

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ПУЛЬКИНА

Анастасия Александровна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ГРИППОЗНОГО ВЕКТОРА С
МОДИФИЦИРОВАННЫМ БЕЛКОМ NS1 ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ
ПРЕЗЕНТАЦИИ АНТИГЕНОВ РЕСПИРАТОРНО-
СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА**

1.5.10 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

*на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Научный руководитель:
доктор биологических наук
А.Ю. ЕГОРОВ

Санкт-Петербург

2023

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	11
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция	11
1.1.1. Респираторно-синцитиальный вирус.....	12
1.1.1.1. Структурно-функциональная организация РСВ.....	12
1.1.1.2. Жизненный цикл РСВ.	15
1.1.2. Механизм иммунного ответа при РСВИ	18
1.1.2.1. Врожденный иммунный ответ на респираторно-синцитиальный вирус	19
1.1.2.2. Адаптивный иммунный ответ при РСВИ.....	20
1.1.2.3. Роль белков РСВ в уклонении от иммунного ответа.	24
1.1.3. Феномен усиления патологии после вакцинации против РСВ	25
1.1.4. Подходы к созданию новых вакцин против РСВ	26
1.1.5. Т-клеточные вакцины.....	31
1.2. Вирус гриппа.....	32
1.2.1. Использование вируса гриппа А в качестве вектора	33
1.2.1.1. Преимущества использования гриппозного вектора.	34
1.2.1.2. Потенциальные недостатки векторов вируса гриппа.....	35
1.2.3. Варианты векторов вируса гриппа. Сегменты, используемые для встраивания трансгена.....	37
1.2.3.1. Ген гемагглютинина НА	37
1.2.3.2. Ген нейраминидазы NA.....	38
1.2.3.3. Ген полимеразного белка РВ-2.....	40
1.2.3.4. Ген М.....	41
1.2.3.5. Ген неструктурных белков NS.....	41
1.2.4. Модуляция иммунного ответа белком NS1	42
1.2.4.1. Структурная организация белка NS1	43
1.2.4.2. Механизмы ингибирования белком NS1 врожденных иммунных ответов ...	44
1.3. Сигнальные пептиды.....	46
1.4. Заключение по обзору литературы.....	48
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1. Материалы исследования	50
2.1.1. Клеточные культуры.....	50
2.1.2. Вирусы	50
2.1.3. Куриные эмбрионы.....	51
2.1.4. Лабораторные животные.....	51

2.2. Методы исследования	51
2.2.1. Вирусологические методы	51
2.2.2. Иммунологические методы	56
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ	60
3.1. Конструирование гриппозного вектора с люциферазным репортером для оценки поверхностной экспрессии белка NS1	60
3.1.1. Получение и характеристика репортерного вектора	60
3.1.2. Оценка экспрессии трансгена NanoLuc <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	62
3.2. Получение и характеристика набора гриппозных векторов с модифицированным NS1 белком, экспрессирующих РСВ антиген	64
3.2.1. Конструирование плазмид, кодирующих ген NS со вставкой антигенов белка F РСВ	64
3.2.2. Изучение экспрессии трансгена РСВ в зараженных клетках	70
3.3. Оценка безопасности и протективной эффективности векторов вируса гриппа при однократном интраназальном введении мышам	73
3.3.1. Мониторинг динамики веса и оценка вирусной нагрузки в легких мышей после однократной иммунизации векторами	73
3.3.2. Оценка вирусной нагрузки в легких мышей после инфекции РСВ	75
3.3.3. Гистологическая оценка срезов легочной ткани иммунизированных мышей после инфекции РСВ	77
3.4. Изучение параметров врожденного иммунного ответа	80
3.5. Изучение параметров адаптивного иммунного ответа после однократной иммунизации векторами	82
3.5.1. Изучение антительного иммунного ответов после иммунизации векторами ...	82
3.5.2. Изучение Т-клеточного иммунного ответов после однократной иммунизации векторами	85
3.6. Изучение параметров иммунного ответа в ходе РСВ инфекции у иммунизированных животных	91
3.6.1. Изучение антительного иммунного ответов после иммунизации векторами ...	91
3.6.2. Изучение Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных в ходе инфекции РСВ	91
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), наряду с вирусом гриппа и коронавирусом SARS-CoV-2, является одним из основных клинически значимых респираторных патогенов, поражающих преимущественно детей первых месяцев жизни [177, 211] и пожилых людей [53]. Перенесенная в детском возрасте РСВ инфекция (РСВИ) ассоциирована с отдаленными последствиями, в том числе развитием бронхиальной астмы [3, 5, 57, 105]. Наиболее эффективным средством специфической профилактики вирусных инфекций является вакцинация, которая традиционно направлена на формирование вируснейтрализующих антител. Но в защите от повторной РСВИ и элиминации вируса также важно образование антиген-специфичных Т клеток, как системных, так и ассоциированных со слизистой оболочкой верхних дыхательных путей [84, 121, 153, 170].

Одним из способов доставки протективных антигенов в организм является использование вирусных векторов в качестве носителей [246]. Для создания вакцин на основе вирусных векторов были использованы различные вирусы: ретровирусы, лентивирусы, аденовирусы, поксвирусы, альфавирусы, аренавирусы, герпесвирусы, флавивирусы, парамиксовирусы, и рабдовирусы [245, 246]. Вирусные векторные вакцины, доставляющие антигенные белки, стимулируют индукцию антител, Т-хелперных клеток и цитотоксических Т лимфоцитов (CTL) [245]. Специфические свойства вектора определяются вирусом-носителем, который может иметь свои преимущества и недостатки. Основными недостатками некоторых вирусных векторных вакцин являются риск интеграции генома вируса в геном клетки-хозяина, образование антител к самому вирусу-носителю или невозможность преодолеть предсуществующий иммунный ответ [55, 123]. Также недостатком вирусных векторов может быть превосходство противовекторного иммунитета перед иммунитетом, индуцированным к встроенному антигену [213, 217, 228, 257]. Иммунодоминирование может возникнуть, если эпитопы в векторе занимают более высокий ранг в иерархии доминирования, чем эпитопы в антигене. Добавление адъюванта не позволяет переориентировать иммунный ответ Т клеток с доминантных векторных детерминант на субдоминантные эпитопы вставки. Праймирование антигеном также не всегда позволяет корректировать иммунные реакции [257]. Таким образом, для создания эффективной векторной вакцины требуются исследования по оптимизации дизайна генетических конструкций самих векторов.

Интраназальная иммунизация вектором вируса гриппа исключает геномную интеграцию из-за отсутствия ДНК стадии в репликативном цикле вируса. Множество антигенных подтипов вируса гриппа позволяет избегать предсуществующий иммунитет

или проводить повторную иммунизацию с целью достижения максимального профилактического эффекта. В результате многочисленных исследований, посвященных созданию вакцин на основе вектора вируса гриппа, был выявлен ряд белков, толерантных к вставке гетерологичного генетического материала: гены HA, NA, NS, PB-2 и M.

Неструктурный белок NS1 вируса гриппа является перспективной мишенью для конструирования векторных вакцин, поскольку его укорочение ведет к усилению иммуногенности вируса за счет стимуляции цитокинового ответа [2, 190, 231]. В то же время, цитоплазматическая и особенно внутриядерная локализация белка NS1 и слитого с ним трансгена может ограничивать формирование к нему гуморального иммунного ответа. Представленная работа посвящена исследованию возможности оптимизации стратегии конструирования вектора вируса гриппа А с модифицированным белком NS1, с целью повышения эффективности презентации эпитопов трансгена.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время описаны различные стратегии встраивания представляющих интерес генов в последовательность гена NS вируса гриппа. Одной из используемых модификаций является слияние антигенов с полноразмерным белком NS1 [75]. Альтернативным способом конструирования является замена последовательности, кодирующей белок NS1, последовательностью интересующего гена, с сохранением синтеза белка NP. Подобная конструкция, описанная впервые Wolschek с соавторами [266], была использована при разработке вакцин против SARS-CoV-2 [27, 45]. Одна из них (dNS1-RBD, Pneucolin[®]) является первой в мире мукозальной вакциной против COVID-19, которая прошла три фазы клинических исследований и была разрешена для экстренного использования в Китае [269, 272]. Еще одной популярной стратегией встраивания антигена является его слияние с укороченным до 124-126 N-концевых аминокислот (ак) белком NS1. Такой способ генетических манипуляций использовали для экспрессии множества представляющих интерес генов или их частей, включая IL-2 [59, 122], пептиды *Brucella abortus* [239], вируса гепатита С [274], вируса иммунодефицита человека [240], аденовируса человека [270], РСВ [16, 129, 273], коронавируса [107] или микобактерии туберкулеза [220].

Тем не менее, изучение возможности повышения иммуногенности гриппозных векторов с модифицированным белком NS1 является актуальной задачей. В настоящее время исследуются способы оптимизации дизайна конструкции гена NS, направленные на увеличение антительной и Т-клеточной иммуногенности вакцинного антигена. Например, в одной из работ была описана возможность формирования стойкого антительного ответа к трансгену за счет добавления трансмембранного и цитоплазматического домена DAF к

рецептор-связывающему домену белка Spike коронавируса (RBD), экспрессируемого с открытой рамки считывания белка NS1 [45]. Двукратная иммунизация мышей вектором со вставкой DAF приводила к формированию RBD-специфичных антител класса IgG в более высоком титре, чем при иммунизации животных вектором без DAF [45]. Вопрос усиления Т-клеточной иммуногенности трансгена, экспрессируемого в составе химерного белка NS1, остается открытым. Существенной проблемой является доминирование эпитопов вектора над эпитопами вставки, которая может быть решена с помощью многократной иммунизации векторами, несущими один и тот же трансген, но отличающихся поверхностными антигенами [58]. Однако для задачи получения иммунного ответа после однократной иммунизации данная стратегия не подходит. В связи с этим, необходимо подобрать оптимальную стратегию конструирования гриппозных векторов с модифицированным белком NS1, влияющую на локализацию трансгена в инфицированных клетках и позволяющую сфокусировать иммунный ответ на Т- и В-клеточных эпитопах вставки, а не вектора. Одним из путей достижения этой цели может быть встраивание гидрофобных последовательностей в состав трансгена, например, сигнальных пептидов [62].

Цель работы. Оценка влияния дизайна гриппозных векторов, экспрессирующих антигены респираторно-синцитиального вируса, ассоциированные с укороченным до 124 аминокислотных остатков белком NS1, на их иммуногенность и защитную эффективность в отношении экспериментальной РСВ инфекции.

Задачи исследования:

1. Получить репортерный гриппозный вектор, экспрессирующий люциферазу NanoLuc с открытой рамки считывания (ОРС) укороченного до 124 аминокислотных остатков белка NS1 (NS1124). Оценить эффективность внеклеточного транспорта трансгена NanoLuc при заражении культуры клеток и мышей.
2. Сконструировать набор гриппозных векторов с модифицированным белком NS1, экспрессирующих идентичный трансген участков белка F РСВ, но различающихся присутствием сигнального пептида IgGк и расположением трансгена относительно белка NS1124. Оценить влияние использованных модификаций на локализацию трансгена в зараженных клетках.
3. Изучить репродуктивную активность, безопасность и иммуногенность сконструированных векторов при однократном интраназальном введении мышам.
4. Оценить защитную эффективность векторов после однократной интраназальной иммунизации на модели экспериментальной РСВ инфекции у мышей.

5. Охарактеризовать иммунный ответ в ходе РСВ инфекции у иммунизированных животных.

Научная новизна работы.

1. Впервые было показано, что трансгены, слитые с укороченным до 124 аминокислотных остатков белком NS1 вируса гриппа А, детектируются во внеклеточном пространстве зараженных клеток.
2. В рамках работы был сконструирован оригинальный трансген, состоящий из кассеты участков белка F РСВ (248–290 и 409–451 ак), который был использован для конструирования рекомбинантных гриппозных векторов.
3. Впервые продемонстрирована возможность реконструкции геномного сегмента NS путем встраивания новой открытой рамки считывания для последовательности антигена РСВ, дополненного сигнальным пептидом IgGк.
4. Впервые показана возможность фокусирования Т-клеточного иммунного ответа на эпитопах вставки с помощью дополнения трансгена последовательностью сигнального пептида IgGк.
5. Продемонстрирована защитная эффективность сконструированных гриппозных векторов с модифицированным белком NS1 в отношении РСВ инфекции уже при однократной интраназальной иммунизации мышей. При этом иммунизация гриппозными векторами, содержащими последовательность сигнального пептида IgGк, приводила к более эффективному подавлению репликативной активности РСВ в легких зараженных животных без развития иммунопатологии.
6. Показано, что защитный механизм интраназальной иммунизации мышей вектором NS-2AsF может быть связан с формированием РСВ-специфичных CD8⁺ Т клеток, в частности ко-продукторов IL-10 и IFN- γ , а также привлечением CD4⁺ регуляторных Т клеток в ткани легких.

Теоретическая и практическая значимость работы определяется как фундаментальными, так и практическими аспектами. Полученные результаты указывают на важность поиска оптимального дизайна конструкции гриппозных векторов с модифицированным геном NS с целью повышения иммуногенности трансгенов. В настоящей работе показано, что введение последовательности сигнального пептида IgGк в состав трансгена позволяет сфокусировать и существенно усилить Т-клеточный иммунный ответ к эпитопам вставки. При этом защита от экспериментальной РСВ инфекции может быть достигнута уже после однократной интраназальной иммунизации животных за счет формирования РСВ-специфического Т-клеточного иммунного ответа в отсутствие

нейтрализующих антител. Полученные в рамках проведенного исследования результаты были использованы при создании вакцины RSV/Flu-01E, предназначенной для профилактики респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у пожилых людей, находящейся на этапе клинических исследований I и II фазы. Полученные результаты могут быть экстраполированы при конструировании других векторов, кодирующих вставки протективных антигенов разнообразных патогенов, для которых показана важность индукции Т-клеточного иммунного ответа.

Методология и методы исследования. В работе были использованы стандартные молекулярно-биологические, молекулярно-генетические, вирусологические, серологические, иммунологические и статистические методы. Исследования проводили на базе лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Трансген NanoLuc, слитый с укороченным белком NS1124 вируса гриппа, детектируется в супернатантах клеток и плазме крови мышей на ранних сроках инфекции. При этом, во внеклеточном пространстве клеточных культур, зараженных репортерным вирусом, обнаруживается в 100-1000 раз меньше трансгена NanoLuc, чем в цитоплазме.
2. Сконструированы генетически стабильные гриппозные векторы, экспрессирующие вставку консервативных участков белка F РСВ. Показано, что векторы обладают сходной репродуктивной активностью, но различаются по паттерну накопления антигена РСВ в зараженных клетках, зависящему от встраивания последовательности сигнального пептида IgGк в состав трансгена.
3. Сконструированные векторы были в одинаковой степени аттенуированы для мышей при однократном интраназальном введении. Однако интенсивность индукции CD8+ Т-клеточного ответа к эпитопу РСВ усиливалась при дополнении трансгена последовательностью сигнального пептида IgGк. Независимо от дизайна вектора, иммунизация не приводила к формированию детектируемого антительного ответа к антигену РСВ.
4. Однократная интраназальная иммунизация мышей полученными векторами приводила к подавлению репродукции РСВ в легких независимо от дизайна конструкции. При этом в группах мышей, иммунизированных IgGк-содержащими векторами, были выявлены минимальные иммунопатологические изменения без признаков воспалительного процесса.

5. Профилактическая эффективность вектора NS-2AsF была обусловлена повышенной индукцией популяции РСВ-специфичных CD8⁺ Т клеток, продуцирующих IL-10 и IFN- γ , а также накоплением в легких CD4⁺ регуляторных Т клеток на фоне РСВ инфекции.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном проведении обзора литературы, планировании и проведении лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Методическая помощь при выполнении работы была оказана сотрудниками лабораторий векторных вакцин, внутриклеточного сигналинга и транспорта, и лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертационного исследования были представлены: на XX Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии (г. Гатчина, Россия, 2019), «The 1st ISIRV International Influenza Vaccine Meeting - Immunological Assays and Correlates of Protection for Next Generation Influenza Vaccines», (г. Сиена, Италия, 2019), на международном форуме «Молодежные дни вирусологии 2020» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2020), на I Международная научно-практическая конференция «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий» (г. Томск, Россия, 2020), на IV Всероссийской конференции молодых учёных «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2023) и на «Individual and population immunity to respiratory viruses» (г. Гонконг, Китай, 2023).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ: 3 научные статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 7 тезисов докладов на отечественных и международных научных конференциях, 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, включая 6 таблиц и 31 рисунок. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, 6 глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 277 источников на русском и английском языках.

Работа выполнена при финансовой поддержке:

1. Грантом для студентов вузов, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, тема проекта «Конструирование гриппозного вектора, экспрессирующего химерный белок NS1 с люциферазной активностью». 25.09.2018 №124.
2. Грантом для студентов вузов, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, тема проекта «Оценка эффективности противовирусных препаратов с помощью биолюминесцентной конструкции на основе вируса гриппа». 25.06.2020 №823.
3. Грантом Президента Российской Федерации для молодых кандидатов наук, № 075-15-2019-226
4. ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками для здоровья» Минздрава России в рамках проекта «Разработка и характеристика вакцинных штаммов-кандидатов-прототипов против РСВ-инфекции», контракт № 0373100122119000065 от 09.07.2019.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция

По данным всемирной организации здравоохранения респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) признан ведущей причиной инфекций нижних дыхательных путей у детей, в том числе первых месяцев жизни [34, 113, 177, 211] и является одним из основных возбудителей острых респираторных заболеваний (ОРЗ) [168]. РСВ инфекция (РСВИ) носит U-образный возрастной характер распределения, поражая в основном детей младше 5 лет и пожилых старше 65 лет [26]. В странах с низким и средним уровнем дохода РСВ более распространен среди младших возрастных групп [223], тогда как в промышленно развитых странах наибольшая заболеваемость встречается среди пожилого населения [224].

РСВИ среди недоношенных младенцев и детей с хроническими заболеваниями часто сопровождается тяжелым течением заболевания, большим числом госпитализаций и высокой смертностью. До начала пандемии Ковид-19 РСВ называли второй по частоте причиной смерти детей в возрасте до 6 месяцев [152]. В этой возрастной группе регистрировали порядка 1,4 миллиона РСВ-ассоциированных госпитализаций и 13300 случаев смертельных исходов в год [146]. По оценкам, ежегодно во всем мире среди детей в возрасте до 5 лет РСВ является причиной около 33,0 миллионов случаев острых инфекций нижних дыхательных путей (ИНДП), приводящих к 3,6 миллионам госпитализаций, 26300 случаев внутрибольничных смертей, а также 101400 общих случаев РСВ-ассоциированных смертей [146].

Пожилые люди, как и лица с хроническими заболеваниями или иммуносупрессией, подвержены высокому риску заболевания и развитию осложнений, включая пневмонию и бронхолит [53, 138, 224]. По оценкам, на 2015 год среди пожилых людей было зарегистрировано около 1,5 млн случаев РСВИ и 214000 РСВ-ассоциированных госпитализаций в промышленно развитых странах [224]. Общее число госпитализаций и внутрибольничных смертей, связанных с РСВ, среди пожилых оценивается в 336000 и 14000 случаев соответственно [224]. Однако в этой группе населения клинические проявления являются атипичными, отсроченными и сопровождаются низкой вирусной нагрузкой, что мешает диагностике.

Госпитализация здоровых, не пожилых людей с РСВИ встречается редко, тем не менее реинфекции случаются на протяжении всей жизни [53, 97]. Большая часть из них проявляется легкими симптомами со стороны верхних дыхательных путей, но РСВ называют причиной 50-90% бронхолитов, 5-40% пневмоний, 10-30% трахеобронхитов [3].

РСВИ носит ярко выраженный сезонный характер [180], но во время пандемии Ковид-19 пик циркуляции РСВ был сдвинут на более поздний [44, 103, 248]. Описанные сейчас два серотипа вируса А и В могут ко-циркулировать в течение сезона [80], при этом серотип А обычно более распространен, вирулентен и контагиозен. Часто РСВ ко-циркулирует с вирусом гриппа [17, 21, 23], но пик распределения РСВ шире, чем у гриппа [17].

В Российской Федерации РСВИ является основной вирусной инфекции в структуре заболеваемости детей. По данным Федерального центра по гриппу и ОРВИ (ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России), в период эпидемии 2018-2019 гг. доля РСВИ-ассоциированной тяжелой острой респираторной инфекции среди детей в возрасте до 2 лет составила 28,1% [21]. В зависимости от возраста, преморбидного фона, наличия хронических респираторных заболеваний и иммунодефицитных состояний частота заболеваемости РСВИ в России варьирует в пределах 13-66% у детей и 3-18% у взрослых [4, 8, 9].

1.1.1. Респираторно-синцитиальный вирус

1.1.1.1. Структурно-функциональная организация РСВ

РСВ относится к семейству *Pneumoviridae*, к роду *Orthopneumovirus*, отряду *Mononegavirales* [80]. РСВ является оболочечным вирусом, вирион которого имеет форму сферы с диаметром 100–350 нм, или филаментов диаметром 60–200 нм и длиной до 10 мкм [34]. Оболочка РСВ состоит из липидного бислоя, получаемого от плазматической мембраны клетки-хозяина при отпочковывании, и трех вирусных трансмембранных белков: гликопротеина G, белка слияния F и малого гидрофобного белка SH (рис. 1) [34]. Трансмембранные гликопротеины являются основными мишенями нейтрализующих антител и вакцин. Внутренняя поверхность вириона выстлана негликозилированным белком матрикса М, который определяет морфологию вирионов [34]. Внутри вирусной частицы находится рибонуклеокапсид (РНП), состоящий из вирусной рибонуклеиновой кислоты (РНК), упакованной белками полимеразного комплекса: нуклеопротеин N, фосфопротеин Р, фактор процессивности транскрипции М2-1 и большая субъединица полимеразы L [34], (рис.1). Белки NS1 и NS2 не встроены в вирусную частицу и выполняют ведущую роль в уклонении от врожденного иммунного ответа. Функции белков и их расположение кратко описаны в таблице 1 и представлены на рисунке 1.

