviridae*, *Togaviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae* и др. [297, 348]. 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 [181]. 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 адъювантов, 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 предрасположенности населения к гриппу. 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 холодоадаптированного 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 [190]. 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 РСВ инфекцией, двое младенцев погибли [169]. В этой связи к новым вакцинам от РСВ 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 холодной 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 [3].

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 F<sub>243-294</sub> РС вируса [184]. 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 [156]. 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<sup>+</sup> Т-клеточный иммунный ответ [305]. 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<sup>+</sup> Т-клеток памяти, специфичных эпитопу M2<sub>82</sub> РСВ, что указывает на необходимость соблюдения осторожности при разработке вакцин против РСВ на основе Т-клеток [306]. Важно отметить, что Schmidt с соавт. продемонстрировали, что иммунизация эпитопом M2<sub>82</sub> РСВ, доставленным непосредственно в ткани легких с использованием рекомбинантного вируса гриппа, приводила к образованию локализованных в легких РСВ-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти (тканерезидентных Т-клеток памяти, tissue resident memory, T<sub>RM</sub>), связанных со снижением иммунопатологии после заражения РС вирусом [306]. Известно, что живые гриппозные вакцины, в отличие от инактивированных, способны вызывать образование субпопуляции T<sub>RM</sub> 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 [371]. 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<sub>RM</sub> клеток, специфичных как к эпитопам вируса гриппа, так и к встроенным Т-клеточным эпитопам другого вируса.

### **Цели и задачи исследования**

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<sup>+</sup> Т клеток, обладающих выраженной цитотоксической активностью в отношении целевого эпитопа *in vivo*.
6. Впервые показана способность РСВ эпитоп-специфических CD8<sup>+</sup> 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  $CD8^+$  T-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 B- и T-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 Arexvy (GlaxoSmithKline, Великобритания) и Abygsvo (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 [140].

### **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<sup>+</sup> 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.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Типы противовирусных вакцин

Вопреки существенным научным и медицинским достижениям последних десятилетий, вирусные инфекции остаются актуальной проблемой общественного здравоохранения ввиду способности патогенов к эволюции и быстрому распространению в человеческой популяции, вызывая локальные эпидемии и глобальные пандемии. Разработка противовирусных вакцин является одним из наиболее эффективных подходов в борьбе с вирусами, поскольку вакцинация позволяет активизировать иммунную систему организма и защитить его от возможной инфекции. В 1798 году Эдвард Дженнер изобрел вакцину против оспы. Его идея основывалась на наблюдении, что доярки, которые ранее переносили не угрожающую жизни коровью оспу, не заболевали особо опасной натуральной оспой. Он предположил, что введение небольшого количества гноя из пустулы человека, заболевшего коровьей оспой, здоровому может предотвратить заболевание натуральной оспой. Спустя век Луи Пастер создал новый принцип получения ослабленного (аттенуированного) инфекционного агента с помощью воздействия – нагревания, либо помещения его в бескислородную среду. Еще одним популярным способом аттенуации стало проведение последовательных пассажей патогена в неестественных (неоптимальных) условиях. Благодаря этому методу появились вакцины против туберкулеза (BCG), вируса бешенства и вируса желтой лихорадки. В 1923 году Александр Гленн и Барбара Хопкинс разработали метод инактивации бактериальных токсинов с помощью формальдегида. С помощью этого метода были созданы вакцины против дифтерии и столбняка [97]. Возможность культивирования вирусов в условиях *in vitro* открыла перспективы для использования иных способов ослабления вирусов. В 1960-х годах были созданы вакцины против полиомиелита, кори, краснухи, эпидемического паротита и ветряной оспы. Также были разработаны вакцины на основе капсульных полисахаридов для борьбы с менингококками и пневмококками. Благодаря стремительному развитию микробиологии и иммунологии была оценена значимость эпитопов патогенов и реакции, развивающиеся у хозяина в ответ на вакцинацию. Развитие методов молекулярной генетики и секвенирования генома позволило разработать вакцины против РНК-вирусов, например, живые и инактивированные вакцины против гриппа [7, 205] и живые ротавирусные вакцины [60]. Учитывая, что цельноклеточные вакцины в некоторых случаях могут вызывать нежелательные побочные эффекты, стали появляться ацеллюлярные пептидные вакцины, например вакцина против коклюша [299]. По разным

причинам традиционные подходы, включающие живые аттенуированные вакцины и инактивированные вакцины, оказались неэффективными в отношении некоторых патогенов: ВИЧ, РСВ, вируса Эпштейна-Барра и др. Одним из альтернативных методов борьбы с такими инфекциями является использование векторных вакцин для доставки в организм целевых протективных антигенов.

## 1.2. Вирусные векторы

Концепция вирусных векторов стала возможной благодаря развитию методов получения рекомбинантных ДНК в 70-х годах, что открыло перспективы для направленного встраивания фрагментов чужеродного генетического материала в геном вируса-вектора. Первые рекомбинантные молекулы ДНК были созданы в 1972 году. Клеточную культуру трансфицировали рекомбинантным вирусом SV40, экспрессирующим сегмент фага  $\lambda$  и галактозный оперон [118, 146]. Результаты исследования открыли возможность использования технологии рекомбинантной ДНК для любых последовательностей ДНК вектора и вставки, независимо от того, какому виду они принадлежат. Прорывом в вирусологии стала разработка вирусных векторов на основе вирусов простого герпеса и вирусов коровьей оспы [220, 262, 276]. Затем были разработаны методы по специфическому целенаправленному изменению геномов аденовирусов, непатогенных вирусных сателлитов – аденоассоциированных вирусов [197], цитомегаловирусов [170, 203], вируса Эпштейн-Барра [289] и прочих.

Использование ретровирусов, гаммаретровирусов и лентивирусов для доставки генов в клетки или ткани-мишени является одним из инструментов генной терапии. Генная терапия направлена на изменение генов внутри организма в попытке вылечить или остановить развитие болезни, обусловленной наличием мутаций в геноме человека. В целом, можно выделить два класса вирусных векторов, один из которых включает векторы для генной терапии, т.е. направленной модификации генома целевых клеток с целью коррекции патологического состояния, а другой – векторы для доставки в клетки-мишени чужеродных генов для временной экспрессии с целью индукции иммунного ответа к целевым патогенам [42, 75].

### 1.2.1. Наиболее распространенные вирусные векторы

Широкое распространение в качестве вектора получили аденовирусы (AdV). Эти векторные кандидаты обладают низкой патогенностью и токсичностью, обеспечивают длительную экспрессию трансгена [258]. Стоит подчеркнуть, что вирусные векторы имеют общие структурные черты с вирусами дикого типа, и, попадая в организм хозяина, стимулируют выработку врожденного и адаптивного иммунного ответа. Если ранее

организм подвергался воздействию аналогичного вируса дикого типа, то сгенерированные антитела потенциально могут мешать экспрессии трансгена и блокировать трансдукцию при вакцинации. Среди разнообразия подтипов аденовирусов в качестве вирусных векторов принято использовать AdV2, AdV26 и AdV35, которые демонстрируют низкую серопревалентность. Также применяют AdV5 из-за его высокой иммуногенности и эффективности [104]. В аденовирусные векторы встраивают фрагменты размером больше 5 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) с помощью систем двойных векторов, используя свойство межмолекулярной конкатемеризации генома аденовируса [79, 220]. В этом случае большую экспрессионную кассету делят на две, которые встраивают в аденовирусные вектора, используя стратегию двойного транс-сплайсинга [369].

Вирусы простого герпеса (ВПГ) – еще одна разновидность ДНК-вирусов. ВПГ активирует литический тип репликации и индуцирует латентную инфекцию, обеспечивая длительную экспрессию трансгена [85]. Делеция генов ВПГ позволила создать векторы экспрессии с низкой токсичностью и возможностью включать в геном фрагмент ДНК размером до 30 т.п.н. [129].

Альфовирусы (вирус леса Семлики, вирус лихорадки Синдбис, вирус венесуэльского лошадиного энцефалита и Getah-like M1) и флавивирусы (вирус Кунджин, Западного Нила и Денге) – группа одноцепочечных самореплицирующихся РНК с положительной полярностью, которые используются в качестве векторов с упаковочной емкостью 6-8 т.п.н. [201]. Самореплицирующиеся вирусные векторы способны поддерживать высокие уровни экспрессии трангенов благодаря наличию РНК-зависимой РНК-полимеразы, с помощью которой воспроизводится субгеномная РНК в количестве около  $10^6$  копий на клетку [200].

Вирусные векторы на основе ретровирусов относятся к семейству РНК-содержащих вирусов. Жизненный цикл ретровирусов отличается способностью копировать РНК-геном в форму двуцепочечной ДНК, который случайным образом интегрируется в геном клетки-хозяина. Интегрированная форма называется провирусом. ДНК провируса встраивается в плазмидные векторы для клонирования [12], при этом ретровирусы могут вмещать до 8 т.п.н. чужеродного генетического материала. Недостатком ретровирусов является их неспособность инфицировать неделящиеся клетки, что повысило интерес к применению лентивирусных векторов для генной терапии. Хотя лентивирусы относятся к семейству ретровирусов, они способны инфицировать как неделящиеся, так и неделящиеся клетки, обеспечивая низкую цитотоксичность [164, 346]. Лентивирусный вектор имеет такую же хромосомную интеграцию и упаковочную способность, что и обычные ретровирусы и поддерживает внутри себя вставку, которая

требует длительной экспрессии [245].

Разрабатывают векторные вакцины на основе вируса коровьей оспы, рабдовирусов (вирусы бешенства и везикулярного стоматита) [303], вируса болезни Ньюкасла [68], вирусов Коксаки [35] и других вирусов. Основные преимущества и недостатки известных вирусных векторов отражены в Таблице 1.

Таблица 1 – Основные достоинства и ограничения применения некоторых вирусных векторов (модифицированный вариант [108, 338]).

Название вектора	Тип генома	Емкость вектора	Достоинства	Ограничения использования
Адено-ассоциированные вирусы	оцДНК	<5 т.п.н.	Широкий тканевой тропизм; непатогенные; длительная экспрессия генов - вставки	Небольшая емкость; требуется большая доза из-за невысокой иммуногенности; наличие предсуществующего иммунитета к вектору
Аденовирусы 5 типа	дцДНК	8 т.п.н.	Высокая эффективность трансдукции в тканях; индуцируют выработку устойчивого гуморального и клеточного иммунных ответов.	Лицам старше 55 лет требуется несколько инъекций; наличие предсуществующего иммунитета; риск развития вакцин-индуцированного тромбоза
Аденовирусы 26 типа И аденовирусы шимпанзе	дцДНК	8 т.п.н.	Индуцируют выработку устойчивого гуморального и клеточного иммунных ответов Низкая серопревалентность	Риск развития воспалительной реакции и вакцин-индуцированного тромбоза

			у людей	
Ретровирусы	РНК	8 т.п.н.	Устойчивый механизм передачи чужеродной вставки в делящихся клетках	Небезопасны; могут спровоцировать процесс онкогенеза; трансдуцируются только в делящихся клетках
Лентивирусы	РНК	7-8 т.п.н.	Отсутствие или низкий предсуществующий иммунитет; высокая иммуногенность; не требуется адъювант; высокая устойчивость к иммунным реакциям	Неизвестное происхождение; не стандартизирован производственный процесс
Вирусы простого герпеса	дцДНК	40-150 т.п.н.	Большая емкость; обладают сильным тропизмом к нейронам (надо пояснить)	Могут инициировать сильные воспалительные реакции
Вирусы кори	оцРНК	25 т.п.н.	Высокая емкость, хорошо переносятся пациентами	Низкая иммуногенность в случае введения без адъюванта
Вирус везикулярного стоматита	оцРНК	11 т.п.н.	Не является человеческим патогеном; можно разработать мукозальную вакцину	Могут оказаться нейровирулентными для детей (поражают нейроны центральной нервной системы (ЦНС) у грызунов и макак)



Технология векторных вакцин активно использовалась во время эпидемии, вызванной лихорадкой Эбола в Западной Африке, и пандемии COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2. В целом сам подход к созданию векторных вакцин требует оценки рисков для биобезопасности. В условиях глобальных эпидемий и пандемий требуются готовые векторы с известным профилем безопасности и сведениями об эффективности предыдущих вакцинных кандидатов, для создания которых использовались эти векторы.

### 1.2.2. Использование вирусов гриппа в качестве вирусного вектора

У любого вирусного вектора есть свои преимущества и недостатки, однако не все кандидаты оказываются приемлемыми для людей с точки зрения безопасности. Одной из перспективных стратегий является использование в качестве вектора-носителя для чужеродных генов ослабленного вируса, который представляет собой готовую вакцину с доказанной эффективностью и описанным профилем безопасности. Вирусы гриппа – одни из наиболее изученных патогенов, обладающих рядом преимуществ и набором характеристик, которые могут использоваться как альтернатива существующим вирусным векторам. Описаны технологии получения рекомбинантных вирусов гриппа с помощью методов обратной генетики. Например, вирусы гриппа получают по модифицированному методу с помощью системы РНК полимеразы I/II, разработанному Hoffmann и соавторами [128]. Геном вируса гриппа организован таким образом, что во время репликации отсутствует стадия синтеза ДНК, что позволяет исключить интегрирование чужеродного вирусного генома в клетку-хозяина [175]. Это свойство делает гриппозную платформу привлекательной в сравнении с векторами-кандидатами с ДНК геномом. Кроме того, вирусы гриппа способны вызывать сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ после иммунизации, а также стимулировать механизмы врожденного иммунного ответа, такие как ген-1, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I) и интерферона бета (ИФН-β) [270].

При интраназальном введении векторная вакцина на основе вируса гриппа позволяет доставлять желаемые чужеродные эпитопы другого антигена в верхние дыхательные пути, индуцируя иммунитет в слизистых оболочках носовых ходов – в основных местах проникновения многих патогенных микробов и вирусов, при этом не требуется использование адъювантов [334]. Применение вакцины в виде назального спрея – простой, безыгольный и безболезненный способ введения, не требующий участия квалифицированного медицинского персонала. В ранних экспериментах с гриппозным вектором была продемонстрирована возможность включения чужеродных эпитопов в антигенные участки белка НА: химерные вирусы индуцировали выработку антител и

цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [102].

К настоящему времени показана возможность встраивания чужеродной генетической информации в гены гемагглютинаина (НА), нейраминидазы (NA) и неструктурных белков вирусов гриппа. Во многих исследованиях в качестве основы рекомбинантной векторной вакцины используется штамм A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), который является донором высокой репродуктивности для производства инактивированной вакцины против гриппа, или модельный штамм A/WSN/1933 (H1N1). Оба штамма не были лицензированы для применения в качестве живой вакцины у людей, так как неизвестна их история происхождения, а также эффективность и безопасность в разных возрастных группах. Атенуированный фенотип у этих штаммов достигается в результате изменения генетической структуры, а именно укорочением гена NS1 белка. В случае вакцинации пациентов может произойти реассортация генов с вирусом гриппа дикого типа, которая будет представлять опасность реверсии к вирулентному фенотипу. Другой класс аттенуированных вирусов гриппа – холодоадаптированные штаммы вируса, которые более трех десятилетий применяются в практике здравоохранения во всем мире в качестве основы для живой гриппозной вакцины (ЖГВ) [147, 165]. Атенуированный фенотип таких вирусов стабильно сохраняется благодаря мутациям в генах, кодирующих внутренние белки вириона [137, 146]. Эти обстоятельства позволили предположить, что холодоадаптированные вирусы гриппа могут быть рассмотрены в качестве вирусных векторов для разработки вакцин против других респираторных патогенов.

Эволюция вирусов гриппа в основном опосредована точечными мутациями и реассортацией вирусных геномов, принадлежащих разным штаммам. Соответственно требуется ежегодное обновление штаммов в составе ЖГВ с актуальными поверхностными антигенными вариантами НА и NA. Учитывая это обстоятельство, можно обойти вопрос предсуществующего иммунитета у лиц, ранее вакцинированных этим вектором. Живая холодоадаптированная гриппозная вакцина используется многие десятилетия в качестве безопасного и эффективного средства для борьбы с вирусом гриппа в мире [147, 165]. Основу отечественной ЖГВ составляют холодоадаптированные вирусы гриппа, подготовленные на основе доноров аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69. Она рекомендована к использованию для профилактики гриппозных инфекций на протяжении практически 40 лет. С 2003 года в США лицензирована живая гриппозная вакцина FluMist на основе доноров аттенуации A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) и В/Ann Arbor/1/66 [138]. При создании живой гриппозной вакцины используются поверхностные гены НА и NA от сезонных вирусов гриппа и 6 генов внутренних и неструктурных белков от донора аттенуации. Штамм ЖГВ может быть получен методами

классического скрещивания диких вирусов с донором аттенуации, либо с помощью методов обратной генетики [137]. Благодаря температурочувствительному фенотипу штаммы ЖГВ реплицируются в верхних дыхательных путях человека, вызывая образование иммунитета на слизистых оболочках, а также системного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, при этом не размножаясь в нижних отделах респираторного тракта.

Векторные вакцины на основе вирусов гриппа представляют собой перспективное направление для создания вакцин против респираторных вирусов, таких как РСВ, SARS-CoV-2, метапневмовирус (МПВ), вирусы парагриппа. Уже более 30 лет различные векторы используются для создания вакцин против РСВ, а, поскольку одним из главных вопросов при разработке таких вакцин является безопасность вектора, использование в качестве вектора штаммов лицензированной ЖГВ, имеющей обширную доказательную базу по безопасности применения у лиц в возрасте от 3 лет и старше, является весьма перспективным направлением. Поскольку вирусы гриппа и РСВ циркулируют одновременно в эпидемическом сезоне, создание вакцины, направленной на две инфекции, также позволит снизить нагрузку на систему общественного здравоохранения.

### 1.3. Респираторно-синцитиальный вирус

#### 1.3.1. Общая характеристика

РСВ принадлежит к порядку *Mononegavirales*, семейству *Pneumoviridae* (пневмовирусов) роду *Orthopneumovirus*. До 2016 года вирус относили к семейству *Paramyxoviridae* [276]. Другим представителем семейства пневмовирусов является метапневмовирус человека. Оба пневмовируса занимают лидирующее положение в структуре заболеваемости детей с рождения до года, пожилых и лиц с ослабленным иммунитетом [172].

Вирионы РСВ плеоморфны: различают сферические формы с диаметром 100-350 нм и нитевидные длиной до 10 мкм и диаметром 60-200 нм [45, 143]. Генетический материал РСВ представлен одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью, размером 15.2 т.н. Геном РСВ несегментирован и содержит 10 открытых рамок считывания, кодирующих 9 структурных и 2 неструктурных белка. Ген M2 содержит две открытые рамки считывания и кодирует 2 белка: M2-1 и M2-2. Вирусная РНК упакована внутри нуклеокапсида спирального типа симметрии, представляющего собой рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП) (Рисунок 1). Репликация происходит с участием РНК-зависимой РНК полимеразы, состоящей из большого L белка и фосфопротеина P (кофактор L). В процессе транскрипции принимают участие P, L и M2-1 белки [277, 311].

РСВ относится к оболочечным вирусам, генетический материал которых окружен белковой оболочкой и липидным бислоем, приобретенным от клетки-хозяина в процессе сборки вируса и его отпочковывания. Матриксный белок М располагается между капсидом и внешним липидным бислоем. Во внешний липидный бислой встроены интегральный мембранный белок-слияния F, белок прикрепления G и малый гидрофобный SH белок. Белки M2-2, NS1 и NS2 не входят в состав вириона, но выполняют важную роль в процессе репликации [99, 368].

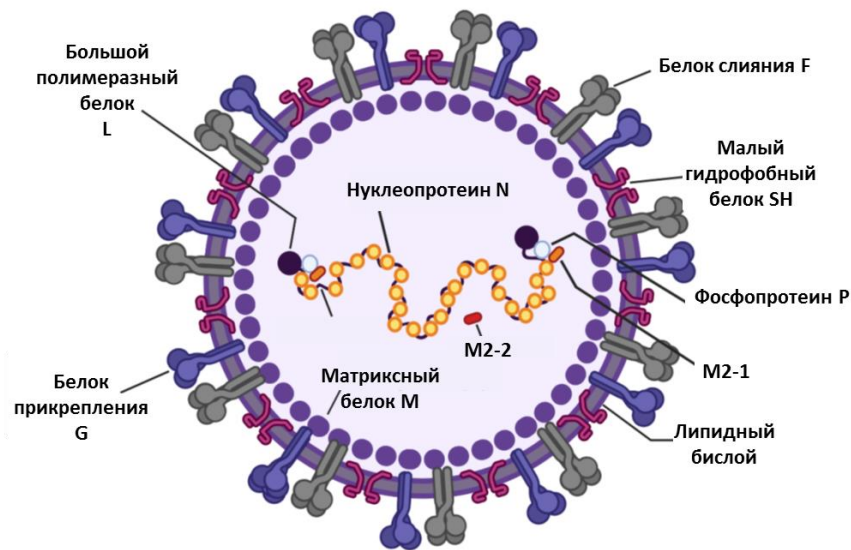


Рисунок 1 – Структура респираторно-синцитиального вируса.

Рисунок адаптирован из [155].

### 1.3.2. Роль белков РСВ в его жизненном цикле

#### 1.3.2.1. Белки F, G, SH

Процесс проникновения вируса в клетку состоит из 2 этапов: прикрепление вириона к клетке хозяина и слияние вирусной оболочки с плазмолеммой клетки. Главная функция гликопротеина G – прикрепление вирионов к клеточной поверхности.

Как правило, при изучении механизмов прикрепления и проникновения РСВ в клетки-мишени используют иммортализованные клеточные культуры. Так, для клеток эпидермальной карциномы человека HEp-2 установлено, что за прикрепление к глюкозаминогликанам клеточной поверхности отвечает белок G РСВ [122]. В свою очередь иммортализованные клеточные культуры не являются идеальной моделью для изучения РСВ, поскольку они достаточно сильно отличаются от эпителия дыхательных путей человека. Благодаря использованию культуры клеток эпителия дыхательных путей человека было показано, что РСВ прикрепляется к апикальной поверхности реснитчатых

клеток. При этом пораженный эпителий не экспрессирует детектируемый уровень гепарансульфата, следовательно, вирус использует иной путь проникновения в клетку хозяина, отличающийся от immortalized клеток. Кроме этого, глюкозаминогликаны не присутствуют на апикальной поверхности плазматических мембран первичных эпителиальных клеток, следовательно, не играют ключевой роли в процессе связывания вируса с клеткой-хозяином *in vivo* [193]. Многие клетки имеют хемокиновый рецептор CX3CR1, в том числе и реснитчатый эпителий клеток легких. Установлено, что только два домена - фракталкин (CX3CL1) и CX3C в составе G-белка РСВ способны связываться с CX3CR1 [218]. Функциональная роль связывания лиганда фракталина с клеточным рецептором CX3CR1 при легочных инфекциях пока слабо изучена. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что при связывании консервативного мотива CX3C G белка с клеточным рецептором CX3CR1 происходит развитие РС инфекции. Тем не менее аттенуированный мутантный вирусный кандидат *cp52* РСВ, лишенный двух поверхностных гликопротеинов G и SH, способен реплицироваться в клеточной культуре *in vitro*, однако с 10-кратной потерей инфекционной активности, но не способен реплицироваться *in vivo* [159, 336]. Кроме этого, G белок способен связываться с гепарансульфат протеогликанами immortalized клеток *in vitro* HSPGs, но эти рецепторы также минимально представлены в эпителии клеток человека [93]. По всей видимости, РСВ использует несколько белков для прикрепления и проникновения в клетку. Установлено, что после связывания F белка РСВ с клеточными рецепторами происходит проникновение вируса в клетки путем макропиноцитоза, а также клатрин-опосредованного эндоцитоза и слияния вирусной оболочки с плазмолеммой клетки [193]. Таким образом, два белка G и F определяют одну и ту же функцию [94]. F белок необходим вирусу для проникновения в клетку, так как он способствует рН-зависимому слиянию вирусной мембраны с плазмолеммой клетки, благодаря которому происходит инфицирование. Согласно данным литературы F белок способен связываться с нуклеонином, эпидермальным фактором роста (EGFR), инсулиноподобным фактором роста -1 (IGFR1), внутриклеточной адгезионной молекулой 1 (ICAM-1). Исследование Mastrangelo указывает, что РНК-связывающие домены 1 и 2 (RBD 1, 2) нуклеонина, экспрессирующегося на апикальной поверхности эпителия дыхательных путей человека, способны связывать F белок РСВ [217].

F белок синтезируется в виде полипептида F<sub>0</sub>, состоящего из 574 а.о. F<sub>0</sub> претерпевает посттрансляционные изменения в сайтах N-гликозилирования, способствуя правильному фолдингу, и последующую транспортировку компонентов репликационного комплекса РСВ в клетку-мишень при участии клеточных шаперонов [62, 109, 345].

Одноцепочечный неактивный белок-предшественник  $F_0$  содержит 2 полиосновных сайта расщепления, узнаваемых фуриноподобными клеточными протеазами. В результате протеолитического расщепления образуются три полипептида: субъединица  $F_2$  на N-конце, 27 аминокислотный полипептид рер27 и субъединица  $F_1$  на C-конце. Субъединица  $F_1$  содержит трансмембранный домен, 2 гептадных домена и пептид слияния на N-конце. Остатки в составе  $F_2$  субъединицы способствуют возможности слияния с клетками F белка и отвечают за видоспецифичность вируса. В зрелом белке, находящемся в активированном состоянии, субъединицы  $F_1$  и  $F_2$  связаны ковалентно двумя дисульфидными связями и образуют гетеродимерный протомер. Три протомера  $F_1$ - $F_2$  связываются посредством слабых межмолекулярных взаимодействий с образованием зрелой формы тримерного F белка в конформации «до слияния» (префьюжн, pre-F). На поверхности вириона F белок в такой конформации имеет пространственную конфигурацию сферического типа и выступает над поверхностью вирусной оболочки на  $\sim 12$  нм [19]. Пептид слияния расположен в составе субъединицы  $F_1$  в центральной полости белка [225]. Процесс слияния вирусной и клеточной мембран опосредован процессом рефолдинга F белка, в результате которой происходит смена конформации «до слияния» на стабильную конформацию «после слияния». В процессе рефолдинга гидрофобный пептид слияния субъединицы  $F_1$  вытягивается из центральной полости F тримера в конформации «до слияния» и встраивается в мембрану клетки-хозяина [225].

#### 1.3.2.2. Белки L, P, N, M2-1

После слияния мембран РСВ проникает в клетку, и его рибонуклеопротеиновый комплекс, включающий вирусную РНК, высвобождается в цитоплазму клетки. Судя по последним данным, транскрипция и репликация происходят в тельцах включения. Эти образования были обнаружены в инфицированных РСВ клетках: в объективе электронного микроскопа они выглядят как скопление гранулярной либо аморфной природы [248]. Согласно опубликованным результатам исследований, тельца включения представляют собой не продукт умерших клеток, а структуру, в которой продолжает происходить репликация вирусной РНК [362]. Внутри телец включения обнаружены как белки N, L, P и M2-1 [46, 191], необходимые для репликации и трансляции вирусного генома, так и вирусная РНК [295].

Геном РСВ является несегментированным и представлен одноцепочечной РНК отрицательной полярности (-) РНК, на которой синтезируется антигеномная (+) РНК. Каталитический кор РНК-зависимой полимеразы представлен L белком, состоящим из нескольких доменов. Полимераза РСВ катализирует как минимум три ферментативные

реакции: во-первых, саму РНК полимеризацию; во-вторых, катализирует добавление гуанозинового кэпа на 5' конец мРНК; и в-третьих, метилирование кэпа. Также присутствуют соединительный и С-концевой домен для поддержания структуры белка. Еще одним необходимым для функционирования РНК-зависимой РНК полимеразы белком является фосфопротеин Р. Этот белок отвечает за координацию процесса синтеза РНК. Р взаимодействует с нуклеопротеином N в случае, когда N связывает РНК (N:РНК), и когда не связывает РНК (белок N<sup>o</sup>), а также связывается с белком М2-1 [64, 65].

Важным условием для проведения вирусной репликации является образование N<sup>o</sup> белка, не содержащего РНК, служащего для инкапсуляции синтезированной одноцепочечной геномной (-) РНК и антигеномной (+) РНК [86, 249]. Благодаря белку-шаперону Р, N не связывается с клеточными РНК клетки-хозяина и препятствует само-олигомеризации с N-конца [142, 158, 289].

Уникальный транскрипционный фактор, характерный для пневмовирусов, это белок М2-1, являющийся белком-антитерминатором транскрипции. Отчасти благодаря установлению его роли в своеобразном контроле над процессами транскрипции, РСВ включили в состав нового семейства пневмовирусов [235]. В прокариотических клетках под антитерминационными механизмами понимают такое взаимодействие регуляторных белков со структурами РНК, которое приводит к дестабилизации терминаторных сигналов, либо РНК-полимераза обходит области, содержащие терминаторы. Таким образом, для РСВ транскрипции необходимы белки L, P, М2-1, а вирусной репликации – N и Р.

#### 1.3.2.3. Белки NS1, NS2, М2-2

Два неструктурных белка NS1 и NS2 могут функционировать как по отдельности, так и в комплексе, демонстрируя синергический эффект. Внутри зараженной клетки организма оба белка экспрессируются и взаимодействуют с врожденной иммунной системой, влияя на механизмы сигналинга и выработку интерферона [321, 332]. Показано, что ингибирование процессов апоптоза опосредуется белками NS1 и NS2, благодаря чему достигается количественное увеличение выхода вирусного потомства [34]. На основе системы мини-репликона было продемонстрировано, что коэкспрессия белка NS1 и в меньшей степени NS2 ингибирует транскрипцию и репликацию за счет воздействия на геномные промоторы в (-) и (+) цепях РНК [14]. Следовательно, NS1 и, возможно, NS2 могут подавлять и ограничивать синтез вирусной РНК, однако эта гипотеза требует дальнейшего подтверждения [65].

Пока точно не установлена роль М2-2 белка в жизненном цикле РСВ.

Зафиксировано, что в инфицированных клетках белок М2-2 экспрессируется в небольшом количестве. Согласно данным исследований М2-2 может регулировать синтез РНК. Рекомбинантный РСВ с делецией М2-2 медленнее и хуже реплицируется и демонстрирует повышенную активность транскрипции по сравнению с РСВ дикого типа [28].

### 1.3.3. Штаммы РСВ

Большинство лабораторных исследований РСВ сосредоточено на изучении ограниченного числа «исторических» вирусных образцов или прототипных штаммов, выделенных у заболевших. Чаще всего для описания функций вирусных белков и установления закономерности протекания РС инфекции используются два штамма РСВ-А2 и РСВ Long. Эти эталонные штаммы вируса сравниваются с клиническими изолятами, полученными от больных.

#### 1.3.3.1. РСВ Long

Именно этот штамм был выделен американским педиатром и вирусологом Робертом Чанокком из мазка горла ребенка с бронхопневмонией в 1956. После 11-13 пассажей на культуре эпителиальных клеток карциномы гортани человека HEp-2 был получен штамм RSV Long [52]. Штамм Long активно применяли в первых экспериментах по заражению лабораторных животных [49, 266]. Для этого штамма была разработана система обратной генетики по получению рекомбинантного РСВ [134]. В 60-тых годах при изучении свойств штаммов Long и CN-18537 стало очевидным, что РСВ не монотипичен и существуют разные антигенные варианты вируса, что нашло подтверждение позднее [61]. Различают А и В подтипы РСВ.

#### 1.3.3.2. РСВ А2

Впервые этот штамм выделили у ребенка в Австралии в 1961 году [188]. Полученный изолят без дополнительных пассажей стал прототипом подгруппы РСВ А2 и активно используется до сих пор в качестве эталонного вируса. С использованием РСВ А2 ведутся разработки живых аттенуированных вакцин против РСВ. Штамм РСВ А2 активно размножается в культурах эпителиальных клеток до высоких вирусных титров (HEp-2, Vero, A549), проявляя выраженное цитопатическое действие на более ранних сроках после контакта с вирусом, что делает этот штамм оптимальным для организации и проведения экспериментальной работы [325]. При проведении экспериментов по заражению РСВ А2 животных фиксируется высокий уровень иммунного ответа, позволяя проводить подробный анализ его свойств [237, 364]. В 1995 году была представлена первая обратно-генетическая система для РСВ А2. Культура клеток HEp-2 была



инфицирована модифицированным вирусом осповакцины Анкара (MVA), экспрессирующим ДНК-зависимую РНК-полимеразу бактериофага T7 и гены, кодирующие белки N, P, L, M2 (ORF1), а также кДНК, кодирующую антигенную РНК РСВ штамма А2 [63]. В 2012 году была разработана усовершенствованная система с использованием бактериальной искусственной хромосомы ВАС [133] в качестве вектора, экспрессирующей антигенную РНК штамма А2-линия 19 РСВ, который более патогенен для мышей, чем А2 [236], и плазмид, содержащих гены белков N, P, L, M2.

#### 1.3.3.3. РСВ Line 19

РСВ Line 19 относится к подтипу А и впервые был выделен у младенца с респираторным заболеванием в 1967 году [126]. Патогенез инфекции при заражении РСВ Line 19 у мышей отличается от патогенеза, вызванного другими штаммами А2 и Long. Иммунный ответ у мышей при заражении РСВ линии 19 развивается по типу Th-2 и характеризуется повышенной экспансией бокаловидных клеток эпителия и повышенным уровнем ИЛ-13 и белка-муцина MUC5AC по сравнению с другими штаммами [199, 327].

#### 1.3.3.4. РСВ СН-18537

СН-18537 относится к подтипу В и впервые был выделен в 1962 году. Еще в 60-х годах было установлено, что СН-18537 отличался по антигенности от других изолятов того времени [61]. Штамм СН-18537 является прототипом для подгруппы РСВ-В и используется в различных исследованиях для оценки антигенности и генетического разнообразия [192].

#### 1.3.3.5. РСВ Мемфис-37

Штамм Мемфис-37 относится к подтипу А РСВ и был выделен в 2001 году у больного ребенка [171]. Клинический изолят был клонирован методом бляшек и накоплен на одобренной FDA клеточной культуре Vero при соблюдении требований GMP. Мемфис-37 использовался для изучения патогенеза РСВ, динамики иммунологического ответа на инфекцию у здоровых иммунокомпетентных взрослых, а также в качестве платформы для тестирования ингибиторов, вакцин и терапевтических средств для лечения РС инфекции [17, 88]. В одном из исследований было показано, что характер патогенеза и иммунные реакции при интраназальном заражении новорожденных ягнят штаммом РСВ Мемфис-37 наиболее близки к человеку по сравнению с другими животными [180].

#### 1.3.4. Патогенез РС инфекции

При попадании РСВ в организм хозяина паттерн-распознающие рецепторы (PRRs) иммунной системы обнаруживают молекулярные паттерны, ассоциированные с

патогенами (PAMPs), стимулируя механизмы врожденного иммунного ответа. Система PRRs включает в себя толл-лайк рецепторы (TLRs), RIG-I, нуклеотид-связывающие рецепторы олигомеризации подобные домену (NLR). При связывании с этими рецепторами в организме хозяина происходят клеточно-опосредованные реакции, а именно выработка интерферонов I типа, провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые стимулируют механизмы врожденного иммунитета. Активация макрофагов, натуральных киллеров (NK) и дендритных клеток определяет дальнейшее формирование приобретённого вирусспецифического иммунного ответа [196].

#### 1.3.4.1. Нейтрофилы

РС инфекция способна стимулировать выработку системного иммунного ответа, особенно выработку нейтрофилов в респираторном тракте. Количество нейтрофилов преобладает над остальными клеточными популяциями в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) у детей, находящихся на аппарате искусственной вентиляции лёгких (ИВЛ) [87]. Нейтрофилы активируются на начальной стадии патогенеза и продуцируют нейтрофильную эластазу, а также экспрессируют маркеры активации CD11b, CD18, и CD54 (ICAM-1) [83]. Во время инфекции у заболевших наблюдается апоптоз нейтрофилов и образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) [254]. В случае летального исхода по причине РС инфекции в легочной ткани погибшего регистрируется обширная нейтрофильная инфильтрация [148, 357].

#### 1.3.4.2. Натуральные киллеры

Существует корреляция между тяжестью протекания заболевания и общим количеством NK клеток, а при летальном исходе NK клетки практически не обнаруживаются в легочной ткани [36, 37]. В случае тяжелых бронхоолитов у детей, находящихся на ИВЛ, в БАЛ обнаруживают NK клетки, экспрессирующие гранзим В [21, 166].

#### 1.3.4.3. Дендритные клетки

Дендритные клетки (DCs) способны обнаружить РСВ и переработать вирусные антигены в пептиды, которые презентуются Т клеткам в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) в качестве эпитопов. Таким образом, DCs способны активировать адаптивную иммунную систему хозяина. DCs способны генерировать защитный гуморальный иммунный ответ, инициируя поляризацию в сторону CD4<sup>+</sup> Т-клеток. На поверхности дендритных клеток экспрессируются РС-распознающие рецепторы PRRs: TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR7, RIG-I и NOD2 [155]. В

легочной ткани представлены несколько субпопуляций дендритных клеток, включая cDC1, которые презентуют антигены CD8<sup>+</sup> Т-клеткам, cDC2, которые опосредуют праймирование CD4<sup>+</sup> Т-клеткам, и плазматоидные DC, которые продуцируют ИФН I типа.

Мобилизация обычных и плазматоидных дендритных клеток из кровотока в слизистые оболочки носа происходит на ранних стадиях РС инфекции.

#### 1.3.4.4. Макрофаги и моноциты

Альвеолярные макрофаги выступают в роли антигенпрезентирующих клеток (АПК) во время РС инфекции. Они обнаруживаются в БАЛ заболевших и коэкспрессируют поверхностные гликопротеины РСВ, HLA-DR, ИЛ-1 $\beta$  и цитоплазматический фактор некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) [233, 253]. У погибших в результате РС инфекции зафиксирована активация CD69<sup>+</sup> моноцитов в легочной ткани [148]. Во время острой РС инфекции у заболевших наблюдается сниженная экспрессия TLR8 и ФНО- $\alpha$  моноцитов в периферической крови, которая нормализуется при выздоровлении, а также увеличенная экспрессия TLR4 [23, 101].

#### 1.3.4.5. Популяции Т-хелперов

Иммунный ответ Th1 считается провоспалительным и важен для выработки клеточно-опосредованного иммунного ответа, который требуется для контроля внутриклеточных патогенов; следовательно, он играет важную роль в защите от вирусных инфекций. Ответ по типу Th1 характеризуется продукцией цитокинов ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-18 и ФНО- $\alpha$ . При РС инфекции в кровотоке повышена концентрация ИФН- $\gamma$ , растворимых рецепторов ФНО-II и ИЛ-2. Системный ИФН- $\gamma$  оказывает защитное действие при РС инфекции, однако его уровень зависит от возраста пациента и тяжести протекания заболевания: он значительно ниже у детей с бронхиолитами, которым требуется ИВЛ, чем у детей с более легким течением заболевания [124, 263]. Сниженный индекс соотношения ИФН- $\gamma$ / ИЛ-10 свидетельствует о наличии гипоксии и одышки [8]. У пациентов с гипоксией во время острой фазы РС инфекции в мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС) зафиксирована сниженная экспрессия мРНК ИФН- $\gamma$ . Кроме того, уровни циркулирующего ИЛ-12 ниже у пациентов с тяжелым течением РСВ-ассоциированных бронхиолитов, чем у пациентов с легкой формой инфекции или в группе контроля [124, 263].

Локально, в слизистых оболочках носовых ходов и легких отмечается повышение уровня ИФН- $\gamma$  [166, 168]. Активная секреция ИФН- $\gamma$  в дыхательных путях оказывает защитное действие, при этом более низкая продукция ИФН- $\gamma$  связана с повышенными

показателями тяжести протекания заболевания, гипоксией и потребностью в вентиляции легких [103, 309]. При РСВ-ассоциированном бронхолите при выздоровлении наблюдается увеличение соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-10 в носоглотке, что свидетельствует о защитной функции ИФН- $\gamma$  [27].

Также при РС инфекции наблюдается повышение других цитокинов, продуцируемых Th1, а именно – ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-18 и ФНО- $\alpha$  в слизистых оболочках носа [26, 77, 259], а в легких – ИЛ-1, ИЛ-2 и ФНО- $\alpha$  [166]. Выработка ФНО- $\alpha$  достигает пика в острой фазе инфекции, а затем снижается во время выздоровления [26, 57]. В БАЛ младенцев с тяжелой формой РС-инфекции наблюдается высокое соотношение мРНК ИЛ-6, а по мере снижения тяжести протекания заболевания наблюдается высокое соотношение ИЛ-6/ФНО- $\alpha$  [132].

Иммунный ответ по типу Th2 характеризуется продукцией цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10, и ИЛ-13, которые влияют на формирование антительного иммунного ответа (в частности IgE), а также функционирование эозинофилов. У детей с РС инфекцией наблюдается повышенная концентрация всех маркеров Th2 иммунного ответа [76, 230, 370]. Преобладание Th2 ответа наблюдается также при атопии, что может быть связано с защитой от паразитарных инфекций, а также может опосредовать и ограничивать Th1-опосредованное воспаление. Чем выше концентрация ИЛ-6 и ИЛ-10 в крови, тем тяжелее болеет пациент [8, 76, 344]. Уровни ИЛ-4, ИЛ-5 и ССЛ-5 при РС инфекции выше, чем при инфекции, вызванной вирусом гриппа А [330].

У детей с РС инфекциями обнаружено повышение концентрации ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13 в назальных смывах [26, 58, 296] и в легких [30, 166, 229]. Выработка ИЛ-10 в дыхательных путях, по-видимому, оказывает защитное действие при РС инфекции, при этом концентрации обратно пропорционально коррелируют с продолжительностью кислородной поддержки [24, 58]. Однако у детей младше 3 месяцев наоборот, высокая концентрация ИЛ-10 коррелирует с тяжестью течения заболевания [344].

У младенцев, находящихся на ИВЛ, в БАЛ повышена концентрация ИЛ-6 [166], в отличие от легкой формы болезни [26, 340]. Такая же тенденция наблюдалась у взрослых, госпитализированных с РС инфекцией [354]. Однако не все экспериментальные данные позволяют сделать вывод о корреляции тяжести заболевания и содержания ИЛ-6 в назальном секрете.

При развитии бронхолитов в результате РС инфекции формируется иммунный ответ, обусловленный преобладанием хелперов второго типа Th2. Высокое соотношение ИЛ-4/ИФН- $\gamma$  представляет собой критерий смещения баланса Th1/Th2 в сторону Th2 и обнаруживается при тяжелом течении бронхолита, вызванном РСВ [42, 263]. Однако

имеющиеся в литературе данные относительно соотношения Th1/Th2 противоречивы и не всегда согласуются. Так, в некоторых источниках указано, что высокое соотношение ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 встречается у детей с тяжелым течением РСВ-ассоциированного бронхиолита по сравнению с контрольной группой [53, 124, 252]. В другом исследовании сравнивали степень выработки ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 в носоглотке у детей, болеющих РСВ и метапневмовирусом (МПВ). В этом исследовании синтезировалось больше ИЛ-4 при РС инфекции по сравнению с МПВ, а уровни ИФН- $\gamma$  были схожи. Эти результаты согласуются с утверждением о наличии иммунного ответа с дисбалансом Th1/Th2 и сдвигом к Th2 [257].

Кроме этого, при тяжелом протекании РСВ-ассоциированного бронхиолита количество циркулирующих Т-хелперов первого типа с фенотипом CXCR3<sup>+</sup> значительно снижается во время фазы острой инфекции по сравнению с периодом выздоровления. Напротив, количество Т хелперов второго типа с фенотипом CCR4<sup>+</sup> не снижается. К тому же у детей с бронхиолитами наблюдается преобладание цитокинов Th2-профиля в БАЛ, характеризующиеся высокими соотношениями легочных цитокинов по сравнению с системными: ИЛ-4/ИЛ-12, ИЛ-10/ИЛ-2, ИЛ-10/ИФН- $\gamma$ , ИЛ-6/ИФН- $\gamma$  и ИЛ-6/ИЛ-2 [26].

У пожилых людей наблюдается более низкое количество РСВ-специфических Т-клеток. В экспериментах *in vitro* при стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови здоровых пожилых пациентов F-белком РСВ или цельным вирусом демонстрируется низкая продукция ИФН- $\gamma$  [55, 72, 197]. У пожилых людей изначально наблюдается слабая активность субпопуляций Th1-клеток, что может объяснить высокую частоту встречаемости тяжелых форм болезни в этой возрастной когорте.

#### 1.3.4.6. Механизмы формирования иммунологической памяти к респираторным вирусным инфекциям

Иммунологическая память – это способность иммунной системы быстро и эффективно отвечать на патоген, с которым организм уже встречался ранее. Важным элементом приобретённого иммунитета являются Т-клетки памяти, локализованные в различных тканях, и выполняющие эффекторную функцию. Т-лимфоциты памяти вызывают реакцию на антигены во вторичных лимфоидных органах. Клетки памяти разделены на три подгруппы: Т клетки центральной памяти (Т<sub>CM</sub>), эффекторной памяти (Т<sub>EM</sub>), резидентные клетки памяти (Т<sub>RM</sub>) [106, 216, 240, 302]. Высоко пролиферативные Т<sub>CM</sub> экспрессируют CCR7<sup>hi</sup> и CD62L<sup>hi</sup>, их экспрессия способствует хомингу во вторичные лимфатические органы. Т<sub>EM</sub> экспрессируют интегринны и хемокиновые рецепторы, благодаря которым Т<sub>EM</sub> проникают в ткани и локализуют очаг воспаления в них [215, 271]. В меньшем количестве Т<sub>EM</sub> экспрессируют CCR7 и CD62L по сравнению с Т<sub>CM</sub>.

$T_{RM}$  были обнаружены по результатам исследований процессов трансплантологии [106, 349] и парабиоза тканей [136, 145, 322]. Они были определены как дополнительный класс нециркулирующих и самоподдерживающихся Т-клеток памяти, которые могут долгое время сохраняться в тканях. Эта группа является наиболее многочисленной среди всех Т-клеток памяти и обнаруживаются в коже [106, 113], легких [10, 131, 208, 268, 351, 367], кишечнике [216], носовой полости [264], половых органах [69, 207, 315], головном мозге [350], печени [96], почках [47] и в лимфоидной ткани [32, 98].  $T_{RM}$ , расположенные в разных тканях, фенотипически и функционально различаются. В большинстве тканей, где представлены  $T_{RM}$ , наблюдается, во-первых, подавление экспрессии CCR7 (С-С-рецептор хемокина 7) и L-селектина CD62L, дефицит которых замедляет выход Т-лимфоцитов из ткани. Во-вторых, наблюдается активация молекул клеточной адгезии CD103, CD69, CXCR3 и интегрина CD49a, благодаря которым происходит удержание  $T_{RM}$  клеток в определенном локусе ткани [106, 337]. Обычно  $T_{RM}$  характеризуются коэкспрессией CD69 и CD103. Экспрессия CD69 ограничивает выход Т-лимфоцита из ткани за счет противодействия S1P1 рецептору, тем самым препятствуя экстравазации лимфоцитов [209, 317]. Молекула CD103 связывается с молекулой клеточной адгезии E-кадгерином, который присутствует в эпителии барьерных тканей для поддержания ее целостности [185]. Функционально  $T_{RM}$  выполняют роль эффекторных клеток [130, 250], обладают цитотоксической активностью, производят цитокины [106, 145]. Помимо этого, они могут привлекать и другие иммунные клетки для контроля противомикробных инфекций [105, 301]. Таким образом,  $T_{RM}$  это Т-клетки памяти, которые локализованы в определенной ткани и готовы обеспечить немедленный передовой иммунитет при попадании соответствующего антигена.

Защиту от респираторных инфекций обеспечивают  $T_{RM}$ , локализованные в слизистой носовой полости и легких. При контакте с респираторным патогеном DCs мигрируют в медиастиальный лимфатический узел для активации наивных  $CD8^+$  Т-клеток. Затем эффекторные  $CD8^+$  Т-клетки мигрируют в ткани носовой полости или легких для их дальнейшего преобразования в  $T_{RM}$  как показано на Рисунке 2. По продукции CD69 и CD103 идентифицируют  $CD8^+$   $T_{RM}$  в легких и носовой полости [264, 268]. В легких  $CD4^+$   $T_{RM}$  экспрессируют CD69, тогда как экспрессия CD103 не зафиксирована [250]. Легочные  $T_{RM}$  внутри легочных компартментов различаются фенотипически и функционально, адаптируясь к микроокружению внутри своей локальной ниши. Так  $CD8^+$   $T_{RM}$  в легочной паренхиме проявляют в основном цитолитическую функцию, экспрессируя высокие уровни гранзима В, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  [228]. В легочных путях  $T_{RM}$  в основном проявляют проапоптотическую функцию [125].



ИЛ-33 и ФНО- $\alpha$  приводит к подавлению K $\ddot{u}$ ppel-подобного транскрипционного фактора и тканевого рецептора S1PR1, который препятствует выходу T<sub>RM</sub> из ткани [317].

В легких CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> образуются при участии ИЛ-2 и ИЛ-15. Дифференцировка T<sub>RM</sub> дополнительно поддерживается за счет сети локальных клеточных взаимодействий внутри ткани. Одна из работ продемонстрировала, что присутствие тканерезидентных T-хелперов, которые являются подтипом ИФН- $\gamma$  продуцирующих CD4<sup>+</sup> T-клеток в легких, стимулирует пролиферацию T<sub>RM</sub> через ИЛ-21 зависимый механизм [319, 331]. Установлена роль легочных моноцитов для дифференцировки и поддержания легочных CD8<sup>+</sup> [74, 80], АПК [374]. Некоторые транскрипционные факторы, включая Hobit и Blimp1 [211], а также T-bet и Eomes [210] могут контролировать образование CD8<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> в разных тканях, включая легкие (Рисунок 2). Поддержание уровня CD8<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> в паренхиме легких зависит либо от восполнения их из популяции циркулирующих клеток CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>, либо от восполнения их из очагов регенерации ткани RAMD (депо T-клеток памяти, ассоциированные с репарацией ткани).

T<sub>RM</sub> дыхательных путей участвуют в защите от различных респираторных патогенов. Была установлена роль легочных CD8<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> в обеспечении перекрестной защиты против вирусов гриппа разных подтипов [367]. При изучении иммунных клеток в легочной ткани доноров обнаружен большой пул грипп-специфических CD8<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> [244]. Значение легочных T<sub>RM</sub> подчеркнуто в исследованиях, касающихся РСВ. Jozwi $\acute{c}$  и соавт. показали, что люди с высоким уровнем РСВ-специфических CD8<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> в дыхательных путях легче переносили РС инфекцию, и что вирусная нагрузка в их респираторном тракте снижена [154]. Другие исследования также выделяют роль РСВ специфических CD8<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>-клеток, которые образуются у мышей в легочной ткани, как важного элемента для защиты против РСВ [173, 198].

#### 1.4. Прототипы вакцин против РСВ

Впервые РСВ был обнаружен в 1956 году [52], и уже более 60 лет ведутся работы по созданию вакцины против этой инфекции. Успешный опыт по созданию формалин-инактивированных вакцин против полиомиелита, кори и парагриппа были применен для создания первых вакцин против РСВ, однако попытки оказались неудачными и требовались новые подходы к этой проблеме. Актуальные сведения о вакцинных кандидатах, находящихся на стадии в доклинических исследований, представлены в Приложении 1. Сведения о кандидатах, изученных в разных фазах клинической испытаний, суммированы в Приложении 2.



#### 1.4.1. История создания вакцин против РСВ

В 50-х годах одним из успешных приемов было признано получение вакцин путем инактивации вируса формалином [293]. В США в 60-х годах были проведены сначала пилотные испытания формалин-инактивированной вакцины против РСВ (ФИ-РСВ) на младенцах, а затем крупномасштабные клинические испытания этой вакцины в группе детей разных возрастов. Самая молодая когорта включала детей в возрасте от двух до семи месяцев. В опытной группе дети (в возрасте 4 месяцев до 10 лет) получали две дозы ФИ вакцины внутримышечно, а в контрольных группах вводили трехвалентную вакцину против парагриппа [56]. У 68% вакцинированных формалин-инактивированной вакциной наблюдали четырехкратное увеличение уровня антител к РСВ по сравнению с контрольными группами [56]. В сезон циркуляции РСВ дети, получавшие ФИ-РСВ вакцину, болели тяжелее (7,9%), чем в группе контроля (4,7%) [56]. Усиление протекания заболевания наблюдали у детей младше двух лет [56]. В другом исследовании участвовали дети в возрасте 2-7 месяцев; после вакцинации ФИ-РСВ наблюдали прирост нейтрализующих антител в 6 раз по сравнению с группой контроля [169]. В последующий за вакцинацией зимний период (1966-67) в группе вакцинированных ФИ-РСВ детей заболел 21 ребенок из 30 при естественном столкновении с РС вирусом, тогда как в группе контроля – в 5% случаев. Шестнадцати из них потребовалась госпитализация, двое младенцев погибли [169]. При сравнении результатов испытаний среди разных возрастных групп было установлено, что дети из самой младшей группы в наибольшей степени подвержены риску тяжелого протекания заболевания при иммунизации ФИ-РСВ в случае естественного заражения РСВ. Было установлено, что развитие вакцин-индуцированного усиления протекания заболевания было вызвано тем, что детей первично иммунизировали ФИ-РСВ. Один из аргументов заключался в том, что у детей, ранее болевших РСВ, после иммунизации ФИ-РСВ не развивалось состояние иммунопатологии после заражения РСВ. Согласно другому аргументу, при внутримышечном введении живого РС вируса РСВ-наивному ребенку не наблюдается защитный эффект от вакцинации, однако и не развивается состояние иммунопатологии. Таким образом, при разработке вакцинных кандидатов против РСВ следует подробно охарактеризовать фенотип формирующихся Т-клеток памяти, а также В-клеток памяти с определенной антигенной специфичностью.

После неудачных клинических испытаний ФИ-РСВ вакцины начались попытки создания живой аттенуированной вакцины. Логика данной стратегии состоит в том, что при иммунизации РС вирус будет реплицироваться исключительно в верхних дыхательных путях, в результате чего синтезированный вирусный антиген будет

подвержен внутриклеточному процессингу и презентации на поверхности АПК, что будет способствовать формированию сбалансированного Т-клеточного и В-клеточного иммунного ответа. При вакцинации младенцев иммунный ответ будет формироваться локально в слизистой оболочке дыхательных путей, где наблюдается низкий уровень материнских IgG антител [347]. Основное преимущество использования такой технологии – безинъекционный способ введения, рекомендованный к применению в педиатрии. На начальных этапах возникли определенные трудности при создании живых аттенуированных РС вакцин, связанные с особенностями культивирования вируса, термолабильностью и его низкой жизнеспособностью. Живой аттенуированный вирус может быть получен несколькими способами: с помощью многократного пассирования вируса при пониженной температуре, либо с помощью мутагенеза, который предполагает обработку вирусов специальными мутагенами, либо введение мутаций в «дикий» вирус. Для ослабления РС вируса обычно проводят манипуляции в белках SH или G [159]. Однако клинические испытания вакцинных кандидатов, полученных с помощью мутагенеза, показали, что не удается достигнуть баланса между достаточной жизнеспособностью вакцинного штамма и его иммуногенностью. В 80-х годах под руководством Н.П. Лещинской был модифицирован низкотемпературный штамм, полученный от профессора П.М. Чанок (США), путем проведения дополнительных 16-ти последовательных пассажей при пониженной температуре. При интраназальной иммунизации данным вакцинным кандидатом детей в возрасте 1-2 лет наблюдали клинические реакции средней тяжести, которые коррелировали с четырехкратным приростом специфических РСВ антител. Высокие титры антител сохранялись лишь в течение 6-8 недель после вакцинации, а затем снижались до исходного уровня [3]. Таким образом, благодаря механизмам аттенуации не удалось получить готовый вакцинный препарат, обеспечивающий поддержание длительного защитного иммунитета. Не было показано развитие вакцин-индуцированной патологии при применении живых аттенуированных вакцин. В связи с неудачей классических методов начали разрабатываться альтернативные методы получения вакцин против РСВ.

#### 1.4.2. Современные подходы к разработке вакцин против РСВ

##### 1.4.2.1. Вакцины на основе вирусоподобных частиц

Вакцины на основе вирусоподобных частиц синтезируются путем самосборки наночастиц, которые экспонируют на своей поверхности множественные копии выбранного антигена и имитируют нативные вирионы. Высокий уровень гуморального и

клеточного иммунного ответа достигается благодаря не только многократному повторению участков антигена, но и иммуностимулирующим свойствам матрицы для иммобилизации наночастиц [144]. Более того, отсутствие вирусного генома в составе этих вакцинных кандидатов делает их безопасными ввиду неспособности воспроизводить жизнеспособные вирионы. На настоящий момент два вакцинных кандидата на основе наночастиц прошли клинические испытания – ResVax (Novavax) и SynGEM (Virtuvax) [318].

Вакцинный кандидат ResVax представляет собой нановакцину для защиты новорожденных и содержит F белок РСВ (конформация «после слияния») и вводится с адьювантом фосфатом алюминия. Эта вакцина разрабатывается для защиты младенцев путем вакцинации будущих матерей, детей в возрасте от 6 месяцев до 5 лет и пожилых лиц старше 60 лет. Вакцинация ResVax здоровых беременных женщин (n=50) вызывала выработку нейтрализующих антител к РСВ, которые эффективно передавались новорожденным [241]. Успехи этого этапа исследований позволили включить вакцинный кандидат в программу исследований PREPARE (многоцентровое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование III фазы). Основная цель этого этапа – оценка эффективности ResVax в отношении инфекций нижнего отдела дыхательных путей, вызванных РСВ инфекцией у младенцев от рождения до 90–180 дней жизни [212]. На этом этапе было показано, что применение ResVax позволило снизить на 44% случаи госпитализаций у детей, связанные с инфекциями нижних дыхательных путей, вызванными РСВ вирусом. Кроме того, зафиксировано снижение РСВ-специфических заболеваний нижних отделов респираторного тракта на 39,4% и снижение РСВ-ассоциированной гипоксемичной дыхательной недостаточности у младенцев младше 3 месяцев на 58,8%. Важно отметить, что случаи пневмонии встречались на 49,4% реже у детей, рождённых у вакцинированных матерей, чем в группе плацебо [212].

SynGEM представляет собой мукозальную вакцину, содержащую F белок РСВ (конформация «до слияния»), связанный с бактериоподобными частицами (BLPs), полученными из *Lactococcus lactis*. Благодаря BLPs, вакцинный антиген РСВ предстает в более естественной конформации, а также наблюдается усиленный иммунный ответ в отношении РСВ [341]. Клинические испытания ResVax без адьюванта были неэффективны в группе пожилых. Вакцинация способствовала снижению на 61% случаев госпитализации пожилых с ХОБЛ. По результатам первой фазы клинических испытаний у привитых не наблюдался прирост нейтрализующих антител в сыворотках крови, которые распознают эпитопы в составе уникального Ø сайта F белка в конформации «до слияния», хотя F белок в составе ResVax разрабатывали со стабилизирующими мутациями для

поддержания конформации pre-F [13, 275]. Тем не менее вакцина индуцировала выработку паливизумаб-подобных антител. В настоящее время клинические испытания ResVax приостановлены.

#### 1.4.2.2. Векторные вакцины

В векторных вакцинах используют вектор-носитель для доставки антигенов РСВ в клетки-мишени и индукции иммунного ответа за счет адьювантного эффекта вектора в отношении антигенов вируса, которые находятся во вставке. Клинические испытания проходят вакцины против РСВ, в которых в качестве вектора используются вирусы MVA, аденовирусы, вирусы парагриппа крупного рогатого скота и вирус Сендай.

Вакцинный кандидат MVA-BN-RSV (Bavarian Nordic) сконструирован на основе модифицированного вируса осповакцины MVA. Этот кандидат экспрессирует F и G белки обоих подтипов (A и B) РСВ, а также N и M2 белки РСВ. Результаты фазы I клинических испытаний показали, что он может индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ против РСВ у пожилых и молодых лиц [294]. Последующее испытание фазы II, оценивающее безопасность и иммуногенность вакцины у 420 пожилых людей ( $\geq 55$  лет), показало, что она хорошо переносится и приводит к формированию стойкого иммунного ответа, который сохраняется в течение как минимум 6 месяцев. Вторую иммунизацию проводили через год после первой и обнаружили, что уровень T клеточного иммунного ответа был выше или схож с тем, который наблюдался после первой иммунизации [150]. В 2022 году началось исследование III фазы у пожилых людей.

Компанией ReiThera разработаны две рекомбинантные вакцины на основе вирусных векторов: PanAd3-PCV и MVA-PCV. В качестве антигенов РСВ используют белки F ( $F_0$   $\Delta$ TM-полноразмерный F без трансмембранного домена), N и M2-1, которые доставляются в клетку-мишень либо аденовирусным вектором обезьян с дефектом репликации (PanAd3), либо MVA вектором [262]. Вакцинные кандидаты PanAd3-PCV и MVA-PCV, вводимые в разных комбинациях разными способами (внутримышечное либо интраназальное введение PanAd3, MVA – внутримышечно), хорошо переносились и были иммуногенны у здоровых взрослых (18-50 лет), несмотря на ранее существовавший естественный иммунитет к РСВ [312]. В I фазе клинических испытаний у пожилых лиц наблюдалась стимуляция как гуморального, так и клеточного звена иммунитета после вакцинации [119].

Аденовирусный вектор, неспособный к репликации, используют для создания VXA-RSV-f (Vaxart). Вакцина содержит белок F РСВ и молекулярный адьювант в виде двуцепочечной РНК. Пероральное введение этой вакцины стимулирует продукцию РСВ-

F-специфических антител у хлопковых крыс и защищает их от челленджа РСВ [153]. Первичные клинические исследования были проведены на взрослых и закончились в 2018 году, но результаты до настоящего времени не были опубликованы [343].

Вакцинный кандидат Ad26.RSV.Pre-F (Janssen) разрабатывают на основе аденовируса человека 26 типа, экспрессирующего белок F в конформация «до слияния» [361]. Эта вакцина продемонстрировала более высокую эффективность по сравнению с Ad26.RSV.Post-F, где F находился в конформации «после слияния». Во второй фазе клинических исследований оценивали сочетанное введение Ad26.RSV.preF и вакцины против сезонного гриппа у 180 здоровых пожилых людей, показавшее приемлемый профиль безопасности и отсутствие признаков иммунной интерференции [290]. Испытания этой вакцины на РСВ-серопозитивных детях в возрасте 12-24 месяцев и взрослых (18-50 лет) показали, что вакцинация индуцирует выработку нейтрализующих антител к РСВ, которые сохраняются в течение 7 месяцев, и то, что вакцинированные были менее подвержены заражению РСВ в естественных условиях [328].

ChAd155-RSV (GlaxoSmithKline) разработана на основе аденовируса-155 шимпанзе, и кодирует белки РСВ F, N и M2-1 [59]. Вакцинный кандидат был предварительно протестирован на модели телят, которая точно воспроизводит механизмы иммунного ответа к РСВ у детей. При вакцинации телят индуцировались нейтрализующие антитела к РСВ, отсутствовали признаки вакцин-индуцированного усиления заболевания и была продемонстрирована защита против бычьего РСВ [182]. Вакцину предложено использовать для профилактики детей в возрасте с 2 месяцев. Во время испытания этого кандидата у здоровых взрослых, ранее подвергшихся естественному воздействию РСВ, ChAd155-RSV, введенный внутримышечно, хорошо переносился и вызывал специфический гуморальный и клеточный иммунитет [59].

Вакцинный кандидат MEDI-534 (MedImmune) разработан на основе гибридного бычьего вируса парагриппа PIV3 с замещенными гемагглютинин-нейраминидазой (HN) и F белком от PIV3 человека, который экспрессирует РСВ-F белок [123]. В I фазе клинических испытаний с участием детей, ранее болевших РСВ, эта живая аттенуированная интраназальная вакцина была безопасной, но минимально иммуногенной [115]. Однако при тестировании на младенцах, серонегативных к РСВ, которые являются целевой популяцией для этой вакцины, MEDI-534 хорошо переносилась и индуцировала иммунный ответ против РСВ примерно у 50% случаев, а против вектора PIV3 – во всех случаях [29]. Необходимы дальнейшие исследования для достижения генетической стабилизации MEDI-534 и усиления иммунного ответа на РСВ [33].

SeVRSV (NIAID) представляет собой способный к репликации вирус Сендай,

штамм мышиноного парагриппа первого типа (PIV-1), который несет ген F РСВ. Вакцинация взрослых (18-45 лет) указывает на то, что предсуществующий иммунитет к вектору приводит к низкому уровню иммунного ответа к РСВ [300].

#### 1.4.2.3. Живая аттенуированная вакцина

Существует несколько подходов к созданию живых аттенуированных вакцин против РСВ. В основе традиционного подхода лежит чувствительность вируса к определенным температурам репродукции или к воздействию химических агентов. Альтернативный подход базируется на использовании методов обратной генетики для получения ослабленного репликационно-компетентного вируса. Вакцины, разработанные при помощи методов обратной генетики, были протестированы на младенцах в возрасте от 4 недель [160, 365]. Живые аттенуированные вакцины рассматривают как безопасные для детей, ранее не болевших РСВ, поскольку их использование не вызывает состояние вакцин-индуцированной усиления протекания заболевания после инфицирования РСВ [169, 366]. Кроме этого, живые аттенуированные вакцины обычно выпускают в виде назальных капель. Попадая в дыхательные пути, они реплицируются в них, в независимости от наличия материнских антител, обеспечивая формирования как гуморального, так и клеточного иммунного ответа [161, 320].

Большинство вакцин этого типа находятся в I фазе клинических испытаний, и ни один из кандидатов не продвинулся дальше фазы II, поскольку достаточно сложно найти вариант с оптимальным балансом между требуемым уровнем аттенуации и высокой иммуногенностью.

По данным исследований одним из способов получения аттенуированного штамма РСВ является делеция SH гена. В связи с этим были разработаны несколько вариантов вакцин. Кандидат rA2cp248/404/1030 $\Delta$ SH сконструирован с несколькими температурочувствительными мутациями и мутациями, приобретёнными в результате пассирования вируса при низкой температуре, а также делецией гена SH. Она была достаточно аттенуирована для детей в возрасте 1-2 месяца [160].

Вакцинный кандидат MEDI-559 (MedImmune, AstraZeneca) отличается от предыдущего кандидата наличием 39 молчащих нуклеотидных замен. Обе вакцины были протестированы на здоровых детях в возрасте 5-24 месяцев, ранее не болевших РСВ. Однако по результатам исследований была обнаружена недостаточная генетическая стабильность обоих кандидатов, склонность к реверсии отдельных точечных мутаций, которые приводят к снижению температурной чувствительности, наблюдающиеся у более трети изолятов вакцинного вируса [213, 304].

RSVcps2 (NIAID, NIH/Wyeth) представляет собой стабилизированную версию вакцины MEDI-559. В I фазе клинических испытаний на детях (6-24 месяца) RSVcps2 хорошо переносилась и обладала умеренной иммуногенностью [39].

Также аттенуированного фенотипа живой вакцины можно добиться с помощью делеции M2-2 гена PCV. Делеция M2-2 приводит к сдвигу в программе синтеза вирусной РНК таким образом, что увеличивается уровень транскрипции вирусной РНК и экспрессия вирусного антигена, но снижается репликация вирусного генома [28]. Оценивались два вакцинных кандидата, приготовленные с использованием этого свойства – MEDI/ $\Delta$ M2-2 и LID/ $\Delta$ M2-2 [162, 222]. В обоих вариантах есть делеция M2-2, оба получены из разных производных кДНК PCV одного подтипа A2, отличающихся на 21 нуклеотидную последовательность, расположенную в разных местах генома. У вакцинного кандидата LID/ $\Delta$ M2-2 удалены нетранслируемые области гена SH и добавлены молчащие замены (сайлент мутации) в SH белке. Внесенные мутации не влияют на фенотип собранного вируса, что подтверждается опытами на мышах [41]. Вакцинация обоими кандидатами стимулировала выработку PCV-нейтрализующих антител, однако важно отметить, что LID/ $\Delta$ M2-2 считалась более эффективной, поскольку она обеспечивала небольшое увеличение репликации: в среднем пиковое значение титра вируса, выделяемого вакцинированными было в 100 раз выше у тех, кто получил LID/ $\Delta$ M2-2 [162, 222]. В связи с чем вакцинный кандидат LID/ $\Delta$ M2-2 предложено было модифицировать путем внесения дополнительной мутации в белке L, вызывающей температурочувствительность, либо внесением 5 точечных мутаций в белки N, F и L, которые ранее были обнаружены в аттенуированном штамме PCV, которые связывают с холодовой адаптацией. Из-за активной репликации кандидат LID/ $\Delta$ M2-2 модифицировали новыми мутациями. Однако вакцинный кандидат LID/cp/ $\Delta$ M2-2 оказался гиператтенуированным, имел низкий инфекционный титр и стимулировал выработку антител лишь у части участников клинических испытаний [222].

Вакцинация кандидатом LID/ $\Delta$ M2-2/1030s, созданным путем добавления генетически стабилизированной мутации 1030s, продемонстрировал у привитых высокий титр нейтрализующих антител, который был клинически эквивалентным титру антител, образующихся при натуральной PC инфекции [224].

Модифицированный вакцинный кандидат на основе LID – D46/NS2/N/ $\Delta$ M2-2-HindIII был сконструирован так, чтобы добиться сходного фенотипа с кандидатом MEDI/ $\Delta$ M2-2. В целом он оказался более аттенуированным по сравнению с LID/ $\Delta$ M2-2, но демонстрировал высокие значения вирусных титров [222].

В исследованиях, проведенных Stobart и соавт., было показано, что

рекомбинантный штамм РСВ OE4 (RSV-A2-dNS1-dNS2- $\Delta$ SH-dG<sub>m</sub>-G<sub>snull</sub>-line19F) с повышенным уровнем антигена F в конформации «до слияния» демонстрирует термостабильность и иммуногенность, несмотря на сильную аттенуацию в дыхательных путях хлопковых крыс [325].

Другая многообещающая стратегия заключается в делеции NS1 и NS2, которые нарушают TGF $\beta$  сигнальный путь клетки хозяина, преобразуя иммунный ответ с целью повышения репликации вируса [18, 234]. Каргон и соавт. провели пошаговую оценку клинических испытаний фазы I вакцинного кандидата RSV/ $\Delta$ NS2/ $\Delta$ 1313/11314L и продемонстрировали его аттенуацию и иммуногенность у РСВ-серонегативных детей [163]. Другие вакцинные кандидаты 6120/ $\Delta$ NS2/1030s и RSV 6120/ $\Delta$ NS1 находятся в стадии изучения на животных.

#### 1.4.2.4. Субъединичные вакцины

Субъединичные вакцины содержат фрагменты белков РСВ и индуцируют прежде всего CD4<sup>+</sup> Т-клеточный иммунный ответ [279]. Вакцинация может представлять риск из-за развития вакцин-индуцированного усиления заболевания после естественного инфицирования РСВ у детей, серонегативных к РСВ [157, 169]. В настоящее время такой тип вакцин разрабатывают для беременных и пожилых людей, которые уже болели РСВ, с целью минимизации риска развития вакцин-индуцированного заболевания [219]. Благодаря использованию адъювантов с этим типом вакцин можно добиться не только повышения иммуногенности, но и индукции нейтрализующих антител за счет стимуляции TLRs рецепторов и добиться созревания аффинности антител [141]. Для создания субъединичных вакцин часто используется F белок в конформации «до слияния» [279], поскольку в конформации постфьюжн отсутствуют некоторые антигенные сайты, которые могут негативно сказаться на эффективности вакцины [31, 227].

Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID, США) разрабатывает вакцинный кандидат VRC-RSVRGP084-00-VP на основе F белка в конформации «до слияния». Вакцина содержит белок DS-Cav1 – секретлируемый вариант F белка, который стабилизирован в конформации «до слияния» [226]. По предварительно опубликованным результатам, благодаря использованию DS-Cav1 была повышена нейтрализующая активность РСВ в сыворотке с 7 до 15 раз, индукция специфических антител к F белку в конформации «до слияния» также была высокая [67].

В компании GSK был разработан вакцинный кандидат RSVPreF3 OA, который вводят вместе с адъювантом AS01. В 2022 году были анонсированы результаты III фазы испытания вакцины у пожилых старше 60 лет. Эффективность вакцины оценили в 82,6% в



отношении инфекций нижних дыхательных путей, вызванных РС вирусом [110]. В мае 2023 года FDA одобрило вакцину RSVPreF3 OA (Arexvy) для использования у людей старше 60 лет.

На основании промежуточных результатов III фазы клинических испытаний (NCT05035212) была одобрена еще одна субъединичная вакцина Abyrsvo, разработанная Pfizer [92]. Эта вакцина содержит два белка F в конформации «до слияния» для обеспечения защитного эффекта в отношении РСВ подтипов А и В. В испытаниях принимали участие 37 000 человек старше 60 лет и эффективность вакцины была оценена в 85,7%.

Вакцинный кандидат DeroVax (DPX)-RSV сконструирован на основе эктодомена белка SH вместе с вакцинной платформой – адъювантом на липидной или масляной основе DeroVax, благодаря которой обеспечивается длительное воздействие антигена. Результаты I фазы клинических испытаний (NCT02472548) продемонстрировали безопасность и формирование длительного гуморального иммунного ответа, который оценивали в течение 180 дней после иммунизации в сыворотке крови у людей в возрасте 50-60 лет [179].

В вакцине GSK3003891A не удалось добиться стабильности антигена F в конформации «до слияния» на этапе производства [219, 279]. Субъединичная вакцина MEDI-7510, разработанная MedImmune, доказала свою иммуногенность, но не смогла защитить пожилых людей от РСВ, поэтому исследования по ее разработке больше не проводят [89].

#### 1.5. Заключение к обзору литературы

РСВ является причиной тяжелых респираторных заболеваний у детей первого года жизни, людей с ослабленным иммунитетом и пожилых лиц [66, 246]. Клиническая картина протекания РС инфекции проявляется по-разному – от легких инфекций верхних и нижних дыхательных путей до пневмоний и бронхолитов у детей.

Единственным специфическим средством лечения является препарат моноклональных антител Паливизумаб (MedImmune, США), рекомендованный для младенцев из группы высокого риска или лиц, кто имеющим другие медицинские проблемы, включая заболевания сердца или легких. Однако высокая стоимость курса лечения делает этот препарат недоступным в странах с наибольшим ущербом от РСВ [310]. К основным проблемам разработки вакцины против РСВ относят необходимость вакцинирования младенцев на раннем этапе (2-4 месяца), выявленный эффект усиления протекания заболевания, связанный с введением формалин-инактивированной РСВ

вакцины с адьювантом квасцов, и трудности в достижении требуемых показателей профилактической эффективности, о чем свидетельствуют повторные инфекции с заболеванием, возникающим на протяжении всей жизни. На данный момент разрабатываются вакцины для женщин репродуктивного возраста и беременных с целью защиты когорты наивных младенцев, а также для защиты пожилых лиц и детей. На разных фазах клинических испытаний находятся вакцины на основе вирусоподобных частиц, векторные, субъединичные и живые аттенуированные вакцины.

В рамках данного исследования предложено рассматривать штаммы лицензированной живой гриппозной вакцины в качестве платформы для разработки вакцины против РСВ. Вирусный вектор на базе штамма ЖГВ обладает рядом серьезных преимуществ по сравнению с остальными векторными платформами. Во-первых, данные вирусы в составе живой гриппозной вакцины стимулируют выработку гуморального и клеточного иммунного ответа и уже многие годы используются в качестве эффективного средства профилактики сезонных гриппозных инфекций. Во-вторых, такие вакцины обладают удобным способом введения и выпускаются в виде назального спрея. Температурочувствительный вакцинный штамм локально реплицируется в слизистой оболочке носоглотки, индуцируя выработку мукозальных антител и цитотоксических Т-лимфоцитов. Кроме того, применение ЖГВ не требует использования адьювантов или повышенных вакцинных доз. Включение же в состав ЖГВ иммуногенных фрагментов-эпитопов нескольких респираторных вирусов, которые бы стимулировали выработку В- и Т-клеточного иммунного ответа к этим вирусам, представляет альтернативный и инновационный подход в конструировании вакцин против ОРВИ.

## Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1. Материалы исследования

*Плазмидные ДНК.* Гены, кодирующие внутренние белки штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), были ранее клонированы в вектор для обратной генетики вируса гриппа рСIPolISapIT [137]. Для конструирования экспериментальных вакцинных штаммов использовали гены гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (NA) потенциально пандемического штамма А/Anhui/1/2013 (H7N9), закодированные в векторе рСIPolISapIT [324].

*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 А2 респираторно-синцитиального вируса из коллекции штаммов вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава РФ и штамм А2 РСВ, любезно предоставленный профессору Sang-Moo Kang (Институт биомедицинских наук, Государственный университет штата Джорджия, Атланта, США) профессором Barney S. Graham (Медицинская школа Morehouse, Атланта, США). Патогенный для мышей вирус гриппа А/Shanghai/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC-RG32A (H7N9-PR8) был предоставлен Центром по контролю за заболеваемостью (CDC, Атланта, США). В качестве контроля использовали рекомбинантный штамм ЖГВ А/17/Anhui/2013/61 (H7N9), полученный ранее в ФГБНУ «ИЭМ» методами обратной генетики [324].

*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 рAL2-T компанией «Евроген» (Москва, Россия).

*Пептиды* M2-1<sub>82-90</sub> (SYIGSINNI) и M2-1<sub>126-145</sub> (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).

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1 Методы обратной генетики

#### *Конструирование химерных генов вируса гриппа*

Для создания вакцинных кандидатов на основе холодоадаптированных вирусов гриппа использовали методы генной инженерии. В генах гемагглютинаина (НА), нейраминидазы (НА) и неструктурного белка NS1 вируса гриппа проводили модификации. Для встраивания были подобраны три варианта эпитопных кассет РСВ. Вирусы получали методами обратной генетики с использованием 4 вариантов химерных плазмид ЖГВ-РСВ и плазмид, кодирующих гены штамма ЖГВ подтипа H7N9.

Для встраивания фрагмента F<sub>243-294</sub> РСВ с N-конца субъединицы НА1 молекулы гемагглютинаина проводили предварительную модификацию гена НА вируса A/Anhui/1/2013 (H7N9) с целью внесения сайта рестрикции BsmBI между участком, кодирующим сигнальный пептид (SP), и геном НА1. Для этого с помощью специально подобранных праймеров, содержащих сайты посадки рестриктазы BsmBI, амплифицировали два соответствующих фрагмента гена НА. Затем с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) перекрывающихся фрагментов (overlap PCR) получали полноразмерную последовательность гена H7 с сайтом BsmBI. ПЦР проводили с использованием набора Phusion Green High-Fidelity ПЦР (Thermo Fisher Scientific, США). Конструкцию встраивали в вектор для обратной генетики вируса гриппа pCIPolISapIT по сайтам рестрикции SapI. Изначально фрагмент F<sub>243-294</sub> РСВ синтезировали с линкерами AAAPGAA с обоих концов. Данный фрагмент был амплифицирован с внесением дополнительных фланкирующих сайтов для рестриктазы BsmBI. Далее проводили клонирование фрагмента РСВ F<sub>243-294</sub> в подготовленный ранее вектор со вставкой H7 по сайтам BsmBI. Сшивание цепей ДНК катализировали T4 ДНК лигазой (Thermo Fisher Scientific, США), после чего проводили трансформацию клеток *E.coli* лигирующей смесью с использованием набора TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки высевали на агаризованную среду с ампициллином и инкубировали при 37°C в течение 12-18 часов. Выросшие колонии накапливали в питательной среде Лурия-Бертани (LB) (VWR life science Amresco, США) в присутствии селективного агента ампициллина. Плазмидная ДНК была выделена набором GenJET Plasmid Miniprep/Maxiprep kit (Thermo Fisher Scientific, США). Наличие вставки РСВ подтверждали аналитической рестрикцией XbaI и секвенированием по методу Сэнгера с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 3130xl (Applied Biosystems, США) и набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1.

Также получали модифицированную версию химерного гена НА+РСВ, в которой гибкий линкер AAAPGAA между РСВ вставкой и НА1 субъединицей был заменен на GGGGSGGGGS. Для этого с помощью праймера вносили сайт BsmBI и последовательность, кодирующую полипептид GGGGSGGGGS, с 5'-конца ПЦР-продукта гена НА1. У химерной плазмиды НА+РСВ, которая описана ранее в настоящем исследовании, с помощью праймеров амплифицировали фрагмент, кодирующий сигнальный пептид, линкер AAAPGAA и вставку РСВ F<sub>243-294</sub>, и вводили с 3'-конца последовательность, кодирующую полипептид GGGGSGGGGS, и сайт BsmBI. Два фрагмента соединяли с помощью overlap PCR с использованием Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, США). Полученную последовательность встраивали в вектор с двунаправленным считыванием рCIPolISapIT по сайтам рестрикции SapI. Последующие манипуляции, направленные на получение плазмидной ДНК, были такие же, как описаны ранее.

Модификацию гена нейраминидазы N9 проводили с целью внесения полиэпитопной кассеты, направленной на индукцию Т-клеточного иммунного ответа к РСВ. Для этого фрагмент РСВ встраивали с С-конца молекулы НА через сайт саморасщепления P2A, который позволяет обеспечить независимый процессинг вирусного белка и встроенных эпитопов РСВ [170]. На начальном этапе получали конструкцию гена N9, в которой были продублированы последние 157 нуклеотидов гена НА, а между этими дополнительными нуклеотидами и участком, кодирующим полноразмерный белок НА, был встроен сайт BsmBI, используя стратегию overlap PCR. На втором этапе амплифицировали участок синтезированной кассеты, кодирующей сайт P2A, фрагменты M2-1-белка РСВ и стоп-кодон. Подготовленный фрагмент со вставкой встраивали в модифицированный ген N9 по сайтам BsmBI с использованием стратегии, описанной ранее для получения химерной конструкции НА+РСВ.

Данную Т-клеточную кассету также клонировали в ген, кодирующий неструктурный белок NS1 штамма А/Ленинград/134/17/57, усеченный до 126 а.о. Сайт для посадки рестриктазы BsmBI вносили после 126-й аминокислоты в NS1 с помощью праймеров и overlap PCR. Плазмиду встраивали в вектор для обратной генетики рCIPolISapIT по сайтам рестрикции SapI. С помощью праймеров во фрагмент со вставкой РСВ вводили сайты посадки для рестриктазы BsmBI и клонировали его в вектор с плазмидой, содержащей ген модифицированного NS1. Таким образом, вставка РСВ локализовалась после 126 аминокислоты NS1 белка, а после нее следовало продолжение гена NS1 в интактной форме.

### *Получение рекомбинантных вирусов гриппа методом электропорации*

Для каждого вакцинного кандидата собирали набор из 8 плазмид, кодирующих все гены целевого вируса, по 2 мкг каждая. Плазмидные ДНК преципитировали с использованием натрий-ацетатного буфера путем инкубации при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 18-20 часов с последующим центрифугированием при 13 000 об/мин,  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Буфер заменяли на 70% этанол и центрифугировали 5 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Надосадок отбирали, осадок подсушивали на воздухе и растворяли в ТЕ буфере (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0).

Клетки Vero, достигшие состояния монослоя, пересеивали на новый флакон с использованием бессывороточной среды OptiPRO SFM (Gibco, США). Спустя 12-18 часов суспензию клеток Vero трансфицировали набором подготовленных плазмид с использованием электропоратора Neon Transfection System (Invitrogen, США) в режиме двух импульсов 1150 В по 20 мс. После процедуры клетки инкубировали в среде без антибиотика 6 часов в  $\text{CO}_2$  инкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$ . Клетки промывали в фосфатно-солевом буфере Дюльбекко (DPBS) и помещали их в среду с антибиотиком-антимикотиком и трипсином в концентрации 4 мкг/мл (Sigma-Aldrich, Германия) и далее инкубировали при  $33^{\circ}\text{C}$  в  $\text{CO}_2$  инкубаторе. Через 3 дня клетки ресуспендировали и получившейся суспензией заражали 10-11 дневные развивающихся куриные эмбрионы (РКЭ) (АО «Птицефабрика Сиявинская», Россия), которые инкубировали в течение 48 часов при  $33^{\circ}\text{C}$ . Наличие инфекционного вируса определяли в реакции гемагглютинации с 0,5%-ми куриными эритроцитами.

### *Изучение генетической стабильности*

Генетическая стабильность сконструированных рекомбинантных вакцинных штаммов была изучена с помощью проведения 5-10 последовательных пассажей в РКЭ и проведением секвенирования генов HA, NS1, NA, содержащих вставку полиэпитопных кассет РСВ, и сравнением с исходными последовательностями этих генов вектора.

#### 2.2.2 Вестерн блот анализ

Оценку экспрессии встроенного нейтрализующего эпитопа РСВ F<sub>243-294</sub> проводили методом Вестерн-блот анализа очищенных на градиенте плотности сахарозы рекомбинантных вирусов гриппа. Проводили электрофоретическое разделение белков вакцинных кандидатов в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфат натрия (SDS) (Bio-rad, США). Перед нанесением образцов на гель их смешивали с 4-х кратным Лэмбли буфером (1М Tris (рН 6,8), 4% SDS, 20% глицерин, 10%  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,002 % бромфеноловый синий) (Bio-rad, США) и инкубировали 3 мин при  $98^{\circ}\text{C}$ . Электрофорез проводили в камере «Mini-Protean» (BioRad, США) при

напряжении 100 В в течение 1 часа в буфере 10xTris/Glycine/SDS (BioRad, США). Образцы переносили из геля на поверхность нитроцеллюлозной мембраны в аппарате Semi-Dry Trans-Blot (Bio-Rad, США) при силе тока 25мА в течение 1 часа. После этапа блокировки неспецифических сайтов связывания с помощью 5%-го обезжиренного молока, приготовленного в 0,05% PBS-Tween (PBST) (Sigma Aldrich, США), в течение 30 мин, мембраны инкубировали с препаратом моноклональных антител Паливизумаб (MedImmune, США) в разведении 1:500 в течение 2 часов. Образование иммунных комплексов определяли с помощью добавления вторичных козьих антител против человеческого IgG, меченных пероксидазой хрена (Sigma, США), в разведении 1:1000 и спустя 1 час – субстрата DAB (Sigma, США).

### 2.2.3 Вирусологические методы

#### *Культивирование, анализ инфекционной активности и фенотипических характеристик вирусов гриппа*

Вирусы гриппа накапливали в 8-10-дневных РКЭ, которые инкубировали 48 часов при 33°C. Для сбора аллантоисной жидкости РКЭ предварительно охлаждали в течение двух часов при 4°C. Собранную аллантоисную жидкость осветляли центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 минут. О наличие вируса судили по результатам положительной реакции гемагглютинации с 0,5% куриными эритроцитами, рассчитывали гемагглютинирующий титр. Для этого в круглодонных планшетах (U-образных) готовили серийные 2-кратные разведения вируса на PBS и добавляли равный объем 0,5% куриных эритроцитов. За гемагглютинирующий титр принимали наибольшее разведение вируса, при котором наблюдалась агглютинация эритроцитов.

Оценку чувствительности вирусов к репродукции при различных температурах инкубации (*ts/ca* фенотип) проводили путем их титрования в РКЭ при 26, 33 и 38°C. Длительность инкубации вирусов составляла 48 часов для температур 33 и 38°C и 6 суток – для 26°C. С помощью метода Рида и Мэнча [269] были определены титры вирусов, которые выражали через  $\log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub>/мл (50%-ная эмбриональная инфекционная доза).

В работе также оценивали уровень репликации вирусов гриппа в культуре клеток MDCK. Монослой клеток, засеянных накануне на 96-луночных планшетах, заражали серийными 10-кратными разведениями вирусов в среде ДМЕМ (Gibco, США) с антибиотиком-антимикотиком (Thermo Fisher Scientific, США) и 1 мкг/мл ТРСК в объеме по 25 мкл/лунку и инкубировали 1 час при 33°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Затем инокулят отбирали, планшет промывали теплым PBS, и клетки покрывали поддерживающей средой, содержащей 1 мкг/мл трипсина ТРСК. Спустя 3 суток 50 мкл

среды из планшета переносили в U-образные планшеты и добавляли равный объем 0,5% куриных эритроцитов. Титр вируса определяли по методу Рида и Менча и выражали в  $\log_{10}$ ТЦИД<sub>50</sub>/мл (50%-ная тканевая цитопатическая инфекционная доза).

#### *Культивирование РС вируса, получение ФИ-РСВ*

Монослой клеток Нер-2 заражали РС вирусом, штаммом А2, разведенным в среде ДМЕМ с антибиотиком-антимикотиком. Клетки инкубировали 2 часа при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, после чего добавляли равный объем ДМЕМ с антибиотиком-антимикотиком и 2% фетальной бычьей сывороткой (ФБС) (Gibco, США). Через 5 дней монослой снимали и клеточную суспензию центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут при 4°C. Собранный надосадоk хранили при -70°C в виде аликвот. Для инактивации вируса к надосадоку добавляли формалин в концентрации 0,01% и инкубировали 3 суток при 37°C. Далее проводили центрифугирование при 30 000 об/мин в течение 1 часа при 4°C. Осадоk ресуспендировали в DPBS и использовали в качестве формалин-инактивированной вакцины (ФИ-РСВ).

#### *Титрование РС вируса методом бляшкообразования с иммуноокрашиванием*

За день до проведения исследования клеточную суспензию Нер-2 рассеивали на 6-луночные планшеты (Sarstedt, Германия). На следующий день монослой Нер-2 промывали PBS и заражали серийными 10-кратными разведениями РСВ А2 от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-6</sup>, приготовленными на ДМЕМ с добавлением антибиотика-антимикотика и 2% ФБС. Зараженные планшеты удерживали 2 часа при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Вирусосодержащую среду заменяли на среду с добавлением 1% агарозы и инкубировали 5 дней при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки фиксировали в растворе 10% формалина при 4°C. Через 12-18 часов из планшетов удаляли фиксирующий раствор и агар. Об уровне репродукции РСВ в системе *in vitro* судили по методу иммуноокрашивания вирусных бляшек. Для блокирования неспецифических сайтов связывания монослой покрывали 5% обезжиренным молоком на 30 минут. Последующие инкубации проводили при комнатной температуре на шейкере-качалке. Монослой промывали PBST три раза по 10 минут и инкубировали с первичными моноклональными антителами к F белку РСВ (MAV 8599, EMD Millipore Corp., США), разведенными 1:1000 в 1% обезжиренном молоке на PBST, в течение 2 часов. Затем после трехкратной промывки монослой покрывали на 30 мин вторичными козьими антителами к мышинным IgG (Southern Biotech, США) в разведении 1:1000, приготовленными в 1% молоке на PBST. Монослой промывали четыре раза PBST и визуализировали бляшки с



использованием DAB субстрата (Sigma-Aldrich, США). Титр РС вируса выражали в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на мл.

#### 2.2.4 Методы работы с экспериментальными животными

##### *Соблюдение этических принципов*

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). Манипуляции по вакцинации, забору крови и экспериментальному заражению проводили под общей анестезией с использованием изофлурана или эфирного наркоза.

##### *Процедуры по иммунизации мышей*

Предварительно мышей выдерживали в течение 14 дней в карантинной зоне лаборатории. Иммунизацию животных проводили путем закапывания в каждый носовой ход исследуемых вакцинных кандидатов в дозе  $6 \log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub> в объеме 50 мкл. Группа контроля получала такой же объем PBS. Процедуру вакцинации проводили дважды с интервалом 21 день. Дополнительно для контроля безопасности вакцин в эксперимент вводили группу мышей, которых вакцинировали внутримышечно формалин-инактивированным РС вирусом (ФИ-РСВ), эмульгированным в алюм-адьюванте (Sigma, США), в дозе 2 мкг, двукратно с интервалом 2 недели.

##### *Оценка активности репликации вирусов в носовых ходах и легких*

На 3 и 6 день после вакцинации у мышей извлекали носовые ходы и легкие, чтобы определить уровень вирусной нагрузки в респираторном тракте. Изолированные органы замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Механическую гомогенизацию органов проводили в 1 мл PBS с антибиотиком-антимикотиком на приборе TissueLyzer LT (QIAGEN, Германия). Гомогенаты тканей осаждали путем центрифугирования при 3500 об/мин в течение 2 минут, и супернатант использовали для определения титра вируса методом предельных разведений в системе РКЭ.

##### *Оценка протективной эффективности вакцин в отношении вируса гриппа и РСВ*

Для оценки протективной активности вакцин в отношении вируса гриппа иммунизированных мышей подвергали интраназальному заражению вирулентным вирусом H7N9-PR8 в дозе  $5 \log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub> в объеме 50 мкл. Через три дня у животных собирали носовые ходы и лёгкие для определения степени вирусной нагрузки по описанной выше схеме.

Для оценки эффективности вакцин в отношении РС инфекции мышей заражали РС вирусом интраназально в дозе  $2 \times 10^5$  БОЕ/особь. На пятые сутки у животных собирали БАЛ, легкие и селезенки. Ткани легких использовали для оценки вирусной нагрузки, определения уровней вирусспецифических Т-клеток памяти, а также для проведения гистопатологических исследований.

## 2.2.5. Иммунологические методы

### 2.2.5.1. Оценка гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа

Через 3 недели после каждой иммунизации проводили забор проб крови из ретроорбитального синуса мышей для оценки гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и постановки реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Для получения сыворотки крови собранные образцы центрифугировали в режиме 1500 об/мин в течение 15 минут при  $4^\circ\text{C}$ , отбирали надосадочную жидкость в новую пробирку и повторяли процедуру еще раз. Собранную сыворотку хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

#### *Иммуноферментный анализ*

В качестве иммуносорбента использовали 96-луночные планшеты с высокой связывающей способностью (Corning, США), покрытые очищенным на градиенте плотности сахарозы вирусом гриппа A/17/Anhui/2013/61 (H7N9), разведенным в PBS в концентрации 50 нг/лунку, которые инкубировали при  $4^\circ\text{C}$  в течение 18 часов. На следующий день планшеты промывали три раза PBST и вносили раствор 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 30 минут и удерживали при  $37^\circ\text{C}$  для блокирования мест неспецифического связывания. Далее после трехкратной промывки в планшеты вносили предварительно разведенные на PBS сыворотки, начиная с разведения 1:10, и титровали с шагом 2 по 2 лунки/образец и инкубировали 1 час при  $37^\circ\text{C}$ . На следующем этапе после трехкратной отмывки в планшеты вносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), разведенные 1:10000, и инкубировали 30 минут при  $37^\circ\text{C}$ . После четырехкратной отмывки связавшиеся с антигеном антитела детектировали при помощи колориметрического субстрата 1-Step Ultra TBM-Elisa Solution (Thermo Fisher, США). Реакцию останавливали путем добавления 25 мкл 1М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и регистрировали оптическую плотность проб при длине волны 450 нм ( $\text{OP}_{450}$ ) на спектрофотометре xMark (BioRad, США). За титр антител принимали последнее разведение сыворотки, при котором значение  $\text{OP}_{450}$  было выше, чем двукратное усредненное значение  $\text{OP}_{450}$  контрольных лунок (без добавления сыворотки).

### *Реакция торможения гемагглютинации*

Образцы сывороток крови обрабатывали рецептор-разрушающим ферментом (RDE) (Denka Seiken, Япония) для исключения факторов неспецифической гемагглютинации. Каждую сыворотку смешивали с RDE в соотношении 1:3 по объему и инкубировали в течение 18-20 часов при 37°C. Далее обработанную сыворотку инкубировали при 56°C в течение 1 часа для дезактивации фермента. Дополнительно сыворотки обрабатывали суспензией 4% куриных эритроцитов в соотношении 1:1 в течение 10 минут при 37°C и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 1 минуты. Далее отбирали надосадок и добавляли PBS до разведения сыворотки 1:10. Сыворотки вносили в U-образные планшеты (Медполимер, Россия) и титровали с шагом 2, с разведения 1:10 до 1:1280. В лунки с разведенными сыворотками вносили антиген A/17/Anhui/2013/61 (H7N9) в рабочей дозе 4 гемагглютинирующие единицы (ГАЕ) в 50 мкл PBS и инкубировали 1 час при комнатной температуре. В результате эксперимента определялось минимальное разведение сыворотки, при котором происходит торможение гемагглютинации. Значения титра антигемагглютинирующих антител выражали в  $\log_2$ .

#### 2.2.5.2. Оценка клеточного иммунного ответа к вирусу гриппа и антигенам РСВ

Уровень Т-клеточного иммунного ответа оценивали в нескольких независимых экспериментах, при этом использовали два принципиально различных метода. Методом проточной цитометрии оценивали уровни вирус/эпитоп-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Методом ЦТЛ *in vivo* оценивали функциональную активность выработанных после иммунизации цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ).

*Выделение клеток из легких и селезенки.* Для выделения клеток из легких эвтаназированных мышей подвергали процедуре перфузии 10 мл холодного PBS вблизи вершины правого желудочка сердца. Легкие собирали и помещали в 0,7 мл поддерживающей среды CR-0 (RPMI (Gibco, США) с добавлением антибиотика-антимикотика (Gibco, США), β-меркаптоэтанола (Amresco, США), 25мМ Хепес буфера (Биолот, Россия) и препарата ИЛ-2 человека в концентрации 10 ед/мл (Ронколейкин, Биотех, Россия). Легкие измельчали ножницами, а затем гомогенизировали с использованием TissueLyzer LT (QIAGEN, Германия). Гомогенаты обрабатывали раствором коллагеназы (Sigma, США) в концентрации 4мг/мл и дезоксирибонуклеазы I (Sigma, США) в концентрации 10 мг/мл в течение 1 часа при 37°C. После этого смесь дополнительно пропускали через клеточный фильтр с размерами пор 70 мкм (BD Biosciences, США). Фильтрованный гомогенат смешивали с 5 мл поддерживающей CR-0 среды и центрифугировали 3 минуты при 500g. Надосадок сливали и смешивали с 2 мл аммоний-хлорид-калийным буфером АХК для лизиса эритроцитов (NH<sub>4</sub>Cl 0.15 М, KНСО<sub>3</sub>

0.01 M, ЭДТА 0.0001 M) в течение 2 минут при комнатной температуре. Затем центрифугировали 3 минуты при 500g и сливали надосадок. Выделенные клетки оставляли в 0,5 мл CR-0.

Для выделения спленоцитов у мышей извлекали селезенки и помещали в 0,5 мл CR-0 среды. Капсулы селезенки надрезали скальпелем, затем гомогенизировали с помощью пестиков и пропускали через фильтр с размерами пор 70 мкм (BD Biosciences, США). Гомогенат смешивали с 5 мл CR-0 и центрифугировали 3 минуты при 500g. Надосадок сливали и обрабатывали гомогенат 3 мл АХК буфера для лизиса эритроцитов в течение 3 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 3 мл CR-0 и центрифугировали 3 мин при 500g. Далее осадок сливали и спленоциты ресуспендировали в 3 мл CR-0.