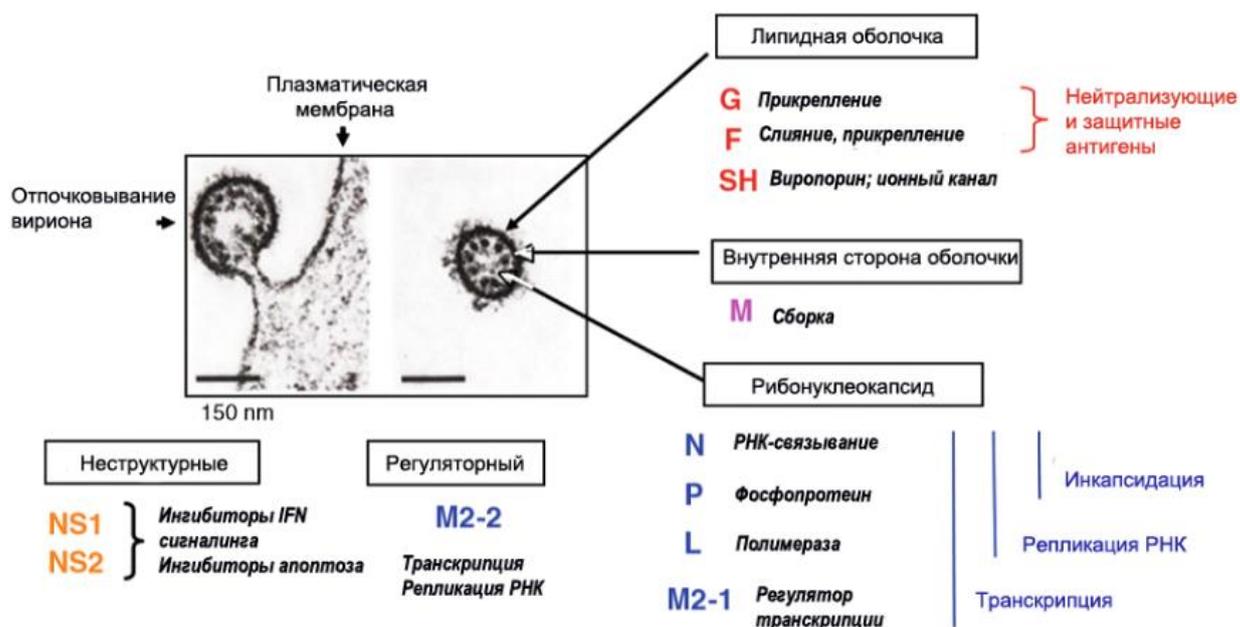


Рисунок 1 – Структура респираторно-синцитиального вируса. Белки РСВ, их функции и расположение в вирусной частице. Электронная микрофотография [адаптировано из 34].

Геном РСВ представлен несегментированной, одноцепочечной РНК отрицательной полярности [80], которая неэпирована и неполиаденилирована. Длина линейного генома составляет около 15 тыс. нуклеотидов. Вирусная РНК разделена на 10 генов, расположенных в следующей последовательности: 3' – NS1 – NS2 – N – P – M – SH – G – F – M2 – L 5'. Каждый ген начинается с высоко консервативного сигнала начала гена (GS, 9 нуклеотидов) и заканчивается умеренно консервативным сигналом конца гена (GE, 12–14 нуклеотидов), который заканчивается 4–7 нуклеотидными остатками U, кодирующими поли(А)-хвост [34]. Первые девять генов разделены межгенными областями, а последние два гена (M2 и L) перекрываются на 68 нуклеотидов [32].

Каждый ген кодирует собственную мРНК, которая в процессе транскрипции полимеразой L метилируется и полиаденилируется [34], что позволяет использовать рибосомальный комплекс клетки-хозяина для белкового синтеза. Каждая мРНК кодирует один основной белок, за исключением M2, который имеет две перекрывающиеся открытые рамки считывания (ОРС) белков M2-1 и M2-2 [34].

Таблица 1 – обозначения и функции белков [32, 80]

Белок	Расположение в вирионе	Свойства и функции
Гликопротеин G 289 - 299 ак	Липидная оболочка (трансмембранные белки)	Муциноподобный поверхностный белок, опосредующий прикрепление вируса. Является мишенью нейтрализующих антител.
Поверхностный белок слияния F 574 ак		Участвует в прикреплении вируса к клетке, обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран, образуя синцитий. Высоко консервативен, является мишенью нейтрализующих антител. Пример F-белка в мембране вириона находится в метастабильной форме «до слияния» (pre-F), после слияния происходит рефолдинг белка и образование формы «после слияния» (post-F). В результате протеолиза из предшественника F0 образуется две дисульфид связанных субъединиц: NH ₂ -F2-F1-COOH и гликопептид p27.
Малый гидрофобный белок SH 64 – 65 ак		Образует катионный канал, влияет на отпочковывание вирионов. Антитела к SH не являются нейтрализующими, но могут снижать вирусную нагрузку.
Матриксный белок M 256 ак	Внутренняя поверхность вириона	Выстилает внутреннюю поверхность вириона, определяя морфологию. Играет роль в сборке вирусных частиц, необходим для транспорта нуклеокапсидов.
Нуклеопротеин N 391 ак	Рибонуклеокапсид	Упаковка геномной и антигеномной РНК, образование РНП, уклонение от системы врожденного иммунного ответа.
Фосфопротеин P 241 ак		Кофактор полимеразы L. Обеспечивает взаимодействие комплекса РНП-полимераза. Способен связываться с мономерами N-белка, препятствуя их самоагрегации и обеспечивая транспортировку N-белков к месту упаковки генома/антигенома.
Полимераза L 2165 ак		РНК-зависимая РНК полимеразы. Синтезирует мРНК-транскрипты и полноразмерные антигеномы. Имеет домены полирибонуклеотидтрансферазы и метилтрансферазы.
M2-1 194 ак		Фактор процессивности транскрипции. Гомотетрамер. Обеспечивает связывание РНК с белком P, участвует в транспорте белка M в тельца включения.
Регуляторный белок M2-2 88 или 90 ак	-	Регуляция транскрипции и репликации.
Неструктурный белок NS1 139 ак	-	Уклонение от врожденной иммунной системы. Ингибирование апоптоза и передачи сигналов IFN I типа
Неструктурный белок NS2 124 ак		

1.1.1.2. Жизненный цикл РСВ.

Прикрепление и проникновение вируса в клетку

РСВ передается воздушно-капельным путем, в первую очередь поражая эпителиальные клетки, выстилающие дыхательные пути. Процесс проникновения вируса в клетку начинается со связывания вириона с поверхностными молекулами на апикальной поверхности поляризованных эпителиальных клеток и слияния мембран [78]. Основными белками, участвующими в прикреплении вируса к поверхности клетки, являются белки G и F. В настоящее время описано большое количество рецепторов, которые вирус использует для прикрепления к клетке: аннексин II, рецептор 1 хемокинов CX3 (CX3CR1), рецептор эпидермального фактора роста (EGF), кальций зависимые лектины, Toll-подобный рецептор 4 (TLR4), молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), нуклеолины и гепарансульфат-протеогликаны (HSPGs) [80]. Связавшись с рецептором, нуклеокапсид РСВ проникает в клетку за счет слияния вирусной оболочки с клеточной плазматической или эндосомальной мембранами [80] (рис. 2). При проникновении вируса путем макропиноцитоза в ранней эндосоме фуриновые протеазы расщепляют и активируют белок F, запуская слияние. Конформационное изменение белка F способствует преодолению «силы гидратации» и созданию поры слияния, через которую нуклеокапсид вирусной частицы проникают в цитоплазму клетки-хозяина, инициируя транскрипцию и репликацию вируса [80].

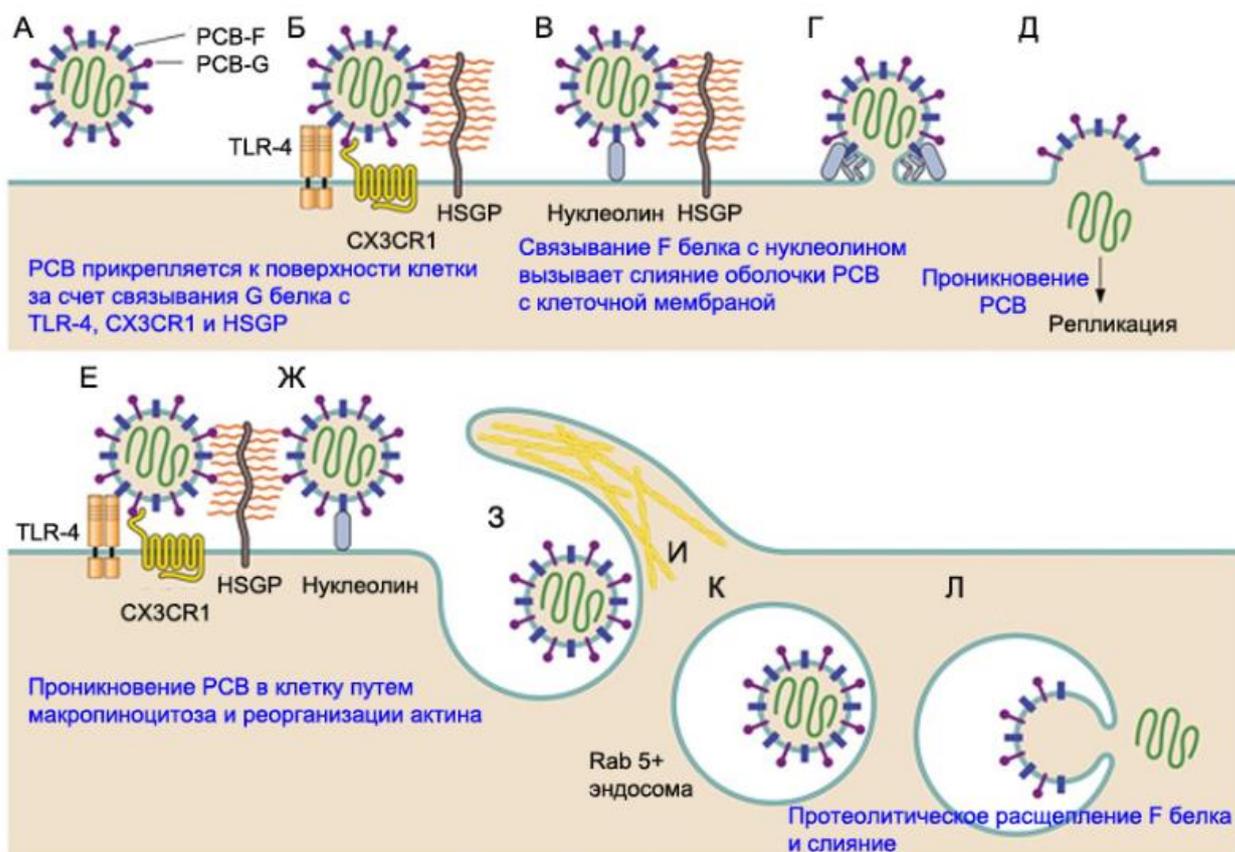


Рисунок 2 – Связывание и проникновение РСВ в клетку-хозяина. РСВ связывается с поверхностью клетки за счет взаимодействия гликопротеина G с поверхностными рецепторами клетки, такими как TLR-4 (Toll-подобный рецептор 4), CX3CR1 (рецептор 1 хемокинов CX3) и HSPG (гепарансульфат-протеогликаны) (А, Б). При взаимодействии белка слияния F с нуклеолином (В) запускается процесс слияния оболочки вируса с мембраной клетки-хозяина (Г). Вирион сливается с клеточной мембраной и попадает в клетку (Д). Также РСВ может попадать в клетку путем макропиноцитоза (Е, Ж). Интернализация вириона (З) происходит при реорганизации актина (И), активности фосфатидилинозитол-3-киназы и ранних эндосомальных везикул Rab5 клетки-хозяина (К). Протеолитическое расщепление белка F запускает доставку нуклеокапсида в клетку путем слияния оболочки вируса с мембраной эндосомы (Л) (адаптировано из [80]).

Транскрипция и репликация вирусного генома

Репликационный комплекс образуется на внутренних клеточных мембранах и состоит из полимеразы L, белков P, M2-1 и вирусной геномной РНК, инкапсулированной белком N. Так как геномная РНК не является инфекционной, белки, участвующие в транскрипции вируса, переносятся вирусной частицей в клетку-мишень. Цикл репликации РСВ полностью протекает в цитоплазме, является РНК-зависимым и подвержен ошибкам из-за отсутствия механизмов коррективовки.

РНК-зависимая РНК-полимераза L способна синтезировать как транскрипты вирусной мРНК, так и полноразмерные антигеномы положительного смысла [80]. При транскрипции полимеразы L перемещается вдоль генома и синтезирует все 10 субгеномных мРНК по механизму «старт-стоп-рестарт». Синтез мРНК инициируется сигналом GS, который стимулирует добавление кэп-структуры к 5'-концу вновь синтезированной мРНК. Синтез поли-(А) на 3'-конце и высвобождение мРНК стимулируется сигналом GE [32]. Сигнал GE гена M2 ведет к преждевременной терминации порядка 90% транскриптов гена L, а синтез полных транскриптов гена L происходит в случае «ошибки» считывания сигнала GE [32]. Тем не менее, это не приводит к резкому снижению синтеза мРНК, кодирующей полимеразу L [56, 134]. Транскрипция происходит по полярному градиенту, так что мРНК белков NS1 и NS2 является наиболее распространенной (рис. 3).

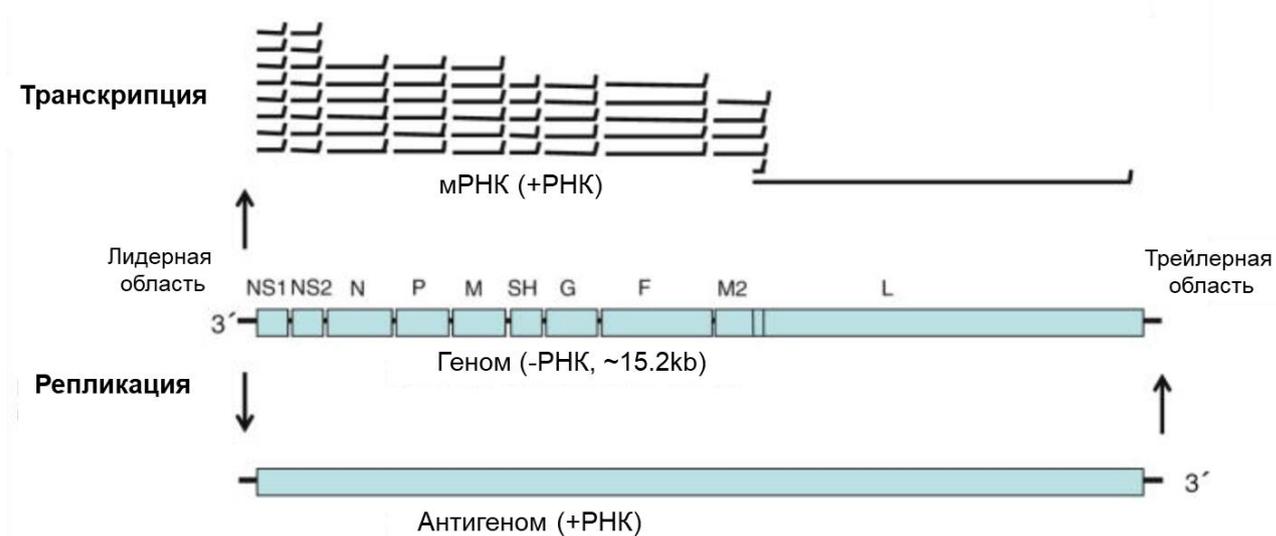


Рисунок 3 – Схема транскрипции и репликации РСВ. Полимераза транскрибирует геном отрицательной полярности, начиная с 3'-конца и образуя мРНК с положительным смыслом по механизму «старт-стоп-рестарт». С гена L синтезируется две полиаденилированные мРНК: очень короткие и полноразмерные мРНК L. На первом этапе репликации РНК синтезируется полноразмерный антигеном с положительным смыслом. Далее полимеразы выполняет вторую стадию репликации, синтезируя геномы полной длины (адаптировано из [32]).

Далее вирусная полимеразы переключается с транскрипции отдельных генов на репликацию полноразмерных антигеномов, игнорируя сигналы GS и GE (рис. 3). Необходимым и достаточным условием для начала репликации является наличие белков N, P и L [34]. Антигеном служит матрицей для синтеза полноразмерных геномов с отрицательным смыслом, упаковываемых в новую вирусную частицу [56; 90]. Удлинение как геномной, так и антигеномной цепи РНК зависит от одновременной инкапсидации

белком N, которая необходима для образования стабильных нуклеокапсидов, защиты РНК от деградации и избегания распознавания врожденной иммунной системой.

Сборка вирионов и почкование

Трансляция вирусных белков осуществляется рибосомальным комплексом клетки-хозяина. Гликопротеины транслируются на эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), затем транспортируются в аппарат Гольджи, где гликозилируются и перемещаются при помощи микротрубочек к мембране для сборки вирусных частиц. Вирусные белки и мРНК начинают обнаруживаться уже через 4-6 часов после инфекции, достигая максимума через 15-20 часов.

Через 10-12 часов после заражения начинается отпочковывание вирионов, которое достигает пика через 24 часа и продолжается до полного разрушения клеток. Координацию сборки и почкования вирионов осуществляет белок М [34]. Встраиваясь в цитоплазматические тельца включения белок М взаимодействует с предварительно сформированными РНП, состоящими из РНК и новосинтезированных белков N, P, L и M2-1. Далее этот комплекс перемещается к липидным рафтам на апикальной поверхности плазматической мембраны, где взаимодействует с гликопротеинами РСВ, прошедшими процессинг. Отпочковывание вирионов от клетки происходит при помощи белка SN, формирующего поры с катионной селективностью.

РСВ обладает способностью к межклеточному распространению посредством слияния соседних плазматических мембран. Это приводит к образованию синцития и поражению эпителия верхних дыхательных путей, способствуя распространению вируса в нижние дыхательные пути и вызывая симптомы, характерные для ОРЗ.

1.1.2. Механизм иммунного ответа при РСВИ

Информации об иммунном ответе здорового человека на первичную РСВИ немного, так как лабораторно подтвержденные случаи преимущественно являются тяжелыми и не отражают течения легкого заболевания, наблюдаемого у подавляющего большинства людей. В связи с этим большая часть информации об иммунном ответе человека на РСВИ получена при экспериментальном контролируемом заражении.

Механизм иммунного ответа на РСВИ в целом схож с иммунным ответом на другие респираторные вирусы, однако, сформированный на РСВ иммунитет является кратковременным и не способным предотвратить реинфекцию [53]. Для эффективной борьбы с вирусной инфекцией необходимо взаимодействие врожденного и адаптивного иммунитета. Врожденный иммунный ответ на РСВИ реализуется за счет клеточных

популяций (эпителиальные клетки, дендритные клетки, макрофаги, моноциты и гранулоциты), паттерн-распознающих рецепторов (PRR), продукции большого количества цитокинов и хемокинов, реакций клеточного стресса и апоптоза. Адаптивный иммунный ответ реализуется за счет Т-клеток и антител.

1.1.2.1. Врожденный иммунный ответ на респираторно-синцитиальный вирус

Решающую роль на начальных стадиях РСВИ играет врожденный иммунный ответ, который запускается в течение первых нескольких минут после инвазии патогена и длится до 3 дней. Врожденный иммунный ответ обеспечивает контроль над инфекцией, определяет тип формируемого адаптивного иммунного ответа и тяжесть заболевания.

Первой линией защиты от вирусных инфекций являются физиологические барьеры: гликокаликс, реснички эпителиальных клеток, секретируемая слизь, и легочные сурфактантные белки. Преодолев мукозальные барьеры, РСВ заражает эпителиальные клетки дыхательных путей, распространяясь от клетки к клетке и образуя синцитий. Эпителиальные клетки верхних дыхательных путей играют ключевую роль в распознавании вируса, активации раннего врожденного иммунного ответа и уничтожению патогена. В обнаружении РСВ инфицированных клеток принимают участие три класса PRR: Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR), RIG-I-подобные рецепторы (retinoic acid-inducible gene-I, RLR) и NOD-подобные рецепторы (nucleotidebinding oligomerization domain, NLR) [120, 237]. Молекулы RIG-I, NLR, TLR3 и TLR7/8 взаимодействуют с рибонуклеиновыми кислотами и обеспечивают распознавание РНК-содержащих вирусов [7, 237]. Передача сигналов от PRR приводит к активации регуляторных факторов интерферона и ядерного фактора- κ B (NF- κ B), которые инициируют экспрессию цитокинов, таких как интерферон (IFN) типа I и III, интерлейкин-1 (IL-1) и IL-6 [7, 237]. В свою очередь IFN активируют JAK/STAT-опосредованный сигнальный каскад, стимулирующий экспрессию интерферон-стимулируемых генов (ISG), которые препятствуют репликации вируса и способствуют его элиминации [237].

Ранний врожденный иммунный ответ характеризуется не только синтезом провоспалительных цитокинов, но и привлечением провоспалительных клеток в легкие. Важную роль в активации врожденного иммунного ответа играют нейтрофилы, эозинофилы и натуральные киллеры (NK клетки). Однако об их роли в разрешении РСВИ существуют противоречивые данные. Согласно литературным данным, нейтрофилы могут быть причиной обострения респираторного заболевания [11]. Их повышенная концентрация отмечалась при иммунизации инактивированной формалином вакциной против РСВ (ИФ-РСВ) и в дыхательных путях младенцев с РСВ-бронхиолитами [11]. Тем

не менее, нейтрофильные ловушки могут предотвращать распространение вируса и ограничивать вирусную репликацию [55]. Также долгое время считалось, что эозинофилы при РСВИ оказывают негативное влияние и являются основной причиной повреждения тканей и дисфункции дыхательных путей [200]. Однако сейчас показано, что эозинофилы во время острой фазы РСВ инфекции могут способствовать более быстрому выведению вируса из организма [117]. Популяция NK-клеток играет важную роль в элиминации вируса из организма, но, по некоторым данным, могут быть причиной чрезмерных воспалительных иммунных реакций [91, 142].

Связь между компонентами врожденного и адаптивного иммунитета осуществляется дендритными клетками (ДК). Основная роль ДК заключается в презентации антигенов и запуске клональной экспансии Т лимфоцитов, специфичных к вирусу. ДК могут приобретать вирусные антигены как за счет прямой инфекции, так и путем фагоцитоза вирионов или инфицированных клеток. Взаимодействуя с патогеном, ДК активируются, созревают и мигрируют в лимфатические узлы, где презентуют антиген наивным Т клеткам. Сигналы ДК во время активации наивных Т клеток определяют тип ответа эффекторных Т клеток [249].

На исход острой РСВИ может оказывать влияние относительное содержание классических и плазмацитоидных дендритных клеток, так как они являются медиаторами противовирусного иммунитета, благодаря способности продуцировать IFN типа I [150]. Повышенное количество плазмацитоидных ДК ускоряет элиминацию вируса и ограничивает легочную иммунопатологию, тогда как их истощение приводит к снижению уровня IFN I типа, увеличению продукции слизи и Th2 цитокинов в легких [227].