Для подсчета выделенных клеток из легких и селезенки использовали камеру Горяева.

*Проведение ICS анализа (внутриклеточное окрашивание цитокинов)*

Выделенные клетки стимулировали либо цельным вирусом гриппа, либо специфическими пептидами. Для стимуляции вирусом в лунки с клеточной суспензией в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/50 мкл добавляли очищенный на градиенте сахарозы вирус A/17/Anhui/2013/61 (H7N9) в объеме 50 мкл с множественностью заражения (MOI), составляющей 3 инфекционные единицы на клетку, и инкубировали 1 час при 37°C. В лунки с клеточной суспензией, предназначенной для стимуляции пептидом M2<sub>82-90</sub> РСВ, и в лунки с интактной клеточной суспензией вносили поддерживающую среду в объеме 50 мкл и инкубировали 1 час при 37°C. Затем в лунки вносили поддерживающую среду с 30% ФБС, получая 10% финальное разведение ФБС в среде с клетками. Через 16-18 часов в клеточную культуру вносили 50 мкл 1000-кратного разведения реактива GolgiPlug (BD bioscience, США), содержащего брефельдин А, для остановки внутриклеточного транспорта. Для стимуляции клеток пептидом реактив GolgiPlug смешивали с пептидом M2<sub>82-90</sub> РСВ в количестве 10 мкМ/пробу и инкубировали в течение 5 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки окрашивали на поверхностные маркеры и внутриклеточные цитокины с помощью флуоресцентно-меченых антител, приведенных в Таблице 2. Для определения жизнеспособности клеток добавляли реагент ZombieAqua (Invitrogen, США) вместе с антителами к поверхностным антигенам (Таблица 2) и инкубировали в течение 20 минут при 4°C в темноте. Фиксацию и пермеабелизацию осуществляли в соответствии с протоколом набора Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences, США). Затем клетки инкубировали с антицитокиновыми антителами (Таблица 2) в течение 20 минут при 4°C в темноте. Клетки фиксировали в растворе 1% параформальдегида и подсчитывали на

цитофлуориметре BC Navios (Beckman Coulter, США). Собранные данные анализировали в программном пакете Flowjo (Three Star Inc., США).

Таблица 2 – Панель антител, используемых для ICS анализа (производство Biolegend)

	Лимфоциты селезенки		Лимфоциты легких	
		кат. №		кат. №
Маркер жизнеспособности	ZombieAqua	423102	ZombieAqua	423102
Антитела к поверхностным антигенам	CD8a-APC/Cy7	100714	CD8a-APC/Cy7	100714
	CD4-APC	100412	CD4-PerCP/Cy5.5	100540
	CD44-PE/Cy7	103030	CD44-APC	103012
	CD62L-PerCP/Cy5.5	104432	CD62L-BV-421	104435
			CD69-PE/Cy7	104512
			CD103-FITC	121420
Анти-цитокиновые антитела	IFN $\gamma$ -FITC	505806	IFN $\gamma$ - PE/Dazzle	505846
	TNF $\alpha$ -APC	506308		
	IL-2-PE/Cy7	503832		

#### ЦТЛ *in vivo* (исследование уровня цитотоксической активности лимфоцитов)

У интактных мышей выделяли лимфоциты из ткани селезенки и разделяли их на 4 части по  $1 \times 10^8$  спленоцитов в каждой. Стимуляцию клеток проводили цельным вирусом A/17/Anhui/2013/61 (H7N9) в дозе 1 MOI, либо пептидами РСВ-M2<sub>82-90</sub>, РСВ-M2<sub>126-145</sub> в концентрации 1 мкМ, разведенными в растворе диметилсульфоксида (ДМСО), в течение 1 часа при 37°C. Клетки из четвертой группы смешивали с ДМСО в качестве отрицательного контроля. После стимуляции каждую группу клеток метили при помощи карбоксифлуоресцеин сукцинимидил эфира (CFSE) в следующих концентрациях: 40мМ, 20мМ, 10мМ и 5 мМ для клеток, нагруженных ДМСО, РСВ-M2<sub>82-90</sub>, РСВ-M2<sub>126-145</sub> и ЖГВ, соответственно. Клетки из разных групп смешивали в равных пропорциях и при помощи инъекции вводили в ретро-орбитальный синус иммунизированных мышей на 21 день после второй вакцинации, с использованием легкого эфирного наркоза. Через 16 часов у мышей собирали селезенки, выделяли из них лимфоциты, согласно описанной выше методике. На цитофлуориметре оценивали количественный состав CFSE-меченых спленоцитов, при этом для каждой концентрации CFSE подсчитывали число клеток при

помощи соответствующего гейтирования, что позволяло определить количество контрольных клеток и клеток, нагруженных соответствующим пептидом. Снижение пропорции клеток, нагруженных антигеном, к контрольным клеткам служило мерой оценки цитотоксического действия  $CD8^+$  Т клеток в организме иммунизированных мышей.

*Анализ маркеров эозинофилии при заражении мышей РСВ*

С целью изучения характера эозинофильной инфильтрации у вакцинированных мышей проводили анализ образцов клеток БАЛ, надосадочной жидкости БАЛ и лимфоцитов легких на пятый день после челленджа РСВ с использованием методов проточной цитометрии и ИФА.

Процедуру получения БАЛ проводили у мышей посмертно путем установки катетера (Exelint International, США) и введения в трахею 1 мл PBS шприцом. Собранный БАЛ центрифугировали в режиме 1700 об/мин в течение 5 минут: осажденные клетки анализировали методом проточной цитометрии, а надосадок анализировали с помощью ИФА. Легкие гомогенизировали тем же способом, который был описан ранее. Гомогенат готовили в среде RPMI 1640 (Gibco, США) с добавлением 150 ед/мл раствора коллагеназы (Thermo Fisher Scientific, США), 1мМ  $MgCl_2$ , 1мМ  $CaCl_2$  и 5% ФБС. Лимфоциты из гомогената собирали на границе раздела фаз 44% и 67% силикагеля Перколл (GE Healthcare Bio-Sciences, США) после центрифугирования градиента при 2800 об/мин в течение 15 минут и ресуспендировали в PBS для последующей промывки. Клетки БАЛ и лимфоциты легких считали в камере Горяева и вносили в количестве  $2 \times 10^6$  лимфоцитов легких и  $10^3$  клеток БАЛ в 50мкл на лунку 96-луночного U-образного планшета для проведения проточной цитометрии.

На первом этапе клетки инкубировали 10 минут при комнатной температуре с анти-мышинными CD16/CD32 (BD Biosciences, США), благодаря которым блокируется связывание антител с Fc гамма рецепторами II и III, которые могут внести свой вклад в фон. Затем БАЛ клетки инкубировали с анти-Siglec-F (E50-2440, BD Biosciences), анти-CD11b, анти-CD11c (N418, eBioscience) в течение 30 минут при 4°C в темноте. Далее клетки фиксировали и анализировали в Becton-Dickinson LSR-II/Fortessa (BD Pharmingen, США). С использованием программы Flowjo (Tree Star Inc., США) проводили процедуру гейтирования популяции дендритных клеток  $CD11b^+$  и анализировали уровень экспрессии Siglec F и CD11c.

Надосадочную жидкость БАЛ анализировали в ИФА по стандартному протоколу набора (ИЛ-5 ELISA Ready-SET-Go; ИФН- $\gamma$  ELISA Ready-SET-Go). За день до проведения эксперимента 96-луночные планшеты Corning Costar 9018 (США) покрывали анти-ИЛ-5

антителом и инкубировали 16-18 часов при 4°C. Промывки осуществляли буфером PBST после каждой инкубации, как указано в протоколе производителя. Блокирующий раствор добавляли к лункам и планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего в планшет вносили образцы жидкости БАЛ по 2 лунки/образец и стандарт, в качестве которого использовали рекомбинантный ИЛ-5 в разведениях с 1:1 до 1:128, и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Затем в планшеты вносили биотинилированные антитела против ИЛ-5 и инкубировали 1 час при комнатной температуре. На следующем этапе планшеты инкубировали 30 минут при комнатной температуре со вторичными антителами, содержащими авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Для визуализации результатов в планшеты добавляли ТМВ субстрат. Реакцию останавливали путем добавления 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и результаты учитывали на спектрофотометре при длине волны 450 нм. По калибровочной кривой зависимости оптической плотности от концентрации стандарта определяли содержание ИЛ-5 в пробах жидкости БАЛ; концентрацию выражали в пикограммах на миллилитр (пкг/мл).

#### 2.2.6. Гистологические методы исследования

Для оценки морфологических изменений легочной ткани у иммунизированных мышей после челленджа РСВ собирали верхнюю долю правого легкого и фиксировали орган в 10% растворе формальдегида минимум 48 часов. Далее кусочки ткани помещали в кассеты и осуществляли проводку по спиртам восходящей крепости до заключения в парафиновые блоки. С блоков изготавливали 5 мкм гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином (H&E), гематоксилином и конго красным (H&CR) и реактивом Шиффа (PAS), а также комбинацией конго красного, гематоксилина Карацци и альцианового синего. Изображение срезов было получено с помощью светового микроскопа (Zeiss Axiovert 100) при 100 кратном увеличении камерой (Canon 30D). Исследование гистологических срезов было проведено независимым экспертом по следующим параметрам: наличие очагов воспаления в дыхательных путях, кровеносных сосудах, интерстициальных пространствах, а также степени выделения слизи и эозинофилов в легочных тканях. В скрининге участвовало не менее 10 срезов ткани от каждой отдельной особи. Каждому органу в группе присваивали балы по шкале от 0 до 5 по наличию и степени поражения ткани [12]: 0 – отсутствует, 1 – легкие, 2 – незначительные, 3 – умеренные, 4 – тяжелые, 5 – крайне тяжелые.

#### 2.2.7. Методы статистического анализа результатов исследования

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения GraphPadPrizm 5. Для сравнения данных использовали U-

критерий теста Манна-Уитни для оценки различий между двумя независимыми группами (сравнение титров вирусов, уровня продукции цитокинов CD8<sup>+</sup> Т-клетками, количества эозинофилов, степени повреждения легочной ткани, соотношений эпитоп-специфических Т-клеток и т.д.). Для сравнения значений титров антител, титров вируса, степени повреждения легочной ткани, количества CD8<sup>+</sup> Т-клеток для трех и более групп применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием достоверно значимой разности Тьюки. При сравнении доли вирус- и эпитоп-специфических T<sub>RM</sub> среди T<sub>EM</sub> в разных экспериментальных группах использовали двухфакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Холма-Сидака. Различия между выборками считали достоверно значимыми при  $p < 0,05$ .



## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ

## 3.1. 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 респираторно-синцитиального вируса 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 [342].

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 (H2<sup>d</sup>) и C57BL/6J (H2<sup>b</sup>), рестрицированные молекулами МНС I и МНС II (Таблица 3). Согласно полученным результатам, большинство предсказанных эпитопов относились к гликопротеину G, фьюжн-пептиду F и M2-1 белку РСВ. На основании анализа показано, что G белок содержит большое количество В- и Т-клеточных эпитопов, однако 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.

Таблица 3 – Количество экспериментально установленных эпитопов в белках РСВ

Белок РСВ	Количество эпитопов				
	человек			Мышь Н-2(b)	Мышь Н-2(d)
	МНС I	МНС II	В-клеточный		
NS1	1	—	—	—	—
NS2	1	—	—	—	2
N	14	—	6	—	1
P	1	—	4	—	1
M	5	1	—	2	1
SH	—	—	—	1	1
G	1	3	107	6	31
F	3	43	9	—	26
M2-1 и M2-2	3	—	—	3	12
L	1	—	—	—	11
Всего	30	47	126	12	86

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, обеспечивают целостность эпитопной кассеты 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. По критериям этих условий, были отобраны В- и Т-клеточные эпитопы, которые объединили в две кассеты для встраивания в геном вируса гриппа (Таблица 4).

Таблица 4 – 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	—	+	—

Выбор первой кассеты был основан на опубликованных ранее результатах исследования: иммунизация мышей векторной вакциной на основе вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), несущей кассету 1 в составе гена H1, стимулировала выработку нейтрализующих антител к РСВ и успешно защищала животных от РС инфекции [184]. Эта полиэпитопная кассета состоит из фрагмента F<sub>243-294</sub>, 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 M2-1 белка РСВ (нуклеотидный фрагмент 70–101 (32 аминокислоты) и нуклеотидный фрагмент 114–146 (33 аминокислоты) (Рисунок 3). В состав кассеты входит иммунодоминантный эпитоп

M2-1 (82-90), который ранее способствует развитию ЦТЛ-иммунитета к РСВ у мышей [339].

Все отобранные эпитопы были выравнены на последовательности вирусного белка M2-1 и картированы алгоритмом CrustalO в программе Jalview (<https://www.jalview.org/>) (Рисунок 3). С использованием алгоритмов NetMHCpan и NetMHCpan в IEDB было показано, что отобранные кассеты не содержат неозпитопов, презентруемых МНС I и МНС II.

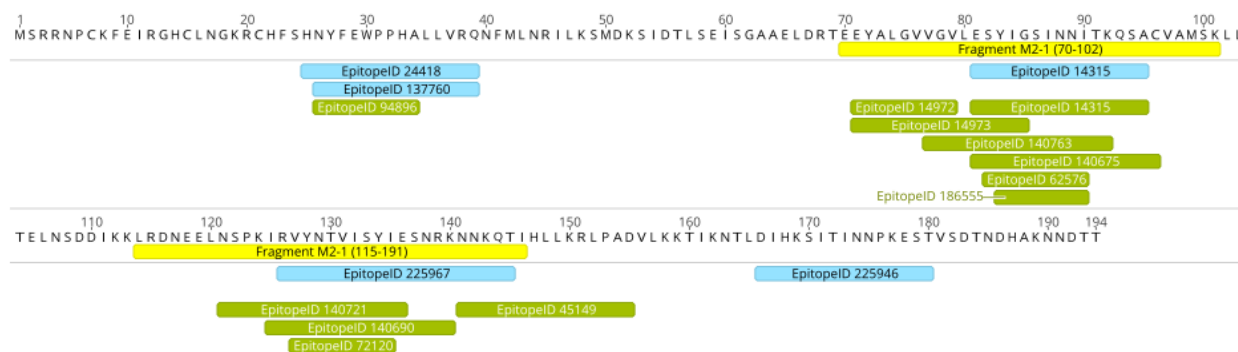


Рисунок 3 – Распределение МНС I – связанных (зеленые) и МНС II-связанных (голубые) эпитопов в белке M2-1. Запрос Immune Epitope DataBase был сформирован в апреле 2017 года (организм-хозяин: мышь BALB/c; антиген: M2-1; положительные результаты) Фрагменты, входящие в состав полиэпитопной кассеты РСВ, которые использовали для встраивания в вектор, показаны желтым цветом.

С помощью программного обеспечения Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) были созданы трехмерные структуры химерной молекулы гемагглютинаина Н7 вируса гриппа, экспрессирующего кассету №1 РСВ. Трехмерная модель гибридной молекулы НА+РСВ была сделана в программе UCSF Chimera, а изображение 3D модели было получено посредством Chimera. 1.10.2 и RasMol. 2.7.5 (<http://rasmol.org/>) (Рисунок 4).

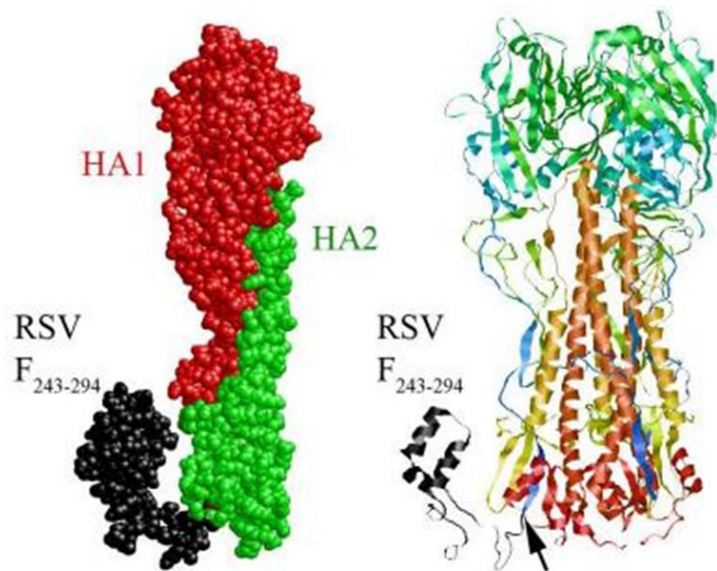


Рисунок 4 – Пространственная схема строения химерных молекул гемагглютинаина вируса гриппа со встроенной кассетой эпитопом F<sub>243-294</sub> РСВ. На схеме вставка фрагмента F<sub>243-294</sub> РСВ показана черным цветом, красным цветом – субъединица HA1 и зеленым цветом – субъединица HA2. Справа представлена модель тримера гемагглютинаина подтипа Н7, расположение вставки F<sub>243-294</sub> РСВ для наглядности показано только на одном из трех мономеров. Сайт присоединения фрагмента РСВ указан стрелкой.

### 3.2. Конструирование рекомбинантных векторных вакцин, экспрессирующих фрагмент РСВ-F<sub>243-294</sub>

#### 3.2.1. Получение рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ и изучение экспрессии эпитопов РСВ

Фрагмент РСВ-F<sub>243-294</sub> был клонирован между сигнальным пептидом и субъединицей HA1 молекулы гемагглютинаина вируса гриппа подтипа Н7 с использованием либо AAAPGAA линкера, либо GGGGSGGGGS линкера (Рисунок 5А).

Химерные гены HA+A-PCB и HA+G-PCB встраивали в специализированный вектор рCIPollSapIT, приспособленный для получения вирусов гриппа методами обратной генетики. Этот вектор снабжен с противоположных сторон вставки сильными промоторами для РНК-полимеразы типа I и РНК-полимеразы типа II, что обеспечивает секрецию белковых продуктов клонируемых генов. Плазмиды, кодирующие внутренние гены донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, а также плазмида, кодирующая нейраминидазу подтипа N9, были подготовлены до начала исследования. Клеточную культуру Vero трансфицировали набором плазмид методом электропорации в оптимизированных ранее условиях.

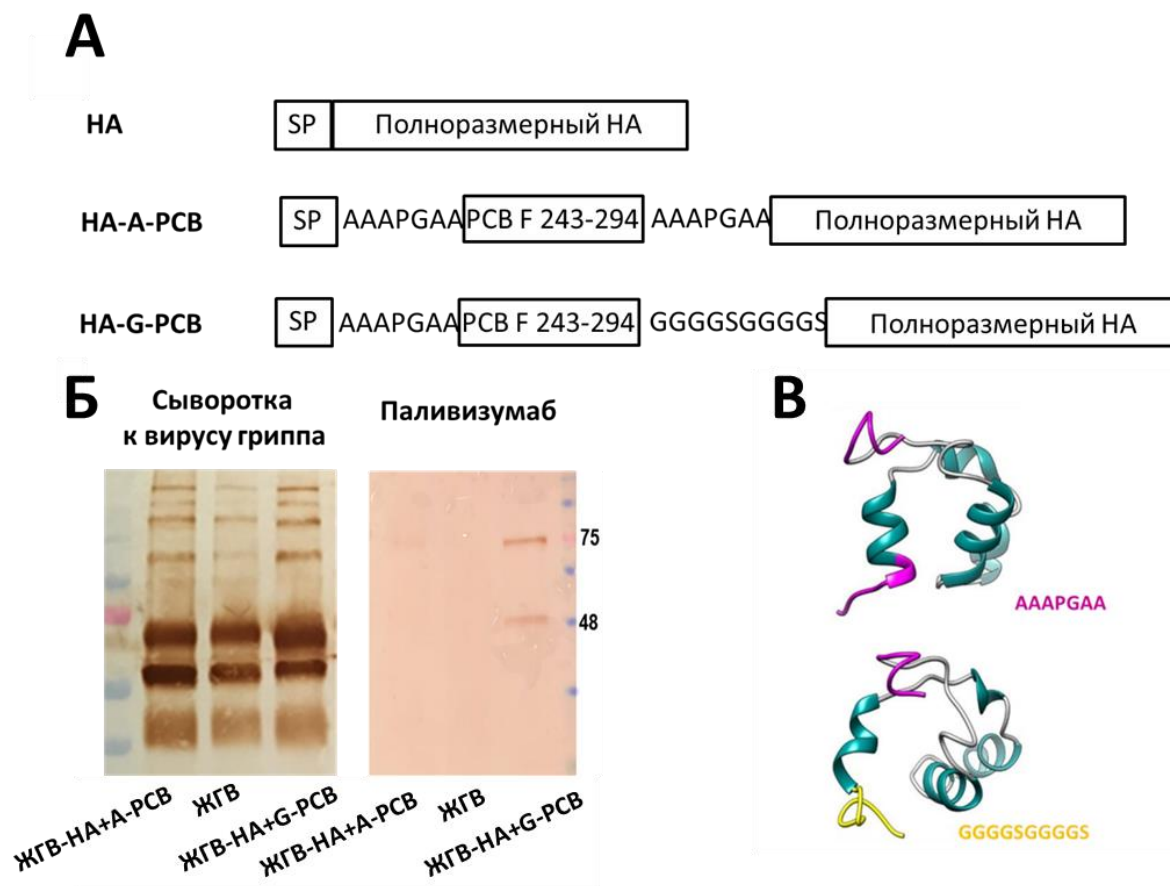


Рисунок 5 – Получение рекомбинантных векторных вакцин ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ и оценка уровня экспрессии эпитопов РСВ векторными вакцинами. **А.** Схематичное представление конструкций НА+РСВ- $F_{243-294}$  с разными линкерами **Б.** Результаты Вестерн-блот анализа рекомбинантных вирусов ЖГВ+НА/РСВ с использованием поликлональной сыворотки к вирусу гриппа и моноклональных антител Паливизумаб. **В.** 3D моделирование конструкций РСВ- $F_{243-294}$ +линкер с помощью алгоритма i-TASSER.

Полученные химерные вирусы ЖГВ+НА/РСВ были накоплены в системе РКЭ. Два рекомбинантных вируса отличались гибким линкером между фрагментом РСВ- $F_{243-294}$  и субъединицей HA1 гемагглютинаина (Рисунок 5А). Вакцинным кандидатам были присвоены названия ЖГВ-НА+А-РСВ (линкер AAAPGAA) и ЖГВ-НА+G-РСВ (линкер GGGGSGGGGS).

Для доказательства того, что вставка РСВ- $F_{243-294}$  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-

РСВ и соответствовали НА1 субъединице (~ 55 кДа) и предшественнику гемагглютинаина НА0 (~ 75 кДа) вируса гриппа, что позволяет предположить, что эпитоп РСВ действительно экспрессируется вместе с белком НА вируса гриппа (Рисунок 5Б). Эти полосы были малозаметными в группе ЖГВ-НА+А-РСВ. Таким образом, линкер между эпитопом РСВ и субъединицей НА1 гемагглютинаина вируса гриппа играет важную роль в процессе пространственной укладки химерного белка.

Для предсказания трехмерной структуры для фрагментов РСВ<sub>243-294</sub> с линкерами использовался алгоритм i-TASSER. Согласно проведенному анализу,  $\alpha$ -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 5В). С другой стороны, этот эффект не наблюдали для конструкции НА+G-РСВ, в которой присутствовал G линкер, благодаря которому обеспечивалась наилучшая гибкость встраиваемой конструкции. Кроме того, формирование вторичной структуры не наблюдается у линкера AAAPGAA, включаемого с N-конца конструкций НА+G-РСВ и НА+А-РСВ.

### 3.2.2. Изучение репродукции рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ в системе *in vitro*

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  $\log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub>/мл для Н7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ, соответственно) и пониженной температуре 26°C (титры 7,1; 6,3 и 6,1  $\log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub>/мл для Н7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ, соответственно), что указывает на сохранность холодоадаптированного фенотипа у вакцинного штамма ЖГВ при модификации гена НА: разница между титром вирусов при оптимальной и пониженной температурах не превышала 3,0  $\log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub>. Помимо этого, вакцинные кандидаты проявляли температурочувствительный фенотип, практически не реплицируясь при 38°C (Рисунок 6А). 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  $\log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub>/мл для Н7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ, соответственно) (Рисунок 6Б). Таким образом, было установлено, что чужеродная

вставка в составе молекулы НА вакцинного штамма ЖГВ не влияла на ростовые свойства вирусов в системе *in vitro*.

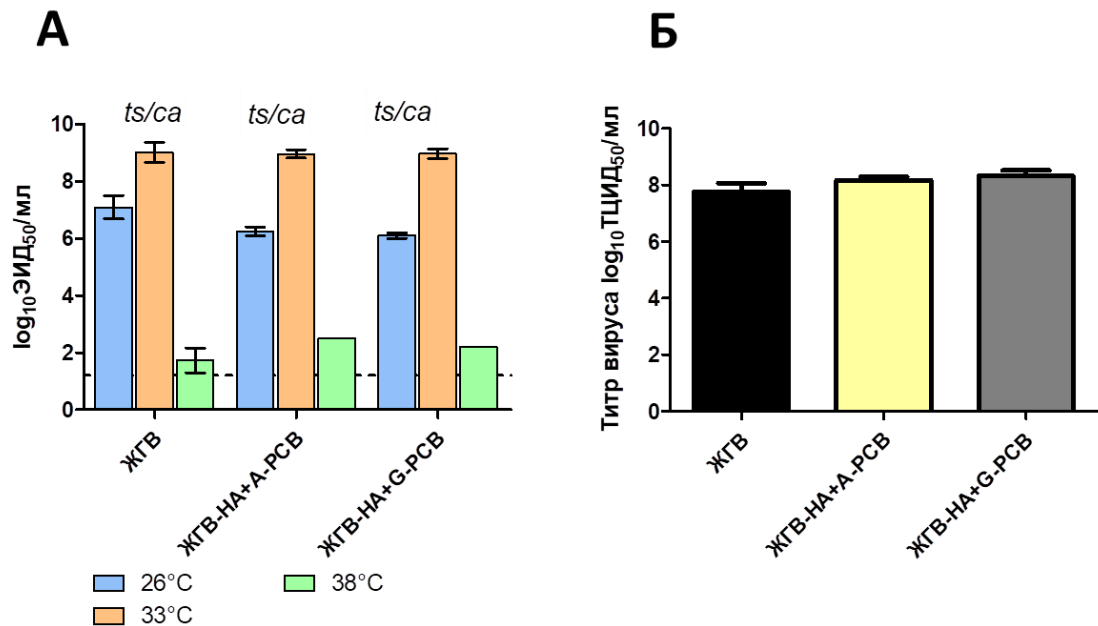


Рисунок 6 – Ростовые характеристики рекомбинантных вирусов в системе *in vitro*. **А.** Инфекционный титр в развивающихся куриных эмбрионах при разной температуре инкубации (33°C, 26°C, 38°C). **Б.** Титр вируса в культуре клеток MDCK при оптимальной температуре инкубации 33°C. *ts* температурочувствительный фенотип. *ca* холодадаптированный фенотип.

Была изучена генетическая стабильность полученных рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ. Проводили секвенирование гена НА после 10 последовательных пассажей в РКЭ и проводили сравнение с нуклеотидной последовательностью исходного НА. На основании анализа не было выявлено нуклеотидной замены ни в РСВ вставке, ни в НА.

### 3.2.3. Оценка репродукции рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ в системе *in vivo*. Иммуногенность и защитная эффективность в отношении вируса гриппа

Группы мышей BALB/c (n=17) интраназально иммунизировали вакцинными кандидатами H7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+А-РСВ или ЖГВ-НА+G-РСВ в дозе  $6 \log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>, двукратно с интервалом в три недели. Контрольной группе вводили PBS. На третьи сутки после первой иммунизации у мышей собирали носовые ходы и легкие (n=5). Через две недели после второй иммунизации у подгруппы мышей (n=7) собирали образцы сыворотки крови, а другую подгруппу мышей (n=5) заражали вирулентным вирусом гриппа H7N9-PR8 в дозе  $10^5$  ЭИД<sub>50</sub>. Через трое суток у мышей собирали носовые ходы и легкие. Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 7.



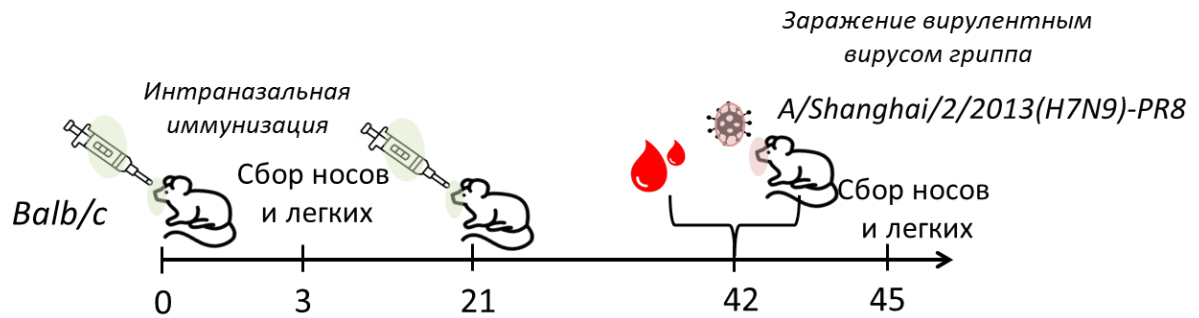


Рисунок 7 – Схема проведения эксперимента к разделу 3.2.3

Оба вакцинных кандидата были способны реплицироваться в верхних дыхательных путях мышей BALB/c после интраназальной иммунизации (Рисунок 8А). Важно отметить, что оба химерных вируса, как и вектор H7N9-ЖГВ, были аттенуированы для мышей, поскольку инфекционный вирус не выделялся из легких иммунизированных мышей на 3 день после иммунизации. Иммунизация мышей векторными вакцинами проводила к выработке специфических IgG антител к вирусу гриппа, сопоставимых с вектором H7N9-ЖГВ (Рисунок 8Б). На третьи сутки после заражения вирулентным вирусом гриппа у иммунизированных мышей не наблюдали репродукцию вируса в легких (Рисунок 8В). Таким образом, мыши из групп H7N9-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 ( $4,4 \log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub>/мл). Следовательно, экспериментальные рекомбинантные вакцины сохранили способность индуцировать полноценный защитный иммунитет в отношении гриппозной инфекции.

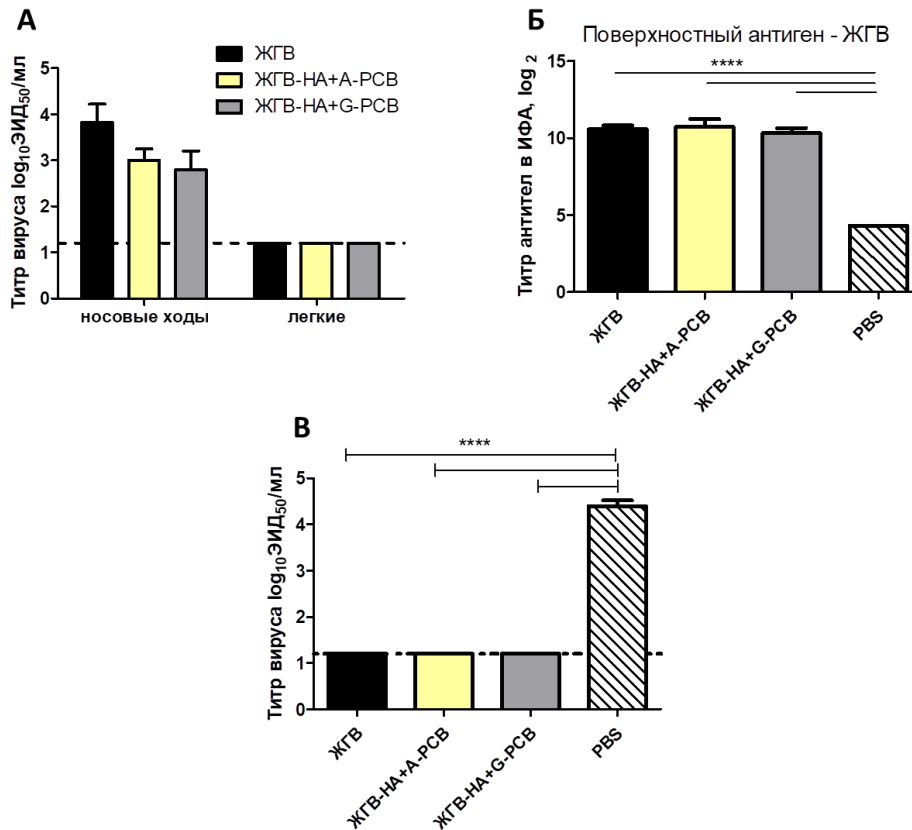


Рисунок 8 – Анализ свойств рекомбинантных вирусов ЖГВ-НА+А-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ при иммунизации мышей BALB/c. **А.** Титр вакцинного вируса в верхних дыхательных путях (носовые ходы) и нижних дыхательных путях (легкие) на 3 сутки после иммунизации. **Б.** Титры вирус-специфических IgG антител к вирусу гриппа в сыворотках крови мышей, собранных через 3 недели после второй вакцинации. **В.** Титр вирулентного вируса гриппа H7N9-PR8 на 3 сутки после экспериментального заражения (челленджа) иммунизированных мышей. Данные анализировали с помощью одностороннего ANOVA с последующими тестами множественных сравнений Тьюки. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.2.4. Иммуногенность и защитная эффективность рекомбинантных штаммов ЖГВ+НА/РСВ в отношении РСВ

Группу мышей BALB/c ( $n=12$ ) интраназально иммунизировали вакцинными кандидатами H7N9-ЖГВ, ЖГВ-НА+А-РСВ, ЖГВ-НА+G-РСВ по описанной выше схеме. Через две недели после второй иммунизации у подгруппы мышей ( $n=7$ ) собирали образцы сыворотки крови и другую подгруппу мышей ( $n=5$ ) заражали РС вирусом в дозе  $2 \times 10^5$  БОЕ. На пятые сутки у мышей собирали легкие для оценки протективного эффекта вакцин (Рисунок 9А).

В данном эксперименте вводили дополнительную группу мышей ( $n=12$ ), которым внутримышечно вводили ФИ-РСВ, эмульгированный в алю-адьюванте, в дозе 2 мкг двукратно с интервалом в две недели (Рисунок 9Б). Спустя две недели после второй иммунизации у подгруппы мышей ( $n=7$ ) собирали образцы сыворотки крови и другую подгруппу мышей ( $n=5$ ) заражали РСВ А2. Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 9 (А, Б).

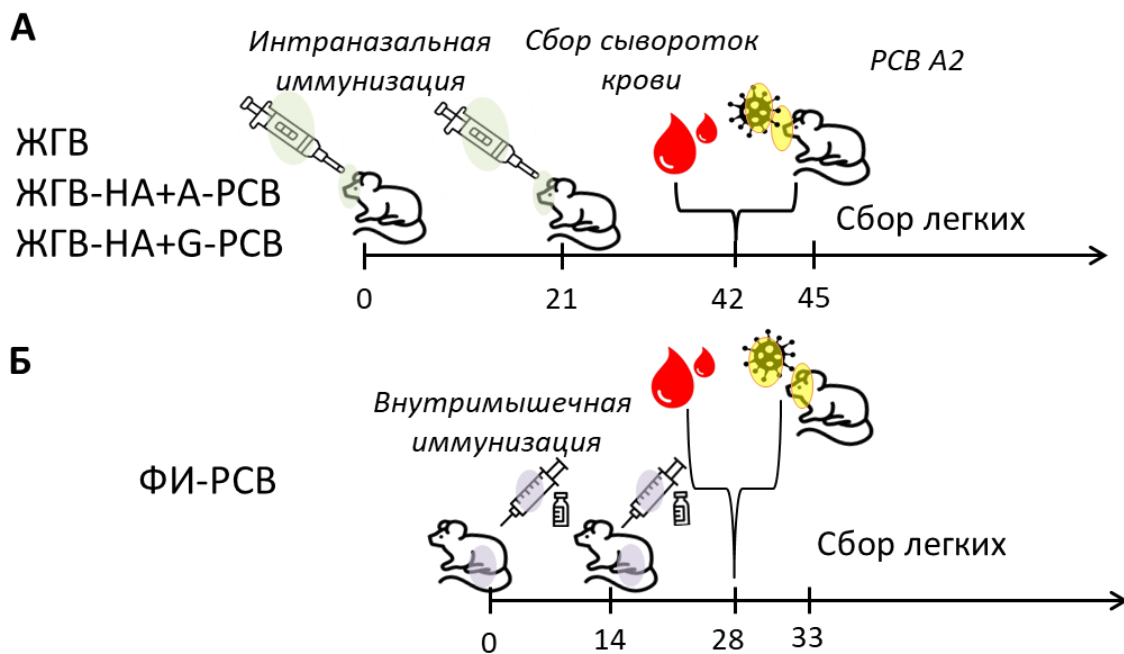


Рисунок 9 – Схема проведения эксперимента к разделу 3.2.4

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 ОП<sub>450</sub> 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 плацебо (Рисунок 10А).

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 10Б). Несмотря на то, что статистической разницы между векторными вакцинами по уровню репликации РСВ в легких мышей после челленджа не

зафиксировали, достоверную разницу между значениями титра вируса наблюдали в группе ЖГВ-НА+G-PCV по сравнению с PBS.

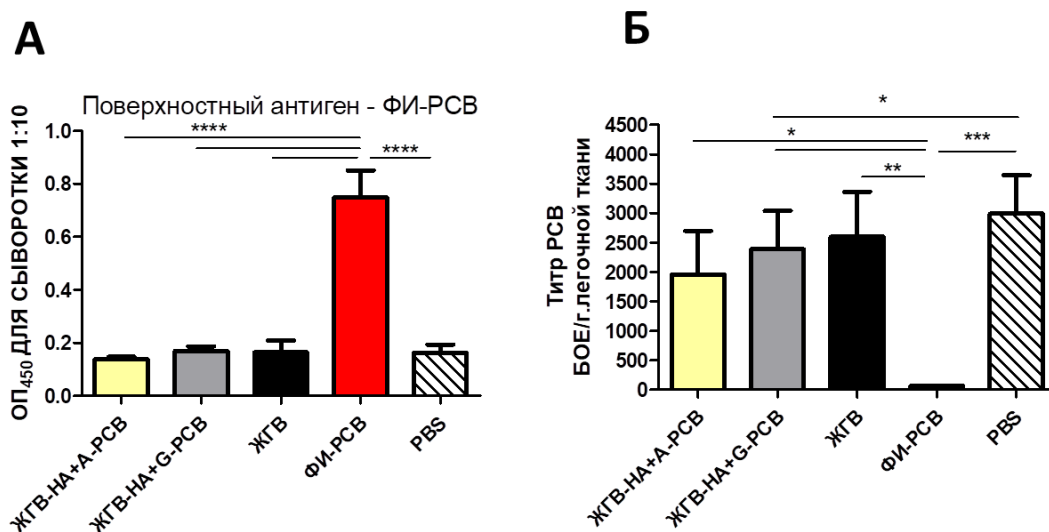


Рисунок 10 – Иммуногенность и протективная активность рекомбинантных штаммов ЖГВ-НА+A-PCV и ЖГВ-НА+G-PCV в отношении РСВ. **А.** Значение оптической плотности образцов сывороток крови в ИФА с цельным РСВ. **Б.** Титр РС вируса в легких мышей на 5-е сутки после заражения РСВ. Данные анализировали с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с привлечением множественного сравнения по критерию Тьюки (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Для оценки защитной эффективности и безопасности векторных вакцин ЖГВ-НА+A-PCV и ЖГВ-НА+G-PCV проводили гистопатологическую оценку состояния легочных тканей у иммунизированных мышей на 5-й день после заражения РС вирусом. Несмотря на полную защиту в отношении РС вируса, в группе ФИ-PCV наблюдали серьезные иммунопатологические изменения легочной ткани. Именно в этой группе мышей легкие имели признаки тяжелых повреждений эпителия и высокий уровень интерстициально-альвеолярного инфильтрата (Рисунок 11А, Б). О наличии слизи в просвете бронхов судили по степени окрашивания среза альциановым синим, и она присутствовала только в группе ФИ-PCV (Рисунок 11А). В целом изменения в легочной ткани в группе ФИ-PCV характеризовались лимфогистиоцитарной инфильтрацией, специфичной для вирусной инфекции. У мышей, иммунизированных ФИ-PCV, 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 РСВ показала высокую степень защиты в группах, иммунизированных векторными вакцинами ЖГВ-НА+A-PCV и ЖГВ-НА+G-PCV (Рисунок 11). Оценка состояния эпителия бронхов мышей

выявила, что в группе ЖГВ-НА+G-PCB степень повреждения была достоверно ниже по сравнению с группой ЖГВ, тогда как для вакцинного варианта ЖГВ-НА+A-PCB достоверной разницы выявлено не было.

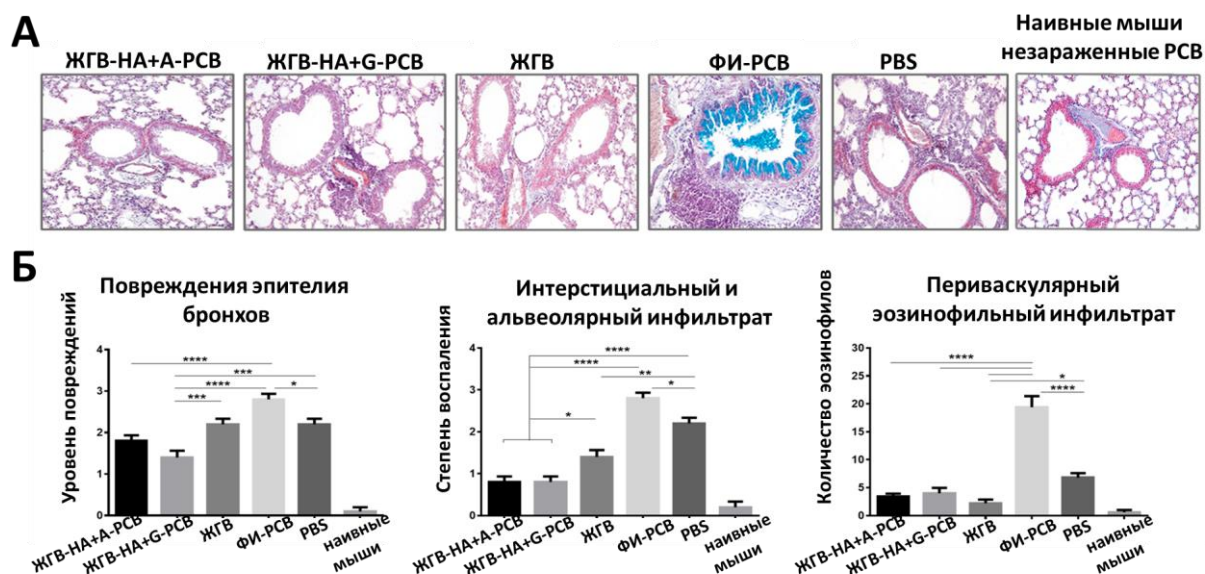


Рисунок 11 – Гистопатологические изменения легочной ткани у иммунизированных мышей после заражения РС вирусом. **А.** Снимки срезов легких, окрашенных красителями конго красным, гематоксилином, альциановым синим. **Б.** Количественный анализ величины повреждений легочной ткани, оценки степени воспаления и содержания эозинофильного инфильтрата. Данные анализировали с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с привлечением множественного сравнения по критерию Тьюки (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### 3.3. Конструирование рекомбинантных штаммов, кодирующих Т-клеточные эпитопы РСВ

#### 3.3.1. Получение химерных вирусов гриппа, 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 NA включалась в состав новой образованной вирусной частицы, а расщепленная кассета РСВ претерпевала независимый процессинг внутри инфицированной клетки (Рисунок 12А).

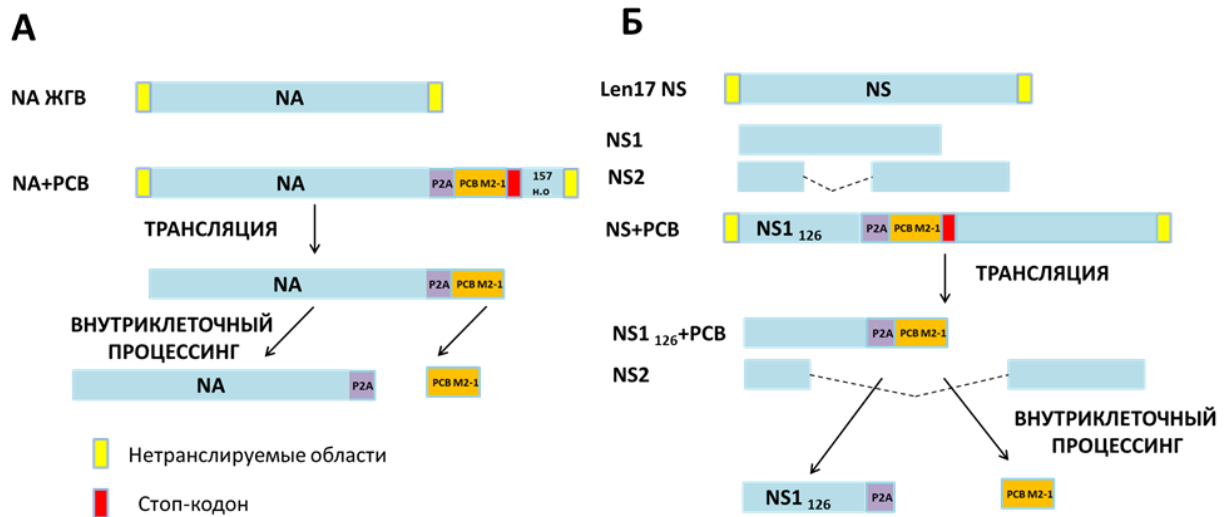


Рисунок 12 – Схема строения нативных и химерных генов NA (штамм A/17/Anhui/2013/61) и NS1 (A/Ленинград/134/17/57) вируса гриппа со вставкой полиэпитопной кассеты PCB. Сайт саморасщепления P2A способствует посттрансляционному отщеплению полиэпитопной кассеты PCB внутри инфицированной клетки. **А.** Модифицированный ген NA/PCB. **Б.** Модифицированный ген NS1/PCB.

Второй вакцинный кандидат был сконструирован путем усечения рамки считывания NS1 белка с С-конца до 126 а.о., за которым следовала Т-клеточная кассета PCB (Рисунок 12Б). Предыдущие исследования продемонстрировали, что укорочение полипептидной цепи белка NS1 до 126 а.о. позволяет получить аттенуированные и иммуногенные вирусы гриппа [81]. Конструкция была смоделирована таким образом, чтобы в процессе посттрансляционных модификаций химерного белка NS1/PCB в инфицированных клетках происходил независимый процессинг эпитопов PCB по эндогенному пути презентации.

### 3.3.2. Оценка репликативных свойств рекомбинантных штаммов ЖГВ-PCB

Ростовые характеристики рекомбинантных вакцинных штаммов ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB оценивали путем титрования вирусов в системе РКЭ при различных температурах инкубации, в культуре клеток MDCK при оптимальной температуре 33°C, а также в респираторном тракте мышей, инфицированных исследуемыми вирусами в дозе 6,0 log<sub>10</sub>ЭИД<sub>50</sub> (Рисунок 13). Обе векторные вакцины репродуцировались при 33°C на одном уровне с вектором H7N9-ЖГВ, таким образом встраивание чужеродного генетического материала PCB в гены NA и NS1 вируса гриппа не влияло на репродуктивную способность вакцинных вирусов в обеих системах культивирования при

оптимальной температуре инкубации (Рисунок 13А, Б). Оба вакцинных кандидата ЖГВ-РСВ не реплицировались при 38°C (Рисунок 13А), сохраняя *ts* фенотип, свойственный вектору Н7N9-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  $\log_{10}$ ЭИД<sub>50</sub>/мл для Н7N9-ЖГВ, ЖГВ+NA/РСВ и ЖГВ+NS1/РСВ, соответственно) (Рисунок 13А), что указывает на ослабление холодоадаптированного фенотипа вакцинного вируса при соответствующей модификации генов NA и NS1.