Таким образом, инфильтрация клеток врожденной иммунной системы активирует про- и анти- воспалительные реакции, которые в свою очередь стимулируют адаптивный иммунный ответ и способствуют элиминации вируса.

1.1.2.2. Адаптивный иммунный ответ при РСВИ

После врожденного иммунного ответа в борьбу с инфекцией вступает адаптивный иммунный ответ, характеризующийся иммунологической памятью и способностью быстро реагировать на ранее встреченные патогены антиген-специфическим образом. Адаптивный иммунный ответ на РСВ у животных и у людей различается. При заражении животных РСВ наблюдается развитие типичного противовирусного иммунного ответа, который характеризуется высоким уровнем вирус-специфичных антител и Т клеток, предотвращающих повторное заражение. У людей, как было отмечено ранее, формируемый

иммунный ответ не способен защитить от реинфекций, но облегчает тяжесть течения инфекции, снижая вирусную нагрузку и предотвращая повреждение ткани легкого.

Адаптивный Т-клеточный иммунный ответ. После взаимодействия с РСВ ДК, загруженные вирусными антигенами, мигрируют в лимфоузлы, где они представляют антигены на МНС-молекулах Т лимфоцитам и активируют CD4+ Т-хелперы (Th) и CD8+ цитотоксические Т лимфоциты (CTL).

РСВ-специфичные CD8+ Т клетки распознают и уничтожают зараженные клетки, продуцируя цитотоксические молекулы, такие как перфорины и гранзимы [215]. Эти лимфоциты накапливаются в легких, дыхательных путях, дренирующих легкие лимфатических узлах, селезенке и периферической крови [69, 214, 215]. Пик концентрации специфических к вирусу CD8+ Т клеток коррелирует с вирусным клиренсом [214, 241], достигая максимальной концентрации в легких зараженных мышей на 8-10 сутки [206, 214], в крови и трахеальных аспиратах инфицированных младенцев – на 12 день после появления симптомов [96], а при экспериментальном заражении взрослых – на 10 день [111]. На модели РСВИ у мышей было показано, что блокировка антителами или дефицит CD8+ Т клеток приводят к замедлению элиминации вируса [22, 77, 241], но перенос РСВ-примированных CD8+ Т лимфоцитов приводит к выздоровлению [22].

У людей РСВИ стимулирует формирование стабильных популяций CD8+ Т-клеток памяти в легких и дыхательных путях. Хотя CD8+ Т клетки памяти не могут предотвратить инфицирование, они имеют решающее значение в снижении вирусной нагрузки и проявлении симптомов заболевания. Роль Т клеток в элиминации вируса особенно очевидна у детей с нарушенным Т-клеточным ответом, у которых отмечают повышенную тяжесть заболевания и длительное вирусовыделение, прекращающееся после трансплантации костного мозга и приживления CD8+ Т клеток [51, 88].

Наиболее эффективным в защите от РСВИ является образование вирус-специфичных легочных тканерезидентных (T_{rm}) CD8+ Т клеток. T_{rm}, в сравнении с эффекторными Т клетками памяти (T_{em}), обладают большей аффинностью к антигену и раньше реагируют на проникновение патогена [65]. Образование в легких специфичных T_{rm} коррелирует со снижением вирусной нагрузки и облегчением течения заболевания [111, 153]. Интраназальный перенос РСВ-специфичных легочных тканерезидентных CD8+ Т клеток снижает вирусную нагрузку и увеличивает концентрацию IFN- γ в дыхательных путях мышей-реципиентов при последующей РСВИ [121]. Стоит отметить, что формирование РСВ-специфичных тканерезидентных Т клеток возможно только при местной иммунизации РСВ антигенами или при естественной РСВИ [121, 170, 214].

Также CD8+ Т клетки являются основными продуцентами IFN- γ , ускоряющего выведение вируса при первичной РСВИ. По литературным данным, интраназальное введение мышам IFN- γ ускоряет клиренс вируса из легких [49], а блокировка IFN- γ антителами приводит к повышенной вирусной нагрузке [183]. Тем не менее, независимо от наличия IFN- γ , полная элиминация РСВ происходит в течение 8 дней [49, 183]. У человека большинство данных также указывает на защитную роль IFN- γ при РСВИ. У младенцев с тяжелым течением РСВИ уровень IFN- γ в крови, сыворотке и носовых секретах существенно снижен по сравнению с детьми с легким течением [18, 28]. Также у пожилых пациентов, более восприимчивых к РСВИ, наблюдается сниженное количество IFN- γ -продуцирующих CD8+ Т клеток [29].

Тем не менее чрезмерная продукция IFN- γ CD8+ Т клетками может быть причиной усиления респираторного заболевания и развития легочной иммунопатологии [183, 214]. Истощение CD8+ Т клеток до РСВИ у мышей приводило к снижению потери массы тела и симптомов заболевания [77]. Для снижения риска развития иммунопатологии необходимо формирование CD8+ Т_м клеток памяти в дыхательных путях [214]. Однако у людей роль CD8+ Т клеток в индукции РСВ-ассоциированной иммунопатологии окончательно неясна. У детей с РСВИ, находящихся на искусственной вентиляции легких, в трахеальных аспиратах обнаруживали повышенную концентрацию гранзимов, продуцируемых CD8+ Т клетками [15]. Несмотря на снижение вирусной нагрузки, пик концентрации CD8+ Т клеток совпадал с выраженными симптомами болезни при экспериментальной контролируемой РСВИ у людей [111]. В то же время у младенцев, госпитализированных с первичной РСВИ, ответ CD8+ Т клеток коррелировал с выздоровлением, а иммуногистохимический анализ срезов легких смертельных случаев исходов РСВИ выявил почти полное отсутствие CD8+ Т клеток, что позволяет предположить, что CD8+ Т лимфоциты не были причиной летальных исходов [261, 262].

CD4+ Т клетки принимают участие в регуляции иммунного ответа на патоген, способствуют продукции антител В-клетками и формированию CD8+ Т клеток памяти. CD4+ Т-хелперы дифференцируются в Th1-, Th2-, Th17-, Th9- и регуляторные Т клетки (Treg) в зависимости от цитокиновой среды и могут играть различные роли в борьбе с РСВ. Th1-клетки продуцируют IFN- γ и стимулируют активацию макрофагов, способствуя уничтожению вируса. Th2-клетки продуцируют IL-4, -5 и -13, которые стимулируют продукцию антител IgE, IgG1 и IgA, защищая слизистую оболочку дыхательных путей от РСВ. Во время РСВИ как Th1, так и Th2 CD4+ Т клетки обнаруживаются в легких и крови, но преобладание Th2-ответов провоцирует усиление тяжести течения заболевания [87]. CD4+ Т-клетки также могут быть фактором иммунопосредованного усиления тяжести

течения заболевания, так как их истощение у мышей приводит к облегчению течения РСВИ [77]. Th17-клетки продуцируют IL-17 и стимулируют продукцию CTL, усиливая иммунный ответ на вирус. Однако секреция IL-17 индуцирует продукцию слизи и приводит к гиперреактивности нижних дыхательных путей. Блокировка IL-17 антителами на модели РСВИ у мышей приводила к снижению продукции слизи [31]. Согласно литературным данным, субпопуляция Th9 CD4+ Т клеток также стимулирует продукцию слизи, усугубляя тяжесть течения заболевания [31].

Для предотвращения повреждения легочной ткани иммунная система организма разработала ряд механизмов, например, образование CD4+ регуляторных Т клеток и выработка ингибирующих цитокинов [46, 203]. Ключевую роль в равновесии иммунной системы осуществляют CD4+ Treg клетки. При РСВИ у мышей Treg пролиферируют и накапливаются в легких. Их деплеция ускоряет элиминацию вируса, но и увеличивает количество антиген-специфических CD8+ Т клеток, продуцирующих IFN- γ и TNF- α [68], которые, как обсуждалось выше, могут быть причиной иммунопатологических изменений в легких. Также истощение Treg приводит к увеличению притока в легкие клеток врожденной иммунной системы (NK-клетки, эозинофилы и нейтрофилы) [47, 68, 151].

Другим механизмом саморегуляции иммунного ответа является продукция IL-10 CD8+ и CD4+ Т лимфоцитами [151, 236, 260]. Дефицит IL-10 или блокада рецепторов IL-10 при РСВИ у мышей приводит к повышенной потере веса, снижению функции легких [151, 236, 260], увеличению числа CD8+ Т клеток, продуцирующих IFN- γ или IFN- γ и TNF- α [151, 236, 260]. Основными продуцентами IL-10 в легких при РСВИ являются CD4+ Т клетки [260], при этом большая их часть - Treg. Также описаны субпопуляции эффекторных CD4+ и CD8+ Т клеток, совместно продуцирующих IFN- γ и IL-10, и лишенных экспрессии Foxp3, которые выступают в роли саморегулятора [151, 236, 260].

Антительный иммунный ответ. Вне зависимости от тяжести течения заболевания, РСВИ стимулирует выработку сывороточных и секреторных антител к большинству белков РСВ, но нейтрализующими являются только антитела, направленные на белки F и G [163]. Отмечают, что с более эффективной защитой от РСВИ коррелирует уровень РСВ-специфических мукозальных, а не сывороточных антител [7, 34, 82, 255], при этом титр сывороточных антител, формируемых при интраназальном введении, сопоставим с таковым при внутримышечном [7, 84].

Уровень сывороточных РСВ-специфических нейтрализующих антител в течение года снижается в 4 раза примерно у 75% взрослых [54]. Повторное заражение возможно уже через месяц [255] и приводит к 8-кратному увеличению титра антител [54]. Среди

новорожденных наблюдается корреляция уровня материнских антител с защитой от РСВИ, но после рождения материнские антитела распадаются с периодом полураспада примерно 21-26 дней, и их защитный эффект снижается [180]. Для предотвращения РСВИ недоношенных детей используют иммунопрофилактику РСВ-специфическими иммуноглобулинами и моноклональными антителами [162].

В целом, адаптивный иммунный ответ при РСВИ представляет собой сложный механизм, в котором задействовано множество клеток и молекул иммунной системы. Его основной целью является элиминация вируса и предотвращение иммунопатологии.

1.1.2.3. Роль белков РСВ в уклонении от иммунного ответа.

Одной из причин частых реинфекций является то, что РСВ, как и другие вирусы, выработал многочисленные механизмы модуляции иммунного ответа, обеспечивающие длительную репродукцию и трансмиссию вируса в организме хозяина, несмотря на его ограниченную генетическую изменчивость [247]. Основную роль в ингибировании врожденного иммунного ответа играют белки NS1 и NS2, подавляющие продукцию и передачу сигналов IFN I типа [15]. Белок NS1 способен модулировать ответ Т клеток, уменьшая количество CD8⁺ Т клеток [127, 173] и стимулируя Th-2-поляризацию иммунного ответа [15]. Белок NS2 стимулирует внутриклеточный сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), задерживая апоптоз зараженных клеток и способствуя длительной вирусной репликации [127].

Дополнительно РСВ имеет несколько механизмов, защищающих ключевые антигенные белки G и F от распознавания иммунной системой. Например, высоковариабельное гликозилирование белка G ограничивает эффективность распознавания антителами вариантов поверхностного антигена сезонных штаммов [33] и препятствует представлению антигена Т клеткам [242]. Кроме того, между штаммами РСВ отмечают сдвиги рамки считывания G-белка, появление точечных мутаций и стоп-кодонов [242]. Наличие двух гипервариабельных участков не только препятствует формированию эффективного гуморального ответа, но и повышает патогенность вируса [15]. Еще одним важным механизмом избегания иммунной системы является синтез секретируемой формы белка G (sG), которая действует как «приманка», ограничивая эффективность G-специфических антител [20]. Комбинация высоко вариабельного гликозилирования и секреция белка sG препятствует формированию вируснейтрализующих G-специфичных антител и Т клеток памяти [15]. Белок G мотива CX3C блокирует действие хемокина CX3CL1 и способствует прикреплению и проникновению вирусных частиц через рецептор CX3CR [242]. Кроме того, область CX3C ограничивает противовирусную активность

клетки, снижая выработку IFN, препятствуя рекрутированию иммунных клеток и модифицируя иммунный ответ [242].

Белок F РСВ, также являющийся мишенью нейтрализующих антител и вакцин, высоко консервативен между штаммами. Но при слиянии вириона с клеткой этот белок претерпевает конформационные изменения и антитела, специфичные к форме белка «после слияния», не обладают вируснейтрализующей активностью [19].

Белок SH может играть роль в пролонгировании жизни инфицированных клеток [67]. SH-делеционные мутанты были исследованы как кандидаты на живые аттенуированные вакцины, но на сегодняшний день ни одна из них не была введена в клиническую практику [202]. Белок N, встраиваясь в билипидную мембрану инфицированных эпителиальных клеток и ДК, препятствует образованию иммунологических синапсов, подавляя активацию Т клеток [15]. В литературе описана способность белка N взаимодействовать с компонентами пути RIG-1, ограничивая противовирусный ответ IFN [148].

Таким образом, вирус способен ускользать от защитных факторов врожденного иммунитета, реплицироваться в клетках иммунной системы, проявляя иммуносупрессивные и иммуномодулирующие свойства [1].

1.1.3. Феномен усиления патологии после вакцинации против РСВ

Разработка вакцины для профилактики РСВИ началась еще в 1957 году, когда впервые удалось выделить этот вирус от человека [25]. Первый вакцинный препарат, дошедший до стадии клинических исследований, состоял из концентрированного инактивированного формалином вируса (ИФ-РСВ), смешанного с гидроокисью алюминия в качестве адьюванта. В 1960-х годах была проведена серия клинических испытаний на детях [115, 118]. Внутримышечная иммунизация ИФ-РСВ хорошо переносилась, но не формировала достаточной защиты от инфекции. При последующей РСВИ у вакцинированных наблюдалось усиление тяжести течения заболевания (Enhanced Respiratory Disease (ERD)), сопровождающееся лихорадкой, хрипами, бронхопневмонией и частыми госпитализациями. 80% заболевших среди вакцинированных ИФ-РСВ нуждались в госпитализации, по сравнению с 5% госпитализаций в контрольной группе вакцины против парагриппа [118]. Два привитых ИФ-РСВ ребенка (в возрасте 14 и 16 месяцев) умерли от легочной недостаточности [118]. Вскрытие подтвердило репликацию РСВ и легочное воспаление [192].

Многолетние исследования были посвящены поиску иммунологических механизмов, лежащих в основе феномена ERD. Было показано, что иммунный ответ на

вакцинацию ИФ-РСВ заметно отличался от ответа на естественную инфекцию. В материалах вскрытия умерших детей была выявлена бронхопневмония с ателектазами и пневмотораксом. Легочная гистопатология описана в литературе как «перибронхиолярная моноцитарная инфильтрация с избытком эозинофилов» [118]. Хотя это называют эозинофилией, фактический отчет описывает преобладание нейтрофилов и мононуклеарных клеток в бронхиальном и бронхиолярном эпителии [204].

Сейчас описано несколько вероятных совместно действующих биологических механизма ERD и низкой эффективности вакцинных препаратов. Во-первых, неправильная конформация антигенов в составе вакцины приводила к индукции низкоафинных антител, не способных нейтрализовать вирус [174]. Во-вторых, введение ИФ-РСВ индуцировало избыточную стимуляцию ответа Th2 по сравнению с естественной РСВИ [169], провоцируя несбалансированное воспаление и гиперреактивность дыхательных путей во время и после инфекции [15, 230]. Изучение ERD у мышей позволило предположить, что эозинофилы, хотя и не являются прямой причиной, но могут являться маркером усиленного ответа Th2 на вакцинацию ИФ-РСВ. Цитокиновые ответы стимулированных Т-хелперов, демонстрировали обилие цитокинов Th2 после вакцинации ИФ-РСВ по сравнению с интраназальной инокуляцией живым ослабленным РСВ [19, 230]. В-третьих, недостаточная регуляторная активность специализированных популяций Т клеток и дендритных клеток, призванных гасить избыточные про-воспалительные реакции системы врожденного иммунитета. В-четвертых, отсутствие цитоплазматического процессинга антигенов, которое происходит при вирусной инфекции, что приводит к неэффективному праймированию лимфоцитов ИФ-РСВ.

Очевидно, что потенциальная возможность развития ERD эффекта должна учитываться при разработке новых препаратов специфической профилактики РСВИ, а также других вирусных инфекций.

1.1.4. Подходы к созданию новых вакцин против РСВ

Разработка вакцины против РСВ является сложной задачей, связанной с большим количеством затрудняющих факторов, таких как специфичность иммунного ответа на РСВ, вариабельность вируса, потенциальная неэффективность вакцины в отношении различных генотипов РСВ, возрастные особенности иммунной системы лиц, наиболее подверженных РСВИ. Сейчас принято выделять три группы населения, нуждающихся в профилактике РСВИ: 1) новорожденные (вакцинация беременных); 2) дети младшего и старшего возраста; 3) пожилые люди.

По данным центра инноваций и доступа к вакцинам (PATH PCB) (обновление 21 сентября 2023 г. [188]) как минимум 21 вакцинный кандидат сейчас находится на различных фазах клинических исследований (КИ). Наиболее распространенной мишенью для профилактики РСВИ является стабилизированный в конформации «до слияния» белок F (pre-F), так как антитела, распознающие белок F в конформации «до слияния», обладают высокой нейтрализующей активностью [162]. Этот антиген использован в вакцинных препаратах, одобренных для профилактики РСВИ у пожилых и беременных женщин в США и странах ЕС. Существенно увеличить скорость изучения защитной эффективности вакцинных кандидатов позволило использование модели контролируемой экспериментальной РСВИ человека (MV-012–968, RSVPre-F, MVA-BN-RSV, биоаналог паливизумаба, клеровимаб и Ad26.RSV.Pre-F) [162, 216]. Для разработки специфических средств профилактики РСВИ используют различные вакцинные платформы: вакцины на основе живых, ослабленных вирусов; субъединичные вакцины; вакцины на основе вирусных векторов, или нуклеиновых кислот. Ниже будут описаны вакцинные кандидаты, находящиеся в различных фазах КИ.

Живые аттенуированные вакцины представляют собой ослабленные вирусы. Разработка живых аттенуированных вакцин против РСВИ началась еще в 1960-х годах. Интраназальное введение живых аттенуированных вакцин имитирует естественную инфекцию, активируя врожденный иммунитет и формируя стойкий местный и системный антительный и клеточный иммунный ответ. Такие вакцины не вызывают ERD у наивных младенцев, поэтому в первую очередь они предназначены для пациентов педиатрического профиля [267]. Основной проблемой является достижение баланса между необходимым уровнем аттенуации вакцинного штамма и сохранением иммуногенности.

В I фазе КИ находится вакцинный кандидат CodaVax-RSV (RSV-MinL4.0, Codagenix), который был получен химическим синтезом. Аттенуация штамма достигнута путем деоптимизации вирусного генома и изменения гена полимеразы L [116]. В доклинических исследованиях иммунизация вакцинным кандидатом приводила к формированию сходного с инфекцией дикого типа гуморального и клеточного иммунного ответа [172]. Первая фаза КИ на взрослых добровольцах завершена (NCT04295070, результаты не опубликованы), сейчас происходит набор волонтеров для исследования первой фазы на детях (NCT04919109).

Вакцинный кандидат Avacc 19 (IT-RSVΔG, Intravacc, NTR7173) был аттенуирован путем удаления белка G. I фаза КИ показала, что вакцинный кандидат безопасен для

серопозитивных здоровых взрослых, но уровень нейтрализующих антител в сыворотке был низким, а назальные IgA были ниже уровня детекции [251].

Во II фазу КИ перешел вакцинный кандидат MV-012–968 (Meissa, NCT04690335), в котором деоптимизированы кодоны белков NS1, NS2 и G, удален белок SH и произведена абляция белка sG [233]. В первой фазе КИ было показано, что иммунизация вакцинным кандидатом безопасна для серопозитивных взрослых и детей, и индуцирует формирование IgA слизистой оболочки (NCT04444284) [162]. Закончилось исследование эффективности вакцины при экспериментальном контролируемом заражении здоровых добровольцев (NCT04690335). Сейчас продолжаются исследования, посвященные оценке безопасности вакцины-кандидата для серонегативных детей (NCT04909021) [165].

Исследование 1/2 фазы NCT03916185 National Institute of Allergy and Infectious Disease и Sanofi на серонегативных детях проводится сразу для трех вакцинных кандидатов ΔNS2/Δ1313/I1314L, RSV 6120/ΔNS2/1030s, RSV 276. Атенуация штаммов достигнута путем удаления белка NS2, введения мутаций в ген полимеразы L (ΔNS2/Δ1313/I1314L, RSV 6120/ΔNS2/1030s) или делеции белка M2-2 и мутации в гене L (RSV 276) [40].

Вакцины на основе химерного живого вируса экспрессируют белки РСВ в составе родственных, аттенуированных вирусов. В I фазе КИ находятся четыре вакцинных кандидата. В одном из них для экспрессии белка F РСВ использован дефицитный по репликации вирус Сендай (SeV/RSV, NCT03473002) [210, 263]. Следующий вакцинный кандидат, состоящий из живого, аттенуированного, рекомбинантного вектора БЦЖ, экспрессирующего белок N РСВ (rBCG-N-hRSV, NCT03213405) в ходе КИ I фазы продемонстрировал безопасность при внутрикожном введении [10]. В вакцинном кандидате PIV5-RSV (BLB201, Blue Lake) для доставки белка F РСВ использован вектор парагриппа. Для этого вакцинного кандидата FDA предоставило статус ускоренного режима, сейчас завершено исследование I фазы у взрослых (NCT05281263), а исследование 1/2 фазы у детей находится в стадии реализации (NCT05655182). Еще один вакцинный кандидат RSV/Flu-01E (NCT05970744) состоит из аттенуированного вируса гриппа, экспрессирующего фрагменты белка F РСВ, также находится в I фазе КИ на взрослых здоровых добровольцах и пожилых старше 60 лет.

Субъединичные вакцины обычно состоят из антигенов или их частей, дополненных адьювантом. Такой тип вакцин преимущественно используется для иммунизации беременных и пожилых людей в связи с возможным вакцино-ассоциированным ERD у не перенесших ранее РСВ детей [12].

Две субъединичные вакцины, одобренные для профилактики РСВИ у пожилых и беременных в США и странах ЕС, в качестве антигена содержат белок F, стабилизированный в конформации «до слияния». Первой вакциной, одобренной для клинического использования, был препарат Arexvu компании GlaxoSmithKline Biologicals [83]. Сейчас для этого препарата продолжаются исследования III фазы AReSVi (NCT04886596), но уже показано, что вакцинация снижает риск развития РСВ-ассоциированного заболевания нижних дыхательных путей на 82,6% и уменьшает вероятность развития тяжелой РСВИ нижних дыхательных путей на 94,1%. КИ продемонстрировали, что иммунизация Arexvu приводит к увеличению титра РСВ-нейтрализующих антител, и усилению антиген-специфичных CD4+ Т-клеток.

Еще одной одобренной FDA США вакциной для иммунизации пожилых и беременных женщин на сроке беременности 32–36 недель является препарат ABRYSVO™ компании Pfizer. Вакцинный препарат состоит из бивалентной композиции белка F подтипов РСВ А и В, стабилизированных в конформации «до слияния». Сейчас продолжаются КИ III фазы RENOIR60 (NCT05035212) на пожилых и исследования III фазы MATISSE (NCT04424316) на беременных женщин. Вакцина RSVpreF продемонстрировала безопасность и эффективность 66,7% в отношении предотвращения РСВ-ассоциированного заболевания ИНДП (96,66% ДИ: 28,8-85,8 %) у пожилых в возрасте старше 60 лет [256]. В ходе промежуточного анализа эффективность вакцины против тяжелой ИНДП при иммунизации беременных составила 81,8% (99,5% ДИ от 40,6 до 96,3) [114].

Опубликованы результаты I фазы КИ вакцинного кандидата DS-Cav1 (NIH/NIAID, NCT03049488), в котором в качестве антигена использован белок DS-Cav1 – секретируемый вариант белка pre-F [38]. Показано, что вакцинация приводит к десятикратному увеличению нейтрализующей активности сывороточных антител [38] и сохраняется в течение всего сезона РСВ [205].

В трех других субъединичных вакцинных кандидатах, также предназначенных для иммунизации пожилых, вакцинные антигены отличаются от белка F. В BARS13 использован белок G и иммунодепрессант циклоспорин А, индуцирующий Treg [141]. Вакцинный кандидат BARS13 продемонстрировал безопасность и иммуногенность в I фазе КИ (NCT04851977) и сейчас перешел во II фазу КИ (NCT04681833). В вакцинном кандидате Derovaх DPX-RSV в качестве вакцинного антигена использован эктодомен белка SH РСВ с липидами, обеспечивающими пролонгированное воздействие антигена и адъюванта. DPX-RSV показал безопасность и иммуногенность в I фазе КИ у взрослых в возрасте 50–64 лет [135, 243]. Сейчас исследование не активно. В третьем препарате VN-0200 в качестве

антигена используется VAGA-9001a, биологическая основа которого в литературе не раскрыта, и адъювант MAVN-9002b (фаза I NCT04914520, фаза II NCT05547087) [162].

Вакцины на основе вирусоподобных частиц состоят из вирусных антигенов, адъювантов и иммуностимуляторов. Такие молекулярные комплексы похожи на вирусы, но не способны инфицировать клетку из-за отсутствия вирусного генома. Эти вакцинные кандидаты являются более безопасной альтернативой живым аттенуированным вакцинам. Сейчас два вакцинных кандидата, разработанных с использованием данной платформы, завершили первую фазу КИ V306-SVLP (Virometix, NCT04519073) и IVX-121 (2020-003633-38, [106]).

IVX-121 – самособирающиеся синтетические вирусоподобные частицы, доставляющие 20 копий стабилизированных тримерных белков pre-F (DsCav-1). По представленным результатам исследования иммуногенности в фазе Ib, однократная иммунизация пожилых препаратом IVX-121 приводила к формированию устойчивого ответа РСВ-нейтрализующих антител [106]. Сейчас компания перешла к разработке двухвалентной вакцины против РСВ и метапневмовируса человека IVX-A12 RSV/hMPV (I фаза - NCT05664334, II фаза - NCT05903183).

Второй вакцинный кандидат на основе вирусоподобных частиц V306-SVLP, представляет собой синтетическую вирусоподобную частицу, которая презентует эпитопы антигенного сайта II белка F [277]. Целью вакцинации является усиление предсуществующего иммунитета у беременных женщин и пожилых людей [98]. КИ I фазы было проведено на здоровых женщинах (NCT04519073), в настоящее время изучается возможность внутрикожной ревакцинации с использованием накожного пластыря [98].

Вакцины на основе нуклеиновых кислот продемонстрировали безопасность и высокую эффективность при борьбе с SARS-CoV-2 [35], ускорив разработки РСВ-вакцин. Вакцинный препарат мРНК-1345 компании Moderna кодирует pre-F РСВ и использует тот же состав липидных наночастиц, что и вакцина против SARS-CoV-2 SpikeVax (Moderna), которая индуцирует и усиливает антительный и Т-клеточный иммунный ответ [162]. Этот вакцинный кандидат проходит исследования III фазы на пожилых добровольцах (NCT05127434). В рамках КИ была показана эффективность вакцинного препарата против ИНДП, вызванных РСВ (83,7%). В настоящее время продолжается исследование фазы I с участием здоровых женщин и серопозитивных детей (NCT04528719, NCT04528719). 5 июля 2023 года компания Moderna анонсировала подачу заявки на получение регистрационного удостоверения на вакцину против РСВ. Сейчас компания разрабатывает комбинированные респираторные вакцины для пожилых людей, включая РСВ, SARS-CoV-

2, грипп и метапневмовирус человека. Проводятся исследования I фазы вакцинного кандидата мРНК-1230, нацеленного на SARS-CoV-2, грипп и РСВ, и препарата мРНК-1045 против гриппа и РСВ (NCT05585632).

В 1/2 фазе КИ находится мРНК-вакцина компании Sanofi, предназначенная для иммунизации пожилого населения (NCT05639894). Исследование направлено на оценку безопасности и иммуногенности внутримышечной иммунизации (как однократной, так и повторной) вакцинным кандидатом, состоящим из мРНК РСВ и липидных наночастиц.

Рекомбинантные векторные вакцины используют модифицированный, дефектный по репликации вирус, доставляющий антигены РСВ и стимулирующий формирование гуморального и клеточного иммунитета. Такой метод иммунизации является эффективным, но сопряжен с формированием ненужной иммунной реакции на вирусный вектор.

Один из вакцинных кандидатов – препарат MVA-BN-RSV компании Bavarian Nordic. В качестве вектора для доставки поверхностных антигенов F и G, и внутренних белков M2 и N РСВ использован модифицированный вирус коровьей оспы Анкара [209, NCT05238025]. К сожалению, 22 июля 2023 г. компания Bavarian Nordic объявила, что в ходе КИ III фазы не были достигнуты первичные конечные точки, в связи с чем компания прекратила исследование препарата.

Вакцинный препарат Ad26.RSV.pre-F компании Johnson & Johnson разрабатывался для двух целевых групп населения: детей (испытания II фазы, NCT03303625 и NCT03606512) и пожилых людей (исследование III фазы, NCT04908683, остановлено). В препарате Ad26.RSV.pre-F был использован аденовирусный вектор для доставки белка pre-F РСВ [130]. Исследование фазы 1/2b на серопозитивных детях в возрасте 12–24 месяцев показало, что Ad26.RSV.Pre-F безопасен и вызывает формирование как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, сохраняющихся в течение 7 месяцев [234].

1.1.5. Т-клеточные вакцины

Общепринятым коррелятом протекции вакцин является формирование нейтрализующих антител, однако, появляющиеся новые варианты штаммов вирусов способны ускользать от индуцированных вакцинацией антител [246]. К примеру, пандемия гриппа H1N1 2009 года показала, что высокий титр сывороточных ингибирующих геммагглютинацию антител, не является надлежащим коррелятом протекции. Перекрестная защита от гетерологичных штаммов вируса гриппа и снижение тяжести течения заболевания были связаны с предсуществующими грипп-специфичными Т клетками [229, 265]. Также во время пандемии Ковид-19 было отмечено, что 40–60% людей, обладающих

вирус-специфичным Т-клеточным иммунитетом из-за предшествующего контакта с распространенными коронавирусами, переносили заболевание легче [81, 137].

Сейчас все чаще отмечают необходимость формирования не только гуморального, но и Т-клеточного иммунного ответа, так как индукция специфичного Т-клеточного иммунитета играет решающую роль в устранении внутриклеточной инфекции [201]. Антиген-специфичные Т клетки облегчают тяжесть течения последующего заболевания и обеспечивают перекрестную защиту от других штаммов [201]. Отмечают, что перекрестно-реактивный Т-клеточный иммунитет может снижать риск антителозависимого усиления инфекции [246].

Для индукции Т-клеточного иммунного ответа, специфичного к вирусу, используют вакцинные платформы, обеспечивающие внутриклеточную экспрессию чужеродных антигенов и стимуляцию образования специфических CTL [246]. Подходящим инструментом является использование вирусных векторов, экспрессирующих протективные антигены внутри клетки. В большинстве случаев векторы на основе вирусов создаются с помощью генной инженерии. Они менее патогенны и могут быть дефектными по репликации. Выбор вируса для доставки протективных антигенов оказывает влияние не только на эффективность вакцинации, но и на поляризацию иммунного ответа. Также оказывать влияние на формируемый иммунный ответ может встроенный трансен, использованные адъюванты и пути введения вакцинного препарата.

Адресная доставка антигена способна повысить иммуногенность вакцины, благодаря индукции тканерезидентных Т клеток памяти. T_{gm}, находящиеся в коже, легких и желудочно-кишечном тракте, играют решающую роль в быстром местном иммунном ответе, предотвращая инвазию патогенов [212]. Интраназальное введение вакцин способно индуцировать как системный, так и местный иммунный ответ [100]. Формирование иммунного ответа на уровне слизистых оболочек блокирует инвазию респираторных патогенов, вырабатывая антиген-специфичные IgA и T_{gm} на поверхности слизистой оболочки.

1.2. Вирус гриппа

Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, основными представителями которого являются вирусы гриппа типов А, В, С и D [186]. Принадлежность вируса гриппа к определенному типу определяется количеством сегментов генома, кругом возможных хозяев, а также антигенными различиями внутренних белков – нуклеопротеина (NP) и матриксного белка (M) [186]. Классификация вируса

гриппа А на подтипы осуществляется на основании антигенных различий поверхностных гликопротеинов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (NA).

Вирус гриппа А – оболочечный вирус, форма вириона которого варьируется от сферической до нитевидной. Липидная оболочка, приобретаемая вирионом при отпочковывании от клетки хозяина, модифицирована трансмембранными вирусными белками: НА, NA и матриксный белок (M2). Липидную оболочку изнутри покрывает белок M1, который обеспечивает жесткость вирусной оболочки. Белок M1 взаимодействует с РНП, состоящим из геномной РНК, плотно упакованной белком NP и ассоциированной с белками полимеразного комплекса (PB1, PB2, PA).

Геном вируса гриппа А сегментирован и состоит из восьми одноцепочечных РНК с отрицательной полярностью. Каждый геномный сегмент кодирует транскрипты основных и штамм-специфичных вирусных белков. Для синтеза нескольких белков с одного геномного сегмента в вирусе гриппа реализуются альтернативный сплайсинг, альтернативная инициация трансляции и рибосомный сдвиг [86].

1.2.1. Использование вируса гриппа А в качестве вектора

Для доставки чужеродных антигенов в организм в настоящее время описано использование различных вирусов: вируса везикулярного стоматита, модифицированного штамма вируса коровьей оспы Анкара, аденовируса, БЦЖ и других [37, 43, 102, 253]. Вакцины на основе вирусных векторов сочетают в себе преимущества безопасности инактивированных вакцин с иммунологическими преимуществами и низкой стоимостью живых вакцин [45]. Использование хорошо изученных вирусных векторов позволяет быстро разработать вакцинные кандидаты для борьбы с возникающими вспышками вирусных пандемий, а также создавать вакцину от патогенов, против которых трудно получить эффективные специфические средства профилактики.

Вирусные векторы имеют разную генетическую емкость, кинетику проникновения, способность к репликации и профили экспрессии белков. В связи с этим уровень иммунного ответа и защиты, обеспечиваемые вирусными векторными вакцинами, могут сильно различаться. Потенциальные преимущества и недостатки вирусных векторов необходимо учитывать при разработке вакцинных кандидатов.

В качестве вирусного вектора возможно использование аттенуированного рекомбинантного вируса гриппа А. Иммунизация вектором вируса гриппа способна индуцировать формирование иммунного ответа к встроенному вакцинному антигену и самому вектору. В ответ на гриппозную инфекцию формируются долговременные слизистые и системные гуморальные иммунные реакции, а также клеточный иммунитет

[208]. Соответственно, и генетически модифицированные вирусы гриппа, экспрессирующие протективные антигены, обладают потенциалом вызывать защитные иммунные реакции против чужеродного патогена как на уровне слизистой оболочки, так и системно.

Преимущества использования вируса гриппа для доставки вакцинных антигенов широко признаны, и с начала 1990-х годов вирус гриппа тестировался на роль вектора, доставляющего протективные антигены в организм [75]. Ранние эксперименты продемонстрировали возможность включения чужеродных эпитопов в антигенные сайты белка НА: химерные вирусы индуцировали как антительный иммунный ответ, так и Т-клеточный [144, 198].

Использование методов обратной генетики позволило получать жизнеспособные рекомбинантные вирусы гриппа, экспрессирующие чужеродные эпитопы, непосредственно из плазмидной ДНК, кодирующей все вирусные гены. В результате многочисленных исследований, посвященных созданию вакцин на основе гриппозных векторов, был выявлен ряд генных сегментов вируса гриппа, толерантных к вставке гетерологичного генетического материала: гены НА, NA, NS, PB-2 и М.

1.2.1.1. Преимущества использования гриппозного вектора.

Аттенуированные вирусы гриппа представляют собой привлекательную альтернативу другим вирусным векторам. Одним из преимуществ является то, что геном вируса гриппа представлен отрицательной РНК и в его репликативном цикле отсутствует стадия ДНК. Это исключает возможность интеграции вирусного генома в геном клетки-хозяина.

Как было отмечено выше, иммунизация рекомбинантным вирусом гриппа А способна стимулировать как гуморальное, так и клеточное звено иммунного ответа, а выбор генетического сегмента для встраивания интересующего антигена позволяет модулировать тип формируемого на протективный антиген иммунного ответа. Вставка антигена в генные сегменты, кодирующие поверхностные гликопротеины НА или NA, приводит к формированию сильного антительного ответа, так как вирусные НА и NA являются основной мишенью нейтрализующих антител. Модификация генных сегментов, кодирующих внутренние, неструктурные или полимеразные белки, индуцирует образование преимущественно CD8+ Т-клеточных ответов.

Важным преимуществом гриппозных векторов является антигенное разнообразие подтипов вируса гриппа, позволяющее проводить повторную иммунизацию для достижения максимального профилактического эффекта и избегания предсуществующего

иммунного ответа. Использование актуальных поверхностных антигенов вируса гриппа позволяет сформировать иммунный ответ сразу против двух возбудителей: сезонного вируса гриппа А и встроенного патогена [125, 158, 268]. При иммунизации вектором вируса гриппа CD8⁺ CTL преимущественно распознают высоко консервативные для различных подтипов эпитопы белков М1, NP, PA или PB-2, формируя защитный иммунитет в том числе против гетерологичных штаммов вируса гриппа. Более того, использование различных вариантов НА позволяет применять гриппозные векторы для вакцинации как людей, так и животных.

В зависимости от выбранного патогена возможно модулировать формируемый иммунный ответ не только путем выбора модифицируемого генного сегмента, но и за счет использования всевозможных способов введения. Помимо интраназального способа иммунизации в литературе описаны и альтернативные варианты вакцинации: подкожно, внутримышечно, интравaginaльно [72, 143, 144, 145, 239]. Эти пути введения также высоко иммуногены [160]. Несмотря на описанные способы модуляции иммунного ответа, при конструировании вакцинного штамма необходимо помнить, что на индукцию иммунного ответа оказывает влияние также и природа встраиваемого антигена.

Безопасность использования живых гриппозных вакцин и векторов на основе вируса гриппа широко освещена [13, 14, 199]. Многие подходы к созданию гриппозных векторов, описанные ниже, не нуждаются в дополнительной аттенуации. Аттенуация штаммов достигается, например, путем укорочения гена NA или гена NS1, путем введения мутаций, обеспечивающих, например, формирование температурочувствительного фенотипа. Известно, что РНК-содержащие вирусы, в том числе вирус гриппа, являются сильными индукторами врожденного иммунитета [231]. К тому же к настоящему времени описано, что векторы вируса гриппа А с модифицированным белком NS1 обладают выраженными самоадьювантными свойствами [171]. Ранее было описано, что нарушение функций неструктурного белка NS1 приводит к усилению иммуногенности вируса за счет стимуляции цитокинового ответа [2, 190, 231].

1.2.1.2. Потенциальные недостатки векторов вируса гриппа

Несмотря на ряд преимуществ, использование вектора вируса гриппа А при разработке вакцинных препаратов имеет ряд потенциальных недостатков. Среди них стоит упомянуть теоретически существующий риск генетической реассортации генных сегментов между рекомбинантной вакциной и циркулирующими вирусами гриппа, особенно при интраназальном введении вакцины в сезон гриппа. Это может быть причиной

потери сегмента химерного гена, кодирующего чужеродный трансген. Использование альтернативных путей введения значительно снижает риск генетической реассортации.

Также необходимо подчеркнуть проблему безопасности, связанную с наличием многоосновного сайта расщепления в НА подтипов H5 и H7. Многоосновный сайт расщепления в НА является важным фактором вирулентности высокопатогенного вируса гриппа птиц, ответственным за системные инфекции и высокую летальность домашних птиц [75]. В случае, если НА подтипов H5 и H7 рассматриваются для разработки вакцины, многоосновный сайт расщепления удаляют.

Векторы вируса гриппа с нарушенной или недостаточной репликацией, как и аттенуированные штаммы вируса гриппа, могут быть менее иммуногены с точки зрения индукции сывороточных антител [73]. Однако интраназальная иммунизация преимущественно направлена на индукцию антител слизистой оболочки IgA и Т-клеточного иммунного ответа (резидентных Т клеток памяти). К тому же как было отмечено ранее, для усиления реакции сывороточных антител на встроенные антигены возможно использование альтернативных путей иммунизации (подкожно, внутримышечно, интравагинально) или увеличение вводимых доз [160].

Общая проблема использования вирусных векторов при разработке вакцин заключается в том, способен ли предсуществующий иммунитет против вектора повлиять на эффективность вакцинации [43]. Люди в течение жизни переносят множественные инфекции вирусом гриппа и иммунизации, в связи с чем у них вырабатываются антитела к подтипам H1N1 и H3N2. Тем не менее, использование НА или NA, с которыми люди ранее не встречались, может в значительной степени снизить риск интерференции со стороны предсуществующих антител.

Еще одной проблемой всех векторных вакцин является доминирование антигенных детерминант вектора над эпитопами вставки [204, 213, 217]. Иммунодоминирование может возникнуть, если эпитопы в векторе занимают более высокий ранг в иерархии доминирования, чем эпитопы в антигене. Переориентировать иммунный ответ Т клеток с доминантных векторных детерминант на субдоминантные эпитопы вставки добавлением адьюванта невозможно. Праймирование антигеном также не всегда позволяет корректировать иммунные реакции [257]. Для решения этой проблемы изучают различные варианты клонирования трансгенов в вектор.

1.2.3. Варианты векторов вируса гриппа. Сегменты, используемые для встраивания трансгена

В настоящее время описаны различные стратегии вставки интересующих генов в геном вируса гриппа. Однако до сих пор не описано вакцинных кандидатов, в которых встраивание чужеродного гена было осуществлено в геномные сегменты PB1, PA или NP, хотя есть исследования, показывающие возможность введения репортерных генов в эти сегменты [75, 94, 244]. Ниже будут рассмотрены некоторые вакцинные кандидаты на основе вируса гриппа А в соответствии с генным сегментом, в который был введен чужеродный антиген.

1.2.3.1. Ген гемагглютиниона НА

Основными функциями НА вируса гриппа является связывание с рецепторами и слияние вирусной оболочки с эндосомальной мембраной. НА определяет тропизм вируса к тканям хозяина, и определяет патогенность вируса. Распространение вируса гриппа в организме хозяина ограничивается сайтом расщепления белка НА. Так, например, для расщепления НА субтипов Н1, Н2, Н3 необходимы трипсиноподобные протеазы, представленные в дыхательных путях человека. Вирусы с многоосновным сайтом расщепления могут инфицировать различные ткани *in vivo* и вызывать системную инфекцию у домашней птицы и хорьков, в то время как вирусы с одноосновным сайтом расщепления вызывают только локальную респираторную инфекцию [154, 218]. Гемагглютинин вируса гриппа является основной мишенью нейтрализующих антител и имеет пять антигенных сайтов (от А до Е) [259], расположенных в основном в головном домене [264]. Их часто используют для проведения модификаций при конструировании гриппозного вектора (рис. 4).

В литературе показана возможность замены антигенного сайта В на аналогичный сайт НА других подтипов вируса гриппа (рис. 4) [144]. Описано клонирование эпитопов белков вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в антигенные сайты В [143] и Е [175] и в положение 173 НА2 [271]. В антигенный сайт Е также встраивали эпитопы белков малярийных паразитов (рис. 4) [145, 167, 198]. Иммунизация такими рекомбинантными вирусами гриппа А преимущественно индуцировала антительный ответ против встроенных белков [60, 145, 167, 198, 271], но некоторые из вакцин-кандидатов были способны вызывать и специфические Т-клеточные ответы [143, 145, 198].

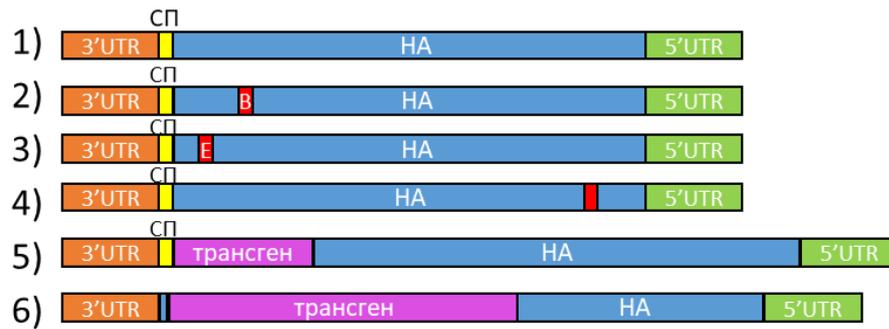


Рисунок 4 - Схематическое изображение стратегий клонирования, использованных для вставки интересных нуклеотидных последовательностей (розовое – трансген, красное – эпитопы Т- и В-клеток, СП – сигнальный пептид) в сегмент гена HA. 1) – схематическое представление гена HA дикого типа; (2–4) – введение последовательностей, кодирующих чужеродный эпитоп в антигенный сайт В (2), Е (3) или в положении 173 HA2 (4); 5) – встраивание последовательности трансгена различной длины между последовательностями, кодирующими сигнальный пептид и геном HA; 6) – последовательность трансгена может заменять большую часть гена HA. Адаптирован из [73].