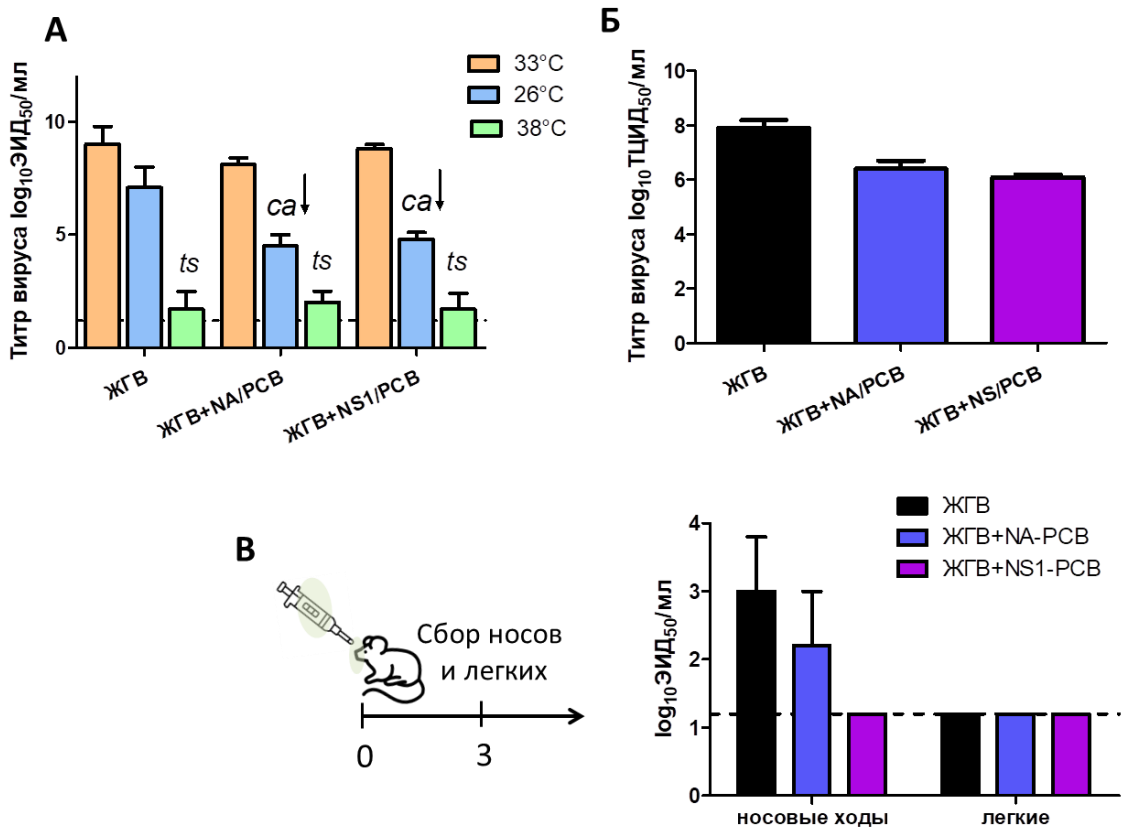


Рисунок 13 – Репродукция вакцинных кандидатов в системах *in vitro* и *in vivo*. **А.** Титр вируса в РКЭ при разных температурах инкубации (33°C, 38°C, 26°C) **Б.** Титр вируса в клетках MDCK при 33°C. **В.** Титры вирусов в носовых ходах и легких мышей BALB/c спустя 3 дня после интраназального введения в дозе  $10^6$  ЭИД<sub>50</sub>.

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.

Группу мышей BALB/c (n=5) интраназально иммунизировали вакцинными



кандидатами ЖГВ, ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB в дозе  $6 \log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>. На третьи сутки после иммунизации у мышей собирали носовые ходы и легкие ( $n=5$ ). Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 13В. При иммунизации мышей рекомбинантные вакцинные штаммы, также как и вектор, не выделялись из тканей легких мышей (Рисунок 13В), подтверждая аттенуированный фенотип вирусов. Кроме того, было показано, что вариант ЖГВ+NS1/PCB не реплицируется в носовых ходах (Рисунок 13В), тогда как степень репродукции варианта ЖГВ+NA/PCB в носовых ходах была сравнима с вектором H7N9-ЖГВ (Рисунок 13В) (титры 3; 2,2 и 1,2  $\log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>/мл для ЖГВ, ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB соответственно).

### 3.3.3. Иммуногенность и защитная эффективность рекомбинантных штаммов ЖГВ-PCB в отношении вируса гриппа

Группы мышей BALB/c ( $n=12$ ) интраназально иммунизировали вакцинными кандидатами H7N9-ЖГВ, ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB в дозе  $6 \log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>, двукратно с интервалом в три недели. Контрольной группе вводили PBS. Через три недели после второй иммунизации у подгруппы мышей ( $n=7$ ) собирали образцы сыворотки крови и другую подгруппу мышей ( $n=5$ ) заражали вирулентным вирусом гриппа H7N9-PR8 в дозе  $10^5$  ЭИД<sub>50</sub>. Через трое суток у мышей собирали носовые ходы и легкие для оценки защитного действия вакцин. Схема проведения эксперимента представлена на на Рисунке 14.

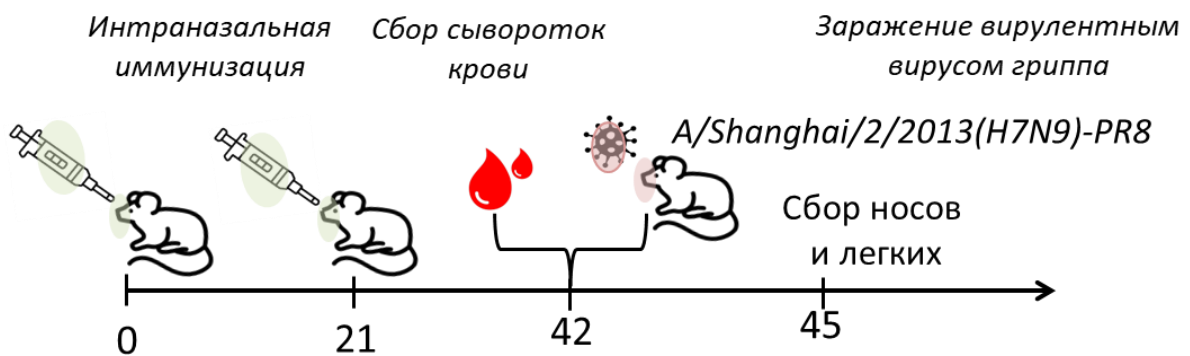


Рисунок 14 – Схема проведения эксперимента к разделу 3.3.3

Несмотря на то, что обе векторные вакцины реплицировались по-разному в респираторном тракте мышей, двукратная иммунизация животных индуцировала высокие уровни антигемагглютинирующих антител и IgG антител к цельному вирусу гриппа, сопоставимые с вектором H7N9-ЖГВ (Рисунок 15А, Б). У иммунизированных мышей вирулентный вирус H7N9-PR8 на низком уровне размножался в легких в отличие от



группы контроля (Рисунок 15В). Полученные данные указывают на отсутствие негативного влияния встроенных эпитопов РСВ на защитные свойства химерных вакцинных штаммов в отношении вируса гриппа.

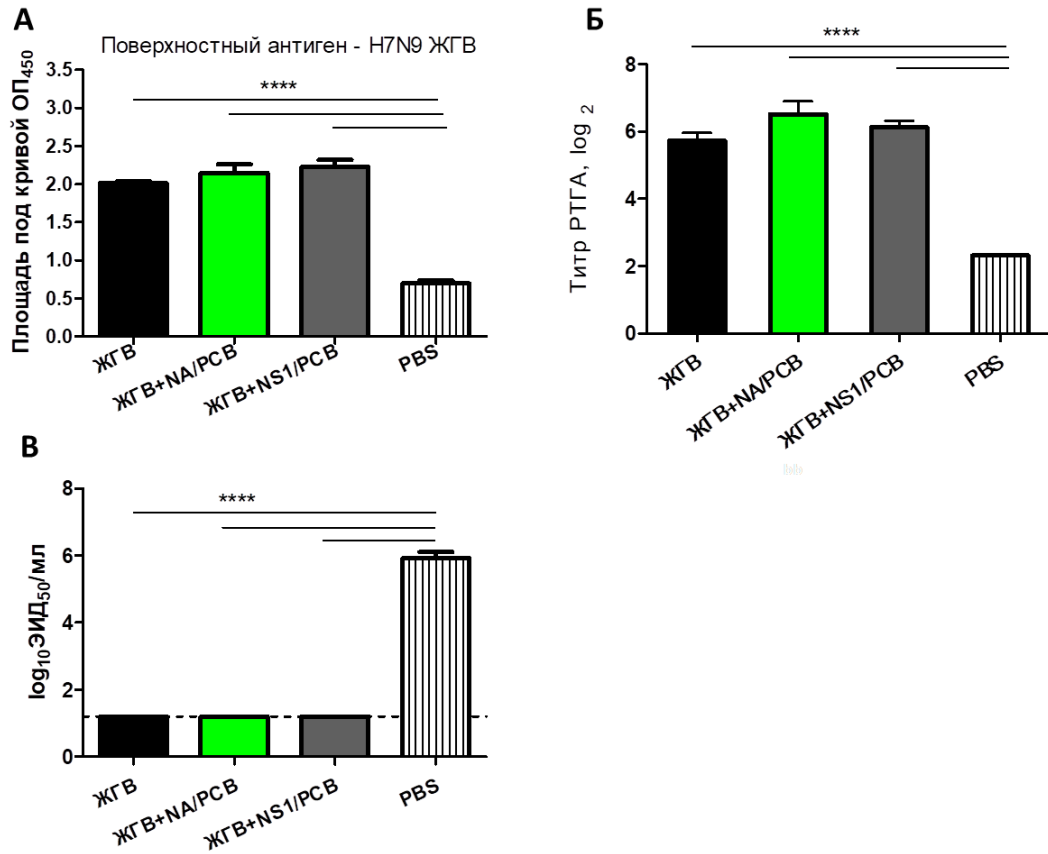


Рисунок 15 – Иммуногенность и защитная эффективность вакцин в отношении вируса гриппа. **А.** Уровни IgG антител в сыворотках крови мышей **Б.** Уровни антигемагглютинирующих антител к штамму A/17/Anhui/2013/61 (H7N9) **В.** Репродукция вирулентного вируса гриппа H7N9-PR8 в носовых ходах и легких у мышей на 3 день после челленджа. Данные анализировали с помощью однофакторного ANOVA с критерием множественных сравнений Тьюки (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 3.3.4. Иммуногенность и защитная эффективность рекомбинантных вакцинных штаммов в отношении РСВ

В рамках диссертационной работы было проведено два независимых эксперимента по оценке безопасности, иммуногенности и протективной активности разработанных Т-клеточных вакцинных кандидатов в отношении РС вируса. Один эксперимент проводился на базе Государственного университета штата Джорджия (Атланта, США) под руководством профессора Sang-Moo Kang, а второй – на базе ФГБНУ «ИЭМ», в отделе

вирусологии им. А.А.Сморозина.

В первом эксперименте впервые изучали защитную эффективность вакцин в отношении РСВ и уделяли внимание вопросам безопасности вакцин, учитывая опыт применения ФИ-РСВ вакцины в 1960-х гг. Соответственно, при разработке потенциальных вакцин-кандидатов против РСВ требуется контролировать вероятность возникновения легочной патологии у вакцинированных мышей после челленджа РС вирусом. Для моделирования состояния вакцин-индуцированной легочной патологии в эксперимент включили дополнительную группу мышей, вакцинированных ФИ-РСВ. В эксперименте исходили из гипотезы о том, что легочное воспаление у вакцинированных ФИ-РСВ после заражения РСВ связано с высоким содержанием инфильтрующих эозинофилов. В связи с этим, у мышей после челленджа РСВ оценивали содержание эозинофилов методами проточной цитометрии с основными маркерами, презентуемыми на их поверхности, а также оценивали уровень одного из регуляторов эозинофилопоэза – ИЛ-5.

Во втором эксперименте проводили углубленный анализ механизмов иммунологической защиты предложенных прототипов векторных вакцин в отношении РСВ. В частности, оценивали функциональную активность  $CD8^+$  эффекторных ЦТЛ в системе *in vivo*, а также способность вакцин индуцировать образование  $T_{RM}$  в интерстиции легочной ткани.

#### 3.3.4.1. Оценка защитной эффективности рекомбинантных вакцинных штаммов, кодирующих Т-клеточные эпитопы РСВ, в отношении РС инфекции (эксперимент №1)

Спустя пять дней после заражения иммунизированных мышей РСВ А2 высокие титры вируса были обнаружены в контрольной группе мышей, получавших PBS, а также в группе Н7Н9-ЖГВ. РС вирус не детектировался в группе ФИ-РСВ, а также репродуцировался на незначительном уровне в группах, иммунизированных векторными вариантами ЖГВ+NA/РСВ и ЖГВ+NS1/РСВ (титр вируса 9775, 11365, 431, 271 БОЕ/грамм ткани для групп PBS, Н7Н9-ЖГВ, ЖГВ+NA/РСВ, ЖГВ+NS1/РСВ, соответственно) (Рисунок 16А).

Один из методов контроля за состоянием легочной патологии после РС инфекции – определение количественного соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов Th1 и Th2 типов. Благодаря анализу доминирующего цитокинового окружения в образцах легких и клеток БАЛ можно отследить смещение баланса Th1/Th2 в сторону преобладания одной из них. В исследовании определяли уровни секреции ИФН- $\gamma$ . Этот цитокин потенцирует развитие наивных  $CD4^+$  Т-клеток в сторону поляризации по Th1 фенотипу. ИФН- $\gamma$  продуцируется эффекторными  $CD8^+$  Т-лимфоцитами,  $CD4^+$  Т-клетками и натуральными

киллерами. Уровни секреции провоспалительного цитокина ИФН- $\gamma$  в легких и образцах БАЛ были достоверно ниже в группах векторных вакцин ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV по сравнению с группой PBS (Рисунок 16Б).

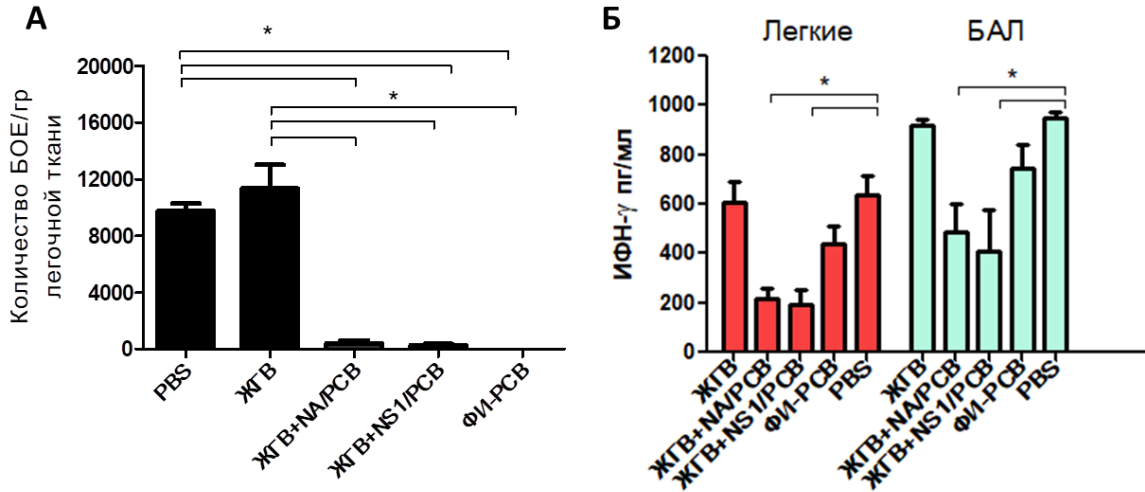


Рисунок 16 – Иммуногенность и защитная эффективность рекомбинантных штаммов ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV в отношении РСВ. **А.** Титр вируса в легких мышей на 5-е сутки после заражения РСВ **Б.** Уровень провоспалительного цитокина ИФН- $\gamma$  в легких и БАЛ, собранных на 5 день после челленджа РС вирусом. Символом \* указана статистически значимая разница между группами, рассчитанная по U-критерию Манна-Уитни ( $p < 0.05$ ).

Дополнительно в БАЛ и в клетках легочной ткани у мышей на 5 сутки после челленджа РСВ определяли степень активации РСВ-M2-1<sub>82-90</sub>-специфических эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток по продукции ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  (Рисунок 17). В клетках БАЛ наблюдали усиленную продукцию ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  в группах векторных вакцин ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV по сравнению группами Н7N9-ЖГВ, ФИ-PCV и PBS. В клетках легких уровень обоих цитокинов был выше в группах ЖГВ-PCV по сравнению с остальными группами (Рисунок 17). Установлено, что вакцинация ЖГВ+NS1/PCV способствует образованию более устойчивых иммунных реакций по сравнению с ЖГВ+NA/PCV, о чем можно судить по уровням ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ , как в клетках легких, так и в БАЛ после стимуляции РСВ-пептидом.

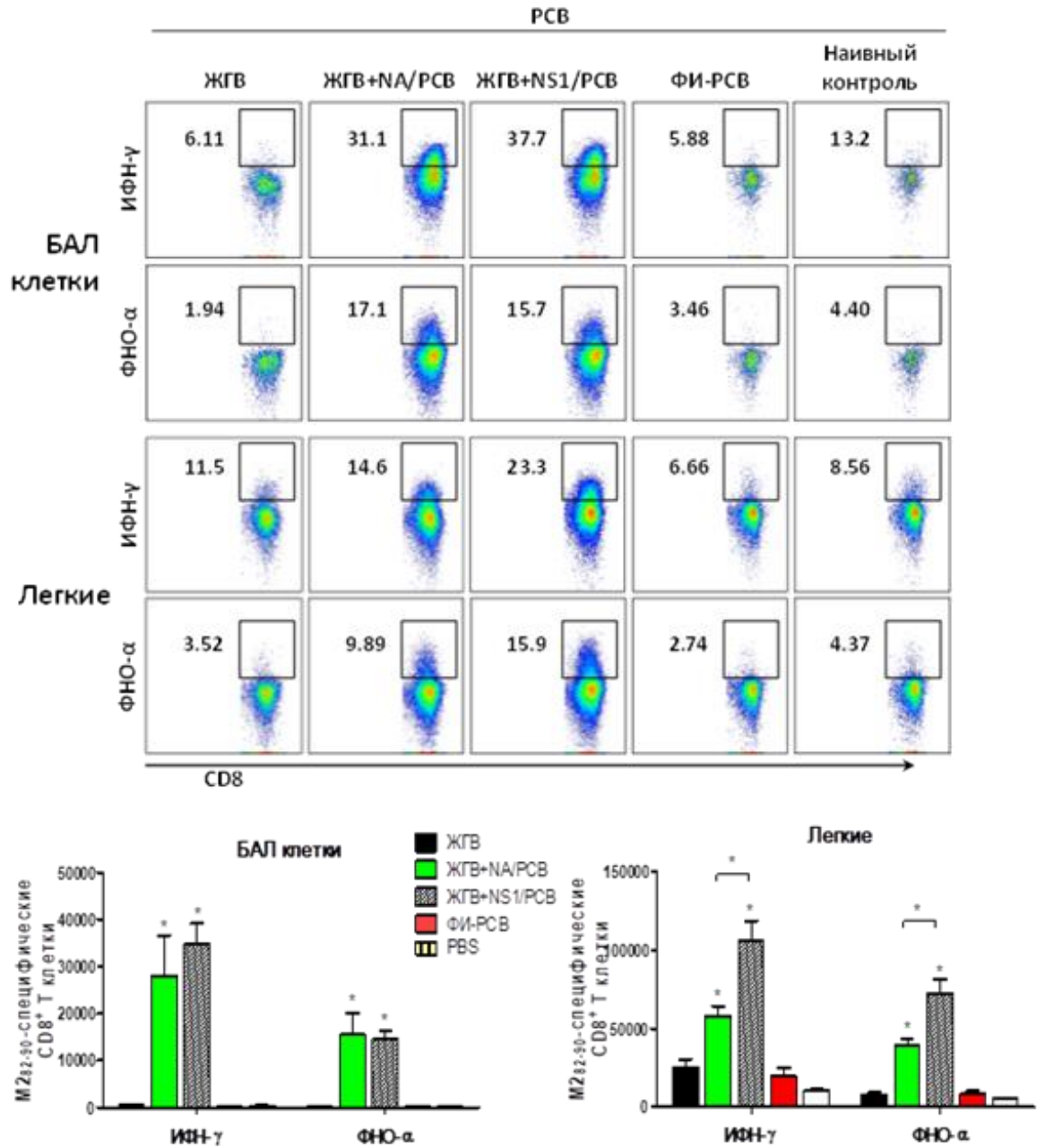


Рисунок 17 – Оценка уровней цитокин-продуцирующих M2-специфичных CD8 T-клеток в БАЛ и легких у иммунизированных мышей после челленджа РСВ. Клетки стимулировали пептидом M2<sub>82-90</sub> РСВ и использовали метод внутриклеточного окрашивания цитокинов, для количественной оценки продукции ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ . \* $p < 0,05$  (U-тест Манна-Уитни).

Для выявления факторов, опосредующих бронхолегочную патологию, после заражения РС вирусом проводили углубленный анализ клеток, выделенных из БАЛ и легких мышей на 5 сутки после челленджа. В клетках БАЛ и в клетках легких в группе ФИ-РСВ выявляли высокий уровень инфильтрующих клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры эозинофилов  $CD11c^-CD11b^+Siglec F^+$ . По сравнению с группой ФИ-РСВ, количество эозинофилов в группах векторных вакцин ЖГВ+NA/РСВ и ЖГВ+NS1/РСВ, вектора H7N9-ЖГВ и PBS было достоверно ниже (Рисунок 18А). Обычно повышенную выработку эозинофилов фиксируют при патологических изменениях в структуре легочной ткани после иммунизации ФИ-РСВ и последующим заражением РСВ.

Также оценивали концентрацию фактора дифференцировки эозинофилов и провоспалительного цитокина ИЛ-5 в БАЛ и ткани легких привитых мышей после челленджа. Цитокин ИЛ-5 секретировался на максимальном уровне в группе ФИ-РСВ, а его количество в группах векторных вакцин и вектора H7N9-ЖГВ были сопоставимы с группой PBS (Рисунок 18Б).

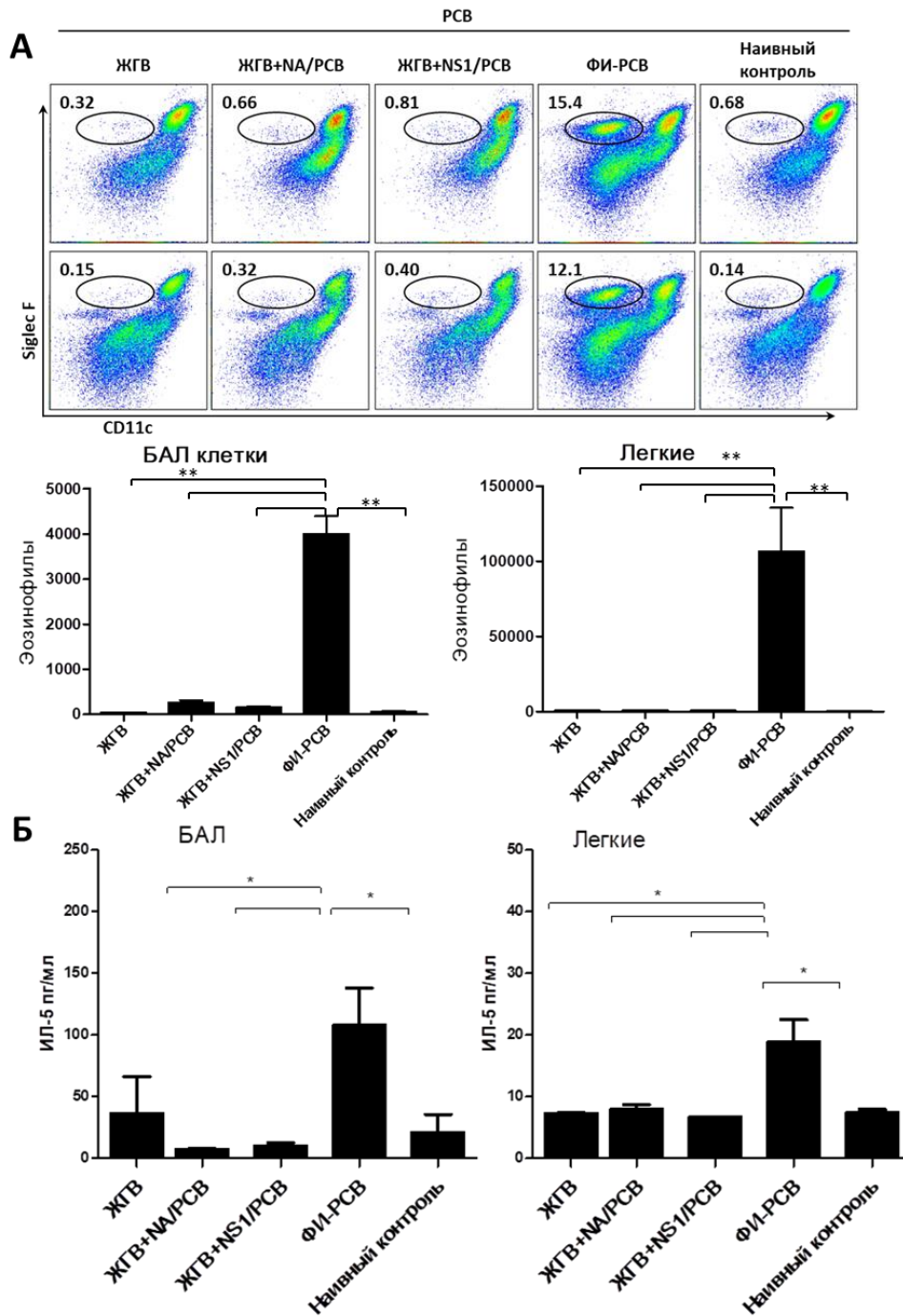


Рисунок 18 – Степень экспрессии CD11c-CD11b<sup>+</sup>Siglec F<sup>+</sup> и количества эозинофилов в клетках БАЛ и легких после заражения PCV. **А.** Репрезентативные графики проточной цитометрии по экспрессии CD11c-CD11b<sup>+</sup>Siglec F<sup>+</sup> и количество эозинофилов в БАЛ клетках и легких. При гейтировании выделяли популяцию CD11b (выделена овалом) и анализировали по экспрессии CD11c и Siglec F. **Б.** Оценка уровня провоспалительного ИЛ-5 в легких и в БАЛ. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 (U-тест Манна-Уитни).

Оценка гистологических срезов легких мышей после челленджа РСВ показала, что в группе PBS РС-инфекция вызывала умеренные патологические поражения (Рисунок 19). Крайне тяжелые легочные поражения выявляли в группе ФИ-РСВ, включая обструкцию респираторного тракта, сопровождающуюся сужением периферических дыхательных путей, формированием экссудата воспалительных клеток и слизи в альвеолярном, бронхиальном пространстве, а также вокруг кровеносных сосудов (Рисунок 20). По мнению независимого эксперта, небольшое число баллов по степени поражения легочной ткани было присвоено группе PBS и вектора ЖГВ, что свидетельствует о том, что вектор не способен вызывать осложнения в условиях естественной РС-инфекции (Рисунок 20А). Векторные варианты ЖГВ+NA/РСВ, ЖГВ+NS1/РСВ характеризовались минимальными баллами по степени воспаления в интерстиции легких, количеству слизи и содержанию эозинофилов (Рисунок 20Б, В).

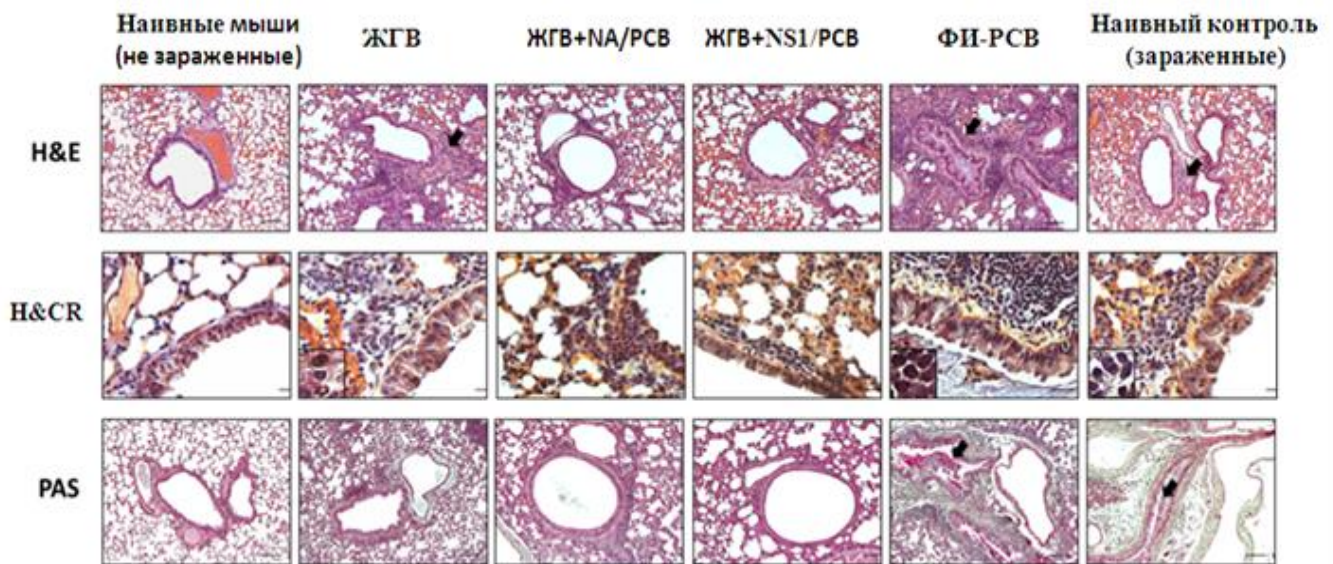


Рисунок 19 – Гистопатологические изменения легочной ткани у иммунизированных мышей после заражения РС вирусом. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином (H&E), гематоксилин конго красным (H&CR), по методу Шиффа (PAS). Стрелками показаны участки интенсивного окрашивания.



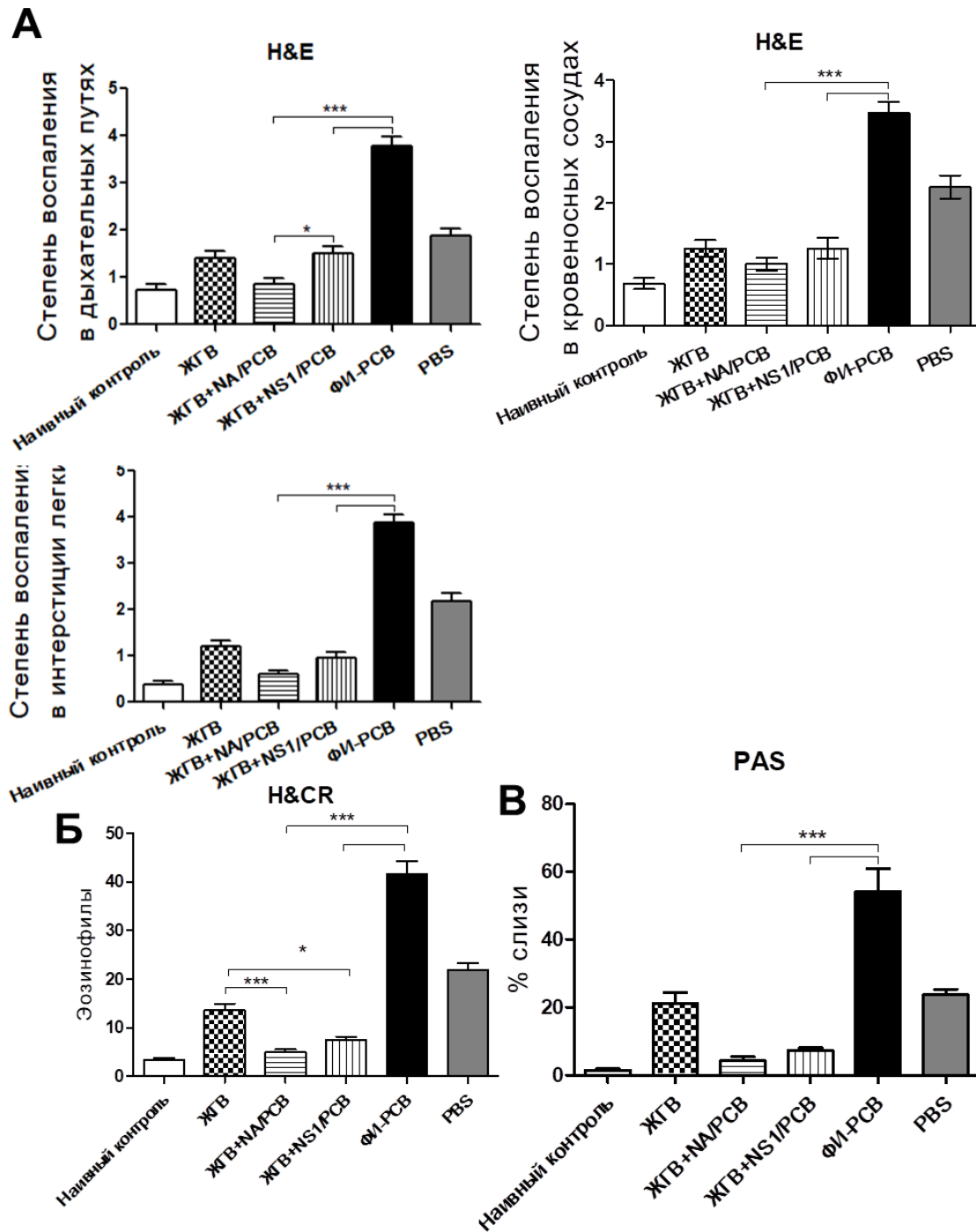


Рисунок 20 – Гистопатологические изменения легочной ткани у иммунизированных мышей после заражения РС вирусом. **А.** Оценка степени поражения легочной ткани в разных группах иммунизированных мышей на 5-е сутки после челенджа РСВ, выставленная независимым гистологом по шкале 1-5 по наличию и степени поражения ткани: 0 – отсутствует, 1 – легкие, 2 – незначительные, 3 – умеренные, 4 – тяжелые, 5 – крайне тяжелые. **Б.** Количество инфильтрированных эозинофилов в легких. **В.** Процентное соотношение площади окрашенного среза легкого с положительной экспрессией PAS у отдельных мышей (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$  тест Манна-Уитни)



### 3.3.4.2. Оценка иммуногенности и эффективности рекомбинантных вакцинных штаммов, кодирующих Т-клеточные эпитопы РСВ, в отношении РС инфекции (эксперимент №2)

#### *Функциональная активность цитотоксических Т-лимфоцитов*

Оценивали уровень и функциональную активность антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, образующихся после вакцинации двумя дозами векторных вакцин ЖГВ+NA/PCV, ЖГВ+NS1/PCV в системе *in vivo*.

На начальном этапе оценивали уровень индукции M2-1<sub>82-90</sub><sup>-</sup> и M2-1<sub>126-145</sub><sup>-</sup> специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенках у мышей после иммунизации. Количество ИФН-γ<sup>+</sup> M2-1<sub>82-90</sub>-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток было высоким и статистически не различалась в группах векторных вакцин ЖГВ+NA/PCV, ЖГВ+NS1/PCV через 3 недели после второй вакцинации (Рисунок 21А). После иммунизации не было выявлено увеличения уровня экспрессии ИФН-γ<sup>+</sup> M2-1<sub>126-145</sub>-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток (данный пептид содержит CD8<sup>+</sup> эпитоп M2-1<sub>127-135</sub>) (Рисунок 21Б). Дополнительно проводили стимуляцию лимфоцитов цельным вирусом гриппа, использованным в качестве вектора, чтобы оценить, как влияют предложенные модификации 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/PCV и ЖГВ+NS1/PCV, который был сопоставим с группой H7N9-ЖГВ (Рисунок 21В), 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<sup>+</sup> Т-клеток (Рисунок 21Г).

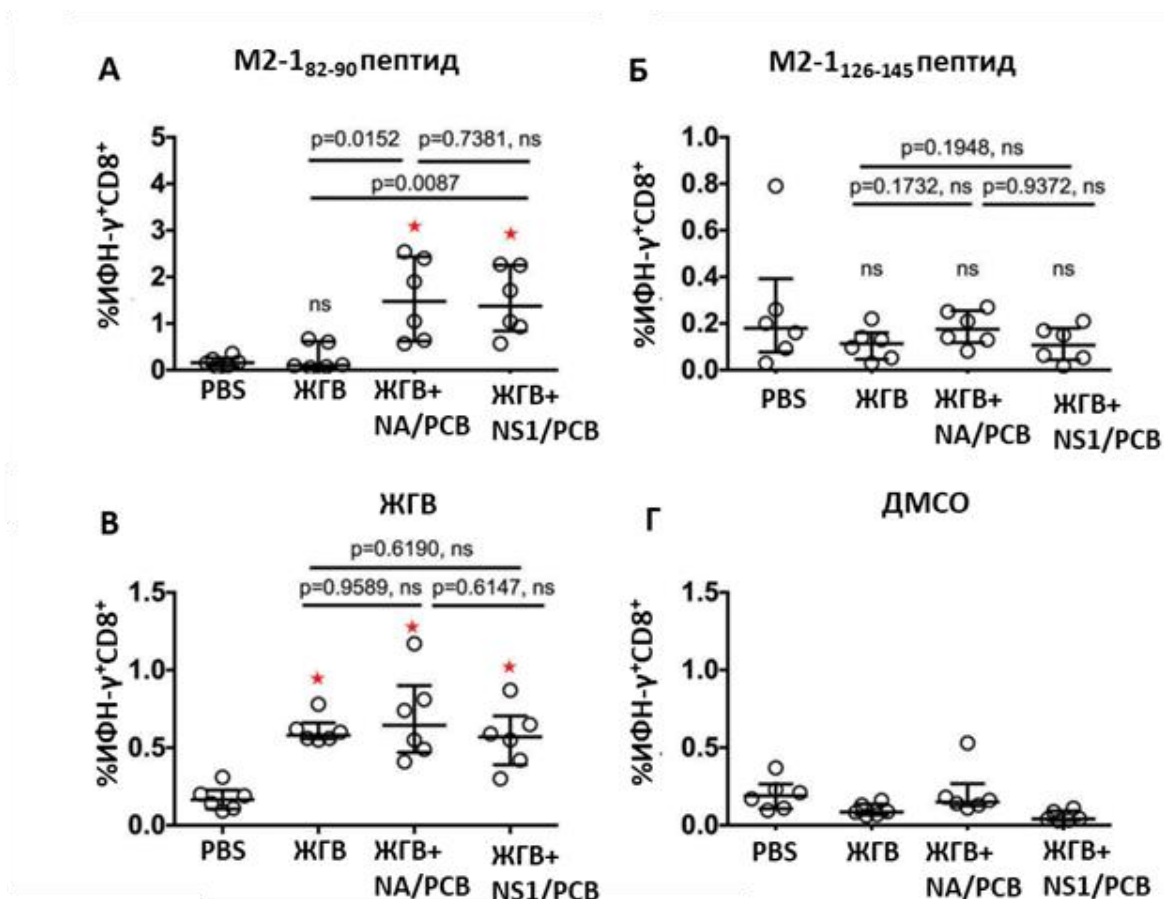


Рисунок 21 – Уровни ИФН $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток у иммунизированных мышей при стимуляции пептидами РСВ, ЖГВ и ДМСО. **А.** M2-1<sub>82-90</sub>; **Б.** M2-1<sub>126-145</sub>, **В.** Цельный вирус гриппа (ЖГВ); **Г.** ДМСО. Применяли метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) для определения доли ИФН $\gamma$ -продуцирующих клеток среди пула CD8<sup>+</sup> Т клеток. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (указаны значения р с применением теста Манна-Уитни (U-критерий). ns – различия недостоверны ( $p \geq 0,05$ ). Красными звездочками указаны значимые различия в уровнях экспрессии ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетками между группами.

В тесте по определению функциональной активности образованных ЦТЛ в качестве мишени использовали спленоциты наивных мышей, нагруженные пептидами РСВ M2-1<sub>82-90</sub>, либо M2-1<sub>126-145</sub> (Рисунок 22). Исследуемые спленоциты окрашивали реагентом CFSE в различных концентрациях, который прочно связывается с долгоживущими молекулами внутри клеток. Окрашенные спленоциты вводили внутривенно в ретроорбитальный синус иммунизированных мышей ( $n=7$ ). О качестве ЦТЛ иммунного ответа судили по уровню специфического уничтожения CD8<sup>+</sup> Т-клеток, т.е. изменению пропорции спленоцитов, нагруженных целевыми пептидами, к контрольным клеткам.

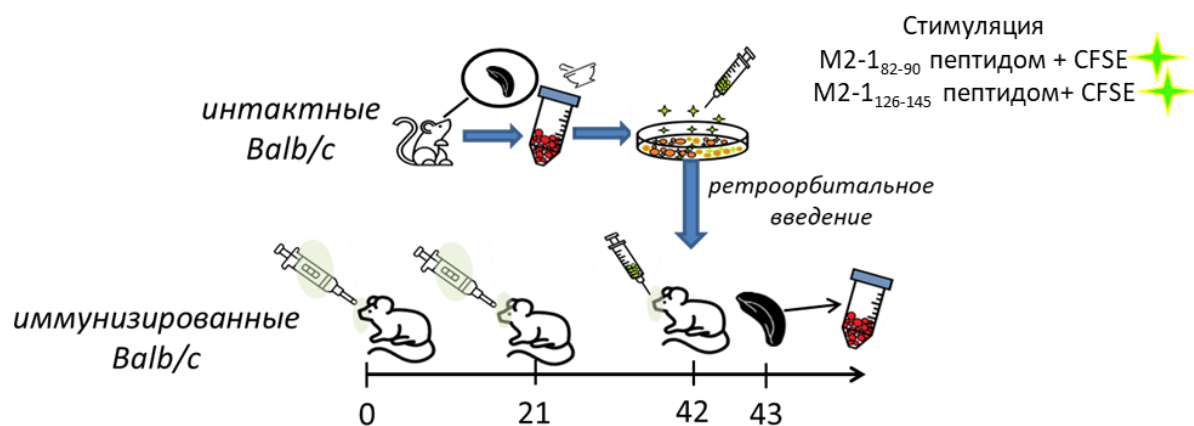


Рисунок 22 – Схема проведения эксперимента по оценке функциональной активности цитотоксических Т лимфоцитов у иммунизированных мышей (ЦТЛ *in vivo*).

По результатам анализа высокая специфическая активность ЦТЛ в отношении клеток-мишеней, нагруженных пептидами M2-1<sub>82-90</sub>, наблюдалась в обеих группах мышей, иммунизированных вакцинными кандидатами ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB, по сравнению с группой ЖГВ (Рисунок 23А). У мышей из групп ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB не обнаруживали активацию ЦТЛ против клеток-мишеней, нагруженных пептидом M2-1<sub>126-145</sub> (Рисунок 23Б).

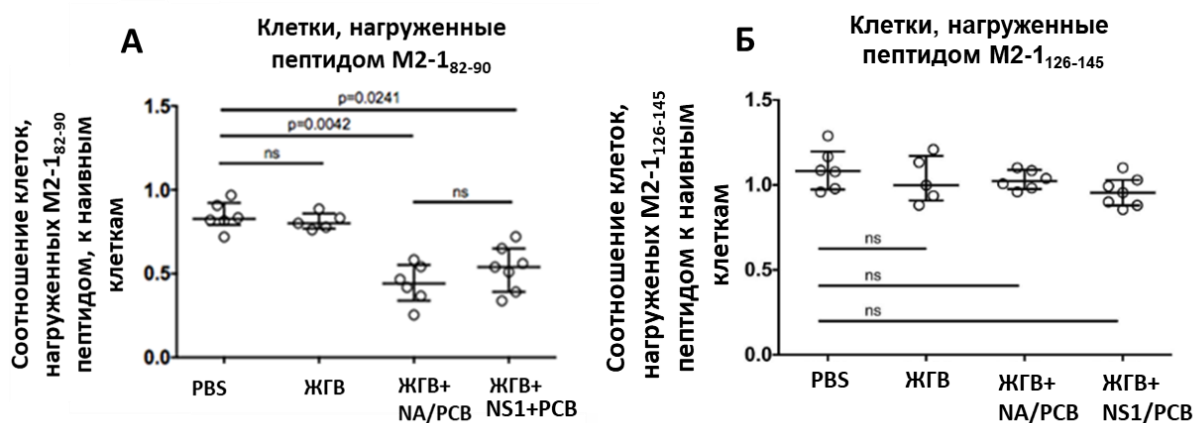


Рисунок 23 – Оценка функциональной активности ЦТЛ у иммунизированных мышей (ЦТЛ *in vivo*). **А.** Соотношение клеток спленоцитов, нагруженных M2-1<sub>82-90</sub> пептидом к наивным клеткам спленоцитов. **Б.** Соотношение клеток спленоцитов, нагруженных M2-1<sub>126-145</sub> пептидом к наивным клеткам спленоцитов. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (указаны значения p с применением теста Манна-Уитни (U-критерий). ns – различия недостоверны ( $p \geq 0,05$ )).

*Системный РСВ-специфический Т-клеточный иммунный ответ*

На 7-е сутки после второй вакцинации векторными вакцинами ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB в селезенках мышей фиксировали высокий уровень РСВ M2-1<sub>82-90</sub>-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (T<sub>EM</sub>), которые секретируют одновременно цитокины ИФН-γ и ФНО-α в ответ на стимуляцию (Рисунок 24). Статистически значимо более высокий уровень цитокинов вырабатывался в группе вакцинного варианта ЖГВ+NA/PCB по сравнению с ЖГВ+NS1/PCB (Рисунок 24Б).

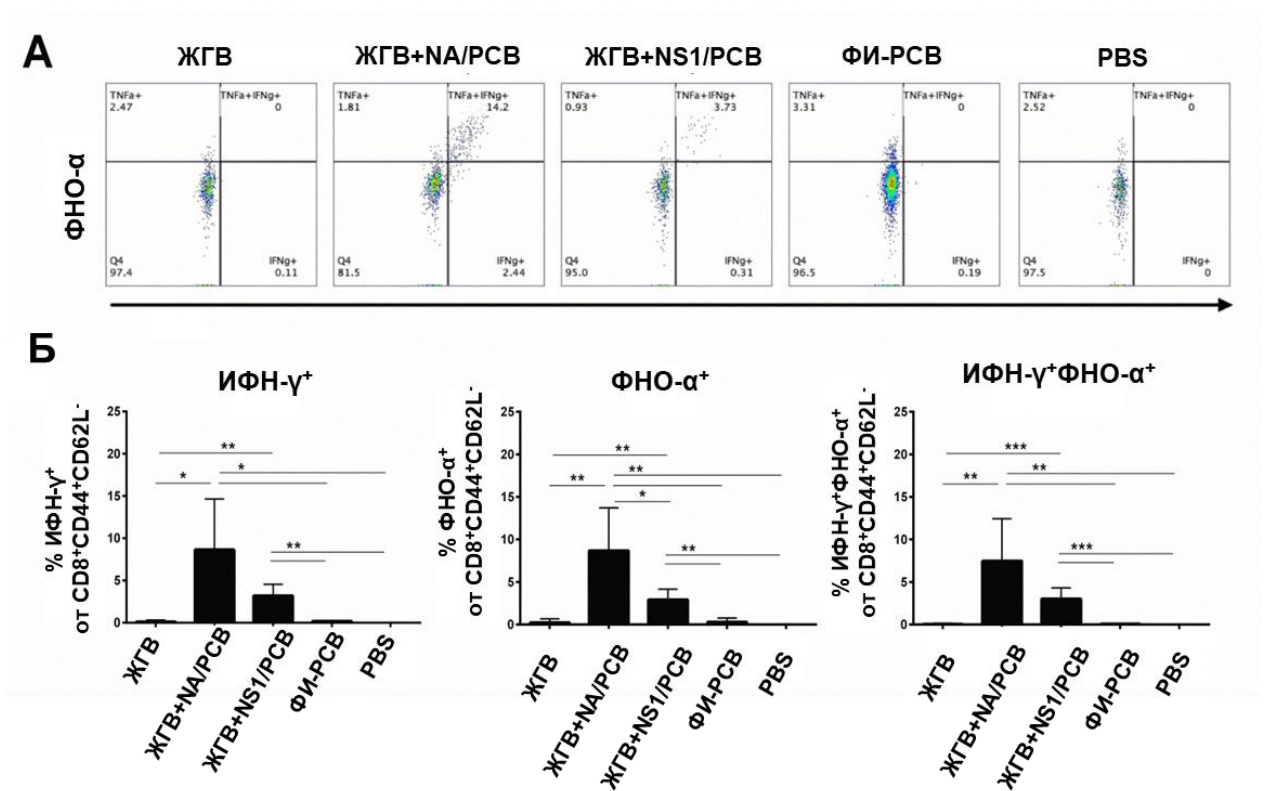


Рисунок 24 – Уровни РСВ-специфических эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенках мышей на 7-й день после двукратной иммунизации. **А.** Визуализация данных проточной цитометрии. Профиль экспрессии цитокинов ИФН-γ и ФНО-α эффекторными Т-клетками памяти. **Б.** Процент клеток CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>, экспрессирующих один из цитокинов ИФН-γ или ФНО-α, либо оба цитокина. Данные были проанализированы с помощью t-тестов с поправкой Холма-Сидака.

*Определение основных субпопуляций тканерезидентных Т-клеток памяти в легочной ткани*

Используя интраназальную схему введения вакцинных вариантов ЖГВ-РСВ важно оценить, каким образом это повлияет на величину популяции резидентных Т-клеток, которые находятся в различных нишах респираторного тракта, особенно легких. На 7-ые сутки после второй иммунизации существенных различий в общем количестве  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток в легких иммунизированных и контрольных мышей не было выявлено (Рисунок 25А). Статистически значимые межгрупповые различия выявляли при оценке соотношений количества  $CD4^+/CD8^+$  клеток (Рисунок 25Б). Соотношения  $CD4^+$  к  $CD8^+$  были статистически значимо выше в группах ЖГВ+NA/РСВ и ЖГВ+NS1/РСВ по сравнению с PBS. Однако более существенная разница зафиксирована в группе ЖГВ+NA/РСВ по сравнению с ЖГВ+NS1/РСВ (Рисунок 25Б).