Также продемонстрирована возможность встраивания чужеродных последовательностей между последовательностью сигнального пептида HA и N-концом белка. Такая стратегия была использована для получения штамма, экспрессирующего антигены возбудителя сибирской язвы [147], ВИЧ [73] и консервативные домены белков G или F РСВ [112, 139, 140] (рис. 4). Иммунизация такими векторами также приводила к формированию специфического антительного ответа.

Описана возможность замены головного домена HA одного подтипа на головной домен HA другого подтипа [85], или замены эктодомена HA вируса гриппа А на таковой вируса гриппа В и наоборот [60] (рис. 4). Иммунизация модифицированными штаммами приводила к формированию антительных и Т-клеточных ответов [85], но такие штаммы требовали дополнительной аттенуации [85]. Вопрос о возможности замены головного домена последовательностью белка, отличного от вируса гриппа еще все остается открытым.

1.2.3.2. Ген нейраминидазы NA

NA вируса гриппа разрушает рецепторы к вирусу гриппа А на клетках организма хозяина, отщепляя остатки сиаловых кислот. Его активность антагонистична связыванию

рецептора NA, однако, NA необходима для эффективной репликации вируса, высвобождению новых вирусных частиц из инфицированных клеток [254].

К настоящему времени описаны различные варианты замены части последовательности, кодирующей белок NA на последовательность интересующего белка следующих патогенов: вирус болезни Ньюкасла [187], вирус Западного Нила [160] и ВИЧ [42] (рис. 5). Иммунизация такими вакцинными кандидатами индуцирует Т клетки и антитела. Вакцинные кандидаты высоко аттенуированы [42, 160] и для вирусной репликации требуется добавление экзогенной NA [225].

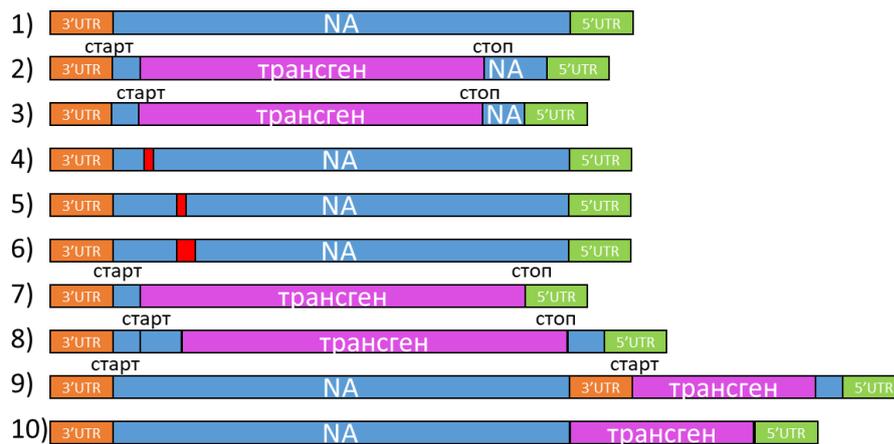


Рисунок 5 - Схематическое изображение стратегий клонирования, использованных для вставки интересующих нуклеотидных последовательностей (розовое – трансген, красное – эпитопы Т- и В-клеток) в сегмент гена NA. 1) схематическое представление гена NA дикого типа; (2, 7, 10) – встраивание трансгена в ОРС NA с заменой последовательности NA или слияние с ней; (3, 8) – встраивание альтернативного стартового кодона; (4 – 6) – встраивание эпитопов в различных положениях сегмента NA; 9) – встраивание альтернативного стартового кодона для бицистронной конструкции; 10) – слияние полноразмерного гена NA с геном интереса. Адаптирован из [73].

Интравагинальное введение химерного вируса гриппа А, в область стебля NA которого встроены эпитопы Т- или В-клеток интересующих антигенов (например, *Chlamydia trachomatis* [93] или ВИЧ [72]) приводят к формированию специфических антител и Т клеток слизистых оболочек. Этот подход был использован для создания рекомбинантного вируса гриппа А, несущего эпитопы γ -герпесвируса [232], вируса лимфоцитарного хориоменингита [23, 136] или белка CS *Plasmodium yoelii* [198] (рис. 5).

Интересным подходом является создание бицистронных конструкций химерного гена, кодирующего полный белок NA и представляющий интерес антиген [156]. Для экспрессии белков в инфицированных клетках ОРС гена интереса клонировали ниже

лидерной последовательности гена NA [155, 157]. Такой подход был описан для индукции антительного и Т-клеточного ответа на токсоплазму [157] и Mengo вирус [155]. Однако отмечают, что полученные таким способом векторы недостаточно аттенуированы [155].

Также описано конструирование вектора вируса гриппа А с модифицированным белком NA для профилактики РСВИ. Иммунизация мышей вектором, в котором с С-конца нейраминидазы был встроены Т-клеточный CD8 эпитоп белка М2-1, защищали мышей от контрольного заражения РСВ, не вызывая легочной эозинофилии [129] (рис. 6).

1.2.3.3. Ген полимеразного белка PB-2

Белок PB-2 является частью полимеразного комплекса, состоящего из PB-1, PB-2, PA и NP. Полимеразный комплекс выполняет несколько функций в цикле репликации вируса, включая транскрипцию мРНК, кРНК и вРНК. PB2 имеет кэп-связывающий домен, который участвует в процессе захвата кэпа из клеточных мРНК [73].

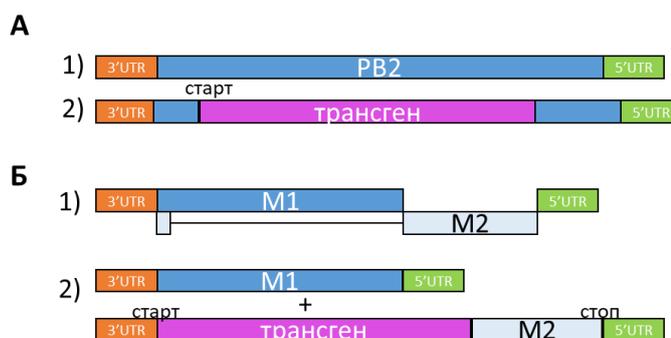


Рисунок 6 - Схематическое изображение стратегий клонирования, использованных для вставки интересующих нуклеотидных последовательностей (трансген) в сегменты генов PB-2 (А) и М (Б). (А) 1) – последовательность, кодирующая PB-2 дикого типа; 2) – встраивание трансгена после 336 нуклеотидов с 5'-конца гена PB-2. (Б) 1) – структура М-сегмента дикого типа; 2) – два генетически модифицированных генных сегмента были сконструированы для замены исходного генного сегмента М и получения вируса с 9 генными сегментами. Трансген был встроены в ORF с последовательностью, кодирующей белок M2. Адаптирован из [73].

Инсерция чужеродных генов в PB2 приводит к полной потере полимеразной активности и, как следствие, дефициту репликации вируса [125, 185]. Для накопления PB2-дефицитных вирусов необходимо использование клеток, синтезирующие этот белок [125]. Одним из описанных способов модификации гена PB-2 является замена гена PB-2 на HN-белок вируса парагриппа человека [125] (рис. 6А). Вакцинация рекомбинантным вирусом гриппа индуцировала формирование НА- и HN-специфичных антител, обеспечивала защиту как от вируса гриппа, так и от парагриппа. Подобная стратегия клонирования была

также использована для разработки вакцинного кандидата против РСВ. Однако иммунизация мышей штаммом, в котором произведена замена гена РВ-2 на последовательность, кодирующую белок F РСВ, не приводила к формированию РСВ-специфичных антител и усиливала тяжесть течения РСВ инфекции [63].

1.2.3.4. Ген М

Белок М2 совместно с белком М1 кодируется геном М. М2 формирует протонный канал и играет роль в высвобождении РНП в клетку [73]. Описанная в литературе модификация гена М заключалась в замене внеклеточного домена М2 на НА1 вируса гриппа А/PR/8/34 [268] (рис. 6Б). Для сборки вируса сегмент М-гена был заменен двумя сегментами. Один сегмент гена кодировал только М1, второй кодировал химерный белок М2 со встроенным трансгеном. Иммунизация вектором индуцировала формирование антител против НА исходного (H9) подтипа и вируса гриппа А/PR/8/34 (H1).

1.2.3.5. Ген неструктурных белков NS

Белок NS1 кодируется восьмым сегментом NS, является вирусным фактором патогенности и, как известно, влияет на клеточные пути IFN I типа [132]. Отсутствие активности белка NS1 в вирусе гриппа А приводит к его повышенной чувствительности к противовирусному действию IFN [48, 71]. Подробнее функции белка NS1 в подавлении иммунной системы будут рассмотрены ниже.

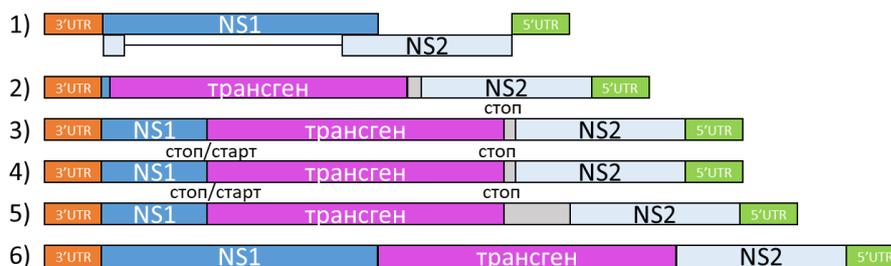


Рисунок 7 – Схематическое изображение стратегий клонирования, используемых для введения интересующих генов (трансген) в сегмент гена NS 1) – схематическое представление сегмента гена NS дикого типа, NS1 (темно-синий), NS2/NEP (голубой); (2-5) – клонирование трансгена в OPC с различными вариантами укорочения гена NS1; (4-5) – встраивание трансгена после кассеты «стоп/старт».6) – слияние полноразмерного сегмента гена NS с геном интереса. Адаптирован из [73].

Одной из интересных стратегий клонирования является замена последовательности, кодирующей белок NS1 на последовательность трансгена с сохранением последовательности белка NS2. Подобная конструкция была использована

при разработке вакцин против SARS-CoV-2 [27, 45]. Одна из них (dNS1-RBD, Pneucolin[®], ChiCTR210005139) является первой в мире мукозальной вакциной против COVID-19, которая прошла три фазы клинических исследований и была разрешена для экстренного использования в Китае [269, 272].

Еще одной популярной стратегией вставки антигена является его слияние с укороченным до 124-126 N-концевых аминокислотных остатков белка NS1. Такой способ генетических манипуляций использовали для экспрессии множества представляющих интерес генов или их частей, включая IL-2 [59, 122], пептиды *Brucella abortus* [239], вируса гепатита С [274], вируса иммунодефицита человека [240], аденовируса человека [270], РСВ [129, 273], коронавируса [107] или микобактерии туберкулеза [220, 235]. С последней конструкцией были проведены клинические испытания фазы I (NCT03017378, NCT02501421), которые продемонстрировали безопасность и иммуногенность интраназального и сублингвального введения здоровым, БЦЖ-вакцинированным добровольцам. Также закончилось клиническое исследование I – II фазы (NCT05696067) вакцины для профилактики коронавирусной инфекции. Сейчас проходят клинические исследования вакцинных кандидатов, сконструированных с помощью описанной стратегии, для профилактики РСВИ (NCT05970744, фаза I), туберкулеза (NCT05945498, фаза I). Ранее в Казахстане вектор, экспрессирующий пептиды *Brucella abortus* (Flu-BA), был внедрен в ветеринарную практику для иммунизации крупного рогатого скота [207].

Еще одним вариантом клонирования трансгена в ген NS является слияние интересующей генетической последовательности с последовательностью полноразмерного белка NS1. Иммунизация мышей подобным вектором, экспрессирующим эпитопы белков F и G РСВ, стимулировала формирование специфических антител и Т клеток, предотвращая вирусную репликацию и гистопатологические изменения в ткани легкого [16].

1.2.4. Модуляция иммунного ответа белком NS1

Принимая во внимание не только разнообразие вакцинных кандидатов с модифицированным геном NS вируса гриппа, но и использование таких вакцинных препаратов в клинической и ветеринарной практике, стоит отметить, что генетические манипуляции с геном NS вируса гриппа являются наиболее перспективными. Это связано не только с тем, что модификации белка NS1 не оказывают влияния на морфологию вириона, но с нарушением функций белка NS1 блокировать иммунный ответ и обеспечивать тем самым безопасность рекомбинантного штамма [48].

1.2.4.1. Структурная организация белка NS1

Неструктурный белок NS1 кодируется восьмым сегментом РНК вируса гриппа вместе с белком ядерного экспорта NEP/NS2 и третьим белком NS3 [219]. В зависимости от штамма вируса белок NS1 имеет длину от 230 до 237 аминокислот и молекулярную массу примерно 26 кДа [86, 186]. NS1 активно экспрессируется на протяжении всего жизненного цикла вируса гриппа и обнаруживается как в цитоплазме, так и в ядре инфицированной клетки. Соотношение концентрации цитоплазматического и ядерного белка NS1 зависит от штамма, типа зараженных клеток и стадии жизненного цикла вируса [64, 252].

Белок NS1 состоит из четырех хорошо изученных функциональных доменов. N-концевой РНК-связывающий домен (RBD, 73 ак) [86] необходимый для димеризации белка и связывания двуцепочечных РНК (дцРНК) [30, 258]. Аминокислоты с 35 по 41 содержат сигнал ядерной локализации (NLS) [79]. Следующие 10–15 аминокислот образуют высоко вариабельный линкерный домен (L) [108], обеспечивающий пространственную ориентацию RBD и эффекторного домена (ED) [86]. ED белка NS1 (88 – 202 ак) ответственен за взаимодействие более чем с 50-ю белками клетки-хозяина [86] (рис. 8). Взаимодействия между ED приводят к олигомеризации белков NS1, необходимой для связывания дцРНК [86]. Аминокислоты со 137 по 146 содержат сигнал ядерного экспорта (NES) [86]. Последний C-концевой домен (СТТ) содержит от 11 до 33 аминокислот и влияет на вирусный патогенез. [86]. Некоторые штаммы вируса гриппа А в домене СТТ содержат второй NLS (216–221 ак), образующий сигнал ядрышковой локализации (NoLS) [108]. Расположение доменов представлено на рисунке 8.

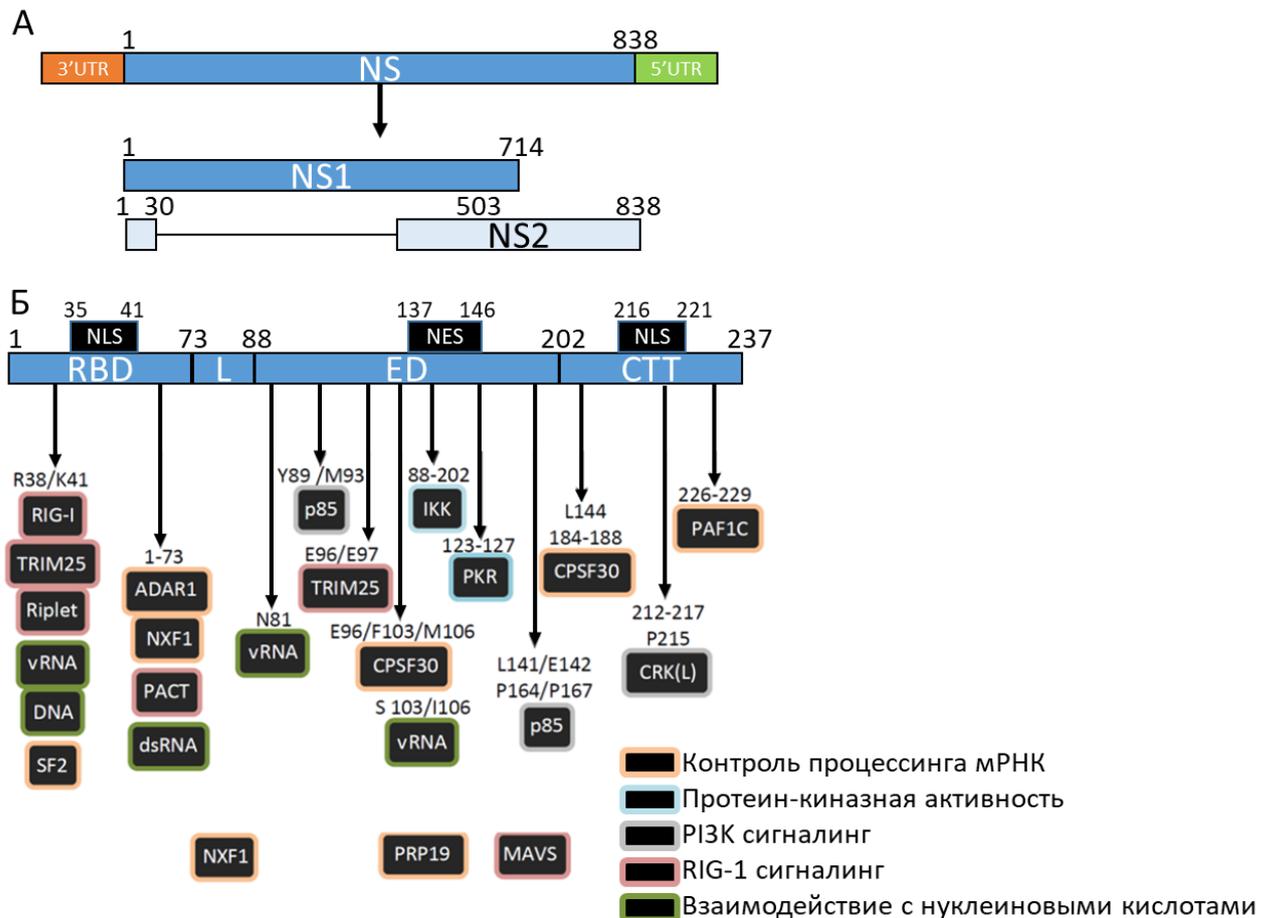


Рисунок 8 – Схематическое изображение неструктурного сегмента NS вируса гриппа А, вирусных транскриптов и доменов NS1. (А) Генный сегмент NS с некодирующими областями (UTR). Белки NS1 и NS2/NEP. (Б) Доменная структура и схема взаимодействий белка NS1.

1.2.4.2. Механизмы ингибирования белком NS1 врожденных иммунных ответов

Вирус гриппа, как и другие вирусы, имеет ряд механизмов, позволяющих ему избегать действия иммунной системы организма-хозяина. Одним из них является иммуносупрессорное действие неструктурного белка NS1 [191]. Блокировка противовирусного иммунного ответа хозяина происходит в основном благодаря ингибированию продукции IFN и противовирусной активности генов, стимулируемых IFN (ISG). Выделяют три механизма избегания противовирусного ответа, основную роль в которых играет белок NS1: 1) прямое ингибирование выработки IFN (взаимодействие с рецепторами RIG-I и связывание с дцРНК); 2) блокировка экспрессии мРНК; 3) взаимодействие с ISG [108].

Ингибирование выработки IFN белком NS1 происходит благодаря угнетению способности внутриклеточных сенсоров (RIG-1) обнаруживать вирусные РНК. NS1

напрямую взаимодействует с убиквитин-лигазами E3 TRIM25 и Riplet, функцией которых является активация сигналов RIG-I [108]. РНК-связывающие свойства белка NS1 позволяют ему связывать как вирусную РНК, оставляя ее незамеченной для RIG-I рецепторов, так и клеточную РНК [92, 258]. Описано, что мутации в RBD домене (R38A и K41A) ингибируют связывание белка NS1 с дцРНК [258] и снижают вирусную репликацию [108]. Косвенное регулирование сигналов RIG-I происходит путем индукции убиквитин-модифицирующего белка A20, который ингибирует IRF3-опосредованную индукцию IFN I типа и ISG [108].

Подавление экспрессии генов хозяина. С-терминальный домен белка NS1 содержит сайты связывания с субъединицей CPSF30 (cleavage and polyadenylation specificity factor) и poly(A)-связывающим белком II (PABPII) [178]. Связывание NS1 с CPSF30 ингибирует распознавание комплексом CPSF сигналов полиаденилирования на 3'-конце мРНК, блокируя расщепление незрелых мРНК (пре-мРНК) и привлечение poly(A)-полимеразы [108]. Связывание белка NS1 с PABPII препятствует синтезу длинных олиго(A)-хвостов, способствуя накоплению в ядре инфицированных клеток пре-мРНК, содержащих короткие poly(A)-хвосты [86]. Дополнительно N-терминальный домен белка NS1 способен взаимодействовать с poly(A)-хвостами клеточных пре-мРНК, блокируя их транспорт в цитоплазму [178]. Другой функцией белка NS1 является блокировка сплайсинга клеточных пре-мРНК, путем связывания с U6 и U6atac небольших ядерных РНК (мяРНК), которые являются ключевыми компонентами сплайсосом [194, 258]. В результате в ядре накапливаются непроцессированные клеточные пре-мРНК, что приводит к «выключению» экспрессии генов, включая IFN, ISG и провоспалительные гены [178, 179].

Белок NS1 способен усиливать скорость трансляции вирусных мРНК [108]. Было показано, что N-терминальная область NS1 способна взаимодействовать с клеточным фактором инициации трансляции eIF4GI и poly(A)-связывающим белком 1 (PABP1), которые стимулируют трансляцию полиаденилированных мРНК [108]. Это облегчает связывание полисом и преимущественную трансляцию мРНК вируса гриппа [108].

Взаимодействие с ISG. Интерферон-стимулируемые гены выполняют противовирусные функции через различные механизмы, включая прямое нацеливание на вирусы, разрушение вирусной РНК, ингибирование трансляции, блокирование высвобождения вирионов и регуляцию иммунных ответов хозяина. N-терминальный домен белка NS1, связываясь с дцРНК, препятствует активации PKR [108], которая ограничивает синтез всех белков, включая вирусные [70]. Также белок NS1 ограничивает распознавание дцРНК 2'-5'- олигоаденилатсинтетазой (OAS-РНКазы L, 2'-5'-oligoadenylate synthase) [108]. OAS является IFN-индуцированным противовирусным белком, активирующим рибонуклеазу L (РНКазу L), которая гидролизует вирусную или клеточную

одноцепочечную РНК, предотвращая репликацию вируса [108]. Продукты деградации РНК распознаются RIG-I-подобными рецепторами и активировать выработку IFN.

Также показано участие N-терминального домена белка NS1 в предотвращении активации каспазы 1 типа, что приводит к угнетению пост-трансляционного процессинга цитокинов про-IL1 β /про-IL18 в культуре первичных человеческих макрофагов [231]. Другой важной мишенью NS1 является сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Взаимодействие NS1-PI3K увеличивает скорость интернализации вируса, ингибирует апоптоз [108].

Таким образом, модификация генетической последовательности белка NS1 является перспективным механизмом аттенуации рекомбинантного штамма, поскольку нарушает способность вируса противодействовать интерферон-обусловленному противовирусному ответу организма и приводит к неполноценной репликации в интерферон-компетентных системах [71]. Тем не менее вирусы сохраняют способность к заражению клеток респираторного эпителия. При заражении рекомбинантными штаммами с дефектным белком NS1 происходит выработка высокого уровня интерферонов I типа и других цитокинов. Интраназальная иммунизация рекомбинантным вирусом гриппа с модифицированным белком NS1 позволяет сформировать протективный иммунный ответ за счет формирования местных секреторных IgA и тканерезидентных Т клеток [58].

1.3. Сигнальные пептиды

Подавляющее большинство мембраносвязанных и секретируемых белков на N-конце содержат пептидные области, которые называются сигнальными пептидами или сигнальными последовательностями (СП) [95]. Эти последовательности, несущие информацию о транспорте белка, были открыты еще в 1971 году Гюнтером Блобелем и Дэвидом Сабатини, а в 1991 году Блобелю была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине за открытие сигнального пептида [184].

Типичный СП имеет длину 25-30 аминокислотных остатков и состоит из трех основных частей: 1) положительно заряженный домен N-конца, 2) гидрофобное ядро Н и 3) сайт расщепления С [184]. Хотя все СП имеют общую структуру, они высоко вариабельны по аминокислотному составу. СП различаются между собой эффективностью транслокации, сайтами расщепления, расположением белка-мишени и специфическими пост/ко-трансляционными модификациями, такими как гликозилирование [95, 184].

Большое функциональное разнообразие позволяет использовать СП в различных областях от производства рекомбинантных белков, до диагностика заболеваний и вакцинация. Использование СП при производстве биотерапевтических препаратов и

рекомбинантных белков позволило увеличить их производство до коммерчески значимого уровня [166], увеличивая эффективность транслокации и снижая потери выхода белка в процессе очистки. Также включение СП позволяет избежать образования телец включения и сворачивания секреторных белков [95, 184].

Использование сигнальных пептидов при разработке вакцинных препаратов нацелено на для усиления иммунного ответа организма на вакцинацию. Ранее было продемонстрировано, что иммунизация мышей вакцинным кандидатом против вируса Денге на основе рекомбинантно модифицированного вируса коровьей оспы Анкара, дополненных СП, способствовала развитию гуморального ответа на встроенный белок [195]. Введение аденовирусного вектора, кодирующего белок капсулярного менингококка группы В со вставкой сигнальной последовательности на N-конце, также приводило к индукции более высоких титров антител у мышей, тем иммунизация вектором без СП [222].

Из используемых сигнальных пептидов последовательность, полученная из легкой цепи мышинового иммуноглобулина каппа (IgG_κ) (METDTLLLWVLLLWVPGSTG), является одной из наиболее хорошо охарактеризованных. Этот сигнальный пептид опосредует секрецию следующего за ним белка по пути котрансляционной транслокации (рис. 9). Такой тип транслокации начинается с трансляции СП, который взаимодействует с частицей распознавания сигнала (SRP) [176]. SRP транспортирует комплекс, состоящий из рибосомы и растущего белка, к мембране ЭПР, где связывается с рецептором SRP [126], доставляя растущую белковую цепь к транслокону на мембране ЭПР. Затем сигнальный пептид отщепляется сигнальной пептидазой и вновь синтезированный белок высвобождается в просвет ЭПР [184]. В ЭПР вновь синтезированные белки включаются в транспортные везикулы, которые движутся к плазматической мембране и высвобождают секреторные белки путем экзоцитоза [184].

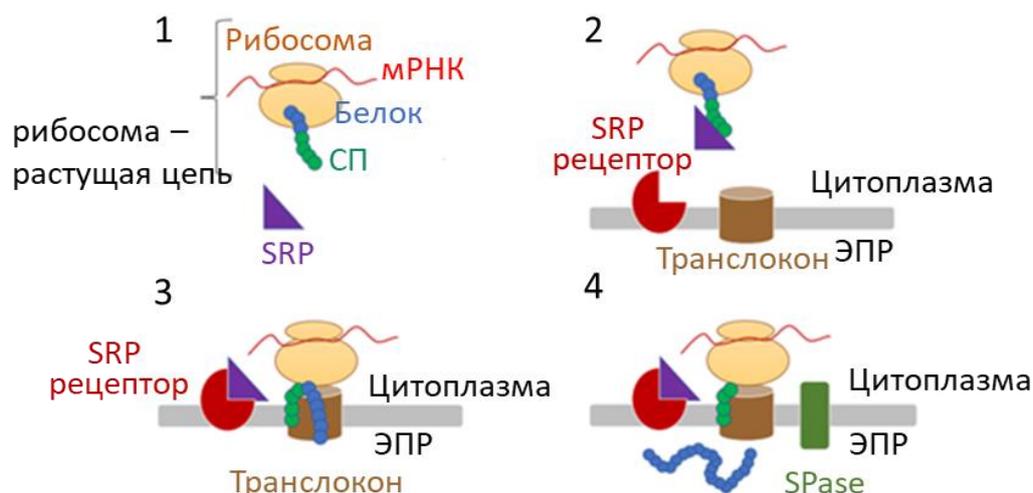


Рисунок 9 –Котрансляционная транслокация. 1. Трансляция белка на рибосоме начинается с сигнального пептида (СП), который детектируется частицей распознавания сигнала (SRP). 2. SRP связывается с СП и переносит комплекс рибосома-растущая цепь к мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР). 3. SRP, связываясь с рецептором SRP, переносит комплекс рибосома-растущая цепь на связанный с мембраной транслокон, который транспортирует транслируемый белок в просвет ЭПР. 4. Сигнальный пептид отщепляется рекрутируемой сигнальной пептидазой, синтезированный белок высвобождается в просвет ЭПР.

К настоящему времени в литературе описано использование сигнального пептида IgGк в эукариотических экспрессионных векторах и в аденовирусном векторе [184]. Было показано, что иммунизация мышей модифицированным рекомбинантным аденовирусным вектором, содержащим сигнальную последовательность IgGк, индуцирует формирование антиген- специфических цитокин-продуцирующих CD4+ Т-клеток и антител с более высокой авидностью [62].

1.4. Заключение по обзору литературы

РСВ признан ведущей причиной респираторных инфекций у детей, в том числе первых месяцев жизни. Однако РСВ также является серьезным вирусным патогеном для пожилых людей. Перенесенная РСВИ не предотвращает последующих реинфекций, поэтому повторные случаи инфицирования происходят на протяжении всей жизни человека [226]. Как правило, случаи повторного заражения остаются не диагностированными. Тем не менее, у более уязвимой популяции (например, лиц с ослабленным иммунитетом или пожилых людей) повторное инфицирование может привести к тяжелому заболеванию [53].

Пожилые люди подвержены повышенному риску развития серьезных проявлений РСВИ, включая пневмонию и бронхолит, приводящих к длительным госпитализациям [53].

Перспективным подходом к разработке вакцин против РСВИ является использование вирусных векторов для доставки протективных антигенов. Использование с этой целью вируса гриппа имеет ряд преимуществ: отсутствие ДНК-стадии в репликативном цикле, возможность безыгольного интраназального введения, обширное разнообразие поверхностных антигенов, возможность модификации различных геномных сегментов с целью стимуляции Т-клеточного или гуморального иммунного ответа, ассоциированного со слизистой оболочкой.

Неструктурный белок NS1 вируса гриппа является перспективной мишенью для конструирования векторных вакцин, поскольку его укорочение ведет к усилению иммуногенности вируса за счет стимуляции цитокинового ответа [2, 190, 231]. В то же время, цитоплазматическая и особенно внутриядерная локализация белка NS1 и слитого с ним трансгена может ограничивать формирование к нему гуморального иммунного ответа. Таким образом, для создания эффективной векторной конструкции на основе вируса гриппа целесообразно изучить локализацию трансгена, слитого с укороченным белком NS1. Также необходимо подобрать оптимальную стратегию конструирования гриппозных векторов, влияющую на локализацию трансгена в инфицированных клетках и позволяющую сфокусировать иммунный ответ на Т- и В- клеточных эпитопах вставки, а не вектора. Одним из путей достижения этой цели может быть дополнение встраиваемых трансгенов сигнальными последовательностями. В связи с этим, представленная работа посвящена изучению влияния дизайна гриппозных векторов, экспрессирующих антигены респираторно-синцитиального вируса, ассоциированные с укороченным до 124 аминокислотных остатков белком NS1 на их иммуногенность и защитную эффективность в отношении экспериментальной РСВ инфекции.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Клеточные культуры

В работе использовали культуру клеток эпителия почки африканской зеленой мартышки Vero (ATCC #CCL-81), адаптированную к росту в бессывороточной среде OptiPro (Gibco, США) с добавлением 2% культуральной добавки GlutaMax (Gibco, США). Культуру клеток почки собаки MDCK (Madin-Darby canine kidney) London Line (#FR-58, International Reagent Resource) выращивали в питательной среде Альфа MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки Sc-Biol (Биолот, Россия). Культуру клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека Hep-2 (коллекция клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России) растили в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 5% сыворотки Sc-Biol. Выращивание клеточной линии аденокарциномы человека A549 (ATCC, CCL-185) осуществлялось в питательной среде F12-NutMix (Ham's F-12 Nutrient Mix, Gibco), содержащей 10%-ную эмбриональную сыворотку FBS (Gibco, США).

2.1.2. Вирусы

В работе были использованы вирусы гриппа на основе штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), экспрессирующие эпитопы респираторно-синцитиального вируса или люциферазу NanoLuc, полученные в рамках данного исследования. В качестве контрольного вируса был использован штамм на основе вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), кодирующий укороченный до 124 аминокислотных остатков белок NS1 (NS1₁₂₄) (A/PR8-NS124). Штамм A/PR8-NS124 был получен из коллекции штаммов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава РФ.

Также в работе использовали респираторно-синцитиальный вирус серотипа А штамм A2 (PCV A2), полученный из коллекции International Reagent Resource (IRR, #FR-294, lot 58978263). Вирус культивировали в клетках Hep-2 в среде DMEM с добавлением 2% эмбриональной сыворотки. Для получения рабочего стока монослой клеток заражали в дозе 0,02 ТИД₅₀/клетку, инкубировали 2-3 суток при 37°C, 5% CO₂ до развития 70% цитопатического действия (ЦПД). Далее флакон с зараженными клетками замораживали и размораживали, после чего вирус содержащую жидкость разливали в криопробирки и подвергали быстрому замораживанию в жидком азоте. Аликвоты вируса хранили при температуре < -70°C.

2.1.3. Куриные эмбрионы

Развивающиеся 10 дневные куриные эмбрионы (РКЭ) были получены из ООО «Синявинская птицефабрика» (Россия) с соответствующим ветеринарным свидетельством.

2.1.4. Лабораторные животные

В работе использовались самки мышей линий Balb/c, массой 16-20 грамм, в возрасте 6-8 недель, полученных из питомников лабораторных животных «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России или «Пушино» РАН Филиал института Биоорганической Химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова с соответствующими ветеринарными свидетельствами. Все исследования были выполнены в соответствии с приказом № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. Эксперименты на животных были проведены в рамках договора №0373100122119000065 от 9 июля 2019 года с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации на выполнение научно-исследовательской работы по проекту "Разработка и характеристика прототипных вакцинных штаммов-кандидатов против РСВ инфекции" и были одобрены локальным этическим комитетом при ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России (заседание № 40 от 28 апреля 2021 года и №47 от 17 мая 2021 года).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Вирусологические методы

Работа с нуклеотидными последовательностями. Конструирование плазмид, кодирующих модифицированный ген NS вируса гриппа со вставкой эпитопов белка F РСВ или репортерного белка NanoLuc проводили с использованием программы Vector NTI (Invitrogen, США). Обработку результатов секвенирования проводили с использованием программы Vector NTI.

Работа с бактериями. Накопление плазмид проводили в бактериальном штамме E.coli DH5α. Выделение свободной от эндотоксина пДНК проводили набором EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, США).

Сборка гриппозных векторов с модифицированным белком NS1. Для сборки гриппозных векторов, экспрессирующих эпитопы белка F РСВ или люциферазу NanoLuc, использовали культуру клеток Vero, адаптированную к росту в бессывороточной среде. Набором из 8-ми плазмид на основе вектора pHW2000 [99], кодирующих генные сегменты

PB2, PB1, PA, NP, M, HA, NA и модифицированный NS вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) проводили ко-трансфекцию клеток методом электропорации с помощью Nucleofector II (Lonza, Германия). На 3×10^6 клеток использовали 8 мкг плазмидной ДНК (по 1 мкг каждой) и 100 мкл смеси буферов для трансфекции из набора реагентов Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, США). Трансфицированные клетки высевали в 6-луночные планшеты, используя среду OptiPro (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco) и 2% GlutaMax (Gibco). После инкубации при 37°C 5%CO₂ в течение 6 часов образовавшийся монослой отмывали и сменяли среду на бессывороточную OptiPro (Gibco), содержащую 1 мкг/мл ТРСК-трипсина (Sigma), для обеспечения развития вирусной инфекции. Для определения развития инфекции оценивали формирование ЦПД вируса и в гемагглютинирующий титр с использованием 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Рабочие стоки вирусов были получены при заражении 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ). Аллантаис собирали через 48 часов инкубации при 34°C, аликвоты замораживали и хранили при -80°C.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Вирусную РНК выделяли из 140 мкл вирусосодержащей жидкости при помощи набора QIAmpViral RNA kit (Qiagen, США). ОТ-ПЦР проводили с помощью «одношаговой» ОТ-ПЦР, используя набор реагентов AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Ambion, США). Для этого предварительно проводили отжиг праймера для обратной транскрипции, смешивая 1:1 РНК и праймер Uni12 [276] AGCRAAAGCAGG (100 пмоль/мкл, Beagle, Россия) и инкубируя при 70°C в течение 4 мин. Для постановки ПЦР использовали следующие специально подобранные праймеры: прямой праймер PR8-NS1-332F (TGGCAGGCCCTCTTTGTA) NS-RT-Len (AGCAAAAGCAGGGTGACAAAG) и обратный праймер PR8-NS1-523R (TGACATCCTCAGCAGTATGTCC) NS-3'UTR-1 (GAAACAAGGGTGT TTTATTATTAAT). ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: обратная транскрипция 42°C – 60 мин; денатурация 95°C – 10 мин; затем 39 циклов 95°C – 15 с, 58°C – 30 с, 72°C – 1 мин; 72°C – 5 мин; 8°C – хранение.

Для анализа результатов ОТ-ПЦР проводили горизонтальный электрофорез образцов в 2% агарозном геле (Thermo Scientific, США) в 1X TBE буфере (Thermo Scientific, ЕС), содержащем 5 мкг/мл бромистого этидия (Amresco, США). В качестве маркера молекулярного веса использовали M28 (Сибэнзим, Россия). ЭФ проводили в камере SE-2 (Helicon, Россия) при 150В в течение 1,5 часов. Для детекции результатов ЭФ использовали систему гель-документирования ChemiDoc (Bio-Rad, США).

Секвенирование. Амплификацию полноразмерного гена NS проводили по описанной выше методике. Для выделения продуктов амплификации использовали набор реагентов

Gene Jet PCR Purification kit (Thermo Scientific, США), для измерения концентрации использовали бесцветный спектрофотометр NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США). Секвенирование проводили с помощью набора реагентов BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США) и праймеров, аналогичных использованным на стадии амплификации. Реакцию секвенирования проводили в термоциклере CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler (BioRad, США). Количество ДНК определяли из расчета 50 нг на реакцию. Температурный профиль реакции включал в себя 25 циклов: 96 °C – 10 с, 50 °C – 5 с, 60 °C – 4 мин. Для очистки результатов секвенирующей реакции был использован набор реагентов XTerminator Purification kit в соответствии с рекомендациями производителя. Определение нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации секвенирующей реакции производились 4-канальной автоматизированной системой капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез проводили в полимере POP-6 (Applied Biosystems, США).

Определение инфекционной активности гриппозных векторов. Инфекционную активность определяли методом предельных разведений. Для оценки репродуктивной активности вируса использовали культуры клеток Vero (адаптированную к росту в бессывороточной среде) и MDCK, а также развивающиеся куриные эмбрионы.

Для определения инфекционной активности вируса использовали 96-луночные культуральные планшеты (Nunc, Дания) с суточным монослоем клеток Vero или MDCK. Из вирусосодержащей жидкости (культуральная среда, аллантоисная жидкость, гомогенаты ткани органов мышей), готовили серии десятикратных разведений в культуральной среде (OptiPro для клеток Vero и АльфаMEM для клеток MDCK) с добавлением 1% антибиотика-антимикотика (Gibco) и ТРСК-трипсина (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл для клеток Vero и 2,5 мкг/мл для клеток MDCK. Клетки MDCK дополнительно промывали от сыворотки фосфатно-солевым буфером DPBS (Биолот). В лунки вносили по 100 мкл азведений вирусосодержащего материала (не менее 4-х лунок в параллель для каждого разведения, три серии разведений). Далее планшеты инкубировали 72 часа при температуре 37°C, 5% CO₂. Учет результатов проводили визуально по наличию ЦПД и контролировали при помощи РГА. Расчет 50%-ной тканевой инфекционной дозы (ТИД₅₀) проводили по методу Рида и Менча [196] и выражали в log₁₀ТИД₅₀/мл.

Для определения инфекционной активности вирусов в РКЭ серии десятикратных разведений готовили на DPBS с добавлением 1% антибиотика-антимикотика (Gibco). Полученные разведения вводили в аллантоисную полость 10-11-дневных РКЭ по 200 мкл на эмбрион, по 3 РКЭ в параллель для каждого разведения. Зараженные РКЭ инкубировали

при 34°C в течение 48 часов, после чего РКЭ охлаждали при 4°C в течение 12-17 часов. Учет результатов проводили с помощью РГА с использованием 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Расчет 50%-ной эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) проводили по методу Рида и Менча [196] и выражали в log₁₀ЭИД₅₀/мл.

Определение инфекционной активности респираторно-синцитиального вируса методом бляшкообразования. Для определения инфекционной активности вируса методом бляшек использовали 24-луночные культуральные планшеты (Nunc, Дания) с суточным монослоем клеток HEp-2. Серии десятикратных разведений готовили на культуральной среде DMEM с добавлением 2% эмбриональной сыворотки и 1% антибиотика-антимикотика. Приготовленные разведения вирусосодержащего материала вносили в лунки в объеме 250 мкл и инкубировали 1 час при 37°C, 5% CO₂. Для полужидкого агарозного покрытия использовали среду 2xMEM (Gibco, США) с 0,3% агарозой (NBCo, США), 2% сывороткой, 1% антибиотиком-антимикотиком и 1% GlutaMAX. Для образования четких бляшек планшеты инкубировали 4 суток при температуре 37°C, 5% CO₂ после чего покрытие аккуратно удаляли и дважды промывали DPBS. Фиксацию клеток проводили 80% ацетоном в DPBS в течение 15 мин при комнатной температуре, блокировку проводили раствором 5% сухого обезжиренного молока (ТФ Дитол, Россия) в DPBS в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего дважды промывали 0,1% TWEEN-20 в DPBS (PBST). Для окрашивания антигена РСВ планшеты инкубировали с моноклональными антителами 4F2 [6] 1 час при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена Goat anti mouse IgG (H+L) HRP (Novex, США). В качестве цветного субстрата использовали раствор 0,05% DAB (Serva, Германия), 0,015% перекиси водорода (Нева-Реактив, Россия) в DPBS. Подсчет количества бляшек проводили в подсушенных планшетах. Титр рассчитывали, как произведение усредненного числа бляшек в двух последних разведениях на использованное разведение и выражали в десятичных логарифмах log₁₀БОЕ/мл.

Люциферазную активность репортерного штамма определяли в гомогенатах органов зараженных животных, супернатанте и клеточном лизате зараженных клеток. Исследуемые образцы переносили в планшеты с темными стенками, добавляли смесь субстрата с буфером из набора реагентов Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega) и инкубировали в течение 2 минут. Люминесцентный сигнал измеряли на мультифотометре CLARIOstar (BMG LABTECH).

Определение экспрессии химерных белков методом Вестерн-блот и Дот-блот. Суточный монослой клеток MDCK в 6-луночной планшете заражали вирусными штаммами в дозе 5 ТИД₅₀/клетку и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 8 часов (для Вестерн-

блот) или 12 часов (для Дот-блот). Для Вестерн-блот анализа клетки снимали 0,25% трипсином-ЭДТА (Sigma, США) и лизировали в буфере Лэммли с β -меркаптоэтанолом (Bio-Rad, США). Денатурирующий белковый ЭФ проводили в полиакриламидном геле (Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gel, Bio Rad, США), после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio Rad, США). Для Дот-блот анализа супернатант зараженных клеток наносили на нитроцеллюлозную мембрану и высушивали. Блокировку мембраны проводили 5% сухим молоком в DPBS (Amresco, США) с 0,1% Tween-20 (Serva, Германия). В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела 1H7 против NS1 [131] и мышиную сыворотку к фрагментам белка F РСВ (248 – 290 ак и 409 – 451 ак), в качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена козы антитела против мышиных IgG (Goat anti-mouse IgG(H+L), Invitrogen, США). Окрашивание проводили с использованием набора Opti-4CN Substrate Kit (Invitrogen, США).

Определение экспрессии белков при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания. Для получения монослоя клеток на предметных стеклах для конфокальной микроскопии, стекла промывали, обливали спиртом, высушивали в сухожаровом шкафу для стерилизации и помещали в лунки 48-луночного планшета. Такой планшет с дополнительными стеклами использовали для посева культуры клеток Vero, который далее заражали вирусными штаммами в дозе 1 ТИД₅₀/клетку. Зараженные клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 12 часов, фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma Aldrich, США) и пермеабелизировали 0,2% тритоном X-100 (Helicon, Россия). Блокировку и разведение антител производили в 5% сухом молоке в PBST. В качестве первичных антител использовали мышиную сыворотку к участкам белка F РСВ и кроличью сыворотку к белку NS1 вируса гриппа. В качестве конъюгатов были использованы флуоресцентно меченные антитела Goat Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor® 568) и Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488). Фотографии окрашенных клеток получали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Англия) и обрабатывали с использованием программного обеспечения Leica Application Suite X.