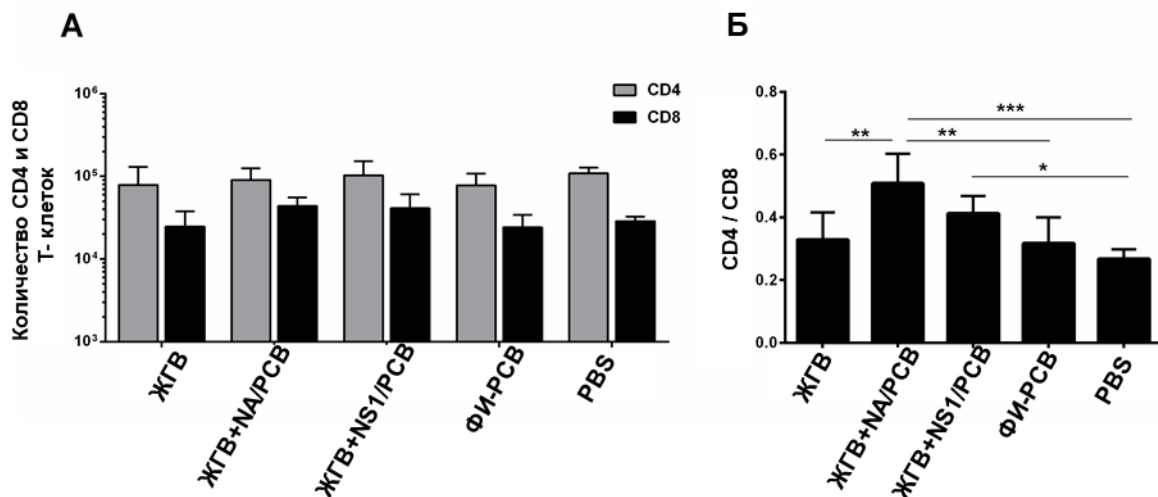


Рисунок 25 – Количество  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток в легочной ткани иммунизированных мышей. **А.** Общее количество  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток в легких на 7-ой день после второй иммунизации. Данные были проанализированы при помощи двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. **Б.** Соотношение  $CD8^+$  и  $CD4^+$  Т-клеток в легких. Данные были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Для  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток определяли уровень эффекторных клеток памяти  $CD44^+CD62L^-$ , которые экспрессировали маркеры  $T_{RM}$ . В работе в качестве маркеров  $T_{RM}$  использовали  $CD69$  и  $CD103$ .

В тканях легких животных всех экспериментальных групп зафиксированы схожие уровни эффекторных  $CD4^+$  Т-клеток памяти, экспрессирующих только маркер  $CD69$  (Рисунок 26Б). Тогда как уровни эффекторных  $CD4^+$  Т-клеток, экспрессирующих оба маркера  $CD69$  и  $CD103$ , были выше в группах ЖГВ+NA/PCВ и ЖГВ+NS1/PCВ (Рисунок 26Б).

Доля  $CD8^+$   $T_{EM}$ , экспрессирующих как один маркер  $CD69$ , так и два поверхностных маркера  $CD69$  и  $CD103$  в легких была выше в экспериментальных группах ЖГВ+NA/PCВ и ЖГВ+NS1/PCВ (Рисунок 26Б). Иммунизация вектором ЖГВ индуцировала выработку  $CD8^+$  Т-клеток с «двойным» фенотипом ( $CD69^+CD103^+$ )  $T_{RM}$  в легких, но количество этих клеток было статистически ниже, чем в группах ЖГВ+NA/PCВ и ЖГВ+NS1/PCВ (Рисунок 26Б).

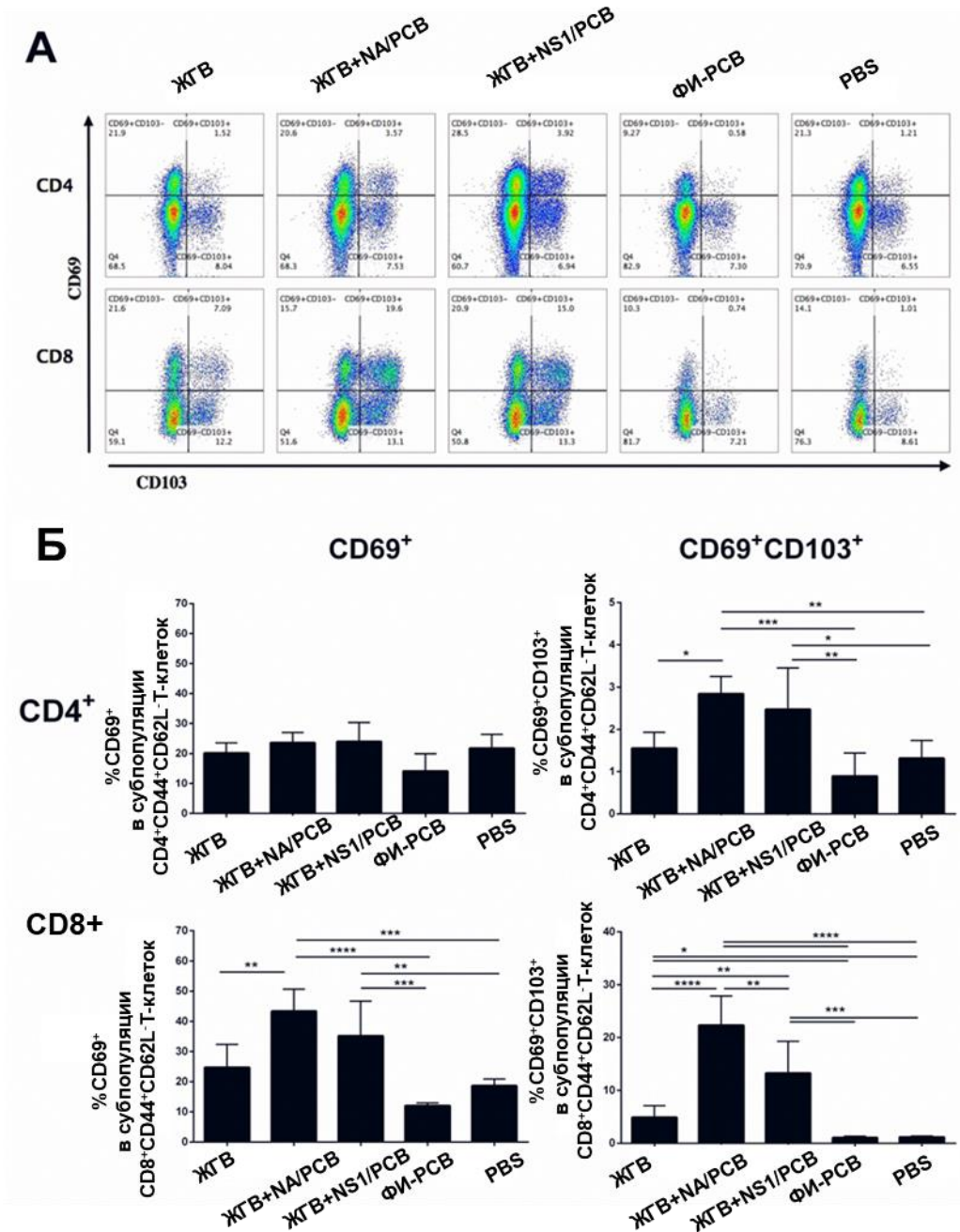


Рисунок 26 – Экспрессия маркеров CD69 и CD103  $T_{RM}$   $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клетками в легких иммунизированных мышей. **A.** Репрезентативные графики проточной цитометрии по экспрессии поверхностных маркеров CD69 и CD103 клетками у эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток памяти. **Б.** Процентное содержание  $CD69^+$  (левая панель) и  $CD69^+CD103^+$  (правая панель) клеток среди эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток. Данные были проанализированы при помощи однофакторного дисперсионного анализа (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Оценивали долю  $CD44^+CD62L^-$  эффекторных клеток памяти ( $T_{EM}$ ) в популяциях  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток, выделенных из легких иммунизированных мышей. Для этого пул клеток, выделенных из легких, стимулировали цельновирионной ЖГВ, либо пептидом РСВ M2-1<sub>82-90</sub>. Количество  $T_{EM}$  клеток оценивали по продукции ИФН- $\gamma$  и экспрессии поверхностных маркеров  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD44^+$  и  $CD62L$ .

Вакцинация ЖГВ, ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB стимулировала выработку грипп-специфических  $CD4^+$  и  $CD8^+$   $T_{EM}$  в легких. В группах ЖГВ, ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB наблюдали одинаковое количество грипп-специфических ИФН- $\gamma$ -продуцирующих  $CD4^+$   $T_{EM}$  (Рисунок 27Б). В группе ЖГВ был зафиксирован статистически более высокий уровень ИФН- $\gamma$ -продуцирующих грипп-специфических  $CD8^+$   $T_{EM}$  по сравнению с группами векторных вакцин ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB.



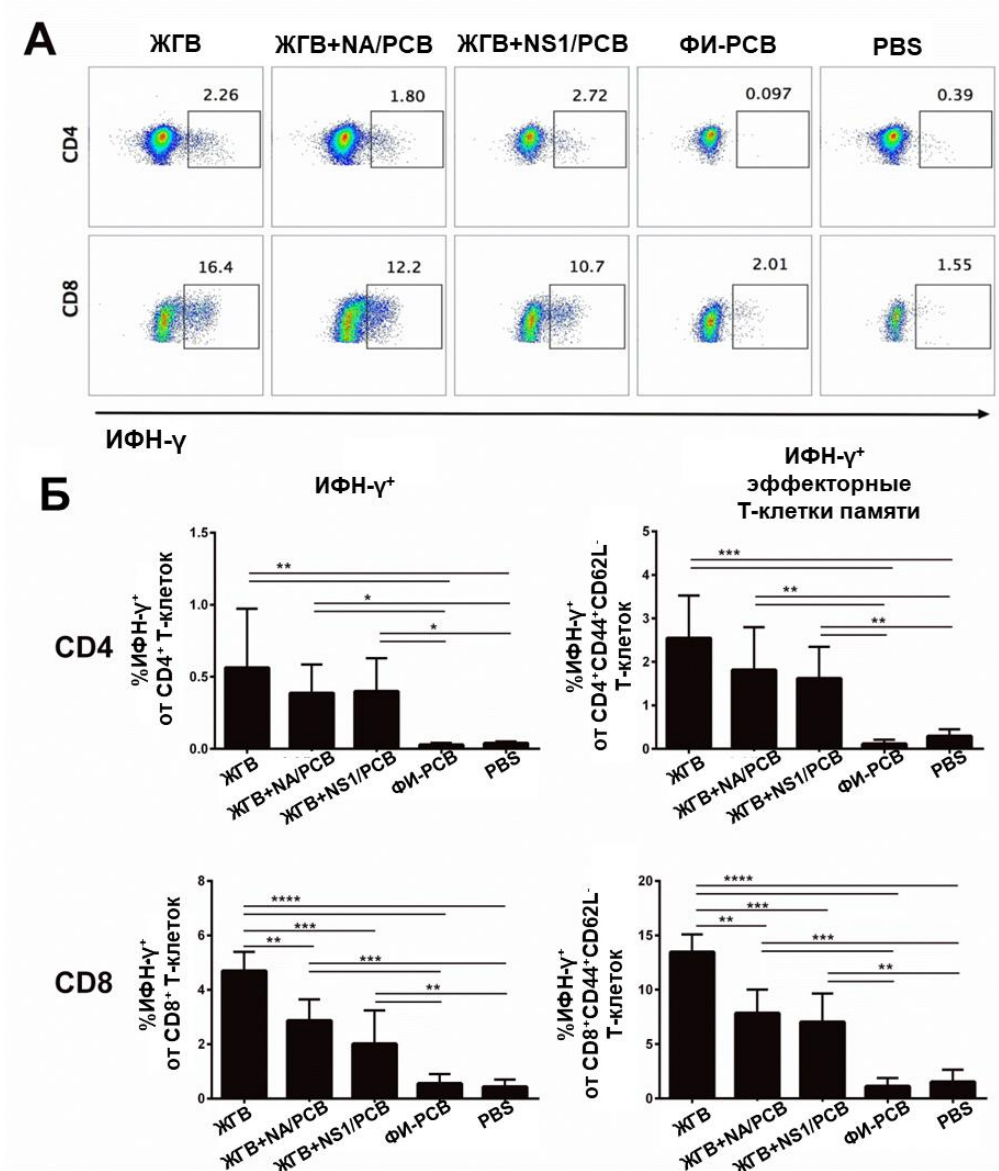


Рисунок 27 – Уровень грипп-специфических Т-клеток, продуцирующих ИФН- $\gamma$ , в легких иммунизированных мышей. **А.** Репрезентативные графики проточной цитометрии по экспрессии ИФН- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторными Т-клетками (Т<sub>ЕМ</sub>). **Б.** Процентное соотношение ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток среди популяций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в легких (левая панель) или среди соответствующей подгруппы Т<sub>ЕМ</sub> (правая панель). Данные анализировали с помощью одностороннего ANOVA с критерием множественных сравнений Холма-Сидака (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

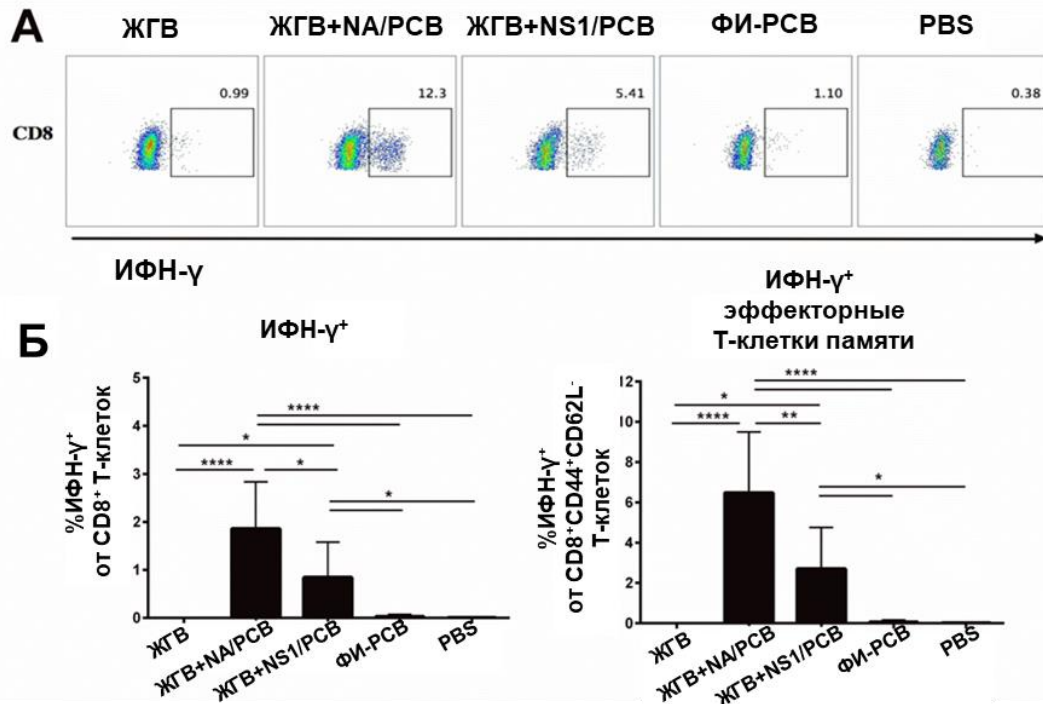


Рисунок 28 – Уровень РСВ-специфических Т-клеток, продуцирующих ИФН- $\gamma$ , в легких иммунизированных мышей. **А.** Репрезентативные графики проточной цитометрии по экспрессии ИФН- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> Т-клетками. **Б.** Процентное соотношение ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток среди популяций CD8<sup>+</sup> Т-клеток в легких (левый график) или среди соответствующей субпопуляции эффекторных Т-клеток памяти (правый график). Данные анализировали с помощью однофакторного ANOVA с критерием множественных сравнений Холма-Сидака (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Высокие уровни РСВ M2-1<sub>82-90</sub>-специфических ИФН- $\gamma$ -продуцирующих CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> вырабатывались в легких мышей, иммунизированных ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB (Рисунок 28). Вариант ЖГВ+NA/PCB проявлял более выраженную способность активировать РСВ-специфические CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> в легких, чем ЖГВ+NS1/PCB (Рисунок 28Б).

Подавляющее большинство грипп-специфических эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток обладали T<sub>RM</sub> CD69<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> фенотипом (Рисунок 29А). Большинство грипп-специфических эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти в группах ЖГВ, ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB обладали T<sub>RM</sub> CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> фенотипом, при этом более высокий уровень экспрессии CD103 наблюдался в группах ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB по сравнению с ЖГВ.

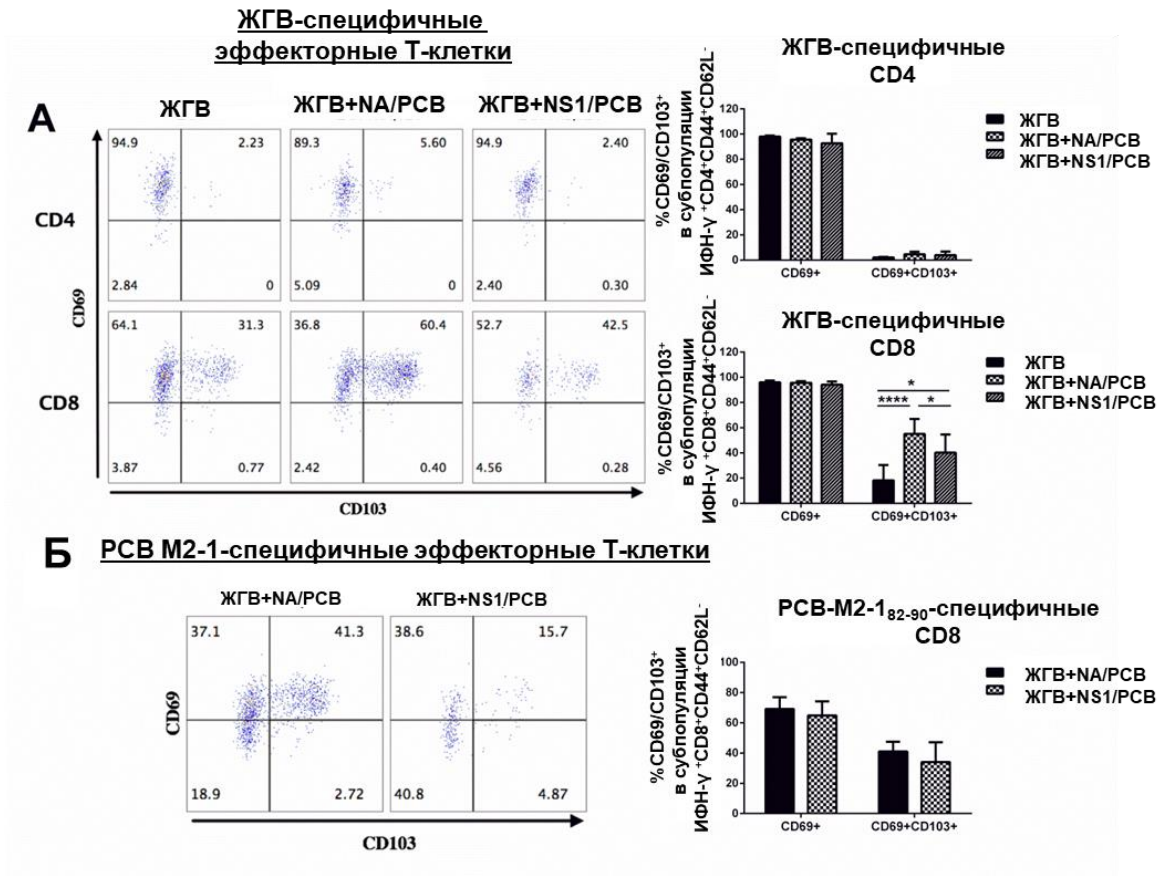


Рисунок 29 – Доля клеток с маркерами  $T_{RM}$  среди грипп-специфичных и РСВ-M2<sub>82</sub>-эпитоп-специфичных эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток памяти в легких у мышей, иммунизированных векторными вариантами ЖГВ-РСВ. **А.** Доля грипп-специфических  $CD69^+CD103^+$   $T_{RM}$  клеток среди  $CD44^+CD62L^-$  эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток **Б.** Доля грипп-специфических  $CD69^+CD103^+$   $T_{RM}$  клеток среди  $CD44^+CD62L^-$  эффекторных  $CD4$  и  $CD8$  Т-клеток. Данные анализировали с помощью двухфакторного ANOVA с тестом множественных сравнений Холма-Сидака (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Уровни грипп-специфических  $T_{RM} CD8^+$  Т-клеток в группах ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB были выше, чем в группе ЖГВ (Рисунок 29А). В группе ЖГВ+NA/PCB на долю грипп-специфических  $CD8^+$   $T_{RM}$  приходилось ~55% клеток, а в группе ЖГВ+NS1/PCB ~40%.

Тем не менее, уровни РСВ-M2<sub>82-90</sub> эпитоп-специфических  $T_{RM} CD8^+$  клеток были идентичны в обеих группах ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB (Рисунок 29Б). 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 29А, Б).

*Защитная эффективность и безопасности рекомбинантных вакцинных штаммов ЖГВ-PCB в отношении РС инфекции*

В данном эксперименте оценивали защитный потенциал рекомбинантных векторных вакцин в отношении РСВ, а также состояние бронхолегочной ткани после челленджа. В качестве группы сравнения использовали мышей, иммунизированных ФИ-PCB вакциной. Через 5 дней после заражения иммунизированных мышей штаммом РСВ А2 вирус реплицировался в незначительных количествах в обеих группах векторных вакцин ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB, по сравнению с группами PBS и ЖГВ. В группе ФИ-PCB вирус методом бляшек не обнаруживался в легких (Рисунок 30Б).

На 5 день после челленджа РСВ были собраны образцы легких во всех группах. Сравнительное гистопатологическое исследование препаратов легких мышей выявило наличие типовых изменений перибронхиолярной и периваскулярной зон, а также альвеолярного интерстиция, ателектаза и эмфиземы, которые в разной степени варьировали в разных группах (Рисунок 30А). Участки с признаками коллапса легочной ткани занимали от 1/5 до 1/3 площади гистологического среза, нередко сопровождаясь эмфизематозно расширенными альвеолами по периферии долей легкого, что свидетельствовало о неравномерном наполнении альвеол воздухом. 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 30А, В). В группе ФИ-PCB наблюдалась гиперпродукция слизи (окраска альциановым синим) 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.

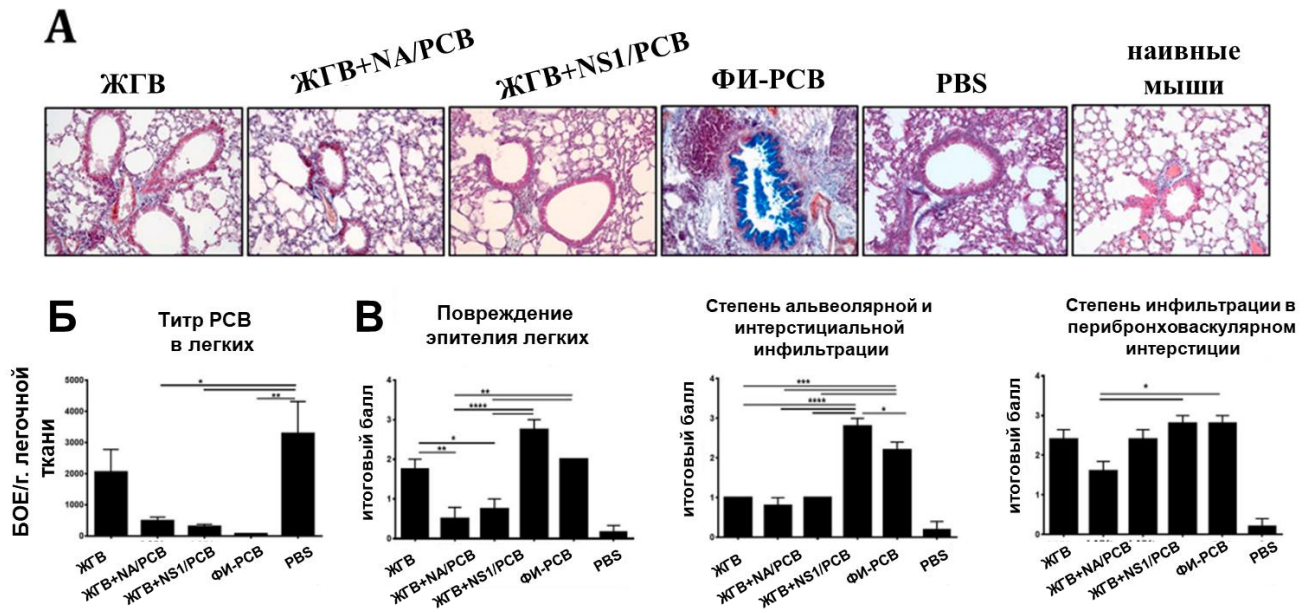


Рисунок 30 – Гистопатологические изменения легочной ткани у иммунизированных мышей после заражения РС вирусом. **А.** Снимки срезов легких, которые одновременно окрашивали конго красным, гематоксилином и альциановым синим. **Б.** Репликация штамма РСВ А2 в легких иммунизированных мышей на 5-е сутки после челленджа РСВ. **В.** Количество патологических изменений. Данные анализировали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с критерием множественных сравнений Холма-Сидака (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Среди тяжелых острых респираторных заболеваний человека на долю РСВ приходится примерно 22% случаев. При этом количество смертельных исходов ежегодно варьируется в промежутке примерно от 55 000 до 199 000, в том числе 50 000 –75 000 среди детей в возрасте до 5 лет [243, 314].

После заболевания РСВ не формируется стойкого иммунитета, из-за чего рецидивирующее инфицирование может происходить многократно раз в течение жизни, и даже повторяться в рамках одного эпидемического сезона [121, 353]. Причины, по которым так происходит, до сих пор не установлены. В 2023 года в США были лицензированы субъединичные вакцины Arexvy (GlaxoSmithKline, Великобритания) и Abyrsvo (RSVpreF) (Pfizer, США) для профилактики РС инфекции у людей старше 60 лет и многие альтернативные вакцинные кандидаты находятся на разных стадиях клинических испытаний (Приложение 2). Долгие годы считалось, что основной целью вакцинации является выработка долгоживущих антител, способных нейтрализовать вирус. Действительно, для РСВ была установлена корреляция между вирусспецифическими сывороточными антителами к РСВ и вероятностью повторного заражения и остроты течения заболевания у взрослых, детей и пожилых людей [261, 323, 353]. Наличие нейтрализующих антител в пуповинной крови коррелировало с защитой от тяжелого течения РС инфекции у младенцев [114]. При оценке состояния пожилых людей, госпитализированных с РС инфекцией, установлено, что даже с детектируемым уровнем нейтрализующих антител, в том числе и таким, который обеспечивает защитный эффект у младенцев, инфекция все равно протекает в тяжелой форме [90]. Следовательно, в этой возрастной группе нейтрализующие антитела менее эффективны, и для этой популяции требуется найти более актуальные факторы защиты. При анализе смертельных исходов у младенцев в результате РС инфекции в легочной ткани практически отсутствуют Т-клетки и НК-клетки, что указывает на вовлеченность этих клеточных популяций в процесс элиминации вируса из организма [358]. Напротив, известно, что Т-клетки принимают активное участие в процессах патогенеза, ассоциированного с РС инфекцией, вызывая воспаление в легочной ткани [44, 116, 306].

Классическая формалин-инактивированная против РСВ не смогла стимулировать образование высокого уровня нейтрализующих антител у привитых. После естественного заражения РСВ вакцина вызывала несбалансированный иммунный ответ, нежелательные реакции, в том числе эозинофилию, что ранее не было зафиксировано для других формалин инактивированных вакцин. Попытки создания аттенуированной вакцины не были успешными, так как не удалось найти баланса между низкой или умеренной

репликацией РСВ и оптимальным уровнем иммунного ответа [161]. Кроме того, вакцинные кандидаты не активировали PAMPs, стимулирующие механизмы врожденного иммунного ответа, и не вызывали выработку адаптивного иммунного ответа через презентацию антигена на молекулах МНС I и МНС II. Процесс производства живой ослабленной вакцины также имеет ряд ограничений, одним из которых является то, что до конца не ясно, каким образом изменение температуры и рН могут влиять на изменение конформации поверхностных белков F и G РСВ [127, 325].

Избежать нежелательных реакций, связанных с неправильной поляризацией иммунного ответа на вакцинацию, можно путем правильной презентации антигенов РСВ иммунной системе организма, что может быть достигнуто с использованием других вирусов для доставки целевых антигенов в клетки-мишени. Начиная с 60-х годов прошлого века для защиты от РСВ разрабатывают вакцины на основе вирусных векторов, в том числе аденовирусов (PanAd3, Ad26, Ad35, ChAd155), модифицированного вируса оспы MVA, рабдовирусов и других (Таблица 1). В целом, векторные вакцины демонстрируют перспективность данной стратегии благодаря индукции мощных клеточных и гуморальных иммунных реакций и обладают хорошим профилем безопасности. Однако стоит учитывать, что эффективность векторной вакцины может быть ограничена ввиду предсуществующего иммунитета, обусловленного предыдущим воздействием и невосприимчивостью к вирусным векторам.

В рамках настоящего исследования для конструирования векторной вакцины от РСВ была предложена новая платформа – живая аттенуированная холодоадаптированная гриппозная вакцина. В отличие от большинства других вирусных векторов, штаммы ЖГВ на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 широко применяли в практике здравоохранения для профилактики сезонного гриппа среди различных возрастных групп, при этом демонстрируя высокий уровень эпидемиологической эффективности даже в периоды циркуляции дрейфовых вариантов вируса гриппа [1, 2, 286, 288]. Кроме того, основным преимуществом такой векторной платформы является обеспечение после иммунизации специфической защиты и в отношении циркулирующих сезонных вирусов гриппа, которые, согласно данным ВОЗ на 2017 год, ежегодно приводят к 650 000 случаям смертельных исходов во всем мире [359].

До начала настоящего исследования был накоплен определенный массив данных об использовании рекомбинантных вирусов гриппа штаммов А/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) и А/WSN/1933 (H1N1) в качестве векторных вакцин против различных инфекционных патогенов [107], при этом в подавляющем большинстве случаев вносимые в геном вируса гриппа модификации были также призваны обеспечить безопасность применения

векторной вакцины у людей, т.е. отвечали за аттенуированный фенотип вируса. В случае использования холодаадаптированных вакцинных штаммов лицензированной ЖГВ не требуется дополнительного обеспечения безвредности, поскольку аттенуированный фенотип вакцинных штаммов контролируется набором мутаций, расположенных в генах полимеразного комплекса [137, 174]. В рамках диссертационной работы были испытаны различные стратегии встраивания генетического материала целевого патогена (РС вируса), ранее описанные при дизайне векторных вакцин на основе лабораторных модельных штаммов вируса гриппа. Учитывая ограниченную емкость гриппозного вектора и необходимость сохранения основных фенотипических характеристик вакцинного штамма ЖГВ, в качестве вставки использовали не цельные белки РСВ, а иммуногенные эпитопы из М2-1 и F белков РСВ. При этом для доказательства концепции исследования дизайн векторных вакцин определяли возможностью проведения углубленного анализа их иммуногенных и протективных свойств с использованием модельных животных, а именно BALB/с мышей [9]. Кассеты подбирали таким образом, чтобы стимулировать преимущественно либо гуморальный (первая кассета), либо Т-клеточный (вторая кассета) иммунные ответы к РСВ. В состав обеих кассет встраивали эпитопы, которые способны активировать цитотоксические Т-лимфоциты у мышей гаплотипа H-2(d). После выбора эпитопов и объединения их в две иммуногенные кассеты синтезированные *de novo* фрагменты были встроены в разные участки генома вируса гриппа с использованием трех основных подходов:

1. Встраивание иммуногенного эпитопа с нейтрализующей активностью проводили в молекулу НА вируса гриппа через гибкий линкер (AAAPGAA или GGGGSGGGGS). Целевой фрагмент РСВ встраивали сразу после сигнальной последовательности НА, с N-конца субъединицы НА1 таким образом, чтобы встроенный фрагмент экспонировался снаружи вирусной частицы в составе гибридной молекулы НА;
2. Присоединение иммуногенного фрагмента РСВ, кодирующего Т-клеточные эпитопы, осуществляли в модифицированный ген НА вируса гриппа, после открытой рамки считывания полноразмерного белка НА через сайт саморасщепления P2A для обеспечения независимого процессинга встроенной кассеты. Вслед за вставкой, содержащей также стоп-кодон, добавляли последние 157 нуклеотидов гена нейраминидазы, которые содержат сигналы для корректной упаковки гена НА в вирион [6];
3. Присоединение иммуногенного фрагмента РСВ, кодирующего Т-клеточные эпитопы, осуществляли в рамку считывания белка NS1 вируса гриппа сразу за 126-м кодоном, также используя сайт саморасщепления P2A. Остальная часть NS гена остается



интактной. Этот подход описан в литературных источниках, в которых указано, что подобное усечение NS1 способствует аттенуации вируса гриппа [81].

Чаще всего в качестве мишени для индукции вирус-нейтрализующих антител выступают эпитопы, расположенные в структурном белке F РСВ, который может находиться в двух конформациях – пре- и пост-фьюжн. У ФИ-РСВ вакцины F белок находился преимущественно в конформации пост-фьюжн [167]. В текущем исследовании был выбран нейтрализующий эпитоп, локализованный в антигенном сайте II белка F РСВ, который стабилен в обеих конформациях F белка. Данный эпитоп относят к паливизумаб-подобным, поскольку коммерческий препарат моноклональных антител Паливизумаб (MedImmune, США) распознает антигенный сайт IIa F белка. Изначально идея интегрирования паливизумаб-подобного эпитопа в субъединицу HA1 вируса гриппа штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) с помощью гибкого линкера AAAPGAA (A-линкер) была реализована коллективом Lee и соавторами [184]. Используя ту же стратегию в рамках данной работы, был получен рекомбинантный вирус ЖГВ-НА+A-РСВ на основе аттенуированной холодоадаптированной ЖГВ-H7N9. Однако, в отличие от исследования Lee и соавт., у кандидата ЖГВ-НА+A-РСВ экспрессию выбранного эпитопа РСВ методом Вестерн-блот анализа не обнаружили. Поэтому был сконструирован дополнительный вариант вакцины с тем же фрагментом РСВ-F<sub>243-294</sub>, но с гибким линкером GGGGSGGGGS (G-линкер). Включение G-линкера обеспечило правильное пространственное расположение фрагмента в составе молекулы HA, что подтвердили методом Вестерн-блот анализа. Анализ 3D-модели HA показал, что кандидат с A-линкером содержал остатки аланина, которые способствовали образованию структуры  $\alpha$ -спирали, которая могла препятствовать правильной укладке РСВ фрагмента, что не наблюдали у кандидата с G линкером. Обнаруженные расхождения в результатах можно объяснить тем, что в данной работе и в исследовании Lee с соавт. использовали разные подтипы молекул HA при конструировании вакцин.

Оба варианта ЖГВ-НА+A-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ оказались температурочувствительными и холодоадаптированными и репродуцировались на одном уровне с вектором ЖГВ в системе РКЭ и в культуре клеток MDCK. Наличие вставки РСВ не повлияло на выработку иммунитета в отношении вируса гриппа при вакцинации мышей, что свидетельствует о возможности использования таких рекомбинантных вакцин в качестве бивалентных препаратов, направленных на несколько респираторных патогенов. Стоит отметить, что оба варианта ЖГВ-НА+A-РСВ и ЖГВ-НА+G-РСВ демонстрировали достаточно низкую иммуногенность в отношении цельного РС вируса при двукратной иммунизации мышей, при этом выявляли высокую иммуногенность к

PCB в группе ФИ-PCB. Можно предположить, что в группе ФИ-PCB сывороточные антитела могут связываться с различными антигенами РС вируса, сорбированного на поверхности планшетов для ИФА. Напротив, рекомбинантные ЖГВ-НА+А-PCB и ЖГВ-НА+G-PCB могут индуцировать только узкоспецифическую популяцию антител, направленных строго на антигенный сайт II F белка PCB, который присутствует в очень маленьком количестве на поверхности вирусных частиц. Закономерно, выработанных целевых антител к PCB, индуцированных обеими вакцинами, было недостаточно для достоверного снижения вирусной нагрузки в легких после PCB челленджа. Тем не менее, была зафиксирована достоверная разница в величине вирусных титров между группами ЖГВ-НА+G-PCB и PBS. Это наблюдение позволяет предположить, что именно G-линкер может быть использован для корректной презентации фрагмента PCB в составе химерного белка НА-PCB. Однако даже со слабым уровнем антительного ответа к РС вирусу в группах ЖГВ-НА+А-PCB и ЖГВ-НА+G-PCB не наблюдались патологические изменения в легочной ткани после заражения PCB. По результатам проведенного исследования максимальная степень поражения легочной ткани наблюдалась в группе ФИ-PCB. Эти данные коррелируют с другими исследованиями, согласно которым ФИ-PCB вакцина вызвала эозинофилию [184], при этом в настоящем исследовании ни контрольная группа, ни другие вакцинные группы не вызывали столь серьезную патологию. При этом в группе ЖГВ-НА+G-PCB наблюдали более высокую степень защиты от повреждения бронхоэпителлия по сравнению с ЖГВ-НА+А-PCB. Таким образом, принцип конструирования вакцины, в котором встраивание фрагмента PCB F<sub>243-294</sub> осуществляли в субъединицу NA1 вируса гриппа через линкер GGGGSGGGGS, обеспечивает лучшую защиту от повреждения легочной ткани, вызванной РС инфекцией, по сравнению с векторным вариантом с AAAPGAA линкером.

Следует отметить, что аналогичная модификация вакцинных штаммов ЖГВ, где 4 tandemных повтора эктодомена M2 белка (M2e) вируса гриппа встраивали с N-конца субъединицы NA1, эффективно индуцировали M2e-специфические антитела при интраназальной иммунизации животных, и уровни таких антител коррелировали с уровнем защиты животных от последующего заражения гетерологичными вирусами гриппа А [177, 231, 232, 256]. Возможно, более компактная укладка фрагментов M2e в составе химерной молекулы НА, а также наличие tandemных повторов способствовали более выраженной иммуногенности встроенного фрагмента, по сравнению с участком F<sub>243-294</sub> РС вируса. Поскольку в настоящем исследовании гуморальный иммунитет к F белку PCB не обнаруживался, то определенная степень защиты привитых мышей от РС-индуцированной патологии может быть обусловлен индукцией PCB-специфических T-

клеток после иммунизации. Для проверки данной гипотезы в дальнейшем планируется оценка Т-клеточного иммунитета у мышей с использованием синтетических пептидов, соответствующих входящим в состав данной кассеты ЦТЛ-эпитолам РСВ.

Вторая стратегия конструирования векторных вакцин на основе штаммов ЖГВ, разработанная в данном исследовании, была связана с идеей направленной стимуляции Т-клеточного иммунного ответа к целевому патогену. Эта идея базируется на известных фактах о способности живой гриппозной вакцины формировать системный и локальный Т-клеточный иммунитет после интраназальной иммунизации [4, 139, 282-285, 287]. Отобранная нами иммуногенная кассета включала три эпитопа из М2-1 белка РСВ, два из которых направлены на активацию CD8<sup>+</sup> Т-клеточных эпитопов (ЦТЛ) у мышей линии BALB/c. Поскольку CD8<sup>+</sup> Т-клетки демонстрируют усиленный защитный эффект при локализации в воротах инфекции [38], следовательно, можно предположить, что предложенная конструкция сможет повысить эффективность вакцинации в отношении РС инфекции. Отобранную кассету интегрировали либо в рамку считывания гена NA, либо в рамку считывания усеченного NS1 белка штамма H7N9-ЖГВ по описанным выше принципам.

Сконструированные вакцинные варианты ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV активно реплицировались в РКЭ и культуре клеток MDCK и проявляли температурочувствительный фенотип. Некоторое снижение активности репликации химерных вирусов при пониженной до 26°C температуре не будет влиять на безопасность вакцины, поскольку главным показателем аттенуации считается температурочувствительность вакцинных штаммов [273]. Стоит отметить, что ослабление *sa* фенотипа не влияет на безопасность ЖГВ, так как аттенуация вакцинных вирусов определяется только *ts* фенотипом [204, 356].

Данное предположение подтвердилось при оценке репликации рекомбинантных штаммов у мышей при интраназальном введении. Оба варианта не реплицировались в легких мышей, а в носовых ходах репродуцировался только вариант ЖГВ+NA/PCV. Стоит отметить, что вакцинный вариант ЖГВ+NS1/PCV был разработан с использованием укороченного до 126 аминокислотных остатка NS1. Вирусы гриппа, несущие укороченный NS1, обладают аттенуированным фенотипом. Учитывая это обстоятельство, возможно, вариант ЖГВ+NS1/PCV оказался слишком ослабленным, поэтому снизилась его репродукция в респираторном тракте, но не изменилась его иммуногенность в отношении вируса гриппа. Подобный эффект наблюдали ранее в нескольких исследованиях [95, 204]. Важно отметить, что обе векторные вакцины стимулировали

выработку IgG антител к вирусу гриппа на одном уровне с вектором ЖГВ и обеспечили защиту мышей от заражения гомологичным вирулентным вирусом гриппа.

В настоящем исследовании показано, что иммунизация векторными вакцинами ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV приводила к образованию вирус-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных как к вирусу гриппа, так и к РСВ. Это свидетельствует о том, что обе векторные вакцины обеспечили корректную доставку выбранной иммуногенной кассеты в организм мышей, вследствие чего произошла эффективная презентация иммуногенного фрагмента РСВ различными АПК. При этом внесенные модификации в вектор ЖГВ не ограничивали стимуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов, распознающих вирус гриппа. Кроме того, было показано, что для стимуляции ответа цитотоксических Т-лимфоцитов против РСВ-специфического эпитопа M2-1<sub>82-90</sub> необязательна активная репликация вакцинного вируса в дыхательном тракте животных (Рисунок 13В).

Интраназальная иммунизация мышей векторными вакцинами (названия двух вакцин) приводила к образованию высоких уровней циркулирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных как к эпитопам вируса гриппа, так и к встроенному иммунодоминантному эпитопу РСВ. При этом индуцированные Т-клетки обладали выраженной цитотоксической активностью в отношении клеток-мишеней, нагруженных соответствующими антигенами обоих респираторных вирусов. Вырабатываемые ЦТЛ уничтожали наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, нагруженные ЖГВ и РСВ пептидом M2-1<sub>82-90</sub>, но не пептидом M2-1<sub>126-145</sub>.

Несколько факторов могли повлиять на преобладание цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных эпитопу M2-1<sub>82-90</sub>. Первый из них связан с особенностями этапа процессинга пептидов, входящих в состав полиэпитопной кассеты: все фрагменты РСВ M2-1 были объединены в одну кассету и равномерно синтезировались в инфицированной клетке. Чтобы повысить вероятность правильного расщепления каждого эпитопа в составе полиэпитопной кассеты, длина каждого из них была увеличена до 4-6 аминокислотных остатка. Таким образом, снижалась вероятность того, что антигенный пептид M2-1<sub>82-90</sub> имеет преимущество в процессе биосинтеза. Другой фактор связан с особенностями презентации антигена и эффективности эпитоп-специфической пролиферации и дифференцировки Т-клеток. По литературным данным, M2-1<sub>82-90</sub> относится к иммунодоминантным и вызывает у мышей BALB/c синтез Т-клеток с защитным потенциалом [178]. Тогда как эпитоп M2-1<sub>126-145</sub> является субдоминантным: только 0,3% M2-1<sub>127-135</sub>-специфических тетрамер-позитивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенках инфицированных мышей в период острой фазы РС инфекции [183]. Это количество Т-

клеток соответствует примерно трети от общего числа обнаруженных M2-1<sub>82-90</sub>-специфических Т-клеток. В исследованиях McDermott и соавт. было продемонстрировано доминирование эпитопа M2-1<sub>82-90</sub> над M2-1<sub>126-145</sub> по степени стимуляции эпитоп-специфических Т-клеток [221]. Таким образом, при иммунизации мышей ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV не наблюдали M2-1<sub>126-145</sub>-специфический Т-клеточный иммунный ответ, но обнаруживали выраженную экспансию M2-1<sub>82-90</sub>-специфических Т-клеток. Важно отметить, что изменения в составе PCV эпитоп-специфических Т-клеток могут спровоцировать патологические поражения тканей и органов во время инфекции [280]. Это связано с функционированием Т-клеток в режиме гиперкомпенсации с иммунодоминантным эпитопом M2-1<sub>82-90</sub>, а не субдоминантным эпитопом DbM1<sub>87-195</sub>. Таким образом, сочетание доминантных и субдоминантных эпитопов может быть предпочтительным для формирования активности ЦТЛ. Для подтверждения этого заключения необходимы дальнейшие исследования баланса активности ЦТЛ при разработке вакцин против PCV.

Поскольку для PCV основной мишенью являются легкие, поэтому в настоящем исследовании оценивали способность рекомбинантных векторных вакцин формировать PCV-специфический Т-клеточный иммунитет непосредственно в тканях легких. Кроме того, оценка этих субпопуляций Т-клеток важна ввиду того, что избыточные уровни системных (т.е. находящихся в спленоцитах) PCV M2-1<sub>82-90</sub>-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти может спровоцировать тяжелую легочную иммунопатологию после заражения PCV [306]. Сконструированные в рамках данной работы векторные вакцины также формировали PCV-специфический Т-клеточный ответ, однако результаты двух независимых экспериментов показали, что вакцинация вариантами ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV эффективно защитила мышей от PCV инфекции без признаков иммунопатологии, в отличие от ФИ-PCV.

В опубликованных исследованиях выявлено формирование специализированных субпопуляций Т-клеток памяти, которые в условиях инфекции остаются в ткани и не попадают в циркуляцию [247, 333]. Резидентные Т-клетки памяти могут быстро реагировать на вторжение патогена либо путем секреции цитокинов и хемокинов для привлечения иммунных клеток в инфицированную ткань [228], либо за счет быстрой пролиферации и уничтожения инфицированных клеток [302], тем самым обеспечивая местную защиту сразу после заражения. T<sub>RM</sub> в легких обычно идентифицируют по степени экспрессии CD69, маркера ранней активации, и цепи αE интегринов (CD103) αEβ7, которая связывает E-кадгерин и помогает специфически удерживать T<sub>RM</sub> в тканях [50].

Ранее было показано, что иммунизация живой гриппозной вакциной на основе донора аттенуации А/Энн Арбор/6/60 приводит к образованию вирусспецифических Т-клеток памяти в тканях легких [371]. Таким образом, в настоящем исследовании были оценены уровни субпопуляций  $T_{RM}$ , специфичных как встроенному эпитопу РСВ, так и эпитопам, входящим в состав вектора ЖГВ.

В результате фенотипирования легочных лимфоцитов было показано, что иммунизация мышей вектором ЖГВ и векторными вакцинами ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV индуцирует выработку  $CD8^+ T_{RM}$  с двойным фенотипом  $CD69^+CD103^+$ . Важно отметить, что уровень  $T_{RM}$  был выше при иммунизации векторными вакцинами, чем при иммунизации вектором ЖГВ. Векторные вакцины стимулировали образование  $CD4^+ T_{EM}$  с фенотипом  $CD69^+CD103^+$ . Это обстоятельство можно объяснить включением в состав полиэпитопной кассеты РСВ M2-1<sub>127-135</sub>-специфического эпитопа для выработки Т-клеточного иммунного ответа Th1-типа [221]. Индукция  $CD4^+ T_{RM}$  могла бы играть ключевую роль в поддержании баланса РСВ-специфических  $CD4^+/CD8^+$  Т-клеточных ответов после иммунизации ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV, тем самым предотвращая иммунопатологию легких. Кроме того, по данным литературы  $CD103^+ CD4^+$  Т клетки обычно не обнаруживали в легких [240] и скорее всего  $CD4^+ T_{RM}$  локализованы в интерстиции легких и экспрессируют CD49b [274]. Поэтому в будущих экспериментах следует использовать маркер CD103 и CD49b для оценки РСВ-специфических  $CD4^+$  Т-клеточных ответов в легких у мышей, иммунизированных ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV.

Иммунизация вектором ЖГВ индуцировала  $T_{RM}$  менее выраженные по сравнению с описанным ранее исследованием, в котором были обнаружены высокие уровни  $CD103^+ CD8^+ T_{RM}$  у мышей, иммунизированных коммерческой ЖГВ (FluMist, США) [371]. В этом исследовании мышей линии C57BL6/J иммунизировали четырехвалентной ЖГВ в дозе  $10^{5.5}$ - $10^{6.5}$  БОЕ/штамм. В нашем исследовании условия вакцинации отличались, и мышей иммунизировали одним штаммом в дозе  $10^6$  ЭИД<sub>50</sub>/мышь. Таким образом, высокая антигенная нагрузка FluMist могла повлиять на формирование более высоких уровней  $T_{RM}$  клеток в легких. Кроме того, у мышей линий C57BL6/J и BALB/c Т-клеточный иммунный ответ формируется по-разному [43, 308].