Приготовление прототипа ИФ-РСВ. Для приготовления прототипа ИФ-РСВ был использован респираторно синцитиальный вирус серотипа А штамм А2 (РСВ А2). Вирус культивировали в культуре клеток HEp-2, как было описано выше. Для очистки, инактивации и концентрации вируса использовали описанный в литературе протокол [119]. Зараженный вирусом флакон с культурой клеток подвергали последовательной заморозке и разморозке. Полученную клеточную суспензию центрифугировали в режиме 5000g, 40 мин, +4°C. К отфильтрованной через шприцевой фильтр (мембрана с диаметром пор 450

нм) надосадочной жидкости добавляли 1:4000 формалина и инкубировали 72 часа при 37°C. Для осаждения вируса проводили ультрацентрифугирование в режиме 160000g, 4 часа, +4°C через подушку из 30% сахарозы. Далее надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали в среде без сыворотки и измеряли концентрацию белка с использованием набора реагентов QuantIt Protein Assay (Invitrogen, США) и флюориметра Qubit fluorometer (Invitrogen, США).

Забор органов и подготовка гомогенатов тканей. Вирусную нагрузку оценивали на 3 и 5 день после иммунизации и на 5 день после РСВИ. Для забора легких мышь умерщвляли при помощи цервикальной дислокации. Легкие помещали в индивидуальные пробирки с DPBS (Биолот, Россия) с добавлением 1% антибиотика-антимикотика (Gibco). Для оценки вирусной нагрузки после РСВИ забор легких производили в охлажденный DPBS, всю работу проводили на льду. Гомогенизацию проводили с помощью TissueLyser II (Qiagen, США) в течение 1 мин при 30 Гц, аликвотили и хранили при -70°C. Для оценки титра вируса гриппа был использован метод предельных разведений на культуре клеток MDCK. Гомогенаты предварительно освобождались от клеточного дебриса центрифугированием в течение 3 минут 3000g. Выделение РСВ осуществляли без предварительного центрифугирования при помощи метода бляшкообразования в культуре клеток HEp-2.

Оценка состояния легких иммунизированных и контрольных животных. Легкие для гистологического анализа собирали на 6 сутки после заражения в индивидуальные пробирки с DPBS с 10% формалином. Гистологическому анализу были подвергнуты срезы легких мышей, окрашенные гематоксилином и эозином. Полуколичественный анализ ткани легких был выполнен в двух вариантах со следующей оценкой степени повреждений: 0 - отсутствие; 1 - минимальные повреждения; 2 - незначительные; 3 - умеренные; 4 - выраженные; и 5 - тяжелые.

ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени. РНК выделяли набором реагентов QIAmp Viral RNA (Qiagen). Для проведения обратной транскрипции использовали набор реагентов Reverta-L (AmpliSens). Количественную ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) с использованием набора реагентов AmpliSens Influenza virus A/B-FRT (AmpliSens).

2.2.2. Иммунологические методы

Иммунизация лабораторных животных. Иммунизацию мышей линии Balb/c сконструированными векторами проводили интраназально под легким эфирным наркозом в объеме 30 мкл на мышь в дозе $6,0 \log_{10}$ ЭИД₅₀. Препарат плацебо вводили в том же объеме

и по той же схеме, что и исследуемые штаммы. Также в качестве контрольного препарата был использован прототип ИФ-РСВ, содержащий 5 мкг очищенного формалин-инактивированного РСВ и 20 мг гидроксида алюминия $Al(OH)_3$ (Sigma). Иммунизацию ИФ-РСВ проводили внутримышечно по 100 мкл/животное.

Забор сывороток животных. Забор сывороток проводили через 21 день после иммунизации и через 6 дней после экспериментального заражения РСВ. Образцы крови отстаивали при $+4^{\circ}C$ в течении 18-20 часов, центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин и отбирали образовавшуюся сыворотку.

Реакция торможения гемагглютинации. Наличие антигемагглютинирующих антител определяли в сыворотках иммунизированных и контрольных животных на 21 день после иммунизации. Полученные от опытных животных образцы цельной сыворотки, обрабатывали RDE согласно инструкции производителя (Denka Seiken, Япония) и 10% куриными эритроцитами. При постановке реакции использовали 96-луночные панели для иммунологических реакций («Медполимер», Россия), в которых готовили двукратные разведения сыворотки. Далее к разведениям сывороток добавляли равный объем вируса в дозе 4 гемагглютинирующие единицы и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После добавления взвеси 0,5% куриных эритроцитов инкубировали при $4^{\circ}C$ до оседания эритроцитов в контрольной лунке. Титр антигемагглютинирующих антител выражали как величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, при котором наблюдалось полное торможение агглютинации.

Иммуноферментный анализ. Наличие вирус-специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) определяли в образцах сывороток опытных и контрольных животных. В качестве антигенов использовали химерный белок F РСВ, состоящий из аминокислотных остатков F₂₄₈₋₂₉₀ и F₄₀₉₋₄₅₁ или очищенный респираторно-синцитиальный вирус. Сорбцию антигена проводили в течение ночи при $+4^{\circ}C$ в 96-луночных планшетах Maxisorp (Nunc). Блокировку, разведение сывороток и антител проводили в 5% сухом молоке в PBST. Из сывороток контрольных и опытных животных готовили серии двукратных разведений и инкубировали 1 час при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена Goat anti mouse IgG (H+L) HRP (Novex, США). В качестве цветного субстрата использовали раствор ТМВ (DAKO, США) по 100 мкл/лунку в течение 5 мин при комнатной температуре, затем реакцию останавливали добавлением 1N H_2SO_4 (Вектон, Россия). Оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм измеряли на мультипланшетном ридере с LVF монохроматорами CLARIOstar (BMG LABTECH, США).

Анализ концентрации цитокинов в бронхоальвеолярных лаважах (БАЛ). Забор органов для оценки цитокинового ответа осуществляли через 24 часа после иммунизации животных. Для получения БАЛ легкие мышей промывали через трахею 1 мл холодного DPBS. Полученные смывы центрифугировали 10 мин при 500g и температуре 4°C, супернатанты аликвотили и хранили при -70°C. Для измерения концентрации цитокинов использовали мультиплекс систему LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) w/VbP (BioLegend) согласно инструкции производителя.

Выделение лимфоцитов. Эвтаназию мышей проводили путем цервикальной дислокации, перфузию легких осуществляли 10 мл охлажденного DPBS. Легкие подвергали механическому измельчению и ферментативному расщеплению раствором коллагеназы (Sigma, США) 0,5 мг/мл и ДНКазы (Sigma, США) 40 ЕД/мл. Далее гомогенаты ткани легкого пропускали через 70 мкм клеточный фильтр (BD). Для избавления от эритроцитарной примеси клеточный осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (RBC Lysis Buffer, Biolegend) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. После отмывок подсчитанные клетки ($1 \cdot 10^6$ клеток/лунка) рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты в среду RPMI1640 (Биолот, Россия), содержащую 10% FBS (Gibco) и 1% раствора пенициллина-стрептомицина (Биолот).

Выявление Т-лимфоцитов, специфичных к белку F PCV или вирусу гриппа А. Оценку поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа проводили методом внутриклеточного окрашивания цитокинов в суспензии клеток ткани легкого через 9 и 21 день после иммунизации и 6 дней после экспериментальной РСВ инфекции. Для оценки Т-клеточного специфического иммунного ответа клетки инкубировали с 5 мкг/мл пептида TYMLTNSSELL (Верта, Россия), соответствующего эпитопу белка РСВ F₂₄₉₋₂₅₈, в течение 6 часов при 37°C и 5% CO₂, или моновакциной A/Guandong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09 (фармсубстанция СПбНИИВС, 5 мкг/мл) в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂. Рестимуляцию проводили в присутствии брэфельдина А (Biolegend, США). После стимуляции клетки окрашивали флуорохром-конъюгированными антителами CD8-PE/Cy7, CD4-PerCP-Cy5.5, CD44-BV510, CD62L-APC/Cy7, CD103 – BV605, CD69 – BV785, IFN γ -FITC, TNF α -BV421, IL10-PE/Dazzle594 и IL2-PE. Окраску внутриклеточных маркеров проводили при помощи набора реагентов Cytofix/Cytoperm (BD) согласно инструкциям производителя. Для разделения популяций живых и мертвых клеток использовали маркер жизнеспособности Zombie Red (Biolegend). Для блокирования неспецифического связывания антител использовался реагент True Stain, содержащий антитела к CD16/CD32 (Biolegend).

Для анализа Т-регуляторных лимфоцитов использовали CD45- APC/Cy7 (Biolegend, США), CD4- PerCPy5.5 (BD Biosciences), CD8-PE/Cy7 (Biolegend), HeliosPE/Dazzle и FoxP3-Alexa 488 (Biolegend). Окрашивание по FoxP3 проводили с использованием набора реагентов True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (Biolegend).

Данные собирали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Результаты анализировали с помощью программы Kaluza Analysis v2 (Beckman Coulter, США). Фоновые значения, полученные от нестимулированных клеток, вычитали из соответствующих значений стимулированных образцов перед статистическим анализом, чтобы оценить увеличение уровней продукции цитокинов при стимуляции пептидом.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах Microsoft Office Excel 2016 и GraphPad Prism v6.01 и RStudio Desktop 1.0.153 (RStudio Inc., USA).

Динамику массы тела животных представляли как среднее арифметическое относительного значения массы тела к массе в день заражения (день 0) в %. Для определения значимости различий между групповыми средними использовали однофакторный или многофакторный дисперсионный анализ ANOVA для группового сравнения, затем критерий Тьюки для апостериорных попарных сравнений. Групповой уровень значимости принимали равным $\alpha = 0,05$. Различия считали достоверными при $p < \alpha$. Для проведения корреляционного анализа использовали критерий Пирсона.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Конструирование гриппозного вектора с люциферазным репортером для оценки поверхностной экспрессии белка NS1

Белок NS1 вируса гриппа А является неструктурным вирусным белком и обильно экспрессируется в инфицированных клетках на протяжении всего жизненного цикла вируса, накапливаясь преимущественно во внутриклеточном компартменте зараженной клетки [64, 252]. Однако белки NS1 и NEP дикого типа вируса гриппа удавалось обнаружить в составе вирусных частиц [50, 104] и на поверхности инфицированных клеток [221]. Появление белка во внеклеточном пространстве провоцирует формирование к нему антител [197]. Для анализа вероятности формирования антительного ответа к трансгену, слитому с укороченным белком NS1 вируса гриппа А, на первом этапе работы была поставлена задача оценить эффективность внеклеточного транспорта трансгена. Для этого был сконструирован репортерный рекомбинантный штамм вируса гриппа А.

3.1.1. Получение и характеристика репортерного вектора

В качестве репортерного гена была выбрана последовательность нанолуциферазы NanoLuc [89], которая по сравнению с такими биолюминесцентными системами, как Renilla или Gaussia обладает повышенной стабильностью, меньшим размером и более чем в 150 раз активным люминесцентным сигналом [52]. Нуклеотидная последовательность NanoLuc была оптимизирована по GC-составу для экспрессии в составе вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (A/PR/8/34). Последовательность NanoLuc не содержала сигналов внеклеточного транспорта. Конструирование плазмиды, кодирующей химерный репортерный ген NS вируса гриппа, было осуществлено с использованием программного обеспечения Vector NTI. Схема химерного гена NS представлена на рисунке 10. Нуклеотидная последовательность, кодирующая химерный репортерный ген, была синтезирована и клонирована в аналог вектора pHW2000 в компании «Евроген» (Россия). Свободную от эндотоксина плазмиду, использовали для трансфекции клеток Vero.

Репортерный вектор вируса гриппа A/PR8-NS-Luc был получен при помощи котрансфекции клеток Vero [99] плазмидой, экспрессирующей модифицированный ген NS вируса гриппа, и набором плазмид, кодирующих белки вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Трансфекцию проводили путем электропарации, используя прибор Nucleofector II (Amaha) и набор реагентов Nucleofector Kit V (Lonza).

Полученный репортерный вектор вируса гриппа A/PR8-NS-Luc характеризовался гомогенной, генетически стабильной популяцией при пассировании в системе РКЭ на

протяжении пяти пассажей. Для оценки ростовых характеристик репортерного вектора проводили титрование вируса в системе РКЭ и клеточных культурах Vero и MDCK. Наибольшая инфекционная активность вируса была обнаружена в системе РКЭ и составляла $8,28 \pm 0,29 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл. В культурах клеток Vero и MDCK вирусный титр был $7,59 \pm 0,63 \log_{10}$ ТИД₅₀/мл и $7,75 \pm 0,43 \log_{10}$ ТИД₅₀/мл соответственно.

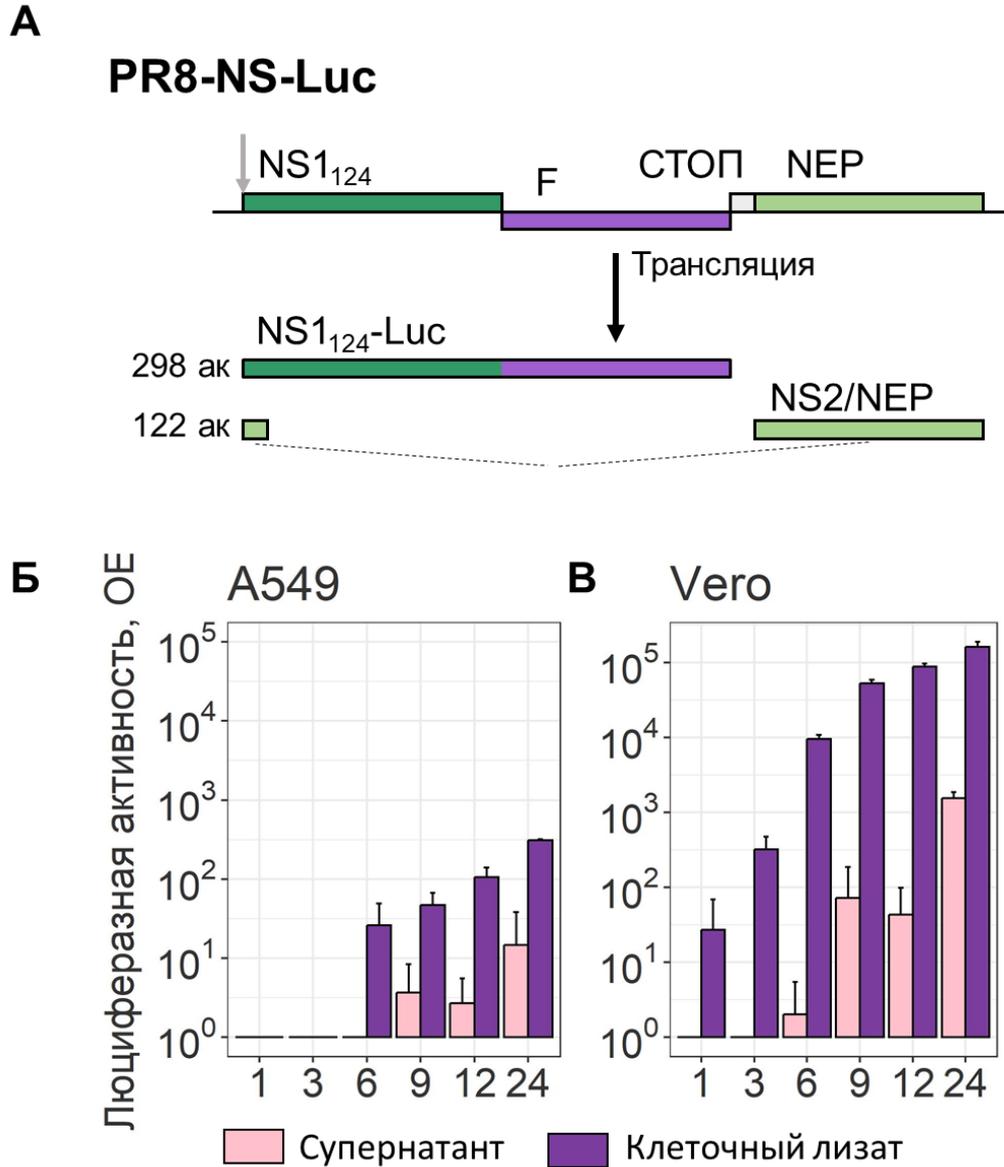


Рисунок 10 – Получение и характеристика репортерного вектора. (А) Схематическое изображение модифицированного геномного сегмента NS рекомбинантного вируса гриппа А/PR8-NS-Luc. (Б-В) Люциферазная активность репортерного штамма А/PR8-NS-Luc в зараженной культуре клеток А549 (Б) и Vero (В). Люциферазный сигнал измеряли в супернатанте и лизате клеток, зараженных вирусом А/PR8-NS-Luc в дозе 0,005 ТИД₅₀/клетку в течение 1 – 24 часов после инфекции.

3.1.2. Оценка экспрессии трансгена NanoLuc *in vitro* и *in vivo*

Для оценки экспрессии трансгена NanoLuc штаммом A/PR8-NS-Luc культуры клеток A549 и Vero заражали в дозе 0,005 ТИД₅₀/клетку. Люциферазную активность оценивали в супернатанте и лизате клеток в течение 24 часов. Результаты представлены на рисунке 10.

Биолюминесцентная активность вируса была обнаружена как в клеточном лизате, так и в супернатанте зараженных клеток A549 и Vero. Во внеклеточном пространстве биолюминесцентный сигнал был обнаружен уже через 9 и 6 часов после инфекции клеток A549 и Vero соответственно. В течение 24 часов лиминесцентная активность репортерного вектора в зараженных клетках нарастала (рис. 10). Было отмечено, что в интерферон-дефицитной культуре клеток Vero биолюминесцентная активность обнаруживалась на более ранние сроки и с большей интенсивностью. Также было показано, что во всех временных точках для использованных клеточных культур люциферазный сигнал во внутриклеточном пространстве был в 100-1000 раз выше, чем во внеклеточном пространстве.

Для оценки экспрессии химерного белка NS1₁₂₄-Luc *in vivo*, мышей линии Balb/c заражали интраназально в дозе 6,0 log₁₀ ТИД₅₀/мышь репортерным вектором A/PR8-NS-Luc или контрольным вирусом A/PR8-NS124, не экспрессирующим трансген. Биолюминесцентную и репродуктивную активность оценивали в гомогенатах легких, БАЛ и сыворотке животных через 12, 24 и 48 часов после инфицирования. Для оценки виремии сыворотку дополнительно исследовали на присутствие вирусной РНК, используя ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 11).

Репортерный вирус гриппа A/PR8-NS-Luc и контрольный вирус без вставки A/PR8-NS124 демонстрировали схожую репродуктивную активность в БАЛ и легких в течение первых двух суток после заражения (рис. 11А и 11Б). Биолюминесцентный сигнал в БАЛ и сыворотке всех животных, зараженных репортерным вектором, удалось обнаружить уже через 12 часов после введения вируса (рис. 11В). Однако вирусная РНК в группе мышей, зараженных репортерным штаммом A/PR8-NS-Luc, была обнаружена лишь у одной мыши через 48 часов после инфекции. Так как в сыворотке крови мышей присутствовал люминесцентный сигнал, но практически не была детектирована вирусная РНК, возможно предположить, что в сыворотке крови присутствует химерный белок NS1, слитый с трансгеном NanoLuc.

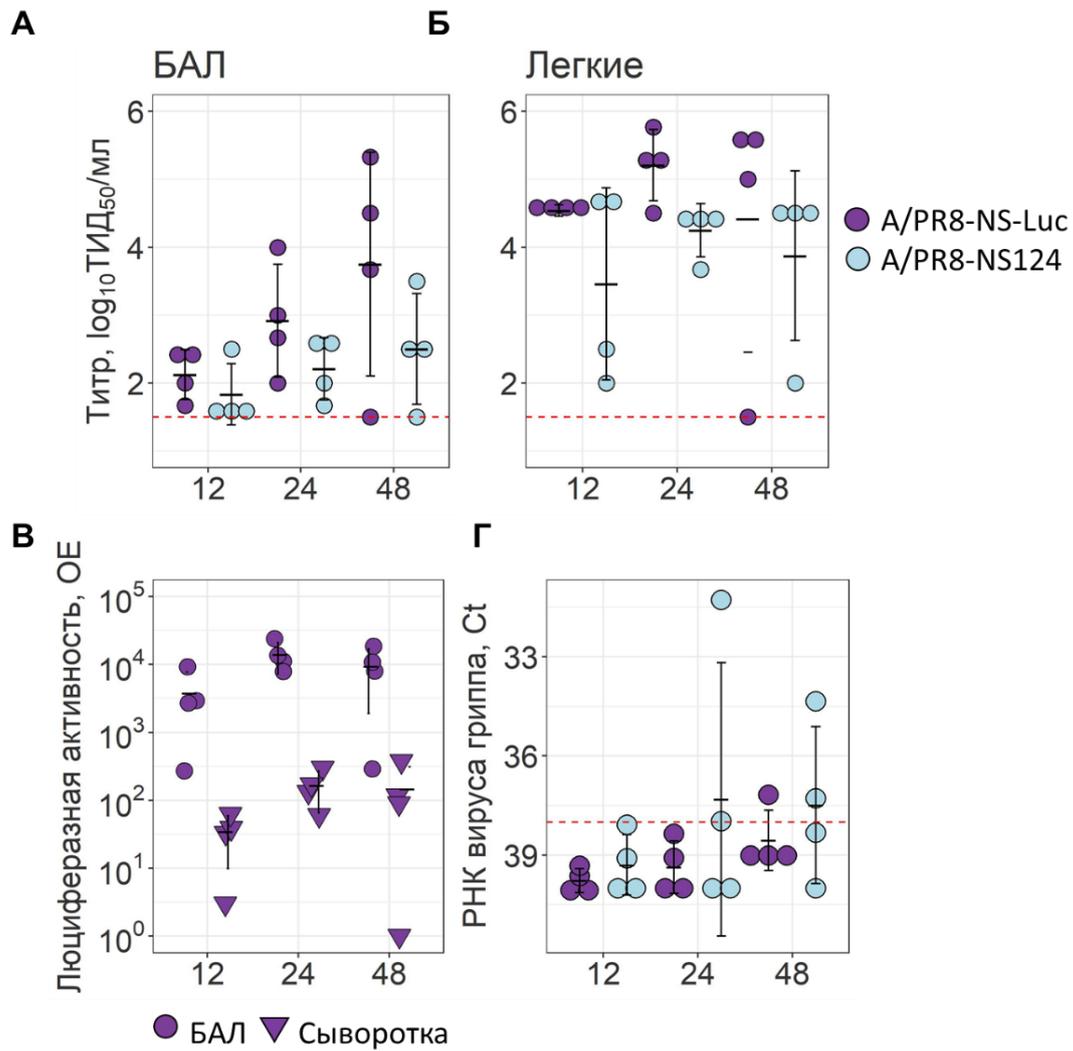


Рисунок 11 – Детекция вируса в органах мышей, зараженных репортерным вирусом A/PR8-NS-Luc и контрольным вирусом без вставки A/PR8-NS124 в течение первых 48 часов. Репликативная активность вирусов в БАЛ (А) и легких (Б) мышей. (В) Люциферазная активность вируса A/PR8-NS-Luc в БАЛ и сыворотке зараженных животных. (Г) Наличие РНК вируса гриппа в сыворотке зараженных животных.