Важным результатом настоящего исследования явилось то, что среди общего пула тканерезидентных Т клеток памяти легких иммунизированных мышей была выявлена высокая пропорция вирусспецифических эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т клеток памяти. При этом уровни грипп-специфических  $CD4^+$  Т-лимфоцитов оказались схожими в группах ЖГВ и векторных вакцин ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV, но уровни грипп-

специфических  $CD8^+ T_{EM}$  были значительно выше в группе ЖГВ по сравнению с группами ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB. Установлено, что подавляющее большинство грипп-специфических  $CD4^+$  Т-клеток в легких обладала фенотипом  $CD69^+CD103^-$ , а количество было сопоставимым в группе ЖГВ и группах ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB. Этот факт указывает на то, что  $CD69^+CD103^+ CD4^+$  Т-клетки памяти, обнаруженные в группах ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB специфичны отличным от вируса гриппа эпитопам. Стоит отметить, что 40-60% грипп-специфических  $CD8^+ T_{EM}$ -клеток, которые индуцировались в группах ЖГВ+NA/PCB и ЖГВ+NS1/PCB, обладали фенотипом  $CD69^+$  и  $CD103^+$ , характерным для  $T_{RM}$ . Эти данные свидетельствуют о том, что сильный иммунный ответ  $T_{RM}$  на иммунодоминантный эпитоп РСВ мог усилить грипп-специфический  $T_{RM}$  ответ. Действительно, рекомбинантные векторные вакцины индуцировали высокие уровни РСВ-специфических  $CD8^+ T_{EM}$ , около 75% из которых экспрессировали маркер  $CD69^+$ , в то время как 35-40% имели "двойной" фенотип  $T_{RM}$   $CD69^+CD103^+$ . Была обнаружена корреляция между величиной индуцированных РСВ-специфических и грипп-специфических  $CD8^+ T_{RM}$ , при этом более высокие значения зафиксированы в группе ЖГВ+NA/PCB по сравнению с ЖГВ+NS1/PCB. Этот костимулирующий эффект был выявлен в группах векторных вакцин с эпитопами РСВ, что может быть объяснено тем, что дифференцировка эффекторных  $CD8^+$  Т-клеток в популяции  $CD8^+ T_{RM}$  происходит под действием цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста ( $TGF\beta$ ) и, в меньшей степени, ИЛ-33 и ФНО- $\alpha$  [208, 247, 352, 372]. Возможно, что локальное микроокружение, сформированное РСВ-специфическими  $T_{RM}$  в легких, может увеличить образование грипп-специфических  $CD8^+ T_{RM}$ , поскольку эпитопы экспрессируются вместе внутри инфицированной клетки и могут одновременно презентироваться через МНС-I путь.

Около 25% РСВ-специфических легочных  $T_{EM}$  не имели маркеров  $CD69^+CD103^+T_{RM}$  и, вероятно, были мигрирующими клетками  $T_{EM}$ . Основным ограничением настоящего исследования является то, что мы не использовали процедуру мечения антителами внутри сосудов для дифференциации популяции Т-клеток, постоянно находящихся в легких, и тех, которые проходят через ткань и вновь попадают в кровотоки [11]. Обнаружение вирусспецифических пулов  $CD8^+$  Т-клеток, экспрессирующих  $CD69$  и  $CD103$ , позволяет предположить, что они остаются в легочной ткани [195]. Следует отметить, что локализация  $T_{RM}$  в периферических тканях является важным параметром и напрямую зависит от их фенотипа. Таким образом, можно выделить две «линии обороны» для защиты организма от инвазии патогенных вирусов. Первая - это клетки  $T_{RM}$ , расположенные непосредственно в респираторном тракте, которые первыми сталкиваются

с инфекцией. Они экспрессируют маркер CD103 (рецептор для E-кадгерина), что определяет их расположение внутри эпителиальных клеток респираторного тракта, и именно поэтому доля CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток была относительно низкой. Ко второй линии защиты от повторной инфекции относятся T<sub>RM</sub>, расположенные в интерстиции легких и базальных мембранах эпителия дыхательных путей респираторного тракта. Они обладают маркером CD49a и рецептором VLA-1, который связывается с коллагеном I и IV типа [333]. В настоящем исследовании мы оценивали снижение вирусной нагрузки в легких только в одной временной точке (5 дней после инфицирования), в то время как было бы важно оценить влияние уровня CD8<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> на кинетику клиренса РС вируса из легких иммунизированных мышей.

Таким образом, при иммунизации векторными вакцинами ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV вырабатывались функциональные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, что подтверждают результаты оценки состояния иммунного ответа после PCV челленджа и сравнение с группой ФИ-PCV. После иммунизации ФИ-PCV выявили преобладание цитокина ИЛ-5 в отличие от групп векторных вакцин (Рисунок 18Б). Выработка ИЛ-5 могла оказывать активирующее воздействие в целом на субпопуляцию Th2, инициируя образование несбалансированного иммунного ответа, тогда как вакцинация ЖГВ-PCV не вызывала обильную эозинофильную инфильтрацию и выделение цитокина ИЛ-5 в дыхательных путях после заражения PCV.

Несмотря на то, что в группах мышей, иммунизированных векторными вакцинами, были выявлены высокие уровни ИФН- $\gamma$  -продуцирующих PCV-специфических Т клеток памяти, секреция провоспалительного цитокина ИФН- $\gamma$  клетками БАЛ и легких, выделенных на 5 день после челленджа PCV в группах векторных вакцин была значительно снижена по сравнению с группами ЖГВ и ФИ-PCV. Полученные результаты согласуются с результатами Morabito и соавт. В этом исследовании мышей иммунизировали векторной вакциной на основе цитомегаловируса, экспрессирующего М белок PCV, и оценивали уровень секреции ИФН- $\gamma$  в динамике после PCV челленджа. ИФН- $\gamma$  достигал максимума на 2-3 день после челленджа и значительно снижался к 4-тому дню, что коррелировало с вирусной нагрузкой в легких [238].

В целом, результаты нашего исследования показывают, что сконструированные рекомбинантные штаммы ЖГВ-PCV, несущие иммунодоминантные Т-клеточные эпитопы PCV, способны вызывать сбалансированный клеточно-опосредованный иммунный ответ в легких и обеспечивают надежную защиту как от гриппа, так и от PCV, не вызывая патологических изменений в тканях легких. Вектор ЖГВ обеспечивает доставку эпитопов PCV к месту проникновения вируса и правильную презентацию чужеродных эпитопов



иммунной системе. 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. Поскольку вакцина ЖГВ-РСВ в будущем может быть использована для иммунизации пожилых людей, входящих в группу риска РС инфекции, то важно будет оценить иммуногенность рекомбинантных вирусов на мышах в возрасте несколько месяцев.

В рамках данного исследования использовали ЖГВ подтипа H7N9, поскольку известно, что этот штамм хорошо реплицируется в верхнем отделе респираторного тракта, вызывая индукцию высокого уровня вирусспецифических и нейтрализующих антител, а также клеточно-опосредованный иммунитет [324]. В целом, для этих целей можно использовать любой другой штамм ЖГВ. Следует отметить, что встраивание чужеродных эпитопов РСВ в ген NA, отличный от N9, может привести к несколько иной иммуногенности векторной вакцины. В то время как встраивание в ген NS1 штамма ЖГВ является более универсальной стратегией, которая может быть использована с любыми другими генами HA и NA. Наши результаты дают обоснование для создания универсальной мультивалентной вакцины против других респираторных патогенов, вызывающих ОРВИ, таких как РСВ, вирусы парагриппа, аденовирусы, коронавирусы, метапневмовирусы и риновирусы.

В заключение следует отметить, что конструкции ЖГВ-РСВ, изученные в рамках данного исследования, были созданы в качестве «proof-of-concept» для детальной оценки формирования субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток у мышей после интраназальной иммунизации. Полученные данные позволяют продолжать разработку вакцин против РСВ, направленных на выработку функциональных Т-клеток путем включения эпитопов РСВ человека в геном штамма ЖГВ. Использование модели экспериментального заражения человека РСВ сможет ускорить процесс разработки вакцины [154]. Так, появляются новые данные об эпитопах РСВ, которые распознаются CD4<sup>+</sup> резидентными Т-клетками дыхательных путей [120], CD8<sup>+</sup> резидентными Т-клетками памяти [154], с выявленной степенью их иммунодоминантности. Кроме того, перспективно комбинировать В- и Т-клеточные эпитопы РСВ при разработке вакцин [272]. В состав безопасной и иммуногенной вакцины против РСВ желательно включить В-клеточный эпитоп с нейтрализующей активностью, эпитоп CD4<sup>+</sup> (для формирования Th1, чтобы избежать дифференцировки Т-клеток в сторону преобладания Th2 и Th17, которые традиционно ассоциированы с развитием астмы) и эпитопы CD8<sup>+</sup>. При этом оба эпитопа

стоит подобрать так, чтобы они были высокоиммуногенными и менее иммунодоминантными [280].

Суммируя сказанное выше, можно заключить, что разработанные рекомбинантные вирусы ЖГВ-РСВ, несущие Т-клеточные эпитопы РСВ, способны индуцировать сбалансированные клеточно-опосредованные иммунные ответы в легких, которые обеспечивают защиту как от вируса гриппа, так и от РСВ одновременно, не вызывая патологических изменений в тканях легких. Вектор ЖГВ способен доставлять иммуногенные эпитопы к месту проникновения вируса и обеспечить правильную презентацию их иммунной системе. Это первое исследование, в котором показано, что вакцинация векторной вакциной на основе штамма ЖГВ способна вызывать мощный локализованный в легочной ткани Т-клеточный иммунитет к эпитопу встроенного фрагмента целевого вируса без изменения иммуногенности самого вектора.

#### 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 Н-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 кассет, 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 кассет в генах НА, NA или NS1 вируса гриппа не нарушает основные биологические характеристики вакцинных штаммов ЖГВ.
2. Рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ, кодирующие отобранные полиэпитопные кассеты 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 F<sub>243-294</sub> 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 кассету РСВ M2-1 (70-101+114-146), индуцируют развитие устойчивого, полностью функционального РСВ-специфического системного и локального CD8<sup>+</sup> 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВИЧ вирус иммунодефицита человека

ОРВИ острых респираторных вирусных инфекций

ЖГВ живая гриппозная вакцина

РСВ респираторно-синцитиальный вирус

ФИ инактивация формалином

НА гемагглютинин

T<sub>RM</sub> резидентные клетки памяти

FDA (The United States Food and Drug Administration) управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

*ts* температурочувствительный фенотип

IEDB (Immuno epitope database) база данных иммуноэпитопов

BCG (Bacillus Calmette—Guerin) вакцина против туберкулеза

AdV (adenovirus) аденовирус

т.п.н. тысяч пар нуклеотидов

ВПГ вирусы простого герпеса

ЦНС центральной нервной системы

RIG-I ген-1, индуцируемый ретиноевой кислотой

ИФН интерферон

ЦТЛ цитотоксические лимфоциты

НА нейрамининаза

МПВ метапневмовирус

РНП рибонуклеопротеиновый комплекс

EGFR (epidermal growth factor receptor) рецептор эпидермального фактора роста

IGFR1 (insulin-like growth factor receptor) рецептор инсулиноподобного фактора роста

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) внутриклеточная адгезионная молекула

RBD (receptor-binding domain) рецептор-связывающий домен

а.о. аминокислотные остатки

preF белок F РСВ в конформации «до слияния»

MVA (modified vaccinia Ankara) модифицированная вакцина Анкара

PRRs (pattern recognition receptor) паттерн-распознающие рецепторы

PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) паттерны, ассоциированные с патогенами

TLRs (toll-like receptors) толл-лайк рецепторы

NLR (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing) нуклеотид-связывающие рецепторы олигомеризации подобные домену

НК (natural killer cells) натуральные киллеры

БАЛ бронхоальвеолярный лаваж

ИВЛ искусственная вентиляция лёгких

NET (neutrophil extracellular traps) нейтрофильные внеклеточные ловушки

DCs (dendritic cells) дендритных клеток

MHC (major histocompatibility complex) главный комплекс гистосовместимости

АПК антигенпрезентирующие клетки

ФНО- $\alpha$  фактор некроза опухоли альфа

PBMC (peripheral blood mononuclear cell) мононуклеарные клетки периферической крови

T<sub>CM</sub> (central memory T cells) T клетки центральной памяти

T<sub>EM</sub> (effector memory T cells) эффекторной памяти

TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) трансформирующий фактор роста  $\beta$

RAMD (repair-associated memory depots) депо T-клеток памяти, ассоциированные с репарацией ткани

BLPs (bacterium-like particles) бактериоподобная частица

SP (signal peptide) сигнальный пептид

ПЦР полимеразная цепная реакция

LB среда Лурия-Бертани

РКЭ развивающиеся куриные эмбрионы

SDS (sodium lauryl sulfate) додецилсульфат натрия

ЭИД<sub>50</sub> 50%-ная эмбриональная инфекционная доза

ТЦИД<sub>50</sub> 50%-ная тканевая цитопатическая инфекционная доза

ФБС фетальная бычья сыворотка

БОЕ бляшкообразующие единицы

ИФА иммуноферментный анализ

РТГА реакция торможения гемагглютинации

БСА бычий сывороточный альбумин

ОП<sub>450</sub> оптическая плотность проб при длине волны 450 нм

RDE (Receptor destroying enzyme) рецептор - разрушающий фермент

ГАЕ гемагглютинирующие единицы

АХК аммоний-хлорид-калийный буфер

ICS анализ (intracellular cytokine staining) внутриклеточное окрашивание цитокинов

MOI (multiplicity of infection) множественность заражения

DMCO раствор диметилсульфоксида

CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) карбоксифлуоресцеин сукцинимидил эфир

H&E (hematoxylin and eosin stain) окраска гематоксилин-эозином

H&CR (hematoxylin and Congo Red) окраска гематоксилином и конго красным

PAS (Periodic Acid Schiff) окраска периодической кислотой-Шиффа

M2e эктодомен M2 белка

PBST (phosphate-buffered saline with Tween 20) фосфатно-солевой буфер с Твин-20

PBS физиологический раствор

*sa* холодадаптированный фенотип

### Список литературы

1. Григорьева, Е.П. Эффективность живой гриппозной реассортантной вакцины при циркуляции дрейфовых вариантов вируса гриппа / Е.П. Григорьева, В.П. Дриневский, Е.М. Дорошенко и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика – 2009. – V.1. – №44 – с. 45-53.
2. Дорошенко, Е.М. Безопасность, иммуногенность и эффективность живых гриппозных аттенуированных интраназальных вакцин - опыт многолетнего применения в различных возрастных группах / Е.М. Дорошенко, Е.П. Григорьева// Эпидемиология и вакцинопрофилактика – 2013. – V.4. – №71 – с. 67-73.
3. Лещинская, Н.П. Клиника и лечение гриппа и других ОРЗ // Сборник научных трудов ВНИИ гриппа МЗ СССР. Ленинград, 1982. p. 172-177.
4. Петухова, Г.Д. Локальный гумморальный и клеточный иммунный ответ мышей при гриппозной инфекции и вакцинации / Г.Д. Петухова, А.Н. Найхин, И.Б. Баранцева и др.// Медицинская иммунология – 2006. – V. 8. – № 4. – p. 511-516.
5. Abarca, K. Safety and immunogenicity evaluation of recombinant BCG vaccine against respiratory syncytial virus in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase I clinical trial / K. Abarca, E. Rey-Jurado, N. Munoz-Durango et al. // EClinicalMedicine – 2020. – V. 27. –p. 100517.
6. AbuBakar, U. Avian Influenza Virus Tropism in Humans / U. AbuBakar, L. Amrani, F.A. Kamarulzaman et al. // Viruses – 2023. – V. 15. – № 4.
7. Aleksandrova, G.I. Use of the genetic recombination method for obtaining vaccinal strains of the influenza virus / G.I. Aleksandrova// Vopr Virusol – 1977. – №. 4. – p. 387-95.
8. Alonso Fernández, J. Soluble interleukin-2 receptor (sCD25) and interleukin-10 plasma concentrations are associated with severity of primary respiratory syncytial virus (RSV) infection / J. Alonso Fernández, I. Roine, A. Vasquez et al. // European Cytokine Network – 2005. – V. 16. – № 1. – p. 81-90.
9. Altamirano-Lagos, M.J. Current Animal Models for Understanding the Pathology Caused by the Respiratory Syncytial Virus / M.J. Altamirano-Lagos, F.E. Diaz, M.A. Mansilla et al. // Front Microbiol – 2019. – V. 10. – №. – p. 873.
10. Anderson, K.G. Cutting edge: intravascular staining redefines lung CD8 T cell responses / K.G. Anderson, H. Sung, C.N. Skon et al. // Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) – 2012. – V. 189. – № 6. – p. 2702-2706.

11. Anderson, K.G. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes / K.G.Anderson, K. Mayer-Barber, H. Sung et al. // *Nat Protoc* – 2014. – V. 9. – № 1. – p. 209-22.
12. Anson, D.S., The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery / Anson, D.S.// *Genetic Vaccines and Therapy* – 2004. – V. 2. – №. – p. 9.
13. Ascough, S. Local and Systemic Immunity against Respiratory Syncytial Virus Induced by a Novel Intranasal Vaccine. A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Clinical Trial / S. Ascough, I. Vlachantoni, M. Kalyan et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* – 2019. – V. 200. – № 4. – p. 481-492.
14. Atreya, P.L. The NS1 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Is a Potent Inhibitor of Minigenome Transcription and RNA Replication / P.L. Atreya, M.E. Peeples, P.L. Collins et al. // *Journal of Virology* – 1998. – V. 72. – № 2. – p. 1452-1461.
15. August, A. A Phase 2 randomized, observer-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of aluminum-adjuvanted respiratory syncytial virus F particle vaccine formulations in healthy women of childbearing age / A. August, G.M. Glenn, E. Kpamegan et al. // *Vaccine* – 2017. – V. 35. – № 30. – p. 3749-3759.
16. Baber, J. A Phase 1/2 Study of a Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Vaccine With and Without Adjuvant in Healthy Older Adults / J. Baber, M. Arya, Y. Moodley et al. // *J Infect Dis* – 2022. – V. 226. – № 12. – p. 2054-2063.
17. Bagga, B. Unrecognized prolonged viral replication in the pathogenesis of human RSV infection / B. Bagga, L. Harrison, P. Roddam et al. // *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* – 2018. – V. 106. – №. – p. 1-6.
18. Bakre, A. Human respiratory syncytial virus non-structural protein NS1 modifies miR-24 expression via transforming growth factor- $\beta$  / A. Bakre, W. Wu, J. Hiscox et al. // *The Journal of General Virology* – 2015. – V. 96. – № 11. – p. 3179-3191.
19. Battles, M.B. Respiratory syncytial virus entry and how to block it / M.B. Battles, J.S. McLellan// *Nature Reviews Microbiology* – 2019. – V. 17. – № 4. – p. 233-245.
20. Bebia, Z. Safety and immunogenicity of an investigational respiratory syncytial virus vaccine (RSVPreF3) in mothers and their infants: a phase 2 randomized trial [Электронный ресурс] / Z. Bebia, O. Reyes, R. Jeanfreau et al. // *J Infect Dis* –jiad024 – 2023. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad024>



21. Bem, R.A. Activation of the Granzyme Pathway in Children With Severe Respiratory Syncytial Virus Infection / R.A. Bem, A.P. Bos, M. Bots et al. // *Pediatric Research* – 2008. – V. 63. – № 6. – p. 650-655.
22. Bembridge, G.P. Subcellular site of expression and route of vaccination influence pulmonary eosinophilia following respiratory syncytial virus challenge in BALB/c mice sensitized to the attachment G protein / G.P. Bembridge, R. Garcia-Beato, J.A. Lopez et al. // *J Immunol* – 1998. – V. 161. – № 5. – p. 2473-80.
23. Bendelja, K. Decreased Toll-like receptor 8 expression and lower TNF-alpha synthesis in infants with acute RSV infection / K. Bendelja, V. Vojvoda, N. Aberle et al. // *Respiratory Research* – 2010. – V. 11. – № 1. – p. 143.
24. Bennett, B.L. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis / B.L. Bennett, R.P. Garofalo, S.G. Cron et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2007. – V. 195. – № 10. – p. 1532-1540.
25. Beran, J. Safety and Immunogenicity of 3 Formulations of an Investigational Respiratory Syncytial Virus Vaccine in Nonpregnant Women: Results From 2 Phase 2 Trials / J. Beran, J.D. Lickliter, T.F. Schwarz et al. // *J Infect Dis* – 2018. – V. 217. – № 10. – p. 1616-1625.
26. Bermejo-Martin, J.F. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children / J.F. Bermejo-Martin, M.C. Garcia-Arevalo, R.O. De Lejarazu et al. // *European Cytokine Network* – 2007. – V. 18. – № 3. – p. 162-167.
27. Bermejo-Martin, J.F. Persistence of proinflammatory response after severe respiratory syncytial virus disease in children / J.F. Bermejo-Martin, M.C. Garcia-Arevalo, A. Alonso et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2007. – V. 119. – № 6. – p. 1547-1550.
28. Bermingham, A. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription / A. Bermingham, P.L. Collins // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1999. – V. 96. – № 20. – p. 11259-11264.
29. Bernstein, D.I. Phase 1 study of the safety and immunogenicity of a live, attenuated respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 vaccine in seronegative children / D.I. Bernstein, E. Malkin, N. Abughali et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal* – 2012. – V. 31. – № 2. – p. 109-114.
30. Bertrand, P. Elevated IL-3 and IL-12p40 levels in the lower airway of infants with RSV-induced bronchiolitis correlate with recurrent wheezing / P. Bertrand, M.K. Lay, G. Piedimonte et al. // *Cytokine* – 2015. – V. 76. – № 2. – p. 417-423.

31. Beugeling, M., J. Respiratory syncytial virus subunit vaccines based on the viral envelope glycoproteins intended for pregnant women and the elderly / M. Beugeling, J. De Zee, H.J. Woerdenbag et al. // *Expert Review of Vaccines* – 2019. – V. 18. – № 9. – p. 935-950.
32. Beura, L.K. CD4<sup>+</sup> resident memory T cells dominate immunosurveillance and orchestrate local recall responses / L.K. Beura, N.J. Fares-Frederickson, E.M. Steinert et al. // *The Journal of Experimental Medicine* – 2019. – V. 216. – № 5. – p. 1214-1229.
33. Biagi, C. Current State and Challenges in Developing Respiratory Syncytial Virus Vaccines / C. Biagi, A. Dondi, S. Scarpini et al. // *Vaccines* – 2020. – V. 8. – № 4. – p. 672.
34. Bitko, V. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth / V. Bitko, O. Shulyayeva, B. Mazumder et al. // *Journal of Virology* – 2007. – V. 81. – № 4. – p. 1786-1795.
35. Bradley, S. Applications of coxsackievirus A21 in oncology / S. Bradley, A.D. Jakes, K. Harrington et al. // *Oncolytic Virotherapy* – 2014. – V. 3. – №. – p. 47-55.
36. Brand, H.K. CD4<sup>+</sup> T-cell counts and interleukin-8 and CCL-5 plasma concentrations discriminate disease severity in children with RSV infection / H.K. Brand, G. Ferwerda, F. Preijers et al. // *Pediatric Research* – 2013. – V. 73. – № 2. – p. 187-193.
37. Brand, H.K., Olfactomedin 4 Serves as a Marker for Disease Severity in Pediatric Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection / H.K. Brand, I.M.L. Ahout, D. de Ridder et al. // *PloS One* – 2015. – V. 10. – № 7. – p. e0131927.
38. Bromley, S.K. The immunological synapse / S.K. Bromley, W.R. Burack, K.G. Johnson et al. // *Annual Review of Immunology* – 2001. – V. 19. – №. – p. 375-396.
39. Buchholz, U.J. Live Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine Candidate Containing Stabilized Temperature-Sensitivity Mutations Is Highly Attenuated in RSV-Seronegative Infants and Children / U.J. Buchholz, C.K. Cunningham, P. Muresan et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2018. – V. 217. – № 9. – p. 1338-1346.
40. Bueno, S.M. Protective T cell immunity against respiratory syncytial virus is efficiently induced by recombinant BCG / S.M. Bueno, P.A. Gonzalez, K.M. Cautivo et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2008. – V. 105. – № 52. – p. 20822-7.
41. Bukreyev, A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expressed by recombinant respiratory syncytial virus attenuates viral replication and increases the level of pulmonary antigen-presenting cells / A. Bukreyev, I.M. Belyakov, J.A. Berzofsky et al. // *Journal of Virology* – 2001. – V. 75. – № 24. – p. 12128-12140.

42. Caballero, M.T. TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization / M.T. Caballero, M.E. Serra, P.L. Acosta et al. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2015. – V. 125. – № 2. – p. 571-582.
43. Califano, D. of Influenza on Alveolar Macrophage Viability Are Dependent on Mouse Genetic Strain / D. Califano, Y. Furuya, D.W. Metzger et al. // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* – 2018. – V. 201. – № 1. – p. 134-144.
44. Cannon, M.J. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus / M.J. Cannon, P.J. Openshaw, B.A. Askonas et al. // *The Journal of Experimental Medicine* – 1988. – V. 168. – № 3. – p. 1163-1168.
45. Cao, D. Structural Insights into the Respiratory Syncytial Virus RNA Synthesis Complexes / D. Cao, Y. Gao, B. Liang et al. // *Viruses* – 2021. – V. 13. – № 5.
46. Carromeu, C. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein / C. Carromeu, F.M. Simabuco, R.E. Tamura et al. // *Archives of Virology* – 2007. – V. 152. – № 12. – p. 2259-2263.
47. Casey, K.A. Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues / K.A. Casey, K.A. Fraser, J.M. Schenkel et al. // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* – 2012. – V. 188. – № 10. – p. 4866-4875.
48. Cautivo, K.M. Efficient lung recruitment of respiratory syncytial virus-specific Th1 cells induced by recombinant bacillus Calmette-Guerin promotes virus clearance and protects from infection / K.M. Cautivo, S.M. Bueno, C.M. Cortes et al. // *J Immunol* – 2010. – V. 185. – № 12. – p. 7633-45.
49. Cavallaro, J.J. Adaptation of respiratory syncytial (RS) virus to brain of suckling mice / J.J. Cavallaro, H.F. Maassab// *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* – 1966. – V. 121. – № 1. – p. 37-41.
50. Cepek, K.L. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin / K.L. Cepek, S.K. Shaw, C.M. Parker et al. // *Nature* – 1994. – V. 372. – № 6502. – p. 190-193.
51. Cespedes, P.F. A single, low dose of a cGMP recombinant BCG vaccine elicits protective T cell immunity against the human respiratory syncytial virus infection and prevents lung pathology in mice / P.F. Cespedes, E. Rey-Jurado, J.A. Espinoza et al. // *Vaccine* – 2017. – V. 35. – № 5. – p. 757-766.
52. Chanock, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children / R. Chanock, L. Finberg// *American Journal of Hygiene* – 1957. – V. 66. – № 3. – p. 291-300.

53. Chen, Z.M. Association of cytokine responses with disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection / Z.M. Chen, J.H. Mao, L.Z. Du et al. // *Acta Paediatrica* (Oslo, Norway: 1992) – 2002. – V. 91. – № 9. – p. 914-922.
54. Cheng, X. A First-in-Human Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of a G Protein-Based Recombinant Respiratory Syncytial Virus Vaccine in Healthy Adults 18-45 Years of Age / X. Cheng, G. Zhao, A. Dong et al. // *Vaccines* (Basel) – 2023. – V. 11. – № 5.
55. Cherukuri, A. Adults 65 years old and older have reduced numbers of functional memory T cells to respiratory syncytial virus fusion protein / A. Cherukuri, K. Patton, R.A. Gasser et al. // *Clinical and vaccine immunology: CVI* – 2013. – V. 20. – № 2. – p. 239-247.
56. Chin, J. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population / J. Chin, R.L. Magoffin, L.A. Shearer et al. // *Am J Epidemiol* – 1969. – V. 89. – № 4. – p. 449-63.
57. Choi, J. The role of TNF-alpha in eosinophilic inflammation associated with RSV bronchiolitis / J. Choi, Z. Callaway, H.-B. Kim et al. // *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* – 2010. – V. 21. – № 3. – p. 474-479.
58. Chung, H.L. Relationship between atopic status and nasal interleukin 10 and 11 levels in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis / H.L. Chung, W.T. Kim, J.K. Kim et al. // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* – 2005. – V. 94. – № 2. – p. 267-272.
59. Cicconi, P. First-in-Human Randomized Study to Assess the Safety and Immunogenicity of an Investigational Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine Based on Chimpanzee-Adenovirus-155 Viral Vector-Expressing RSV Fusion, Nucleocapsid, and Antitermination Viral Proteins in Healthy Adults / P. Cicconi, C. Jones, E. Sarkar et al. // *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* – 2020. – V. 70. – № 10. – p. 2073-2081.
60. Clark, H.F. The new pentavalent rotavirus vaccine composed of bovine (strain WC3) -human rotavirus reassortants / H.F. Clark, P.A. Offit, S.A. Plotkin et al. // *Pediatr Infect Dis J* – 2006. – V. 25. – № 7. – p. 577-83.
61. Coates, H.V. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus / H.V. Coates, L. Kendrick, R.M. Chanock et al. // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, N.Y.) – 1963. – V. 112. – №. – p. 958-964.
62. Collins, P.L. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus / P.L. Collins, Y.T. Huang, G.W. Wertz et al. // *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America – 1984. – V. 81. – № 24. – p. 7683-7687.
63. Collins, P.L. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development / P.L. Collins, M.G. Hill, E. Camargo et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1995. – V. 92. – № 25. – p. 11563-11567.
64. Collins, P.L. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease / P.L. Collins, R. Fearn, B.S. Graham et al. // *Current Topics in Microbiology and Immunology* – 2013. – V. 372. – №. – p. 3-38.
65. Collins, P.L. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus / P.L. Collins, R.A. Karron// *In Fields Virology: Sixth Edition* – Vol. 1 – 2013.
66. Coultas, J.A. Respiratory syncytial virus (RSV): a scourge from infancy to old age / J.A. Coultas, R. Smyth, P.J. Openshaw et al. // *Thorax* – 2019. – V. 74. – № 10. – p. 986-993.
67. Crank, M.C., T.J. Ruckwardt, M. Chen, A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans / Crank, M.C., T.J. Ruckwardt, M. Chen// *Science (New York, N.Y.)* – 2019. – V. 365. – № 6452. – p. 505-509.
68. Csatory, L.K., R.W. Moss, J. Beuth, Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) / Csatory, L.K., R.W. Moss, J. Beuth// *Anticancer Research* – 1999. – V. 19. – № 1B. – p. 635-638.
69. Çuburu, N., B.S. Graham, C.B. Buck, Intravaginal immunization with HPV vectors induces tissue-resident CD8<sup>+</sup> T cell responses / Çuburu, N., B.S. Graham, C.B. Buck// *The Journal of Clinical Investigation* – 2012. – V. 122. – № 12. – p. 4606-4620.
70. Cunningham, C.K., R. Karron, P. Muresan, Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine With Deletion of RNA Synthesis Regulatory Protein M2-2 and Cold Passage Mutations Is Overattenuated / Cunningham, C.K., R. Karron, P. Muresan// *Open Forum Infect Dis* – 2019. – V. 6. – № 6. – p. ofz212.
71. Cunningham, C.K., R.A. Karron, P. Muresan, Evaluation of Recombinant Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccines RSV/DeltaNS2/Delta1313/I1314L and RSV/276 in RSV-Seronegative Children / Cunningham, C.K., R.A. Karron, P. Muresan// *J Infect Dis* – 2022. – V. 226. – № 12. – p. 2069-2078.
72. de Bree, G.J. Respiratory syncytial virus-specific CD8<sup>+</sup> memory T cell responses in elderly persons / G.J. de Bree, J. Heidema, E.M.M. van Leeuwen et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2005. – V. 191. – № 10. – p. 1710-1718.

73. de Jong, R. ChAd155-RSV vaccine is immunogenic and efficacious against bovine RSV infection-induced disease in young calves / R. de Jong, N. Stockhofe-Zurwieden, J. Bonsing et al. // *Nature Communications* – 2022. – V. 13. – № 1. – p. 6142.
74. Desai, P. Inflammatory monocytes contribute to the persistence of CXCR3hi CX3CR1lo circulating and lung-resident memory CD8+ T cells following respiratory virus infection / P. Desai, V. Tahiliani, J. Stanfield et al. // *Immunology and Cell Biology* – 2018. – V. 96. – № 4. – p. 370-378.
75. Diaz, F.E. A Recombinant BCG Vaccine Is Safe and Immunogenic in Neonatal Calves and Reduces the Clinical Disease Caused by the Respiratory Syncytial Virus / F.E. Diaz, M. Guerra-Maupome, P.O. McDonald et al. // *Front Immunol* – 2021. – V. 12. – №. – p. 664212.
76. Diaz, P.V., Increased expression of the glucocorticoid receptor  $\beta$  in infants with RSV bronchiolitis / P.V. Diaz, R.A. Pinto, R. Mamani et al. // *Pediatrics* – 2012. – V. 130. – № 4. – p. e804-811.
77. Díaz, P.V. Levels of inflammatory cytokines and plasma cortisol in respiratory syncytial virus bronchiolitis] / P.V. Díaz, A.A. Gaggero, R.A. Pinto et al. // *Revista Medica De Chile* – 2013. – V. 141. – № 5. – p. 574-581.
78. Diez-Domingo, J. Safety and Immunogenicity of a ChAd155-Vectored Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine in Healthy RSV-Seropositive Children 12-23 Months of Age / J. Diez-Domingo, X. Saez-Llorens, M.A. Rodriguez-Weber et al. // *J Infect Dis* – 2023. – V. 227. – № 11. – p. 1293-1302.
79. Duan, D. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue / D. Duan, P. Sharma, J. Yang et al. // *Journal of Virology* – 1998. – V. 72. – № 11. – p. 8568-8577.
80. Dunbar, P.R. Pulmonary monocytes interact with effector T cells in the lung tissue to drive TRM differentiation following viral infection / P.R. Dunbar, E.K. Cartwright, A.N. Wein et al. // *Mucosal Immunology* – 2020. – V. 13. – № 1. – p. 161-171.
81. Egorov, A. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells / A. Egorov, S. Brandt, S. Sereinig et al. // *J Virol* – 1998. – V. 72. – № 8. – p. 6437-41.
82. Ehreth, J., The global value of vaccination / Ehreth, J. // *Vaccine* – 2003. – V. 21. – № 7-8. – p. 596-600.
83. Emboriadou, M. Human neutrophil elastase in RSV bronchiolitis / M. Emboriadou, M. Hatzistilianou, C. Magnisali et al. // *Annals of Clinical and Laboratory Science* – 2007. – V. 37. – № 1. – p. 79-84.

84. Endt, K. A Recombinant MVA-Based RSV Vaccine Induces T-Cell and Antibody Responses That Cooperate in the Protection Against RSV Infection / K. Endt, Y. Wollmann, J. Haug et al. // *Front Immunol* – 2022. – V. 13. – №. – p. 841471.
85. Epstein, A.L. HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy / A.L. Epstein, P. Marconi, R. Argnani et al. // *Current Gene Therapy* – 2005. – V. 5. – № 5. – p. 445-458.
86. Esneau, C. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus N0-P complex in solution / C. Esneau, B. Raynal, P. Roblin et al. // *Journal of Biological Chemistry* – 2019. – V. 294. – № 10. – p. 3647-3660.
87. Everard, M.L. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection / M.L. Everard, A. Swarbrick, M. Wright et al. // *Archives of Disease in Childhood* – 1994. – V. 71. – № 5. – p. 428-432.
88. Eyles, J.E. Nonreplicating vaccines can protect african green monkeys from the memphis 37 strain of respiratory syncytial virus / J.E. Eyles, J. Erik Johnson, S. Megati et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2013. – V. 208. – № 2. – p. 319-329.
89. Falloon, J. An Adjuvanted, Postfusion F Protein-Based Vaccine Did Not Prevent Respiratory Syncytial Virus Illness in Older Adults / J. Falloon, J. Yu, M.T. Esser et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2017. – V. 216. – № 11. – p. 1362-1370.
90. Falsey, A.R. Relationship of serum antibody to risk of respiratory syncytial virus infection in elderly adults / A.R. Falsey, E.E. Walsh// *The Journal of Infectious Diseases* – 1998. – V. 177. – № 2. – p. 463-466.
91. Falsey, A.R. Phase 1/2 Randomized Study of the Immunogenicity, Safety, and Tolerability of a Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Vaccine in Adults With Concomitant Inactivated Influenza Vaccine / A.R. Falsey, E.E. Walsh, D.A. Scott et al. // *J Infect Dis* – 2022. – V. 225. – № 12. – p. 2056-2066.
92. FDA [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/abryso>
93. Feldman, S.A. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G / S.A. Feldman, R.M. Hendry, J.A. Beeler et al. // *Journal of Virology* – 1999. – V. 73. – № 8. – p. 6610-6617.
94. Feng, Z. Receptors for Respiratory Syncytial Virus Infection and Host Factors Regulating the Life Cycle of Respiratory Syncytial Virus / Z. Feng, L. Xu, Z. Xie et al. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* – 2022. – V. 12. – №. – p. 858629.
95. Ferko, B. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal

- immune responses in mice / B. Ferko, J. Stasakova, S. Sereinig et al. // *J Virol* – 2001. – V. 75. – № 19. – p. 8899-908.
96. Fernandez-Ruiz, D. Liver-Resident Memory CD8+ T Cells Form a Front-Line Defense against Malaria Liver-Stage Infection / D. Fernandez-Ruiz, W.Y. Ng, L.E. Holz et al. // *Immunity* – 2016. – V. 45. – № 4. – p. 889-902.
97. Fitzgerald, J.G. Diphtheria Toxoid as an Immunizing Agent / J.G. Fitzgerald// *Can Med Assoc J* – 1927. – V. 17. – № 5. – p. 524-9.
98. Fonseca, R. Developmental plasticity allows outside-in immune responses by resident memory T cells / R. Fonseca, L.K. Beura, C.F. Quarnstrom et al. // *Nature Immunology* – 2020. – V. 21. – № 4. – p. 412-421.
99. Fontana, J.M. Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses / J.M. Fontana, B. Bankamp, P.A. Rota et al. // *Immunol Rev* – 2008. – V. 225. – №. – p. 46-67.
100. Fries, L. Immunogenicity and safety of a respiratory syncytial virus fusion protein (RSV F) nanoparticle vaccine in older adults / L. Fries, V. Shinde, J.J. Stoddard et al. // *Immun Ageing* – 2017. – V. 14. – p. 8.
101. Gagro, A. Increased Toll-like receptor 4 expression in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis / A. Gagro, M. Tominac, V. Krsulović-Hresić et al. // *Clinical and Experimental Immunology* – 2004. – V. 135. – № 2. – p. 267-272.
102. García-Sastre, A. Influenza virus vectors / A. García-Sastre, P. Palese et al. // *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* – 1995. – V. 23. – № 2. – p. 171-178.
103. García, C. Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis / C. García, A. Soriano-Fallas, J. Lozano et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal* – 2012. – V. 31. – № 1. – p. 86-89.
104. Garofalo, M. Prospects of Replication-Deficient Adenovirus Based Vaccine Development against SARS-CoV-2 / M. Garofalo, M. Staniszewska, S. Salmaso et al. // *Vaccines* – 2020. – V. 8. – № 2. – p. 293.
105. Ge, C. Bystander Activation of Pulmonary Trm Cells Attenuates the Severity of Bacterial Pneumonia by Enhancing Neutrophil Recruitment / C. Ge, I.R. Monk, A. Pizzolla et al. // *Cell Reports* – 2019. – V. 29. – № 13. – p. 4236-4244.e3.
106. Gebhardt, T. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus / T. Gebhardt, L.M. Wakim, L. Eidsmo et al. // *Nature Immunology* – 2009. – V. 10. – № 5. – p. 524-530.



107. Gerlach, T. influenza A viruses as vaccine vectors / T. Gerlach, H. Elbahesh, G. Saletti et al. // *Expert Rev Vaccines* – 2019. – V. 18. – № 4. – p. 379-392.
108. Ghosh, S. Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges / S. Ghosh, A.M. Brown, C. Jenkins et al. // *Applied Biosafety: Journal of the American Biological Safety Association* – 2020. – V. 25. – № 1. – p. 7-18.
109. Gilman, M.S.A. Transient opening of trimeric prefusion RSV F proteins / M.S.A. Gilman, P. Furmanova-Hollenstein, G. Pascual et al. // *Nature Communications* – 2019. – V. 10. – № 1. – p. 2105.
110. GlaxoSmithKline, A Phase 2b, Open-label, Multi-center, Extension Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of a Revaccination Dose of the RSVPreF3 Older Adults (OA) Investigational Vaccine Administered Intramuscularly 18 Months Post-Dose 2 in Adults 60 Years and Older Who Participated in the RSV OA=ADJ-002 Study [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04657198>
111. Glenn, G.M. Safety and immunogenicity of a Sf9 insect cell-derived respiratory syncytial virus fusion protein nanoparticle vaccine / G.M. Glenn, G. Smith, L. Fries et al. // *Vaccine* – 2013. – V. 31. – № 3. – p. 524-32.
112. Glenn, G.M. A Randomized, Blinded, Controlled, Dose-Ranging Study of a Respiratory Syncytial Virus Recombinant Fusion (F) Nanoparticle Vaccine in Healthy Women of Childbearing Age / G.M. Glenn, L.F. Fries, D.N. Thomas et al. // *J Infect Dis* – 2016. – V. 213. – № 3. – p. 411-22.
113. Glennie, N.D. Skin-resident memory CD4+ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection / N.D. Glennie, V.A. Yeramilli, D.P. Beiting et al. // *The Journal of Experimental Medicine* – 2015. – V. 212. – № 9. – p. 1405-1414.
114. Glezen, W.P. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level / W.P. Glezen, A. Paredes, J.E. Allison et al. // *The Journal of Pediatrics* – 1981. – V. 98. – № 5. – p. 708-715.
115. Gomez, M. Phase-I study MEDI-534, of a live, attenuated intranasal vaccine against respiratory syncytial virus and parainfluenza-3 virus in seropositive children / M. Gomez, M.A. Mufson, F. Dubovsky et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal* – 2009. – V. 28. – № 7. – p. 655-658.
116. Graham, B.S. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice / B.S. Graham, L.A. Bunton, P.F. Wright et al. // *The Journal of Clinical Investigation* – 1991. – V. 88. – № 3. – p. 1026-1033.

117. Green, C.A. Safety and immunogenicity of novel respiratory syncytial virus (RSV) vaccines based on the RSV viral proteins F, N and M2-1 encoded by simian adenovirus (PanAd3-RSV) and MVA (MVA-RSV); protocol for an open-label, dose-escalation, single-centre, phase 1 clinical trial in healthy adults / C.A. Green, E. Scarselli, M. Voysey et al. // *BMJ Open* – 2015. – V. 5. – № 10. – p. e008748.
118. Green, C.A. adenovirus- and MVA-vectored respiratory syncytial virus vaccine is safe and immunogenic in adults / C.A. Green, E. Scarselli, C.J. Sande et al. // *Sci Transl Med* – 2015. – V. 7. – № 300. – p. 300ra126.
119. Green, C.A. Novel genetically-modified chimpanzee adenovirus and MVA-vectored respiratory syncytial virus vaccine safely boosts humoral and cellular immunity in healthy older adults / C.A. Green, C.J. Sande, E. Scarselli et al. // *The Journal of Infection* – 2019. – V. 78. – № 5. – p. 382-392.
120. Guvenel, A. Epitope-specific airway-resident CD4+ T cell dynamics during experimental human RSV infection / A. Guvenel, A. Jozwik, S. Ascough et al. // *J Clin Invest* – 2020. – V. 130. – № 1. – p. 523-538.
121. Hall, C.B. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus / C.B. Hall, E.E. Walsh, C.E. Long et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 1991. – V. 163. – № 4. – p. 693-698.
122. Hallak, L.K. Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection / L.K. Hallak, P.L. Collins, W. Knudson et al. // *Virology* – 2000. – V. 271. – № 2. – p. 264-75.
123. Haller, A.A. Expression of the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by bovine parainfluenza virus type 3, a novel attenuated virus vaccine vector / A.A. Haller, T. Miller, M. Mitiku et al. // *Journal of Virology* – 2000. – V. 74. – № 24. – p. 11626-11635.
124. Hattori, S. Relationship between RANTES polymorphisms and respiratory syncytial virus bronchiolitis in a Japanese infant population / S. Hattori, N. Shimojo, T. Mashimo et al. // *Japanese Journal of Infectious Diseases* – 2011. – V. 64. – № 3. – p. 242-245.
125. Hayward, S.L. Environmental cues regulate epigenetic reprogramming of airway-resident memory CD8+ T cells / S.L. Hayward, C.D. Scharer, E.K. Cartwright et al. // *Nature Immunology* – 2020. – V. 21. – № 3. – p. 309-320.
126. Herlocher, M.L. Immunological properties of plaque purified strains of live attenuated respiratory syncytial virus (RSV) for human vaccine / M.L. Herlocher, M. Ewasyshyn, S. Sambhara et al. // *Vaccine* – 1999. – V. 17. – № 2. – p. 172-181.
127. Heumann, R. Dynamical Differences in Respiratory Syncytial Virus / R. Heumann, C. Duncan, C.C. Stobart et al. // *Bull Math Biol* – 2021. – V. 84. – № 1. – p. 11.

128. Hoffmann, E. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids / E. Hoffmann, G. Neumann, Y. Kawaoka et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2000. – V. 97. – № 11. – p. 6108-6113.
129. Holmes, K.D. A multi-mutant herpes simplex virus vector has minimal cytotoxic effects on the distribution of filamentous actin, alpha-actinin 2 and a glutamate receptor in differentiated PC12 cells / K.D. Holmes, A.K. Cassam, B. Chan et al. // *Journal of Neurovirology* – 2000. – V. 6. – № 1. – p. 33-45.
130. Hombrink, P. Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8+ lung-resident memory T cells / P. Hombrink, C. Helbig, R.A. Backer et al. // *Nature Immunology* – 2016. – V. 17. – № 12. – p. 1467-1478.
131. Hondowicz, B.D. Interleukin-2-Dependent Allergen-Specific Tissue-Resident Memory Cells Drive Asthma / B.D. Hondowicz, D. An, J.M. Schenkel et al. // *Immunity* – 2016. – V. 44. – № 1. – p. 155-166.
132. Hornsleth, A. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions / A. Hornsleth, B. Klug, M. Nir et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal* – 1998. – V. 17. – № 12. – p. 1114-1121.
133. Hotard, A.L. A stabilized respiratory syncytial virus reverse genetics system amenable to recombination-mediated mutagenesis / A.L. Hotard, F.Y. Shaikh, S. Lee et al. // *Virology* – 2012. – V. 434. – № 1. – p. 129-136.
134. Hu, B. Development of a reverse genetics system for respiratory syncytial virus long strain and an immunogenicity study of the recombinant virus / B. Hu, J. Jiang, J. Zhan et al. // *Virology Journal* – 2014. – V. 11. – № 1. – p. 142.
135. Iborra, S. Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1(+) Dendritic Cells / S. Iborra, M. Martinez-Lopez, S.C. Khouili et al. // *Immunity* – 2016. – V. 45. – № 4. – p. 847-860.
136. Iijima, N. T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells / N. Iijima, A. Iwasaki // *Science (New York, N.Y.)* – 2014. – V. 346. – № 6205. – p. 93-98.
137. Isakova-Sivak, I. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) / I. Isakova-Sivak, L.-M. Chen, Y. Matsuoka et al. // *Virology* – 2011. – V. 412. – № 2. – p. 297-305.
138. Isakova-Sivak, I. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers / I. Isakova-Sivak, M. Stukova, M. Erofeeva et al. // *Hum Vaccin Immunother* – 2015. – V. 11. – № 4. – p. 970-82.

139. Isakova-Sivak, I. Safety, immunogenicity and infectivity of new live attenuated influenza vaccines / Isakova-Sivak, I., L. Rudenko // *Expert Rev Vaccines* – 2015. – V. 14. – № 10. – p. 1313-29.
140. Isakova-Sivak, I. Development of a T Cell-Based COVID-19 Vaccine Using a Live Attenuated Influenza Vaccine Viral Vector / I. Isakova-Sivak, E. Stepanova, V. Matyushenko et al. // *Vaccines (Basel)* – 2022. – V. 10. – № 7.
141. Jaberolansar, N. Recent advances in the development of subunit-based RSV vaccines / N. Jaberolansar, I. Toth, P.R. Young et al. // *Expert Review of Vaccines* – 2016. – V. 15. – № 1. – p. 53-68.
142. Jamin, M. Nonsegmented Negative-Sense RNA Viruses-Structural Data Bring New Insights Into Nucleocapsid Assembly / M. Jamin, F. Yabukarski // *Advances in Virus Research* – 2017. – V. 97. – №. – p. 143-185.
143. Jeffree, C.E. Distribution of the attachment (G) glycoprotein and GM1 within the envelope of mature respiratory syncytial virus filaments revealed using field emission scanning electron microscopy / C.E. Jeffree, H.W. Rixon, G. Brown et al. // *Virology* – 2003. – V. 306. – № 2. – p. 254-67.
144. Jeong, H. Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections / H. Jeong, B.L. Seong // *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* – 2017. – V. 55. – № 3. – p. 220-230.
145. Jiang, X. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity / X. Jiang, R.A. Clark, L. Liu et al. // *Nature* – 2012. – V. 483. – № 7388. – p. 227-231.
146. Jin, H. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 / H. Jin, B. Lu, H. Zhou et al. // *Virology* – 2003. – V. 306. – № 1. – p. 18-24.
147. Jin, H. Live attenuated influenza vaccine / H. Jin, K. Subbarao // *Current Topics in Microbiology and Immunology* – 2015. – V. 386. – p. 181-204.
148. Johnson, J.E. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection / J.E. Johnson, R.A. Gonzales, S.J. Olson et al. // *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* – 2007. – V. 20. – № 1. – p. 108-119.
149. Jones, B.G. Sendai virus-based RSV vaccine protects African green monkeys from RSV infection / B.G. Jones, R.E. Sealy, R. Rudraraju et al. // *Vaccine* – 2012. – V. 30. – № 5. – p. 959-968.

150. Jordan, E. Broad Antibody and Cellular Immune Response From a Phase 2 Clinical Trial With a Novel Multivalent Poxvirus-Based Respiratory Syncytial Virus Vaccine / E. Jordan, S.J. Lawrence, T.P.H. Meyer et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2021. – V. 223. – № 6. – p. 1062-1072.
151. Jordan, E. Reduced Respiratory Syncytial Virus Load, Symptoms, and Infections: a Human Challenge Trial of MVA-BN-RSV Vaccine / E. Jordan, G. Kabir, S. Schultz et al. // *J Infect Dis* – 2023. – Режим доступа <https://doi.org/10.1101/2022.12.02.22283030>.
152. Jordan E. Decreased Viral Load, Symptom Reduction, and Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection with MVA-BN-RSV Vaccine / E. Jordan, K.G., Schultz, S., Silbernagl G. et al. // *J Infect Dis* – 2022. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad108>.
153. Joyce, C. Orally administered adenoviral-based vaccine induces respiratory mucosal memory and protection against RSV infection in cotton rats / C. Joyce, C.D. Scallan, R. Mateo et al. // *Vaccine* – 2018. – V. 36. – № 29. – p. 4265-4277.
154. Jozwik, A. RSV-specific airway resident memory CD8+ T cells and differential disease severity after experimental human infection / A. Jozwik, M.S. Habibi, A. Paras et al. // *Nature Communications* – 2015. – V. 6. – №. – p. 10224.
155. Jung, H.E. Contribution of Dendritic Cells in Protective Immunity against Respiratory Syncytial Virus Infection / H.E. Jung, T.H. Kim, H.K. Lee et al. // *Viruses* – 2020. – V. 12. – № 1. – p. E102.
156. Jung, Y.J. Live Attenuated Influenza Virus Expressing Conserved G-Protein Domain in a Chimeric Hemagglutinin Molecule Induces G-Specific Antibodies and Confers Protection against Respiratory Syncytial Virus / Y.J. Jung, Y.N. Lee, K.H. Kim et al. // *Vaccines (Basel)* – 2020. – V. 8. – № 4.
157. Kapikian, A.Z. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine / A.Z. Kapikian, R.H. Mitchell, R.M. Chanock et al. // *American Journal of Epidemiology* – 1969. – V. 89. – № 4. – p. 405-421.
158. Karlin, D. Detecting remote sequence homology in disordered proteins: discovery of conserved motifs in the N-termini of Mononegavirales phosphoproteins / D. Karlin, R. Belshaw // *PloS One* – 2012. – V. 7. – № 3. – p. e31719.
159. Karron, R.A. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant / R.A. Karron, D.A. Buonagurio, A.F. Georgiu et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 1997. – V. 94. – № 25. – p. 13961-6.

160. Karron, R.A. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants / R.A. Karron, P.F. Wright, R.B. Belshe et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2005. – V. 191. – № 7. – p. 1093-1104.
161. Karron, R.A. Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccines / R.A. Karron, U.J. Buchholz, P.L. Collins et al. // *Current Topics in Microbiology and Immunology* – 2013. – V. 372. – №. – p. 259-284.
162. Karron, R.A. A gene deletion that up-regulates viral gene expression yields an attenuated RSV vaccine with improved antibody responses in children / R.A. Karron, C. Luongo, B. Thumar et al. // *Science Translational Medicine* – 2015. – V. 7. – № 312. – p. 312ra175.
163. Karron, R.A. Safety and Immunogenicity of the Respiratory Syncytial Virus Vaccine RSV/ΔNS2/Δ1313/I1314L in RSV-Seronegative Children / R.A. Karron, C. Luongo, J.S. Mateo et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2020. – V. 222. – № 1. – p. 82-91.
164. Kay, M.A. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics / M.A. Kay, J.C. Glorioso, L. Naldini et al. // *Nature Medicine* – 2001. – V. 7. – № 1. – p. 33-40.
165. Kendal, A.P., Cold-adapted live attenuated influenza vaccines developed in Russia: can they contribute to meeting the needs for influenza control in other countries? / A.P. Kendal // *European Journal of Epidemiology* – 1997. – V. 13. – № 5. – p. 591-609.
166. Kerrin, A. Differential lower airway dendritic cell patterns may reveal distinct endotypes of RSV bronchiolitis / A. Kerrin, P. Fitch, C. Errington et al. // *Thorax* – 2017. – V. 72. – № 7. – p. 620-627.
167. Killikelly, A.M. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus / A.M. Killikelly, M. Kanekiyo, B.S. Graham et al. // *Scientific Reports* – 2016. – V. 6. – №. – p. 34108.
168. Kim, C.K. Airway IFN- $\gamma$  production during RSV bronchiolitis is associated with eosinophilic inflammation / C.K. Kim, Z. Callaway, Y.Y. Koh et al. // *Lung* – 2012. – V. 190. – № 2. – p. 183-188.
169. Kim, H.W. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine / H.W. Kim, J.G. Canchola, C.D. Brandt et al. // *American Journal of Epidemiology* – 1969. – V. 89. – № 4. – p. 422-434.
170. Kim, J.H. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice / J.H. Kim, S.R. Lee, L.H. Li et al. // *PLoS One* – 2011. – V. 6. – № 4. – p. e18556.

171. Kim, Y.-I. Respiratory syncytial virus human experimental infection model: provenance, production, and sequence of low-passaged memphis-37 challenge virus / Y.-I. Kim, J.P. DeVincenzo, B.G. Jones et al. // *PloS One* – 2014. – V. 9. – № 11. – p. e113100.
172. Kinder, J.T. Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Infections in Three-Dimensional Human Airway Tissues Expose an Interesting Dichotomy in Viral Replication, Spread, and Inhibition by Neutralizing Antibodies / J.T. Kinder, C.L. Moncman, C. Barrett et al. // *J Virol* – 2020. – V. 94. – № 20.
173. Kinnear, E. Airway T cells protect against RSV infection in the absence of antibody / E. Kinnear, L. Lambert, J.U. McDonald et al. // *Mucosal Immunology* – 2018. – V. 11. – № 1. – p. 249-256.
174. Kiseleva, I.V. PB2 and PA genes control the expression of the temperature-sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus / I.V. Kiseleva, J.T. Voeten, L.C. Teley et al. // *J Gen Virol* – 2010. – V. 91. – № Pt 4. – p. 931-7.
175. Kittel, C. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment / C. Kittel, B. Ferko, M. Kurz et al. // *Journal of Virology* – 2005. – V. 79. – № 16. – p. 10672-10677.
176. Kotb, S. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus prefusion F protein (RSVPreF3) candidate vaccine in older Japanese adults: A phase I, randomized, observer-blind clinical trial / S. Kotb, M. Haranaka, N. Folschweiller et al. // *Respir Investig* – 2023. – V. 61. – № 2. – p. 261-269.
177. Kotomina, T. Generation and Characterization of Universal Live-Attenuated Influenza Vaccine Candidates Containing Multiple M2e Epitopes / T. Kotomina, I. Isakova-Sivak, K.H. Kim et al. // *Vaccines (Basel)* – 2020. – V. 8. – № 4.
178. Kulkarni, A.B. Cytotoxic T cells specific for a single peptide on the M2 protein of respiratory syncytial virus are the sole mediators of resistance induced by immunization with M2 encoded by a recombinant vaccinia virus / A.B. Kulkarni, P.L. Collins, I. Bacik et al. // *J Virol* – 1995. – V. 69. – № 2. – p. 1261-4.
179. Langley, J.M. Respiratory Syncytial Virus Vaccine Based on the Small Hydrophobic Protein Ectodomain Presented With a Novel Lipid-Based Formulation Is Highly Immunogenic and Safe in Adults: A First-in-Humans Study / J.M. Langley, L.D. MacDonald, G.M. Weir et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2018. – V. 218. – № 3. – p. 378-387.
180. Larios Mora, A. Kinetics of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Memphis Strain 37 (M37) Infection in the Respiratory Tract of Newborn Lambs as an RSV Infection Model for Human Infants / A. Larios Mora, L. Detalle, A. Van Geelen et al. // *PloS One* – 2015. – V. 10. – № 12. – p. e0143580.

181. Lasaro, M.O. New insights on adenovirus as vaccine vectors / M.O. Lasaro, H.C. Ertl // *Mol Ther* – 2009. – V. 17. – № 8. – p. 1333-9.
182. Lee, L.Y.-H. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals / L.Y.-H. Lee, D.L.A. Ha, C. Simmons et al. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2008. – V. 118. – № 10. – p. 3478-3490.
183. Lee, S. Tissue-specific regulation of CD8+ T-lymphocyte immunodominance in respiratory syncytial virus infection / S. Lee, S.A. Miller, D.W. Wright et al. // *J Virol* – 2007. – V. 81. – № 5. – p. 2349-58.
184. Lee, Y.-N. Recombinant influenza virus expressing a fusion protein neutralizing epitope of respiratory syncytial virus (RSV) confers protection without vaccine-enhanced RSV disease / Y.-N. Lee, H.S. Hwang, M.-C. Kim et al. // *Antiviral Research* – 2015. – V. 115. – №. – p. 1-8.
185. Lee, Y.-T. Environmental and antigen receptor-derived signals support sustained surveillance of the lungs by pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes / Y.-T. Lee, J.E. Suarez-Ramirez, T. Wu et al. // *Journal of Virology* – 2011. – V. 85. – № 9. – p. 4085-4094.
186. Leroux-Roels, G. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus fusion glycoprotein F subunit vaccine in healthy adults: Results of a phase 1, randomized, observer-blind, controlled, dosage-escalation study / G. Leroux-Roels, F. De Boever, C. Maes et al. // *Vaccine* – 2019. – V. 37. – № 20. – p. 2694-2703.
187. Leroux-Roels, I. Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalating Study Evaluating the Safety and Immunogenicity of an Epitope-Specific Chemically Defined Nanoparticle RSV Vaccine / I. Leroux-Roels, J. Bruhwylter, L. Stergiou et al. // *Vaccines (Basel)* – 2023. – V. 11. – № 2.
188. Lewis, F.A. A syncytial virus associated with epidemic disease of the lower respiratory tract in infants and young children / F. A. Lewis, M.L.Rae, A. A. Ferris et al. // *The Medical journal of Australia* – 1961. –p. 932-933. – Режим доступа: <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1961.tb70131.x>
189. Li, C. A Recombinant G Protein Plus Cyclosporine A-Based Respiratory Syncytial Virus Vaccine Elicits Humoral and Regulatory T Cell Responses against Infection without Vaccine-Enhanced Disease / C. Li, X. Zhou, Y. Zhong et al. // *J Immunol* – 2016. – V. 196. – № 4. – p. 1721-31.
190. Li, Y. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a



- systematic analysis / Y. Li, X. Wang, D.M. Blau et al. // *Lancet* – 2022. – V. 399. – № 10340. – p. 2047-2064.
191. Lifland, A.W. Human respiratory syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS / A.W. Lifland, J. Jung, E. Alonas et al. // *Journal of Virology* – 2012. – V. 86. – № 15. – p. 8245-8258.
192. Lim, C.S. Sequence and phylogenetic analysis of SH, G, and F genes and proteins of Human respiratory syncytial virus isolates from Singapore / C.S. Lim, G. Kumarasinghe, V.T.K. Chow et al. et al. // *Acta Virologica* – 2003. – V. 47. – № 2. – p. 97-104.
193. Lingemann, M. The alpha-1 subunit of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (ATP1A1) is required for macropinocytic entry of respiratory syncytial virus (RSV) in human respiratory epithelial cells / M. Lingemann, T. McCarty, X. Liu et al. // *PLoS Pathog* – 2019. – V. 15. – № 8. – p. e1007963.
194. Liu, M.A., Immunologic basis of vaccine vectors / M.A. Liu // *Immunity* – 2010. – V. 33. – № 4. – p. 504-15.
195. Liu, Y. Tissue-Specific Control of Tissue-Resident Memory T Cells / Y. Liu, C. Ma, N. Zhang et al. // *Crit Rev Immunol* – 2018. – V. 38. – № 2. – p. 79-103.
196. Loo, Y.M. Viral regulation and evasion of the host response / Y.M. Loo, M. Gale // *Current Topics in Microbiology and Immunology* – 2007. – V. 316. – №. – p. 295-313.
197. Looney, R.J. Effect of aging on cytokine production in response to respiratory syncytial virus infection / R.J. Looney, A.R. Falsey, E. Walsh et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2002. – V. 185. – № 5. – p. 682-685.
198. Luangrath, M.A. Tissue-Resident Memory T Cells in the Lungs Protect against Acute Respiratory Syncytial Virus Infection / M.A. Luangrath, M.E. Schmidt, S.M. Hartwig et al. // *ImmunoHorizons* – 2021. – V. 5. – № 2. – p. 59-69.
199. Lukacs, N.W. Differential Immune Responses and Pulmonary Pathophysiology Are Induced by Two Different Strains of Respiratory Syncytial Virus / N.W. Lukacs, M.L. Moore, B.D. Rudd et al. // *The American Journal of Pathology* – 2006. – V. 169. – № 3. – p. 977-986.
200. Lundstrom, K., Latest development in viral vectors for gene therapy / K. Lundstrom // *Trends in Biotechnology* – 2003. – V. 21. – № 3. – p. 117-122.
201. Lundstrom, K., Self-Replicating RNA Viruses for Vaccine Development against Infectious Diseases and Cancer / K. Lundstrom // *Vaccines* – 2021. – V. 9. – № 10. – p. 1187.

202. Luongo, C. Increased genetic and phenotypic stability of a promising live-attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate by reverse genetics / C. Luongo, C.C. Winter, P.L. Collins et al. // *J Virol* – 2012. – V. 86. – № 19. – p. 10792-804.
203. Luongo, C. Respiratory syncytial virus modified by deletions of the NS2 gene and amino acid S1313 of the L polymerase protein is a temperature-sensitive, live-attenuated vaccine candidate that is phenotypically stable at physiological temperature / C. Luongo, C.C. Winter, P.L. Collins et al. // *J Virol* – 2013. – V. 87. – № 4. – p. 1985-96.
204. Maassab, H.F. Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets / H.F. Maassab, A.P. Kendal, G.D. Abrams et al. // *J Infect Dis* – 1982. – V. 146. – № 6. – p. 780-90.
205. Maassab, H.F. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines / H.F. Maassab, D.C. DeBorde // *Vaccine* – 1985. – V. 3. – № 5. – p. 355-69.
206. MacDonald, L.D. Type III hypersensitivity reactions to a B cell epitope antigen are abrogated using a depot forming vaccine platform / L.D. MacDonald, A. MacKay, V. Kaliaperumal // *Hum Vaccin Immunother* – 2018. – V. 14. – № 1. – p. 59-66.
207. Mackay, L.K. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation / L.K. Mackay, A.T. Stock, J.Z. Ma et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2012. – V. 109. – № 18. – p. 7037-7042.
208. Mackay, L.K. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin / L.K. Mackay, A. Rahimpour, J.Z. Ma et al. // *Nature Immunology* – 2013. – V. 14. – № 12. – p. 1294-1301.
209. Mackay, L.K. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention / L.K. Mackay, A. Braun, B.L. Macleod et al. // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* – 2015. – V. 194. – № 5. – p. 2059-2063.
210. Mackay, L.K. T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF- $\beta$  and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate / L.K. Mackay, E. Wynne-Jones, D. Freestone et al. // *Immunity* – 2015. – V. 43. – № 6. – p. 1101-1111
211. Mackay, L.K. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes / L.K. Mackay, M. Minnich, N.A.M. Kragten et al. // *Science (New York, N.Y.)* – 2016. – V. 352. – № 6284. – p. 459-463.
212. Madhi, S.A. Respiratory Syncytial Virus Vaccination during Pregnancy and Effects in Infants / S.A. Madhi, F.P. Polack, P.A. Piedra et al. // *The New England Journal of Medicine* – 2020. – V. 383. – № 5. – p. 426-439.

213. Malkin, E. Safety and immunogenicity of a live attenuated RSV vaccine in healthy RSV-seronegative children 5 to 24 months of age / E. Malkin, R. Yogev, N. Abughali et al. // *PloS One* – 2013. – V. 8. – № 10. – p. e77104.
214. Marcandalli, J., B. Fiala, S. Ols, Induction of Potent Neutralizing Antibody Responses by a Designed Protein Nanoparticle Vaccine for Respiratory Syncytial Virus / J. Marcandalli, B. Fiala, S. Ols et al. // *Cell* – 2019. – V. 176. – № 6. – p. 1420-1431 e17.
215. Masopust, D. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue / D. Masopust, V. Vezys, A.L. Marzo et al. // *Science (New York, N.Y.)* – 2001. – V. 291. – № 5512. – p. 2413-2417.
216. Masopust, D. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium / D. Masopust, D. Choo, V. Vezys et al. // *The Journal of Experimental Medicine* – 2010. – V. 207. – № 3. – p. 553-564.
217. Mastrangelo, M.J. Virotherapy clinical trials for regional disease: in situ immune modulation using recombinant poxvirus vectors / M.J. Mastrangelo, E.C. Lattime // *Cancer Gene Therapy* – 2002. – V. 9. – № 12. – p. 1013-1021.
218. Mastrangelo, P. Identification of RSV Fusion Protein Interaction Domains on the Virus Receptor, Nucleolin / P. Mastrangelo, A.A. Chin, S. Tan et al. // *Viruses* – 2021. – V. 13. – № 2.
219. Mazur, N.I. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates / N.I. Mazur, D. Higgins, M.C. Nunes et al. // *The Lancet. Infectious Diseases* – 2018. – V. 18. – № 10. – p. e295-e311.
220. McClements, M.E. Adeno-associated Virus (AAV) Dual Vector Strategies for Gene Therapy Encoding Large Transgenes / M.E. McClements, R.E. MacLaren // *The Yale Journal of Biology and Medicine* – 2017. – V. 90. – № 4. – p. 611-623.
221. McDermott, D.S. Determining the breadth of the respiratory syncytial virus-specific T cell response / D.S. McDermott, C.J. Knudson, S.M. Varga et al. // *J Virol* – 2014. – V. 88. – № 6. – p. 3135-43.
222. McFarland, E.J. Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine Candidate With Deletion of RNA Synthesis Regulatory Protein M2-2 is Highly Immunogenic in Children / E.J. McFarland, R.A. Karron, P. Muresan et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2018. – V. 217. – № 9. – p. 1347-1355.
223. McFarland, E.J. Live Respiratory Syncytial Virus Attenuated by M2-2 Deletion and Stabilized Temperature Sensitivity Mutation 1030s Is a Promising Vaccine Candidate in Children / E.J. McFarland, R.A. Karron, P. Muresan et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2020. – V. 221. – № 4. – p. 534-543.

224. McFarland, E.J. Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine With M2-2 Deletion and With Small Hydrophobic Noncoding Region Is Highly Immunogenic in Children / E.J. McFarland, R.A. Karron, P. Muresan et al. // *J Infect Dis* – 2020. – V. 221. – № 12. – p. 2050-2059.
225. McLellan, J.S. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody / J.S. McLellan, M. Chen, S. Leung et al. // *Science (New York, N.Y.)* – 2013. – V. 340. – № 6136. – p. 1113-1117.
226. McLellan, J.S. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus / J.S. McLellan, M. Chen, M.G. Joyce et al. // *Science (New York, N.Y.)* – 2013. – V. 342. – № 6158. – p. 592-598.
227. McLellan, J.S., Neutralizing epitopes on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein / J.S. McLellan // *Current Opinion in Virology* – 2015. – V. 11. – p. 70-75.
228. McMaster, S.R. Airway-Resident Memory CD8 T Cells Provide Antigen-Specific Protection against Respiratory Virus Challenge through Rapid IFN- $\gamma$  Production / S.R. McMaster, J.J. Wilson, H. Wang et al. // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* – 2015. – V. 195. – № 1. – p. 203-209.
229. McNamara, P.S. Interleukin 9 production in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis / P.S. McNamara, B.F. Flanagan, L.M. Baldwin et al. // *Lancet (London, England)* – 2004. – V. 363. – № 9414. – p. 1031-1037.
230. Mella, C. Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis / C. Mella, M.C. Suarez-Arrabal, S. Lopez et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2013. – V. 207. – № 4. – p. 564-573.
231. Mezhenskaya, D. A Strategy to Elicit M2e-Specific Antibodies Using a Recombinant H7N9 Live Attenuated Influenza Vaccine Expressing Multiple M2e Tandem Repeats / D. Mezhenskaya, I. Isakova-Sivak, T. Kotomina et al. // *Biomedicines* – 2021. – V. 9. – № 2.
232. Mezhenskaya, D. Universal Live-Attenuated Influenza Vaccine Candidates Expressing Multiple M2e Epitopes Protect Ferrets against a High-Dose Heterologous Virus Challenge / D. Mezhenskaya, I. Isakova-Sivak, V. Matyushenko et al. // *Viruses* – 2021. – V. 13. – № 7.
233. Midulla, F. Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages / F. Midulla, A. Villani, J.R. Panuska et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 1993. – V. 168. – № 6. – p. 1515-1519.
234. Mirzaei, H. Viruses as key modulators of the TGF- $\beta$  pathway; a double-edged sword involved in cancer / H. Mirzaei, E. Faghiloo // *Reviews in Medical Virology* – 2018. – V. 28. – № 2. – p. e1967.

235. Molina, I.G. Cooperative RNA Recognition by a Viral Transcription Antiterminator / I.G. Molina, S.A. Esperante, C. Marino-Buslje et al. // *Journal of Molecular Biology* – 2018. – V. 430. – № 6. – p. 777-792.
236. Moore, M.L. A chimeric A2 strain of respiratory syncytial virus (RSV) with the fusion protein of RSV strain line 19 exhibits enhanced viral load, mucus, and airway dysfunction / M.L. Moore, M.H. Chi, C. Luongo et al. // *Journal of Virology* – 2009. – V. 83. – № 9. – p. 4185-4194.
237. Moore, M.L. The Impact of Viral Genotype on Pathogenesis and Disease Severity: Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinoviruses / M.L. Moore, K.L. Stokes, T.V. Hartert et al. // *Current opinion in immunology* – 2013. – V. 25. – № 6. – p. 761-768.
238. Morabito, K.M. Intranasal administration of RSV antigen-expressing MCMV elicits robust tissue-resident effector and effector memory CD8<sup>+</sup> T cells in the lung / K.M. Morabito, T.R. Ruckwardt, A.J. Redwood et al. // *Mucosal Immunol* – 2017. – V. 10. – № 2. – p. 545-554.
239. Mueller, S. A codon-pair deoptimized live-attenuated vaccine against respiratory syncytial virus is immunogenic and efficacious in non-human primates / S. Mueller, C.B. Stauff, R. Kalkeri et al. // *Vaccine* – 2020. – V. 38. – № 14. – p. 2943-2948.
240. Mueller, S.N. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence / S.N. Mueller, L.K. Mackay // *Nature Reviews. Immunology* – 2016. – V. 16. – № 2. – p. 79-89.
241. Muñoz, F.M. Safety and Immunogenicity of a Respiratory Syncytial Virus Fusion (F) Protein Nanoparticle Vaccine in Healthy Third-Trimester Pregnant Women and Their Infants / F.M. Muñoz, G.K. Swamy, S.P. Hickman et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2019. – V. 220. – № 11. – p. 1802-1815.
242. Murphy, B.R. Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3-6 months after immunization / B.R. Murphy, A.V. Sotnikov, L.A. Lawrence et al. // *Vaccine* – 1990. – V. 8. – № 5. – p. 497-502.
243. Nair, H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis / H. Nair, D.J. Nokes, B.D. Gessner et al. // *Lancet (London, England)* – 2010. – V. 375. – № 9725. – p. 1545-1555.
244. Nguyen, T.H. Influenza, but not SARS-CoV-2, infection induces a rapid interferon response that wanes with age and diminished tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells / T.H. Nguyen, J.L. McAuley, Y. Kim et al. // *Clinical & Translational Immunology* – 2021. – V. 10. – № 1. – p. e1242.

245. Nightingale, S.J. Transient gene expression by nonintegrating lentiviral vectors / S.J. Nightingale, R.P. Hollis, K.A. Pepper et al. // *Mol Ther* – 2006. – V. 13. – № 6. – p. 1121-32.
246. Noble, M. Respiratory syncytial virus-associated hospitalisation in children aged  $\leq 5$  years: a scoping review of literature from 2009 to 2021 / M. Noble, R.A. Khan, B. Walker et al. // *ERJ Open Res* – 2022. – V. 8. – № 2.
247. Nolz, J.C. Molecular mechanisms of CD8(+) T cell trafficking and localization / J.C. Nolz // *Cell Mol Life Sci* – 2015. – V. 72. – № 13. – p. 2461-73.
248. Norrby, E. Morphogenesis of Respiratory Syncytial Virus in a Green Monkey Kidney Cell Line (Vero) / E. Norrby, H. Marusyk, C. Örvell et al. // *Journal of Virology* – 1970. – V. 6. – № 2. – p. 237-242.
249. Noton, S.L. Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication / S.L. Noton, R. Fearn // *Virology* – 2015. – V. 479-480. – p. 545-54.
250. Oja, A.E. Trigger-happy resident memory CD4+ T cells inhabit the human lungs / A.E. Oja, B. Piet, C. Helbig et al. // *Mucosal Immunology* – 2018. – V. 11. – № 3. – p. 654-667.
251. Olszewska, W. Protective and disease-enhancing immune responses induced by recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) expressing respiratory syncytial virus proteins / W. Olszewska, Y. Suezter, G. Sutter et al. // *Vaccine* – 2004. – V. 23. – № 2. – p. 215-21.
252. Pancham, K. Premature infants have impaired airway antiviral IFN $\gamma$  responses to human metapneumovirus compared to respiratory syncytial virus / K. Pancham, G.F. Perez, S. Huseni et al. // *Pediatric Research* – 2015. – V. 78. – № 4. – p. 389-394.
253. Panuska, J.R. Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients / J.R. Panuska, M.I. Hertz, H. Taraf et al. // *The American Review of Respiratory Disease* – 1992. – V. 145. – № 4 Pt 1. – p. 934-939.
254. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease / V. Papayannopoulos // *Nature Reviews Immunology* – 2018. – V. 18. – № 2. – p. 134-147.
255. Papi, A. Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Vaccine in Older Adults / A. Papi, M.G. Ison, J.M. Langley et al. // *N Engl J Med* – 2023. – V. 388. – № 7. – p. 595-608.
256. Park, B.R. Broad cross protection by recombinant live attenuated influenza H3N2 seasonal virus expressing conserved M2 extracellular domain in a chimeric hemagglutinin / B.R. Park, K.H. Kim, T. Kotomina et al. // *Sci Rep* – 2021. – V. 11. – № 1. – p. 4151.
257. Park, J.-s. Different Inflammatory Mechanisms of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus / J.-s. Park, Y.-H. Kim, E. Kwon et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2015. – V. 135. – № 2. – p. AB150.

258. Park, K. Cancer gene therapy using adeno-associated virus vectors / K. Park, W.-J. Kim, Y.-H. Cho et al. // *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* – 2008. – V. 13. – №. – p. 2653-2659.
259. Perez, M. Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus / M. Perez, B. Garcia-Barreno, J.A. Melero et al. // *Virology* – 1997. – V. 235. – № 2. – p. 342-51.
260. Peterson, J.T. Safety and Immunogenicity of a Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Vaccine When Coadministered With a Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Vaccine / J.T. Peterson, A.M. Zareba, D. Fitz-Patrick et al. // *J Infect Dis* – 2022. – V. 225. – № 12. – p. 2077-2086.
261. Piedra, P.A. Respiratory Syncytial Virus (RSV): Neutralizing Antibody, a Correlate of Immune Protection / P.A. Piedra, A.M. Hause, L. Aideyan et al. // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* – 2016. – V. 1442. – №. – p. 77-91.
262. Pierantoni, A. Mucosal delivery of a vectored RSV vaccine is safe and elicits protective immunity in rodents and nonhuman primates / A. Pierantoni, M.L. Esposito, V. Ammendola et al. // *Mol Ther Methods Clin Dev* – 2015. – V. 2. – №. – p. 15018.
263. Pinto, R.A. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol / R.A. Pinto, S.M. Arredondo, M.R. Bono et al. // *Pediatrics* – 2006. – V. 117. – № 5. – p. e878-886.
264. Pizzolla, A. Resident memory CD8<sup>+</sup> T cells in the upper respiratory tract prevent pulmonary influenza virus infection / A. Pizzolla, T.H.O. Nguyen, J.M. Smith et al. // *Science Immunology* – 2017. – V. 2. – № 12. – p. eaam6970.
265. Pollard, A.J. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments / A.J. Pollard, E.M. Bijker // *Nat Rev Immunol* – 2021. – V. 21. – № 2. – p. 83-100.
266. Prince, G.A. The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in infant ferrets / G.A. Prince, D.D. Porter // *The American Journal of Pathology* – 1976. – V. 82. – № 2. – p. 339-352.
267. Pulkina A., V.K. IgGκ Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine Against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice [Электронный ресурс] / A. Pulkina, V.K., Muzhikyan A., Sergeeva M. et al. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2023 – V.24 – №14. Режим доступа: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/14/11445>.

268. Purwar, R., Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity / R. Purwar, J. Campbell, G. Murphy et al. // *PloS One* – 2011. – V. 6. – № 1. – p. e16245.
269. Reed L.J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L.J. Reed, H. Muench // *American Journal of Epidemiology* – 1938. – V. 27. – № 3. – p. 493-497.
270. Rehwinkel, J. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection / J. Rehwinkel, C.P. Tan, D. Goubau et al. // *Cell* – 2010. – V. 140. – № 3. – p. 397-408.
271. Reinhardt, R.L. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body / R.L. Reinhardt, A. Khoruts, R. Merica et al. // *Nature* – 2001. – V. 410. – № 6824. – p. 101-105.
272. Retamal-Diaz, A. Contribution of Resident Memory CD8(+) T Cells to Protective Immunity Against Respiratory Syncytial Virus and Their Impact on Vaccine Design / A. Retamal-Diaz, C. Covian, G.A. Pacheco et al. // *Pathogens* – 2019. – V. 8. – № 3.
273. Richman, D.D. The association of the temperature-sensitive phenotype with viral attenuation in animals and humans: implications for the development and use of live virus vaccines / D.D. Richman, B.R. Murphy // *Rev Infect Dis* – 1979. – V. 1. – № 3. – p. 413-33.
274. Richter, M. Collagen distribution and expression of collagen-binding alpha1beta1 (VLA-1) and alpha2beta1 (VLA-2) integrins on CD4 and CD8 T cells during influenza infection / M. Richter, S.J. Ray, T.J. Chapman et al. // *J Immunol* – 2007. – V. 178. – № 7. – p. 4506-16.
275. Rigter, A. A protective and safe intranasal RSV vaccine based on a recombinant prefusion-like form of the F protein bound to bacterium-like particles / A. Rigter, I. Widjaja, H. Versantvoort et al. // *PloS One* – 2013. – V. 8. – № 8. – p. e71072.
276. Rima, B. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae / B. Rima, P. Collins, A. Easton et al. // *J Gen Virol* – 2017. – V. 98. – № 12. – p. 2912-2913.
277. Rincheval, V. Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus / V. Rincheval, M. Lelek, E. Gault et al. // *Nature Communications* – 2017. – V. 8. – № 1. – p. 563.
278. Rodrigues, C.M.C.,S.A. Plotkin, Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives / Rodrigues, C.M.C.,S.A. Plotkin// *Front Microbiol* – 2020. – V. 11. – №. – p. 1526.



279. Rossey, I. Vaccines against human respiratory syncytial virus in clinical trials, where are we now? / I. Rossey, X. Saelens // *Expert Review of Vaccines* – 2019. – V. 18. – № 10. – p. 1053-1067.
280. Ruckwardt, T.J. Responses against a subdominant CD8+ T cell epitope protect against immunopathology caused by a dominant epitope / T.J. Ruckwardt, C. Luongo, A.M. Malloy et al. // *J Immunol* – 2010. – V. 185. – № 8. – p. 4673-80.
281. Ruckwardt, T.J. Safety, tolerability, and immunogenicity of the respiratory syncytial virus prefusion F subunit vaccine DS-Cav1: a phase 1, randomised, open-label, dose-escalation clinical trial / T.J. Ruckwardt, K.M. Morabito, E. Phung et al. // *Lancet Respir Med* – 2021. – V. 9. – № 10. – p. 1111-1120.
282. Rudenko, L. Live attenuated pandemic influenza vaccine: clinical studies on A/17/California/2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries / L. Rudenko, H. van den Bosch, I. Kiseleva et al. // *Vaccine* – 2011. – V. 29 Suppl 1. – p. A40-4.
283. Rudenko, L. Assessment of human immune responses to H7 avian influenza virus of pandemic potential: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study of live attenuated H7N3 influenza vaccine / L. Rudenko, I. Kiseleva, A.N. Naykhin et al. // *PLoS One* – 2014. – V. 9. – № 2. – p. e87962.
284. Rudenko, L. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study / L. Rudenko, I. Kiseleva, M. Stukova et al. // *Vaccine* – 2015. – V. 33. – № 39. – p. 5110-7.
285. Rudenko, L. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial / L. Rudenko, I. Isakova-Sivak, A. Naykhin et al. // *Lancet Infect Dis* – 2016. – V. 16. – № 3. – p. 303-10.
286. Rudenko, L.G. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia / L.G. Rudenko, A.N. Slepushkin, A.S. Monto et al. // *J Infect Dis* – 1993. – V. 168. – № 4. – p. 881-7.
287. Rudenko, L.G. Clinical and epidemiological evaluation of a live, cold-adapted influenza vaccine for 3-14-year-olds / L.G. Rudenko, N.I. Lonskaya, A.I. Klimov et al. // *Bull World Health Organ* – 1996. – V. 74. – № 1. – p. 77-84.
288. Rudenko, L.G. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and US inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents / L.G. Rudenko, N.H. Arden, E. Grigorieva et al. // *Vaccine* – 2000. – V. 19. – № 2-3. – p. 308-18.

289. Ruigrok, R.W.H. Nucleoproteins of Negative Strand RNA Viruses; RNA Binding, Oligomerisation and Binding to Polymerase Co-Factor / R.W.H. Ruigrok, T. Crépin// *Viruses* – 2010. – V. 2. – № 1. – p. 27-32.
290. Sadoff, J. Safety and Immunogenicity of the Ad26.RSV.preF Investigational Vaccine Coadministered With an Influenza Vaccine in Older Adults / J. Sadoff, E. De Paepe, W. Haazen et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2021. – V. 223. – № 4. – p. 699-708.
291. Sadoff, J. Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in Healthy Adults by a Single Immunization of Ad26.RSV.preF in a Human Challenge Study / J. Sadoff, E. De Paepe, J. DeVincenzo et al. // *J Infect Dis* – 2022. – V. 226. – № 3. – p. 396-406.
292. Saeland, E. Immunogenicity and protective efficacy of adenoviral and subunit RSV vaccines based on stabilized prefusion F protein in pre-clinical models / E. Saeland, L. van der Fits, R. Bolder et al. // *Vaccine* – 2022. – V. 40. – № 6. – p. 934-944.
293. Salk, J.E. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress / J.E. Salk // *J Am Med Assoc* – 1953. – V. 151. – № 13. – p. 1081-98.
294. Samy, N. Safety and immunogenicity of novel modified vaccinia Ankara-vectored RSV vaccine: A randomized phase I clinical trial / N. Samy, D. Reichhardt, D. Schmidt et al. // *Vaccine* – 2020. – V. 38. – № 11. – p. 2608-2619.
295. Santangelo, P.J. Dynamics of filamentous viral RNPs prior to egress / P.J. Santangelo, G. Bao// *Nucleic Acids Research* – 2007. – V. 35. – № 11. – p. 3602-3611.
296. Saravia, J. Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33 / J. Saravia, D. You, B. Shrestha et al. // *PLoS pathogens* – 2015. – V. 11. – № 10. – p. e1005217.
297. Sasso, E. New viral vectors for infectious diseases and cancer / E. Sasso, A.M. D'Alise, N. Zambrano et al. // *Semin Immunol* – 2020. – V. 50. – №. – p. 101430.
298. Sastry, M. Adjuvants and the vaccine response to the DS-Cav1-stabilized fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus / M. Sastry, B. Zhang, M. Chen et al. // *PLoS One* – 2017. – V. 12. – № 10. – p. e0186854.
299. Sato, Y. Development of acellular pertussis vaccines / Y. Sato, H. Sato// *Biologicals* – 1999. – V. 27. – № 2. – p. 61-9.
300. Scaggs Huang, F. Safety and immunogenicity of an intranasal sendai virus-based vaccine for human parainfluenza virus type I and respiratory syncytial virus (SeVRSV) in adults / F. Scaggs Huang, D.I. Bernstein, K.S. Slobod et al. // *Hum Vaccin Immunother* – 2021. – V. 17. – № 2. – p. 554-559.

301. Schenkel, J.M. Sensing and alarm function of resident memory CD8<sup>+</sup> T cells / J.M. Schenkel, K.A. Fraser, V. Vezys et al. // *Nature Immunology* – 2013. – V. 14. – № 5. – p. 509-513.
302. Schenkel, J.M. Tissue-Resident Memory T Cells / J.M. Schenkel, D. Masopust// *Immunity* – 2014. – V. 41. – № 6. – p. 886-897.
303. Scher, G. Rhabdoviruses as vectors for vaccines and therapeutics / G. Scher, M.J. Schnell// *Curr Opin Virol* – 2020. – V. 44. – №. – p. 169-182.
304. Schickli, J.H. Nonclinical phenotypic and genotypic analyses of a Phase 1 pediatric respiratory syncytial virus vaccine candidate MEDI-559 (rA2cp248/404/1030ΔSH) at permissive and non-permissive temperatures / J.H. Schickli, J. Kaur, R.S. Tang et al. // *Virus Research* – 2012. – V. 169. – № 1. – p. 38-47.
305. Schmidt, M.E. The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections / M.E. Schmidt, S.M. Varga// *Front Immunol* – 2018. – V. 9.– p. 678.
306. Schmidt, M.E. Memory CD8 T cells mediate severe immunopathology following respiratory syncytial virus infection / M.E. Schmidt, C.J. Knudson, S.M. Hartwig et al. // *PLoS pathogens* – 2018. – V. 14. – № 1. – p. e1006810.
307. Schwarz, T.F. Three Dose Levels of a Maternal Respiratory Syncytial Virus Vaccine Candidate Are Well Tolerated and Immunogenic in a Randomized Trial in Nonpregnant Women / T.F. Schwarz, C. Johnson, C. Grigat et al. // *J Infect Dis* – 2022. – V. 225. – № 12. – p. 2067-2076.
308. Sellers, R.S. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice / R.S. Sellers, C.B. Clifford, P.M. Treuting et al. // *Veterinary Pathology* – 2012. – V. 49. – № 1. – p. 32-43.
309. Semple, M.G. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infants is associated with reduced airway interferon gamma and substance P / M.G. Semple, H.M. Dankert, B. Ebrahimi et al. // *PloS One* – 2007. – V. 2. – № 10. – p. e1038.
310. Shahabi, A. Assessing Variation in the Cost of Palivizumab for Respiratory Syncytial Virus Prevention in Preterm Infants / A. Shahabi, D. Peneva, D. Incerti et al. // *Pharmacoecon Open* – 2018. – V. 2. – № 1. – p. 53-61.
311. Shahriari, S. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding / S. Shahriari, J. Gordon, R. Ghildyal et al. // *Virol J* – 2016. – V. 13. – № 1. – p. 161.
312. Shan, J. The immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus vaccines in development: A systematic review / J. Shan, P.N. Britton, C.L. King et al. // *Influenza and Other Respiratory Viruses* – 2021. – V. 15. – № 4. – p. 539-551.

313. Shao, Y. SARS-CoV-2 vaccine research and immunization strategies for improved control of the COVID-19 pandemic / Y. Shao, Y. Wu, Y. Feng et al. // *Front Med* – 2022. – V. 16. – № 2. – p. 185-195.
314. Shi, T. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study / T. Shi, D.A. McAllister, K.L. O'Brien et al. // *Lancet (London, England)* – 2017. – V. 390. – № 10098. – p. 946-958.
315. Shin, H. vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells / H. Shin, A. Iwasaki // *Nature* – 2012. – V. 491. – № 7424. – p. 463-467.
316. Simoes, E.A.F. Prefusion F Protein-Based Respiratory Syncytial Virus Immunization in Pregnancy / E.A.F. Simoes, K.J. Center, A.T.N. Tita et al. // *N Engl J Med* – 2022. – V. 386. – № 17. – p. 1615-1626.
317. Skon, C.N. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8<sup>+</sup> T cells / C.N. Skon, J.-Y. Lee, K.G. Anderson et al. // *Nature Immunology* – 2013. – V. 14. – № 12. – p. 1285-1293.
318. Smith, G. Recombinant nanoparticle rsv f vaccine for respiratory syncytial virus / G. Smith, Y. Wu, M. Massare // Novavax, Inc., O. World Intellectual Property, Editor. –2013 –  
Режим доступа:  
<https://patentimages.storage.googleapis.com/f2/95/e7/7f0b57de1e5a68/WO2013049342A1.pdf>
319. Son, Y.M. Tissue-resident CD4<sup>+</sup> T helper cells assist the development of protective respiratory B and CD8<sup>+</sup> T cell memory responses / Y.M. Son, I.S. Cheon, Y. Wu et al. // *Science Immunology* – 2021. – V. 6. – № 55. – p. eabb6852.
320. Soto, J.A. Current Insights in the Development of Efficacious Vaccines Against RSV / J.A. Soto, L.M. Stephens, K.A. Waldstein et al. // *Frontiers in Immunology* – 2020. – V. 11. – №. – p. 1507.
321. Spann, K.M. Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3, NF- $\kappa$ B, and Proinflammatory Cytokines / K.M. Spann, K.C. Tran, P.L. Collins et al. // *Journal of Virology* – 2005. – V. 79. – № 9. – p. 5353-5362.
322. Steinert, E.M. Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance / E.M. Steinert, J.M. Schenkel, K.A. Fraser et al. // *Cell* – 2015. – V. 161. – № 4. – p. 737-749.
323. Stensballe, L.G. syncytial virus neutralizing antibodies in cord blood, respiratory syncytial virus hospitalization, and recurrent wheeze / L.G. Stensballe, H. Ravn, K.

- Kristensen et al. // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2009. – V. 123. – № 2. – p. 398-403.
324. Stepanova, E.A. Amino Acid Substitutions N123D and N149D in Hemagglutinin Molecule Enhance Immunogenicity of Live Attenuated Influenza H7N9 Vaccine Strain in Experiment / E.A. Stepanova, T.S. Kotomina, V.A. Matyushenko et al. // *Bull Exp Biol Med* – 2019. – V. 166. – № 5. – p. 631-636.
325. Stobart, C.C. A live RSV vaccine with engineered thermostability is immunogenic in cotton rats despite high attenuation / C.C. Stobart, C.A. Rostad, Z. Ke et al. // *Nature Communications* – 2016. – V. 7. – №. – p. 13916.
326. Stokes, A.H. Repeated Dose Toxicity Study and Developmental and Reproductive Toxicology Studies of a Respiratory Syncytial Virus Candidate Vaccine in Rabbits and Rats / A.H. Stokes, Franklin, D.E. Fisher et al. // *Int J Toxicol* – 2021. – V. 40. – № 2. – p. 125-142.
327. Stokes, K.L. Differential pathogenesis of respiratory syncytial virus clinical isolates in BALB/c mice / K.H. Stokes, M.H. Chi, K. Sakamoto et al. // *Journal of Virology* – 2011. – V. 85. – № 12. – p. 5782-5793
328. Stuart, A.S.V. Phase 1/2a Safety and Immunogenicity of an Adenovirus 26 Vector Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine Encoding Prefusion F in Adults 18-50 Years and RSV-Seropositive Children 12-24 Months / A.S.V. Stuart, M. Virta, K. Williams et al. // *J Infect Dis* – 2022. – V. 227. – № 1. – p. 71-82.
329. Su, C. RSV pre-fusion F protein enhances the G protein antibody and anti-infectious responses / C. Su, Y. Zhong, G. Zhao et al. // *NPJ Vaccines* – 2022. – V. 7. – № 1. – p. 168.
330. Sung, R.Y. A comparison of cytokine responses in respiratory syncytial virus and influenza A infections in infants / R.Y. Sung, S.H. Hui, C.K. Wong et al. // *European Journal of Pediatrics* – 2001. – V. 160. – № 2. – p. 117-122.
331. Swarnalekha, N. T resident helper cells promote humoral responses in the lung / N. Swarnalekha, D. Schreiner, L.C. Litzler et al. // *Science Immunology* – 2021. – V. 6. – № 55. – p. eabb6808.
332. Swedan, S. Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location / S. Swedan, J. Andrews, T. Majumdar et al. // *Journal of Virology* – 2011. – V. 85. – № 19. – p. 10090-10100.
333. Takamura, S., Persistence in Temporary Lung Niches: A Survival Strategy of Lung-Resident Memory CD8+T Cells / S. Takamura// *VIRAL IMMUNOLOGY* – 2017. – V.30 – p. Pp. 438–450.

334. Tamura, S.-i. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines / S.-i. Tamura, T. Tanimoto, T. Kurata et al. // *Japanese Journal of Infectious Diseases* – 2005. – V. 58. – № 4. – p. 195-207.
335. Taylor, G. Efficacy of a virus-vectored vaccine against human and bovine respiratory syncytial virus infections / G. Taylor, M. Thom, S. Capone et al. // *Sci Transl Med* – 2015. – V. 7. – № 300. – p. 300ra127.
336. Techaarpornkul, S. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene / S. Techaarpornkul, N. Barretto, M.E. Peeples et al. // *J Virol* – 2001. – V. 75. – № 15. – p. 6825-34.
337. Topham, D.J. Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells: From Phenotype to Function / D.J. Topham, E.C. Reilly // *Frontiers in Immunology* – 2018. – V. 9. – №. – p. 515.
338. Travieso, T. The use of viral vectors in vaccine development / T. Travieso, J. Li, S. Mahesh et al. // *NPJ vaccines* – 2022. – V. 7. – № 1. – p. 75.
339. Vallbracht, S. Influence of a single viral epitope on T cell response and disease after infection of mice with respiratory syncytial virus / S. Vallbracht, B. Jessen, S. Mrusek et al. // *J Immunol* – 2007. – V. 179. – № 12. – p. 8264-73.
340. van Benten, I.J. RSV-induced bronchiolitis but not upper respiratory tract infection is accompanied by an increased nasal IL-18 response / I.J. van Benten, C.M. van Drunen, L.P. Koopman et al. // *Journal of Medical Virology* – 2003. – V. 71. – № 2. – p. 290-297.
341. Van Braeckel-Budimir, N. Bacterium-like particles for efficient immune stimulation of existing vaccines and new subunit vaccines in mucosal applications / N. Van Braeckel-Budimir, B.J. Haijema, K. Leenhouts et al. // *Frontiers in Immunology* – 2013. – V. 4. – №. – p. 282.
342. van Erp, E.A., Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Infection in BALB/c Mice Differs Between Intratracheal and Intranasal Inoculation / E.A. van Erp, A.J. Lakerveld, H.L. Mulder // *Viruses* – 2019. – V. 11. – № 6.
343. Vaxart, A Phase 1, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Trial to Determine the Safety and Immunogenicity of an Adenoviral-Vector Based Respiratory Syncytial Virus (RSV) F Protein Vaccine (VXA-RSV-f) Expressing Protein F and dsRNA Adjuvant Administered Orally to Healthy Volunteers [Электронный ресурс] / Vaxart // 2018. - Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02830932>.
344. Vieira, R.A. Correlation between inflammatory mediators in the nasopharyngeal secretion and in the serum of children with lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus and disease severity / R.A. Vieira, E.M.d.A. Diniz, M.E.J.R.

- Ceccon// *Jornal Brasileiro De Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira De Pneumologia E Tisiologia* – 2010. – V. 36. – № 1. – p. 59-66.
345. Vigerust, D.J. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions / D.J. Vigerust, V.L. Shepherd// *Trends in Microbiology* – 2007. – V. 15. – № 5. – p. 211-218.
346. Vigna, E. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy / E. Vigna, L. Naldini// *The Journal of Gene Medicine* – 2000. – V. 2. – № 5. – p. 308-316.
347. Vissers, M. Mucosal IgG Levels Correlate Better with Respiratory Syncytial Virus Load and Inflammation than Plasma IgG Levels / M. Vissers, Ahout, M.I. de Jonge et al. // *Clin Vaccine Immunol* – 2015. – V. 23. – № 3. – p. 243-5.
348. Vrba, S.M. Development and Applications of Viral Vected Vaccines to Combat Zoonotic and Emerging Public Health Threats / S.M. Vrba, N.M. Kirk, M.E. Brisse et al. // *Vaccines (Basel)* – 2020. – V. 8. – № 4.
349. Wakim, L.M. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues / L.M. Wakim, Waithman, N. van Rooijen et al. // *Science (New York, N.Y.)* – 2008. – V. 319. – № 5860. – p. 198-202.
350. Wakim, L.M. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence / L.M. Wakim, Woodward-Davis, M.J. Bevan et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2010. – V. 107. – № 42. – p. 17872-17879.
351. Wakim, L.M. Enhanced survival of lung tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells during infection with influenza virus due to selective expression of IFITM3 / L.M. Wakim, N. Gupta, J.D. Mintern et al. // *Nature Immunology* – 2013. – V. 14. – № 3. – p. 238-245.
352. Wakim, L.M. Antibody-targeted vaccination to lung dendritic cells generates tissue-resident memory CD8 T cells that are highly protective against influenza virus infection / L.M. Wakim, J. Smith, I. Caminschi et al. // *Mucosal Immunology* – 2015. – V. 8. – № 5. – p. 1060-1071.
353. Walsh, E.E. Respiratory syncytial virus infection in adult populations / E.E. Walsh, A.R. Falsey// *Infectious Disorders Drug Targets* – 2012. – V. 12. – № 2. – p. 98-102.
354. Walsh, E.E. Viral shedding and immune responses to respiratory syncytial virus infection in older adults / E.E. Walsh, D.R. Peterson, A.E. Kalkanoglu et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2013. – V. 207. – № 9. – p. 1424-1432.
355. Walsh, E.E. A Randomized Phase 1/2 Study of a Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Vaccine / E.E. Walsh, A.R. Falsey, D.A. Scott et al. // *J Infect Dis* – 2022. – V. 225. – № 8. – p. 1357-1366.

356. Wareing, M.D. Immunogenic and isotype-specific responses to Russian and US cold-adapted influenza a vaccine donor strains A/Leningrad/134/17/57, A/Leningrad/134/47/57, and A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) in mice / M.D. Wareing, J.M. Watson, M.J. Brooks et al. // *J Med Virol* – 2001. – V. 65. – № 1. – p. 171-177.
357. Welliver, T.P. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses / T.P. Welliver, R.P. Garofalo, Y. Hosakote et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2007. – V. 195. – № 8. – p. 1126-1136.
358. Welliver, T.P. Respiratory syncytial virus and influenza virus infections: observations from tissues of fatal infant cases / T.P. Welliver, J.L. Reed, R.C. Welliver et al. // *The Pediatric Infectious Disease Journal* – 2008. – V. 27. – № 10 Suppl. – p. S92-96.
359. WHO [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.who.int/news/item/13-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year>
360. Widjoatmodjo, M.N. A highly attenuated recombinant human respiratory syncytial virus lacking the G protein induces long-lasting protection in cotton rats / M.N. Widjoatmodjo, J. Boes, M. van Bers et al. // *Virol J* – 2010. – V. 7. – p. 114.
361. Widjoatmodjo, M.N. Recombinant low-seroprevalent adenoviral vectors Ad26 and Ad35 expressing the respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein induce protective immunity against RSV infection in cotton rats / M.N. Widjoatmodjo, L. Bogaert, B. Meek et al. // *Vaccine* – 2015. – V. 33. – № 41. – p. 5406-5414.
362. Wileman, T., Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? / T. Wileman, // *Annual Review of Microbiology* – 2007. – V. 61. – p. 149-167.
363. Williams, K. Phase 1 Safety and Immunogenicity Study of a Respiratory Syncytial Virus Vaccine With an Adenovirus 26 Vector Encoding Prefusion F (Ad26.RSV.preF) in Adults Aged  $\geq 60$  Years / K. Williams, A.R. Bastian, R.A. Feldman et al. // *J Infect Dis* – 2020. – V. 222. – № 6. – p. 979-988.
364. Woolums, A.R. Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis and Vaccine Development: Opportunities and Future Directions / *Human Respiratory Syncytial Virus Infection* – 2011. – p. 43-62.
365. Wright, P.F. Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy / P.F. Wright, R.A. Karron, R.B. Belshe et al. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2000. – V. 182. – № 5. – p. 1331-1342.
366. Wright, P.F. The absence of enhanced disease with wild type respiratory syncytial virus infection occurring after receipt of live, attenuated, respiratory syncytial virus vaccines / P.F. Wright, R.A. Karron, R.B. Belshe et al. // *Vaccine* – 2007. – V. 25. – № 42. – p. 7372-7378.



367. Wu, T. Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection / T. Wu, Y. Hu, Y.-T. Lee et al. // *Journal of Leukocyte Biology* – 2014. – V. 95. – № 2. – p. 215-224.
368. Wu, W. The interactome of the human respiratory syncytial virus NS1 protein highlights multiple effects on host cell biology / W. Wu, K.C. Tran, M.N. Teng et al. // *J Virol* – 2012. – V. 86. – № 15. – p. 7777-89.
369. Yan, Z. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy / Z. Yan, Y. Zhang, D. Duan et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2000. – V. 97. – № 12. – p. 6716-6721.
370. Ye, Q. Epidemiological characteristics and immune status of children with Respiratory Syncytial Virus / Q. Ye, W.-X. Shao, S.-Q. Shang et al. // *Journal of Medical Virology* – 2015. – V. 87. – № 2. – p. 323-329.
371. Zens, K.D. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection / K.D. Zens, J.K. Chen, D.L. Farber et al. // *JCI insight* – 2016. – V. 1. – № 10. – p. e85832,-85832.
372. Zhang, N. Transforming growth factor- $\beta$  signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention / N. Zhang, M.J. Bevan // *Immunity* – 2013. – V. 39. – № 4. – p. 687-696.
373. Zheng, M.Z.M. Tissue resident memory T cells in the respiratory tract / M.Z.M. Zheng, L.M. Wakim // *Mucosal Immunology* – 2022. – V. 15. – № 3. – p. 379-388.
374. Zhou, A.C. Intrinsic 4-1BB signals are indispensable for the establishment of an influenza-specific tissue-resident memory CD8 T-cell population in the lung / A.C. Zhou, L.E. Wagar, M.E. Wortzman et al. // *Mucosal Immunology* – 2017. – V. 10. – № 5. – p. 1294-1309.
375. Zohar, T. Upper and lower respiratory tract correlates of protection against respiratory syncytial virus following vaccination of nonhuman primates / T. Zohar, J.C. Hsiao, N. Mehta et al. // *Cell Host Microbe* – 2022. – V. 30. – № 1. – p. 41-52 e5.
376. Zuniga, A. An epitope-specific chemically defined nanoparticle vaccine for respiratory syncytial virus / A. Zuniga, O. Rassek, M. Vrohling et al. // *NPJ Vaccines* – 2021. – V. 6. – № 1. – p. 85.

## Приложение 1

## Результаты доклинических испытаний вакцинных кандидатов против РСВ

Вакцина [разработчик]	Состав вакцины [Адьювант]	Животные [путь введения]	Исследование и результаты	Сс.
<b>Живые аттенуированные вакцины</b>				
RSV-MinL4•0 [Codagenix, США]	RSV-Min L – вакцинный кандидат, полученный при помощи внесения «молчащих» мутаций (кодонная де- оптимизация) [Без адьюванта]	Африканские зеленые мартышки  [и.н. + и.т.]	RSV-MinL4•0 более аттенуирован, чем РСВ А2 при введении $2 \times 10^6$ БОЕ (по $10^6$ и.н. и и.т.): значение пиковых вирусных титров в мазках из трахеи в группе иммунизированных RSV-MinL4 в 100 раз меньше, чем в группе wt РСВ. При заражении РСВ А2 в дозе $2 \times 10^6$ БОЕ на 104 день эксперимента выявили защитный потенциал RSV-MinL4•0: пиковые значения по выделению вируса на 6 день в мазках из трахеи и из ротоглотки были в 1000 и в 100 раз меньше, чем в группе наивных мартышек, соответственно.	[239]
IT-RSVΔG [Intravacc, Нидерланды]	Изолят РСВ штамм 98- 25147-X (pPCB-X), у которого удален ген, кодирующий G белок (ΔG)  [Без адьюванта]	Хлопковые крысы  [и.н.]	pPCB-X ΔG был более аттенуирован по сравнению с вектором pPCB-X при введении $10^5$ ТЦИД <sub>50</sub> : значение пиковых титров в легких и носках было в 4-5 раз ниже, чем в группе pPCB-X. Однократная вакцинация pPCB-X ΔG защитила крыс от заражения вирусом РСВ-X в дозе $10^6$ ТЦИД <sub>50</sub> : на 5-й день после челленджа вирус не обнаруживали в легких иммунизированных животных, тогда как в группе плацебо вирус размножился до $5 \log_{10}$ ТЦИД <sub>50</sub> в легких. Вакцинация pPCB-X ΔG не приводила к развитию бронхолегочной патологии, а гистопатологические признаки поражения были значительно снижены по сравнению с группой наивного контроля.	[360]
MV-012–968 [Meissa, США]	RSV-A2-dNS1-dNS2- ΔSH-dGmGsnul-line19F кодонная деооптимизация генов NS1, NS2; удален ген SH (ΔSH). F белок в конформации «до	Мыши BALB/c  [и.н.]	При введении MV-012–968 в дозе $10^6$ фокус-формирующих единиц (FFU) вирусная нагрузка в легких была достоверно ниже, чем у мышей, зараженных РСВ А2 и РСВ А2-19F. Вакцинация MV-012–968 обеспечивала защиту мышей от заражения РСВ А2-line19F в дозе $10^5$ БОЕ: в группе MV-012–968 вирус не выделялся спустя 5 дней после челленджа. Продукция слизи в легких у кандидата MV-012–968 была достоверно ниже, чем у РСВ А2-line 19F и RSV A2-del-M2 на 5 сутки после челленджа.	[325]

	слияния». В ген G введена точечная мутация (M48I) для подавления экспрессии секретрируемой формы белка G (Gsnul). Мембраносвязывающая форма Gm подвергнута кодонной оптимизации (dGm) [Без адьюванта]	Хлопковые крысы  [и.н.]	Репликация MV-012-968 (OE4), введенного в дозе $10^5$ FFU, отсутствовала в носках и легких хлопковых крыс. MV-012-968 (OE4) полностью защищала крыс от заражения PCB-A2-line19F в дозе $10^6$ FFU на 42 день после вакцинации. В отличие от ФИ-PCB, вакцинация MV-012-968 (OE4) не вызывала гистопатологических изменений в легких после заражения PCB.	[19]
RSV ΔNS2/ Δ1313 / I1314L [NIAID/NIH, Sanofi, США]	Кандидат с ts мутациями в L белке (делеция в 1313 положении, компенсаторная мутация I1314L, которая появляется в результате пассирования вируса при постепенно повышающихся температурах); делеция NS2 (ΔNS2)  [Без адьюванта]	Мыши BALB/c  [и.н.]	Кандидат RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L гиператтенуирован для мышей. Вариант RSV/Δ1313 при введении в дозе $10^6$ БОЕ размножался в дыхательных путях мышей значительно слабее по сравнению с wt PCB. Эта животная модель не подходит для оценки иммуногенности и защитной эффективности гиператтенуированных вакцинных кандидатов.	[202, 203]
		Ювенильные шимпанзе  [и.н. + и.т.]	При иммунизации шимпанзе RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L в дозе по $10^6$ БОЕ (и.н. + и.т.) пиковые значения вирусной нагрузки были в 3-25 раз ниже по сравнению с высокоаттенуированными кандидатами MEDI-559 (rA2 cp248/404/1030ΔSH) и cps2 (генетически стабилизированная версия MEDI-559) в носовых смывах. Титр вируса RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L в БАЛ и смывах из трахеи, наоборот, был в 20 раз выше, чем в группах сравнения. Вакцина индуцировала высокие уровни PCB вирус-нейтрализующих антител, однако экспериментов по защите от РС инфекции в данной работе не проводились.	[203]
<b>Рекомбинантные векторные вакцины</b>				
MVA-BN RSV [Bavarian Nordic BN, Дания]	MVA (модифицированная вакцина Анкара), в состав которой включены гены,	Мыши: BALB/c,  [и.н.]	Мышей иммунизировали MVA-BN RSV в дозе $1 \times 10^8$ ТЦИД <sub>50</sub> с интервалом в 3 недели и через 2 недели заражали PCB A2 в дозе $1 \times 10^6$ БОЕ. Через 4 дня после челленджа вирус в легких не был обнаружен. В группах, в которых применяли селективную деплецию CD4 и CD8 Т-клеток, вирус размножался в легких в 600-2000 раз слабее, чем в группе контроля.	[84]

	<p>кодирующие F, G, N и M2-1 (PCB A) и G (PCB B) [Без адьюванта]</p>			
<p>PanAd3-RSV и MVA-RSV [ReiThera, Италия]</p>	<p>PanAd3 (аденовирус обезьян) и MVA, в состав которых включены гены, кодирующие F, N, M2-1 (PCB)  [Без адьюванта]</p>	<p>Хлопковые крысы  [и.н., в.м.]</p>	<p>PanAd3-RSV (<math>5 \times 10^8</math> вирусных частиц) и MVA-RSV (<math>1 \times 10^7</math> БОЕ) вводили в разных комбинациях с интервалом в 4 недели. Во всех группах крысы были защищены от PCB, введенного в дозе <math>1 \times 10^5</math> БОЕ: на 5-е сутки вирус не размножился в легких. Челлендж-вирус не размножился в носках в группах PanAd3-RSV [и.н]/ MVA[в.м] и PanAd3-RSV [и.н]/ PanAd3-RSV [и.н]. Патологические изменения в легких после челленджа были менее выражены в группе PanAd3-RSV [и.н]/ MVA[в.м] по сравнению с группой ФИ-PCB, тогда как остальные группы демонстрировали гистопатологию, схожую с группой наивного контроля после челленджа.</p>	[335]
		<p>Телята (2-4 недели)  [и.н., в.м.]</p>	<p>PanAd3-RSV (<math>5 \times 10^{10}</math> вирусных частиц) и MVA (<math>2 \times 10^7</math> БОЕ) вводили телятам в разных комбинациях с интервалом 4 недели. На 6-й день после челленджа PCB, введенный в дозе <math>10^4</math> БОЕ, не реплицировался в дыхательных путях телят из групп PanAd3-RSV [и.н]/ MVA[в.м], PanAd3-RSV [в.м]/ PanAd3-RSV [в.м], PanAd3-RSV [и.н]/ PanAd3-RSV [в.м], PanAd3-RSV [в.м]/ MVA[в.м]. В группе PanAd3-RSV [и.н]/ PanAd3-RSV [и.н] вирус размножился в легких. В группе PanAd3-RSV [и.н]/ MVA [в.м] вирус не обнаруживали в носках и не обнаруживали макроскопических поражений легких. У телят, иммунизированных по схеме гетерологичного прайм-буста, после челленджа в меньшей степени развивалась массивная инфильтрация полиморфноядерных нейтрофилов в легких и БАЛ по сравнению с телятами из групп гомологичного прайм-буста.</p>	[335]
		<p>Макаки  [и.н., в.м.]</p>	<p>PanAd3-RSV (<math>5 \times 10^{10}</math> вирусных частиц) и MVA (<math>2 \times 10^7</math> БОЕ) вводили макакам в разных комбинациях с интервалом 8 недели. Продукция ИФН-<math>\gamma</math> и ИЛ-4 в PBMC усиливалась в 6 раз после буста. Продукция ИЛ-4 в PBMC была выше в группе PanAd3-RSV [и.н.]/ MVA [в.м] по сравнению с PanAd3-RSV [в.м]/ MVA [в.м]. Спустя неделю после второй иммунизации в PBMC преобладала популяция CD4+ Т-клеток. Только у макак, иммунизированных PanAd3-RSV [и.н.], вырабатывались PCB-</p>	[262]

			специфические IgA. У макак, иммунизированных PanAd3-RSV [в.м], в 40 раз был выше титр нейтрализующих антител по сравнению с PanAd3-RSV [и.н]. Защитный эффект иммунизации не оценивали.	
Ad26.RSV.F и Ad35.RSV.F [Janssen Vaccines, Нидерланды]	Аденовирусы 26 и 35 типов, в состав которых входит ген, кодирующий F в конформации «до слияния» [Нет адьюванта]	Мыши BALB/c [в.м.]	Двукратная иммунизация мышей с интервалом в 4 недели кандидатами Ad26.RSV.F и Ad.35.RSV.F в разных комбинациях в дозе $10^{10}$ вирусных частиц стимулировала выработку РСВ F-специфического Т-клеточного иммунного ответа на 12 неделе: высокие уровни продукции ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ и ИЛ-2 CD8 Т клетками были в группе Ad.35.RSV.F/Ad26.RSV.F и Ad.26.RSV.F/Ad35.RSV.F. Иммунный ответ у мышей во всех группах развивался по типу Th1: фиксировались высокие соотношения IgG2a/IgG1 по сравнению с группой ФИ-PCB. Высокий уровень нейтрализующих антител в группах Ad.35.RSV.F/Ad26.RSV.F и Ad.26.RSV.F/Ad35.RSV.F.	[361]
		Хлопковые крысы [в.м.]	Двукратная иммунизация вариантами Ad26.RSV.F и Ad.35.RSV.F по схеме гомологичного и гетерологичного прайм-буста в дозе $10^{10}$ вирусных частиц индуцировала высокие уровни вирус-нейтрализующих антител и полностью защищала животных от репликации РСВ в респираторном тракте, не вызывая патологических изменений в тканях легких после челленджа. Была оценена возможность снижения дозы вакцины, для чего животных однократно иммунизировали Ad26.RSV.F и Ad.35.RSV.F в дозах $10^6$ - $10^8$ вирусных частиц и подвергали заражению РСВ А2 спустя 7 недель. Все иммунизированные животные были полностью защищены от размножения вируса в легких, а репликация в носях была значительно снижена во всех группах по сравнению с контролем. Баллы гистопатологии в обеих группах были одинаковы и не отличались от группы наивного контроля. Длительность и кросс-протективный потенциал вакцины оценивали путем двукратной иммунизации крыс по схеме гомологичного и гетерологичного прайм-буста кандидатами, взятыми в дозах $10^8$ и $10^{10}$ вирусных частиц, и заражением животных РСВ А2 либо РСВ В15/9 через 30 неделе после иммунизации. Челлендж-вирусы не реплицировались в легких во всех вакцинных группах, при этом комбинация Ad26.RSV.F/Ad.35.RSV.F ( $10^{10}$ вирусных частиц) лучше защищала животных от репликации РСВ В15/9 в	[361]

			носах. В отличие от ФИ-PCB, исследуемые вакцины не вызывали гистопатологических изменений в тканях легких после челленджа.	
		Хлопковые крысы [в.м.]	Сравнивали защитную эффективность однократной иммунизации Ad26.RSV.preF в дозе $10^5$ - $10^8$ вирусных частиц и двукратной иммунизации белком RSV.preF. На 49 день крысам вводили PCB A2 в дозе $10^5$ БОЕ. В группе Ad26.RSV.preF челлендж-вирус не размножился в носгах и легких в отличие от группы RSV.preF. Была установлена корреляция между выработкой нейтрализующих антител и защитой животных от заражения PCB.	[292]
VXA-RSV f пероральная [Vaxart, США]	Ad-RSVF Аденовирус 5 типа, который содержит ген, кодирующий полноразмерный F белок [Нет адьюванта]	Хлопковые крысы [п.о.]	Двукратная иммунизация крыс Ad-RSVF в разных дозах ( $10^8$ - $10^{10}$ БОЕ) защитила крыс от заражения PCB A2 в дозе $1 \times 10^5$ БОЕ на 70 день: вирус не размножился в носгах и легких в группе, где доза вакцины была больше (дозозависимый защитный эффект иммунизации). Уровень гистопатологии в группе Ad-RSVF был намного ниже, чем в группе ФИ-PCB. В группе Ad-RSVF уровень индукции провоспалительных цитокинов был минимальным.	[153]
ChAd155-RSV GS [GSK, Великобритания]	Аденовирус шимпанзе, содержащий гены, кодирующие F белок (делеция трансмембранной области), N, M2-1. [Нет адьюванта]	Телята [в.м.]	Телят иммунизировали ChAd155-RSV в дозе $5 \times 10^{10}$ . Челлендж проводили спустя короткий (4 недели) или длинный (16 недель) период после иммунизации. В отличие ChAd155-RSV у неиммунизированных телят наблюдались лихорадка, высокая температура, респираторный дистресс-синдром, высокий уровень легочной консолидации и гистопатологические изменения в легочной ткани после челленджа. Когда челлендж проводили спустя 4 недели, репликация вируса в БАЛ и назофарингеальных смывах у неиммунизированных была в 500-1000 и в 10 раз выше соответственно, чем в группе ChAd155-RSV. В случае, когда челлендж проводили на 16 неделе, в группах ChAd155-RSV и PBS пиковые значения вирусного титра в БАЛ и носовых смывах были примерно одинаковыми, но вирусный клиренс наступал раньше. С целью установления роли предсуществующий иммунитета к PCB, телят кормили молозивом с содержанием антител к PCB до иммунизации ChAd155-RSV или PBS. В группе ChAd155-RSV у телят с антителами к PCB отсутствовали признаки РС-инфекции (недомогание, лихорадка, учащение дыхания) в отличие от группы PBS, где у телят были	[73]

			антитела к РСВ. В группах ChAd155-RSV с антителами к РСВ, челлендж-вирус размножался в 100 и 10 раз меньше в БАЛ и носовой полости, чем в группе PBS.	
SeV/RSV [Национальный институт аллергологии и инфекционных заболеваний, США]	Вирус Сендай (вирус парагриппа 1 типа), который содержит ген, кодирующий полноразмерный F (PCB) [Нет адьюванта]	Африканские зеленые мартышки  [и.н.+и.т.]	SeV/RSV был аттенуированным при введении в дозе $2 \times 10^6$ ЭИД <sub>50</sub> . Вирус не выделялся в носовых смывах, был в 1000 раз более ослабленным, чем b/h PIV-3 RSV F2. На 28 день мартышек заражали RSV A2 в дозе $1.4 \times 10^6$ БОЕ. Челлендж вирус выделялся в верхних дыхательных путях в группе SeV/RSV в меньшей степени по сравнению с контролем и не выделялся из БАЛ. В группе SeV/RSV после челленджа не наблюдались побочные эффекты. В срезах легких были обнаружены небольшие очаги лимфогистиоцитарного воспаления вокруг терминальных и респираторных бронхиол.	[149]
rBCG-N-hRSV  [Католический университет Чили, Чили]	Бактерия Bacillus Calmette-Guerin (BCG), которая содержит ген, кодирующий N белок РСВ  [Нет адьюванта]	Мыши BALB/c  [п.к.]	Мышам вводили rBCG-N-hRSV, либо BCG-WT в дозе $3 \times 10^5$ БОЕ. Через 3 недели мышей заражали РСВ в дозе $1 \times 10^7$ БОЕ. В группах BCG-WT и неиммунизированных мышей потеря веса составила примерно 10%, тогда как в группе rBCG-N-hRSV потеря веса была незначительной. В группе rBCG-N-hRSV вирусная нагрузка в БАЛ была меньше в 7 и 300 раз, чем в группах BCG-WT и неиммунизированных мышей соответственно. В гистологических срезах легких в группе rBCG-N-hRSV воспаление было выражено в меньшей степени по сравнению с группами неиммунизированных мышей и BCG-WT. В исследовании долговременной защиты челлендж проводили спустя 50 дней после иммунизации. В группе rBCG-N-hRSV мыши меньше теряли вес по сравнению с другими группами, количество инфильтрующих клеток в БАЛ и вирусная нагрузка были ниже, чем в группах неиммунизированных мышей и BCG-WT.	[51]
		Мыши BALB/c [п.к.]	Мышей иммунизировали BCG-N, BCG-M2 в дозе $1 \times 10^8$ БОЕ. Мышей заражали интраназально РСВ в дозе $1 \times 10^7$ БОЕ. После челленджа мыши значительно теряли вес в группах контроля (BCG-WT, UV-RSV, BCG-OVA). В группах BCG-N и BCG-M2 потеря веса не происходила. КТ (компьютерная томография) продемонстрировала отсутствие признаков пневмонии и воспаления в легочной ткани в группах BCG-N, BCG-M2 в отличие от группы неиммунизированных мышей после челленджа. После	[40]

			челленджа в группах BCG-N, BCG-M2 не фиксировали активную инфильтрацию нейтрофилов в БАЛ по сравнению с неиммунизированными мышами. После челленджа группам BCG-N и BCG-M2 присваивали низкие баллы легочной гистопатологии, эквивалентные группе наивного контроля, которую не заражали РСВ. Установили, что иммунизация BCG-N и BCG-M2 стимулирует прежде всего Т-клеточный иммунитет: активируются Т-клетки с Th1-подобным паттерном секреции цитокинов.	
		Мыши BALB/c (с дефицитом RAG-1) [п.к.]	Мышей иммунизировали два раза с интервалом 10 дней BCG-N, BCG-M2, BCG-WT в дозе $1 \times 10^8$ БОЕ. Через 21 день мышей заражали РСВ в дозе $1 \times 10^7$ БОЕ. Мыши из группы BCG-N, активно теряли вес (наравне с неиммунизированными мышами, зараженными РСВ). После заражения РСВ в группах BCG-N и BCG-WT в БАЛ было большое количество инфильтрующих клеток - нейтрофилов и эозинофилов. На 6-той день после челленджа вирусная нагрузка в легких во всех группах была практически одинаковая. На 12-тый день снижение РС вирусной нагрузки наблюдали в группе мышей Balb/c (не RAG-1 KO). Эти результаты свидетельствуют о том, что для РСВ клиренса необходимы Т клетки, а механизмов врожденного иммунитета не достаточно для защиты от РС-инфекции.	[48]
		Телята голштинской породы [п.к.]	Телятам вводили rBCG-N-hRSV, либо WT-BCG в дозе $10^6$ БОЕ два раза с интервалом в 2 недели. Через 2 недели телят заражали РСВ в дозе $10^4$ ТЦИД <sub>50</sub> . У всех телят развивались признаки РС-инфекции (лихорадка, вялость, выделения из носа и глаз, легкая одышка), однако баллы по оценке клинического состояния в группах rBCG-N-hRSV и WT-BCG были ниже, чем у неиммунизированных. Не было различий в баллах по степени поражения легочной ткани в группах rBCG-N-hRSV, WT-BCG и неиммунизированных телят после челленджа и отсутствовали признаки вакцин-индуцированного усиления заболевания.	[75]
MVA-F и MVA-G [National Heart and Lung Institute, Великобритания] [Institute of	Вектор несущий кодирующие F и G белки РСВ MVA, гены, F и G	Мыши BALB/c [и.п.]	Двукратная иммунизация мышей вариантами MVA-F и MVA-G в дозе $10^8$ инфекционных единиц приводила к образованию выраженного гуморального и Т-клеточного иммунитета к РСВ. Заражение иммунизированных мышей РСВ в дозе $1.2 \times 10^6$ БОЕ показало ускоренную элиминацию вируса в группах MVA-F и MVA-G по сравнению группой	[251]



Molecular Virology, Германия]			мышей, иммунизированных вектором MVA. Признаки эозинофилии после челленджа отсутствовали в группах MVA-F и wtMVA и были небольшими в группе MVA-G. Тем не менее, в группе MVA-F был выражен лимфоцитоз (~50%) по сравнению с MVA-G (~20%). В группе MVA-G было больше полиморфноядерных клеток, что сопоставимо с группой ФИ-PCB. После челленджа мыши активно теряли вес в группах MVA-G (до 15%), MVA-F (~12%) и ФИ-PCB (~10%) по сравнению с группой контрольных животных после PCB-челленджа, что свидетельствует об обострении протекания заболевания после иммунизации и заражения PCB.	
rVV-G и rVV-F  [University of Pittsburgh School of Medicine, США]	Вирусы коровьей оспы, содержащие гены, кодирующие F или G белок в разных формах: rVVGsol (растворимая, секреторируемая форма), rVVGmem (форма, заякоренная в мембране), rVVG (обе формы)	Мыши BALB/c  [в.б., скар.]	Иммунизация мышей rVVF, rVVG и rVVGmem приводила к индукции высоких уровней антител, независимо от способа введения. В группе rVVGsol уровень PCB-специфических антител был в ~550 раз выше при в.б. введении, чем при иммунизации посредством скарификации. При заражении иммунизированных мышей штаммом PCB A2 вирус не выделялся из легких в группах rVVF, rVVG, rVVGmem и rVVGsol. При иммунизации посредством скарификации в группах rVVG и rVVGsol наблюдали повышение количества эозинофилов в БАЛ после челленджа. В группе rVVGmem эозинофилов было в 10 раз, чем в группах rVVG и rVVGsol. При в.б. введении эозинофилы в БАЛ не обнаруживались. Способ введения вакцины влиял на развитие легочной патологии.	[22]
PR8-NS-F, PR8-sF-NS  [ФГБУ «НИИ гриппа им.А.А.Сморозина Минздрава России, РФ]	Вирус гриппа A/PR/8/34 с усеченным до 124 аминокислоты (NS <sub>124</sub> ) в состав которой включена иммуногенная каскада F белка (фрагмент F <sub>248-290</sub> и F <sub>409-451</sub> ) с добавлением или без сигнального пептида IgGκ (для	Мыши BALB/c  [и.н.]	Мышей однократно иммунизировали вакцинными кандидатами NS-2AF (содержит сайт 2A на N-конце PCB-вставки), NS-2AsF (NS-2AF, который содержит IgGκ), NS-F (укороченный NS1), sF-NS (NS-F, который содержит IgGκ) в дозе 6 log <sub>10</sub> ТЦИД <sub>50</sub> . На 28 день заражали PCB A2 в дозе 6 log <sub>10</sub> БОЕ. После челленджа уровни вирусной нагрузки у иммунизированных мышей были на 1.5 log <sub>10</sub> БОЕ/мл и 2.26 log <sub>10</sub> БОЕ/мл меньше в группах NS-2AsF и NS-2AF соответственно по сравнению с группой неиммунизированных мышей. Во втором эксперименте в группе sF-NS вирусная нагрузка после челленджа была на 2 log <sub>10</sub> БОЕ/мл меньше, чем в группе неиммунизированных мышей. В группе NS-F репродукция челлендж-вируса была сопоставима с группой неиммунизированных мышей. У мышей из группы NS-2AsF наблюдались низкие показатели	[267]

	внеклеточной доставки)		воспаления и минимальная лимфоцитарная инфильтрация. Минимальные изменения в морфологии легочной ткани наблюдались в группе sF-NS.	
Субъединичные вакцины				
DS-Cav1 [Национальный институт аллергологии и инфекционных заболеваний, США]	Растворимая версия F белка в конформации «до слияния» Pre F с антигенным сайтом Ø [poly I:C]	Мыши CB6F1/J (♀ BALB/cJ + ♂ C57BL/6J  [в.м.]	Мышам вводили PCB- preF в разных вариантах (DS, Cav1, TriC, DS-Cav1) в дозе 10 мкг с интервалом 3 недели. Во всех группах в сыворотках крови титр нейтрализующих антител против PCB был в 4 раза выше, чем в группе PCB- postF и в 20 раз выше установленного защитного порога.	[226]
	Растворимая версия F белка в конформации «до слияния» Pre F с антигенным сайтом Ø [poly I:C]	Макаки резус  [в.м.]	Макакам вводили PCB- preF в разных вариантах (DS, DS-Cav1) в дозе 50 мкг с интервалом 4 недели. В группах DS и DS-Cav1 титр нейтрализующих антител был в 5-10 раз больше в сыворотках, чем в группе PCB- postF. К 8 неделе в группе DS-Cav1 титр нейтрализующих антител был выше, чем в группе DS и в 60 раз выше, чем в группе PCB- post F.	[226]
	Растворимая версия F белка в конформации «до слияния» Pre F с антигенным сайтом Ø [Наноэмульсия, Adju-Phos]	Африканские мартышки  [и.н.]	Мартышек иммунизировали трижды DS-Cav1 (125 мкг) в разных объемах с разными адьювантами. На 70 день животных заражали PCB в дозе 2 x 5.5 log <sub>10</sub> БОЕ. В группе DS-Cav1 (введен в объеме 0,25мл) значение пиковых PCB титров было на 3 log <sub>10</sub> и 2 log <sub>10</sub> ниже в легких и носовой полости, чем в контрольной группе. Была обнаружена корреляция между защитным эффектом в носовой полости и стимуляцией IgA, а также защитой в легких и Fc-опосредованной антительной активностью.	[375]
	Растворимая версия F белка в конформации «до слияния» Pre F с антигенным сайтом Ø [Алюм, Poly I:C, Poly (I:C:LC), MPLA, SAS, Alum+MPLA, SAS+Carbopol, Adjuvex, AddaVax]	Мыши CB6F1/J  [в.м.]	Мышам вводили RSV F DS-Cav1 в комбинации с разными адьювантами два раза с интервалом в 3 недели в дозе 10 мкг. Во всех группах не наблюдали побочные эффекты. В группах RSV F DS-Cav1 с адьювантами SAS + Carbopol наблюдались самые высокие титры нейтрализующих антител, которые были в 15 раз выше, чем в группах Алюм+MPLA и Alum и в 5 раз выше, чем в Poly (I:C). В группах с MPLA, Alum+MPLA, AddaVax и Adjuvex фиксировали IgG1 иммунный ответ в сыворотках. Вакцинация в группах с комбинацией адьювантов SAS, SAS + Carbopol, Poly (I:C) и Poly (I:C: LC) индуцировала IgG1 и IgG2a иммунный ответ. Титр нейтрализующих антител в группе RSV F DS-Cav1 без адьюванта был ниже защитного порогового значения.	[298]

	Растворимая версия F белка в конформации «до слияния» Pre F с антигенным сайтом Ø [ISA 71 VG, либо ISA 71 VG + Карбопол]	Телята [в.м.]	Телятам вводили bRSV F DS-Cav1 с разными адъювантами два раза с интервалом в 4 недели в дозе 50 мкг. Разницы между нейтрализующими титрами в группах с адъювантом ISA 71 VG и ISA 71 VG+ Carborol не наблюдали. Эта комбинация адъювантов незначительно усиливает иммунный ответ у крупного рогатого скота.	
DPX-RSV [Immunovaccine, США]	Внеклеточный домен SH белка РСВ (подтип А) – SHe, включенный в платформу на масляной основе DeroVax [Pam3CSK4 и алюмин]	Мыши CD-1 [в.м.]	Мышам вводили SHe в дозе 25 мкл, смешанный с алюмином (Алюм-SHe), либо в составе DPX (DPX-SHe) один, либо 2 раза (с интервалом 3 недели). У мышей, иммунизированных одной или двумя дозами DPX-SHe титр IgG антител был выше, чем в группе Алюм-SHe, и сохранялся в течение 20 недель после иммунизации. Иммунизация Алюм-SHe не приводила к развитию побочных реакций (снижение активности, цианоз, снижение температуры тела, сгорбленность) в отличие от группы DPX-SHe. В группе Алюм-SHe наблюдалось снижение белков комплимента (С3 и С4) и проявление реакций гиперчувствительности в отличие от DPX-SHe.	[206]
BARS13 [Advaccine Biopharmaceuticals Suzhou Co, Китай]	BARS13 (или CSA+G состоит из CSA – циклоспорин А (может индуцировать Treg) и рекомбинантного G-PCB (укороченный)	Мыши BALB/c [в.м.]	Мышам вводили BARS13 в дозе 10 мкг два раза с интервалом 2 недели. Через 2 недели мышей заражали PCB A2 в дозе $5 \times 10^7$ БОЕ. В группе BARS13 вирусная нагрузка в легких после челленджа была в 10 раз ниже, чем в группах ФИ-PCB и G-белка. В группе BARS13 динамика изменения веса у мышей была сопоставима группой мышей, которых не заражали PCB. В легких мышей из группы BARS13 отсутствовали признаки гистопатологии. Защитный эффект в группе BARS13 объясняли вкладом Treg клеток, которые были высоки в БАЛ и лимфоузлах после челленджа.	[189]
			БАРS13 модифицировали включением в состав вакцины вводили pre-F (BARS13 + pre-F). Мышей иммунизировали по 10 мкг BARS13, либо BARS13 + pre-F, два раза с интервалом в 2 недели. Через две недели мышей заражали PCB в дозе $2 \times 10^6$ БОЕ. Уровни сывороточных IgG антител были выше в группе BARS13 + pre-F, чем BARS13. В группе BARS13 + pre-F были высокие уровни Treg клеток по сравнению с группами ФИ-PCB и pre-F. В группе BARS13 + pre-F уровень нейтрализующих антител был выше в 6 раз, чем в группе BARS13. После челленджа PC нагрузка в легочной ткани в группе BARS13 + pre-F была на 10 % меньше, чем в группе	[329]

			BARs13. Степень легочного воспаления в группе BARs13 + pre-F была минимальной.	
RSVPre-F3/ [GSK3844766A GlaxoSmithKline, Великобритания]	Пептид F, стабилизированный в конформации «до слияния» [AS01]	Кролики [в.м.]	Кроликам вводили RSVPre-F3 в одиночку, либо в комбинации с вакциной Boostrix трижды. В группах RSVPreF3, RSVPreF3/AS01, RSVPreF3 +Boostrix титры IgG антител к RSVPre-F3 были высокими. Иммунизация RSVPre-F3 не оказывала влияния на массу тела, зрение, кожные покровы, аппетит и температуру тела. Клинико-патологические изменения (увеличение лейкоцитов, нейтрофилов, фибриногена и концентрации С-реактивного белка, снижение альбумина) фиксировались на следующий день после введения вакцины и показатели приходили в норму в течение 4 недель. Кроликам вводили RSVPre-F3 за несколько недель до спаривания, во время беременности и во время лактации. Наблюдался пассивный перенос антител от иммунизированных самок крольчатам.	[326]
		Крысы [в.м.]	Крысам вводили RSVPre-F3 за несколько недель до спаривания, во время беременности, во время лактации. У большинства крыс IgG к RSVPre-F3 обнаруживались перед спариванием (31/48), во время беременности (14/31) и в период лактации (16/31) и антитела передавались потомству. Иммунизация самок RSVPre-F3 не влияла на фертильность, беременность, лактацию, выживаемость и к изменениям внешних признаков висцерального и скелетного развития у потомства.	
PCB-F [NIAID, США]	Очищенный F белок PCB	Хлопковые крысы [в.м.]	Двукратная иммунизация белком в дозах 0.05-5 мкг приводила к образованию высоких уровней PCB F-специфических антител, которые циркулировали в течение 6 месяцев после вакцинации, однако их нейтрализующая активность была низкой. Заражение крыс PCB через 3 месяца после иммунизации показало снижение вирусной нагрузки в легких в группе PCB-F в 100 раз по сравнению с контрольной группой. Через 6 месяцев после иммунизации защита от PCB практически отсутствовала - в группах ФИ-PCB и PCB-F. В группе PCB F (5мкг) наблюдалось состояние вакцин-индуцированного усиления заболевания после PCB челленджа, сопоставимое с ФИ-PCB.	[242]
<b>Вакцины на основе вирусоподобных частиц</b>				
V306-SVLP,	Миметик пептида,	Мыши	Мышам вводили V306-SVLP в разных дозах дважды с интервалом в 3	[376]

[Виromетикс, Швейцария]	который связывается с мотавизумабом V-306 [Алюм для дозы 15 мкг V-306]	BALB/c [в.м.]	недели. На 31 день мышей заражали РСВ в дозе $10^6$ БОЕ. Иммунизация V306-SVLP стимулировала выработку нейтрализующих антител к РСВ. На 5 сутки челлендж-вирус не репродуцировался в группах V306-SVLP (50-300мкг) в отличие от PBS, ФИ-РСВ и группы V306-SVLP (15 мкг). Во всех группах V306-SVLP не наблюдали гистопатологических изменений в легких в отличие от ФИ-РСВ.	
		Кролики [в.м.]	Кроликам вводили V306-SVLP в дозе 140 мкг трижды с интервалом в 28 дней. Наблюдись высокие уровни нейтрализующих антител к 8 разным штаммам РСВ подтипов А и В.	
		Хлопковые крысы [в.м.]	Хлопковым крысам вводили препарат моноклональных антител 10D11 анти-V-306 и паливизумаб в разных дозах. Через сутки крыс заражали РСВ в дозе $10^4$ БОЕ. Высокие титры РСВ в легких наблюдались в группе PBS. В группах 10D11 и паливизумаба наблюдалось дозозависимое снижение репликации. Вакцинация V-306 стимулировала выработку антител с паливизумаб-подобными свойствами.	
VX-121 [Икосавакс, США]	Наночастица I53-50 с несколькими тримерами DS-Cav1 (тример F, стабилизированный в конформации «до слияния») на поверхности [AddaVax]	Мыши BALB/c [п.к.]	Мышам вводили DS Cav1-I53-50, либо DS Cav1 в дозе 5 мкг трижды с интервалом в 2 недели. DS Cav1-I53-50 индуцировала более сильный антиген-специфичный и нейтрализующий иммунный ответ. Иммунизация DS Cav1-I53-50 индуцировала образование фолликулярных Т хелперов у иммунизированных мышей в 5.3 раза выше, чем DS Cav1. Поскольку фолликулярные Т хелперы контролируют пролиферацию В-лимфоцитов в фолликулах лимфоидных органов, то количество В-клеток в лимфоузлах мышей из группы DS Cav1-I53-50 было больше, чем в группе DS Cav1.	[214]
	Наночастица I53-50 с несколькими тримерами DS-Cav1 на поверхности [SWE]	Макаки (индийские) [п.к.]	Макак иммунизировали дважды DS-Cav1 (50 мкг) и DS-Cav1-I53-50 (96 мкг) с интервалом в 28 дней. DS-Cav1-I53-50 индуцировал в 5 раз сильнее выработку антиген-специфических в 25 раз интенсивнее нейтрализующих антител, чем DS-Cav1. Было установлено, что специфические антитела в сыворотках макак направлены на РСВ-F белок в конформации «до слияния».	

и.н.: интраназально; и.т.: интратрахеально; в.м.: внутримышечно; п.к.: подкожно; п.о.: перорально; в.б.: внутрибрюшинно; скар.: скарификация

## Приложение 2

## Обзор вакцин против РСВ, находящихся на разных стадиях клинических испытаний

Вакцина [Разработчик]	Фаза клин. Испытаний [целевая группа]	Период	№ испытания в реестре	Результаты опубликованы [ссылка]
Рекомбинантные векторные вакцины				
RSV001 (PanAd3-RSV и MVA-RSV) [ReiThera, Италия]	Фаза I [В.; П.]	2013-2015	NCT01805921	Да [117, 118]
VXA-RSV f [Vaxart, США]	Фаза I [В.]	2016-2018	NCT02830932	Нет
ChAd155-RSV GS [GSK, Велико- британия]	Фаза I [В. ]	2016-2017	NCT02491463	Да [59]
	Фаза I/II [Д.]	2016-2021	NCT02927873	Да [78]
	Фаза I/II [Д]	2018-2022	NCT03636906	Нет
	Фаза II [В. ♀]	2015-2018	NCT02360475	Да [25]
MVA-BN RSV [Bavarian Nordic BN, Дания]	Фаза I [В. П.]	2015-2016	NCT02419391	Да [294]
	Фаза I [В. ]	2016-2018	NCT02864628	Да [294]
	Фаза II [П.]	2016-2018	NCT02873286	Да [150]
	Фаза 2a [В. ]	2021-2021	NCT04752644	Да [152]
	Фаза III [П.]	2022-2024	NCT05238025	Да [151]
SeV/RSV [NIAID, США]	Фаза I [В. ]	2018-2019	NCT03473002	Да [300]
Ad26.RSV.preF [Janssen Vaccines & Prevention B.V., Нидерланды]	Фаза I [В.;П.]	2016-2019	NCT02926430	Да [363]
	Фаза I [Д]	2022	NCT03606512	Да [328]
	Фаза I/2a [В.;Д]	2017-2022	NCT03303625	Да [328]
Ad26.RSV.preF [Janssen Vaccines & Prevention B.V., Нидерланды]	Фаза II [П.]	2017-2021	NCT03339713	Да [290]
	Фаза II [В.,П.]	2017-2021	NCT03334695	Да [291]
rBCG-N-hRSV [Католический университет Чили, Чили]	Фаза I [В. ♂]	2017-2018	NCT03213405	Да [5]

RSV/Flu-01E [ФГБУ «НИИ гриппа им.А.А.Сморозинц ева Минздрава России, РФ]	Фаза I [В.;П.]	2022-2023	РКИ 736	Нет
Ad26.RSV.FA2, Ad35.RSV.FA2 [Crucell Holland BV]	Фаза I [В.]	2015-2016	NCT02561871	Нет
	Фаза I [В.]	2015-2016	NCT02440035	Нет
<b>Живые аттенуированные вакцины</b>				
MV-012-968 [Meissa, США]	Фаза I [В.]	2020-2020	NCT04227210	Нет
	Фаза I [Д.]	2021-2023	NCT04909021	Нет
RSV MEDI ΔM2-2 [NIAID/NIH, MedImmune (AstraZeneca), США]	Фаза I [Д.]	2011-2015	NCT01459198	Да [162]
RSV cps2 [NIAID/NIH, MedImmune (AstraZeneca), США]	Фаза I [Д.]	2013-2015	NCT01968083	Да [39]
	Фаза I [Д.]	2013-2016	NCT01852266	
RSV LID ΔM2-2, NIAID Sanofi Pasteur	Фаза I [Д.]	2014-2016	NCT02040831	[222]
	Фаза I [Д.]	2014-2015	NCT02237209	[222]
RSV LID/ΔM2- 2/1030s [NIAID, США Sanofi Pasteur, Франция]	Фаза I [Д.]	2020-2023	NCT04520659	Нет
	Фаза I [Д.]	2016-2018	NCT02952339	Да [224]
	Фаза I [Д.]	2015-2017	NCT02794870	Да [224]
RSV LID cp ΔM2-2 [NIAID, США]	Фаза I [Д.]	2015-2018	NCT02890381	Да [70]
	Фаза I [Д.]	2015-2018	NCT02948127	Да [70]
RSV D46/NS2/N/ΔM2-2- HindIII, [NIAID, США]	Фаза I [Д.]	2017-2018	NCT03102034	Да [223]
	Фаза I [Д.]	2017-2018	NCT03099291	Да [223]
RSV ΔNS2/ Δ1313 /I1314L [NIAID, США]	Фаза I [Д.]	2013-2018	NCT01893554	Да [163]
	Фаза I [Д.]	2017-2022	NCT03227029	Да [71]
RSV 6120/ΔNS2/1030s [NIAID, США]	Фаза I [Д.]	2017-2022	NCT03387137	Нет
RSV 6120/ΔNS1 и	Фаза I [Д.]	2018-2023	NCT03596801	Нет

RSV 6120/F1/G2/ΔNS1				
RSV ΔNS2/Δ1313/I1314 L; RSV 6120/ΔNS2/1030s; RSV 276, [NIAID, США]	Фаза I и II [Д.]	2019-2022	NCT03916185	Нет
RSV ΔNS2/Δ1313/I1314 L; RSV 276, [NIAID, США]	Фаза I и II [Д.]	2017-2020	NCT03422237	Да [71]
RSV D46 сpΔM2-2, [NIAID, США]	Фаза I [Д.]	2015-2019	NCT02601612	Нет
MEDI-559, [MedImmune (AstraZeneca), США]	Фаза I и II [Д.]	2008-2011	NCT00767416	Да [213]
Субъединичные рекомбинантные вакцины				
GSK3888550A RSVPreF3 [GSK, Великобритания]	Фаза I [В. ♀]	2018-2019	NCT03674177	Да [307]
	Фаза II [В. ♀]	2019-2022	NCT04126213	Да [20]
	Фаза II [В. ♀]	2019-2020	NCT04138056	Нет
	Фаза III [В. ♀]	2020-2023	NCT04605159	Нет
GSK3844766A RSVPreF3 [GSK, Великобритания]	Фаза I/II [В., П.]	2019-2021	NCT03814590	Да [161]
	Фаза I [П.]	2019-2022	NCT04090658	Да [176]
	Фаза III [П.]	2021-наст.вр	NCT04886596	Да [255]
RSVPreF3 [GSK, Великобритания]	Фаза I [В.]	2014-2018	NCT02298179	Да [186]
DPX-RSV(A) [Immunovaccine, США и Университет Далхаузи, Канада]	Фаза I [В.]	2015-2017	NCT02472548	Да [179]
RSV F DS-Cav1 [NIH/NIAID/VRC, США]	Фаза I [В.]	2017-2020	NCT03049488	Да [281]
RSVpreF  [Pfizer, США]	Фаза II [В. ♀]	2019-2019	NCT04071158	Да [260]
	Фаза I/II [В., П.]	2018-2021	NCT03529773	Да [91, 355]
	Фаза 2b [В. ♀]	2019-2022	NCT04032093	Да [316]



	Фаза II [П.]	2018-2021	NCT03572062	Да [16]
	Фаза III [Д., В. ♀]	2020-по наст.вр	NCT04424316	Нет
RSV F vaccine (RSVpreF) [Pfizer, США]	Фаза I/II [П.]	2018-2020	NCT03572062	Да [16]
BARS13, [Advaccine(Suzhou) Biopharmaceuticals Co., Ltd, Китай]	Фаза I [В.]	2019-2019	NCT04851977	Да [54]
	Фаза II [В., П.]	2020-2023	NCT04681833	Нет
	Фаза II [В.]	2018-2019	ACTRN12618 000948291	Нет
Вакцины на основе вирусоподобных частиц				
V306-SVLP [Вирометикс, Швейцария]	Фаза I [В. ♀]	2020-2022	NCT04519073	Да [187]
SynGEM, [Mucosis B.V., Нидерланды]	Фаза I [В. ♀]	2016-2017	NCT02958540	Да [13]
RSV F (ResVax) [Novavax, США]	Фаза I [В.]	2010-2011	NCT01290419	Да [111]
	Фаза II [В. ♀]	2012-2013	NCT01704365	Да [112]
	Фаза II [В. ♀]	2013-2014	NCT01960686	Да [15]
	Фаза II [В. ♀]	2014-2016	NCT02247726	Да [241]
	Фаза III [В. ♀]	2015-2020	NCT02624947	Да [212]
RSV F наночастица, [Novavax, США]	Фаза I [П.]	2012-2014	NCT01709019	Да [100]
	Фаза II [П.]	2014-2016	NCT02266628	Нет
	Фаза II [П.]	2015-2016	NCT02593071	Нет
	Фаза III [П.]	2015-2016	NCT02608502	Нет
	Фаза II [П.]	2017-2018	NCT03026348	Нет
	Фаза I [Д.]	2014-2016	NCT02296463	Нет

Д.: дети; П.: пожилые (нижний порог 55 или 60 лет); В. Взрослые (от 18 лет и верхний порог разный; ♀ женщины