Таким образом, при заражении культуры клеток Vero и A549 сконструированным репортерным вектором A/PR8-NS-Luc биолюминесцентный сигнал в супернатанте зараженных клеток обнаруживался уже через 6 и 9 часов после инфекции соответственно. При экспериментальном заражении мышей линии Balb/c в дозе $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/мышь люциферазная активность штамма A/PR8-NS-Luc была обнаружена в БАЛ и сыворотке крови уже через 12 часов после интраназальной инфекции, тогда как вирусную РНК удалось детектировать в сыворотке крови лишь одного животного через 48 часов после заражения. Это говорит о том, что репортерный белок не попадал в плазму крови в составе вирионов, а доставлялся отдельно или в результате лизиса зараженных клеток. Полученные

результаты свидетельствуют о том, что трансген, экспрессируемый с ОРС модифицированного белка NS1 вируса гриппа, появляется во внеклеточном пространстве как *in vitro*, так и *in vivo*. Тем не менее, люминесцентный сигнал во внеклеточном пространстве был значительно ниже, чем в клетках. Соответственно, количества внеклеточного трансгена может быть недостаточно для эффективного праймирования В-клеточного иммунного ответа. В связи с этим, при конструировании гриппозных векторов с модифицированным NS1 белком, экспрессирующих РСВ антиген были использованы модификации, способствующие транспорту трансгена во внеклеточное пространство.

3.2. Получение и характеристика набора гриппозных векторов с модифицированным NS1 белком, экспрессирующих РСВ антиген

3.2.1. Конструирование плазмид, кодирующих ген NS со вставкой антигенов белка F РСВ

В большинстве вакцин, разрабатываемых для борьбы с РСВИ, в качестве антигенной мишени используется белок F. Этот белок высоко консервативен и играет основную роль в слиянии вирусной оболочки с клеткой-хозяина. Снижение активности этого белка нарушает проникновение вируса и защищает организм от инфекции. Белок F РСВ является одной из основных мишеней вирус-специфических цитотоксических Т лимфоцитов [189] и нейтрализующих антител [182].

Для конструирования антигенной кассеты РСВ были выбраны линейные, высоко консервативные участки белка F РСВ. Сконструированный трансген состоял из двух фрагментов F-белка: 248 – 290 аминокислоты и 409 – 451 аминокислоты. Распределение выбранных участков в белке F РСВ представлено на рисунке 12. Первый фрагмент белка включал в себя антигенный сайт II (255-275 ак), являющийся мишенью паливизумаба [238], а второй – антигенный сайт IV (422-438 ак), являющийся мишенью антител 101F [164]. Помимо В-клеточных эпитопов, выбранные фрагменты содержали Т-клеточные эпитопы, список которых приведен в таблице 2 (на основании базы данных Immune Epitope Database IEDB www.iedb.org). Среди известных эпитопов сконструированный трансген имел иммунодоминантный мышинный Т-клеточный эпитоп F₂₄₉₋₂₅₈ (эпитоп ID 67390), который презентуется на МНС I класса только через ТАР-независимые пути в клетках, инфицированных РСВ или рекомбинантными вирусами, экспрессирующими эпитоп F₂₄₉₋₂₅₈ [109].

Таблица 2 – Список известных эпитопов, входящих в выбранные фрагменты белка F PCB (на основании базы данных Immune Epitope Database IEDB www.iedb.org).

Номер эпитопа в базе данных IEDB	Позиция	Аминокислотная последовательность эпитопа	Принадлежность	Эпитоп
48002	265-277	PITNDQKKLMSNN	Мышь	Т-клеточный
57524	255-275	SELLSLINDMPITNDQKK LMS	Человек, мышь	В-клеточный
57525	255-278	SELLSLINDMPITNDQKK LMSNNV	Мышь	Т- и В-клеточный
59873	275-288	SNNVQIVRQQSYSI	Мышь	Т-клеточный
67389	249-257	TYMLTNSSEL	Мышь	Т-клеточный
67390	249-258	TYMLTNSSELL	Человек, мышь	Т- и В-клеточный
544305	428-441	NRGIKTFSNGCDY	Мышь	Т-клеточный

Нуклеотидные последовательности, кодирующие участки белка F PCB F₂₄₈₋₂₉₀ и F₄₀₉₋₄₅₁, были объединены в кассету трансгена F PCB. Выбранная аминокислотная последовательность была оптимизирована для экспрессии в составе гриппозного вектора на основе вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) путем модификации частот использования кодонов и снижения содержания GC пар.

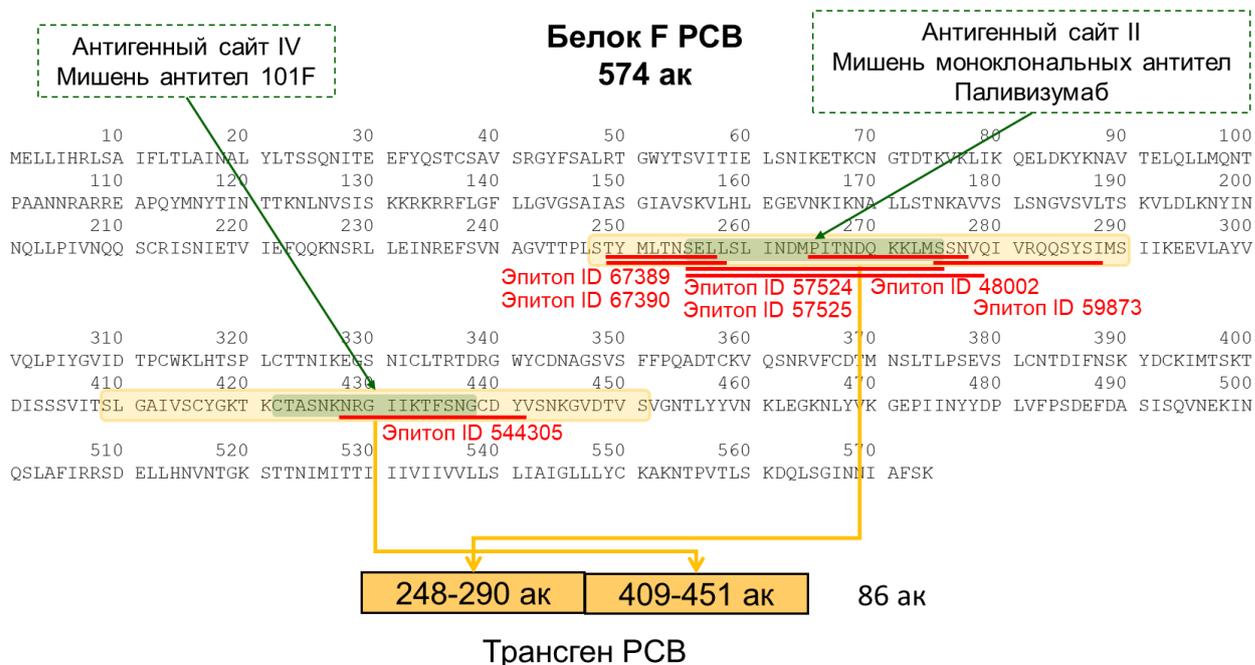


Рисунок 12 – Распределение выбранных участков в белке F PCB. Оранжевым выделены участки белка, отобранных для включения в антигенную кассету – трансген F PCB.

Выбранная антигенная кассета была использована для конструирования плазмид, кодирующих модифицированный ген NS вируса гриппа A/PR/8/34, аттенуированного путем удаления С-концевой половины белка NS1. С использованием программы Vector NTI было смоделировано четыре различных варианта плазмид со вставкой антигена РСВ – с использованием или без использования: сайта “автопротеолиза” 2А (NFDLLKLAGDVESNLOGP), сигнального пептида легкой цепи мышинового иммуноглобулина IgGк (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD), аналогично описанному в статье Кузнецовой и соавт. [133]; а также изменения расположения последовательностей белка NS1₁₂₄ и трансгена F РСВ относительно друг друга и модификации сигналов сплайсинга. Схемы конструкций представлены на рисунке 13.

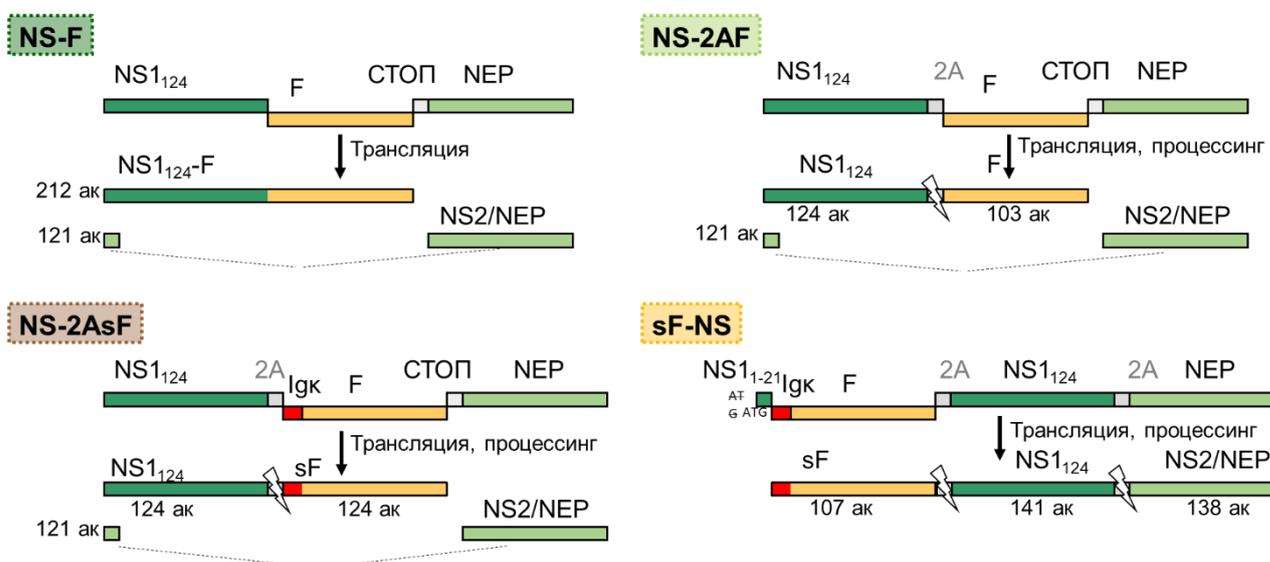


Рисунок 13 – Конструирование геномных сегментов NS вируса гриппа. Схематическое изображение химерных генов NS и экспрессируемых с них белков. NS1₁₂₄ – неструктурный белок вируса гриппа A/PR/8/34, укороченный до 124 аминокислотных остатков; F – кассета участков белка F РСВ, состоящая из фрагментов F_{248–290} и F_{409–451}; СТОП – стоп-кодон; NS2/NEP – белок ядерного экспорта вируса гриппа A/PR/8/34; PR8-NS_{1–21} – модифицированная нуклеотидная последовательность белка NS1, кодирующая первые 21 аминокислоту без старт-кодонов; Igk – последовательность, кодирующая сигнальный пептид IgGк; 2А – последовательность, кодирующая протеолитический сайт 2А пикорновируса; sF – секретируемый трансген РСВ. Картирование эпитопов в белке F РСВ и дизайн генных сегментов проводили в программе Vector NTI.

Сконструированные генные сегменты NS были разделены на две группы: содержащие и не содержащие сигнальную последовательность IgGк. В первую группу входило два варианта геномных сегментов NS-F и NS-2AF, сконструированных для получения векторов, обеспечивающих внутриклеточное накопление трансгена РСВ.

Геномный сегмент NS-F состоял из нуклеотидной последовательности, кодирующей первые 124 аминокислоты белка NS1 вируса гриппа A/PR/8/34, сшитые с антигенной кассетой белка F PCB. Подобные векторы были описаны ранее и охарактеризованы как генетически стабильные и высоко репродуктивные в различных биологических системах [235]. Геномный сегмент NS-2AF отличался от первого варианта присутствием сайта “автопротеолиза” 2A между последовательностью белка NS1 и фрагментами F-белка PCB.

Вторая группа генных сегментов (NS-2AsF и sF-NS) была дополнена сигнальной последовательностью IgGк, обеспечивающей транспорт белков в эндоплазматический ретикулум. Трансген, экспрессируемый в клетках, зараженных векторами, собранными со второй группой генных сегментов, должен был секретироваться из клетки. Генный сегмент NS-2AsF был сходен с описанными сегментами NS-F и NS-2AF, но помимо сайта 2A содержал сигнальный пептид перед антигеном PCB. В генной конструкции sF-NS последовательность сигнального пептида и трансгена была вставлена с N-конца укороченного белка NS1₁₂₄. Для этого 5'-концевая область геномного сегмента sF-NS была модифицирована таким образом, чтобы не содержать в себе старт-кодона до иницирующего кодона последовательности IgGк. Далее были вставлены последовательности, кодирующие трансген PCB и укороченный до 124 аминокислотных остатков белок NS1, разделенные сайтом 2A. Белок NEP синтезировался без сплайсинга и был также отделен сайтом 2A от последовательности укороченного белка NS1. В четвертой конструкции sF-NS антиген PCB и белок NS1₁₂₄ располагались в обратном порядке в сравнении с другими конструкциями. Схематическое изображение структуры химерных сегментов гена NS и экспрессируемых с них белков представлена на рисунке 14.

Нуклеотидные последовательности модифицированных геномных сегментов NS были синтезированы и клонированы в аналог вектора pHW2000 в компании «Евроген» (Россия). Последовательности плазмид были подтверждены секвенированием. Полученные плазмиды были трансформированы в клетки *E.coli* DH5 α , накоплены, очищены с использованием набора реагентов ДНК EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, США) и использованы для сборки вирусов при помощи трансфекции клеток Vero.

3.1.1. Получение и характеристика гриппозных векторов, экспрессирующих трансген PCB

Набор гриппозных векторов, экспрессирующих фрагменты белка F PCB, был получен методом электропорации клеток Vero [99]. Для сборки гриппозных векторов использовали последовательности геномных сегментов PB2, PB1, PA, NP, M, NA и NA лабораторного штамма вируса гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) и одну из четырех химерных конструкций гена NS (по 1 мкг каждой плазмиды). Нами были получены четыре варианта

гриппозных векторов, экспрессирующих участки белка F РСВ в составе ОРС белка NS1 или в сконструированной *de novo* ОРС.

Для исследования гомогенности вирусной популяции и оценки генетической стабильности химерной конструкции генного сегмента NS был проведен ряд последовательных клонирований рекомбинантных штаммов в системе РКЭ. Контроль генетической стабильности химерной конструкции генного сегмента NS проводили методом ОТ-ПЦР со специфически подобранными праймерами для определения длины гетерологичной вставки в генном сегменте NS. Для анализа всех штаммов был использован материал пятого эмбрионального пассажа.

Методом ОТ-ПЦР были получены полноразмерные амплифицированные фрагменты генного сегмента NS, содержащие гетерологичную вставку. На рисунке 14 представлены результаты ОТ-ПЦР, демонстрирующие соответствие длины полноразмерных химерных сегментов NS для четырех рекомбинантных штаммов с исходно заявленными. В качестве положительных контролей были использованы ПЦР фрагменты, полученные с плазмидных ДНК, кодирующих соответствующий химерный NS ген. Методом секвенирования нуклеотидной последовательности гетерологичной вставки в гене NS была подтверждена идентичность полученных векторов с исходными последовательностями или содержание некодирующих замен в штамме sF-NS.

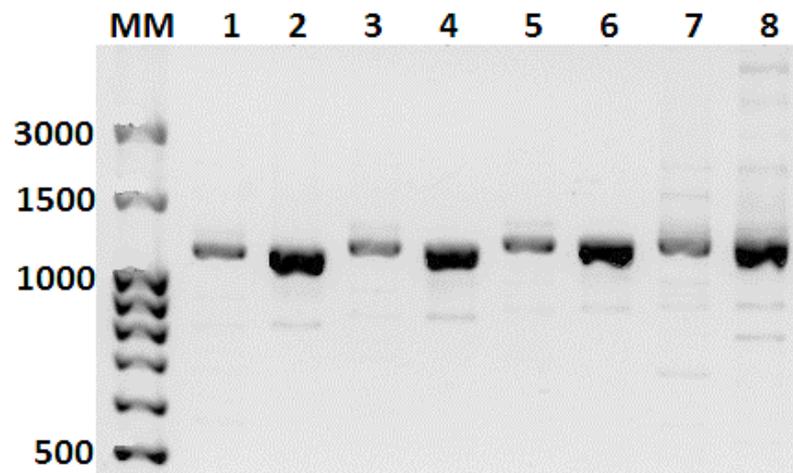


Рисунок 14 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномного сегмента NS гриппозных векторов. MM - маркер молекулярного веса; 1 - штамм NS-F; 2 – контрольная плаزمида рНW-PR8/NS-F; 3 – штамм NS-2AF; 4 – контрольная плазмида рНW-PR8/NS-2AF; 5 - штамм NS-2AsF; 6 – контрольная плазмида рНW-PR8/NS-2AsF; 7 - штамм sF-NS; 8 – контрольная плазмида рНW-PR8/sF-NS. Для постановки ОТ-ПЦР был использован вирусный материал пятого эмбрионального пассажа для всех штаммов.

Для проведения сравнительного исследования репродуктивных свойств вирусов с модифицированным генным сегментом NS были использованы культуры клеток Vero, MDCK и десятидневные РКЭ. Ростовые характеристики вирусов оценивали методом предельных разведений с шагом титрования 1:10. После заражения планшеты с культурой клеток инкубировали 72 часа при 37°C, 5% CO₂, зараженные РКЭ инкубировали 48 часов при 34°C. Результаты оценки ростовых характеристик рекомбинантных штаммов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Ростовые характеристики рекомбинантных штаммов, экспрессирующих участки белка F РСВ, в различных биологических системах. В таблице приведены средние значения со стандартными отклонениями.

Биологическая система	Инфекционная активность вирусов (log ₁₀ ТИД ₅₀ /мл или log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл)			
	NS-F	NS-2AF	NS-2AsF	sF-NS
Vero	8,13±0,34	8,23±0,51	7,78±0,71	7,33±0,50
MDCK	7,03±0,34	7,72±0,4	7,58±0,31	8,00±0,33
РКЭ	8,03±0,14	8,20±0,75	8,28±0,14	8,83±0,60

Для изучения фенотипа температурной чувствительности сконструированных штаммов исследуемые вирусы титровали одновременно при двух температурах 34 и 39°C в системе РКЭ. Критерием температурочувствительности считали разницу в инфекционной активности при температурах 34°C и 39°C (RCT_{34/39}) не менее 3,0 log₁₀ ЭИД₅₀/мл. Результаты анализа температурочувствительного фенотипа полученных векторов представлены в таблице 4. Поскольку показатель RCT_{34/39} у всех вирусов составил более 3,0 log₁₀ ЭИД₅₀/мл, то было сделано заключение, что четыре рекомбинантных вектора характеризовались температурочувствительным фенотипом в системе РКЭ.

Таблица 4 – Определение температурочувствительности рекомбинантных штаммов, экспрессирующих участки белка F РСВ в системе РКЭ.

Название штамма	Инфекционный титр при T °C, (log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл)± CO		Показатель RCT _{34/39} log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл, среднее ± CO	Фенотип
	34	39		
NS-F	7,95±0,00	1,5±0,00	6,45±0,00	ts
NS-2AF	8,33±0,18	2,70±0,35	5,63±0,53	ts
NS-2AsF	8,33±0,18	2,83±0,53	5,50±0,35	ts
sF-NS	8,58±0,88	3,33±0,18	5,25±0,71	ts

Использованные в работе модификации генного сегмента NS не оказывали влияния ни на эффективность сборки вирусов, ни на генетическую стабильность, ни на температурную чувствительность штаммов. Полученные штаммы характеризовались высокой репликативной активностью в различных биологических системах, позволяющих их накапливать в производственных масштабах.

3.2.2. Изучение экспрессии трансгена РСВ в зараженных клетках

Для оценки влияния дизайна генного сегмента NS на экспрессию и локализацию белка NS1 и ассоциированного с ним трансгена были использованы методы Вестерн-блот, Дот-блот анализа, и иммунофлуоресцентного окрашивания клеток, зараженных полученными рекомбинантными гриппозными векторами.

Для Вестерн-блот анализа суточный монослой культуры клеток MDCK заражали разведениями вирусов, соответствующими дозе 5,0 ТИД₅₀/клетку, и инкубировали в течение 8 часов. Окрашивание мембраны проводили с использованием антител 1Н7, специфичных к белку NS1 вируса гриппа А [131]. Для дополнительного контроля соответствия молекулярных масс химерных белков проводили окрашивание поликлональной мышинной сывороткой к трансгену F РСВ лизата клеток, зараженных вирусами NS-F и sF-NS. Результаты Вестерн-блот анализа представлены на рисунке 15. В качестве контроля использовали вирусный вектор A/PR8-NS124, кодирующий укороченный белок NS₁₂₄ без вставки гетерологичного антигена. Для теоретического предсказания молекулярных масс химерных белков и их сравнения с практическими использовали ExPASy ProtParam [74]. Массы химерных белков приведены в таблицах 5, 6.

Таблица 5 – Молекулярная масса химерных белков NS1, экспрессируемых при заражении культуры клеток сконструированными векторами со вставкой эпитопов белка F РСВ, по результатам теоретических расчетов с использованием сервера ExPASy ProtParam

Название штамма	Молекулярная масса полноразмерного химерного белка, кДа	Молекулярная масса химерного белка после автопротеолиза по 2А сайту, кДа
NS124	14,2	-
NS-F	23,6	-
NS-2AF	25,3	14,2
NS-2AsF	27,7	14,2
sF-NS	43,8	14,2 / 27,7 / 30,4

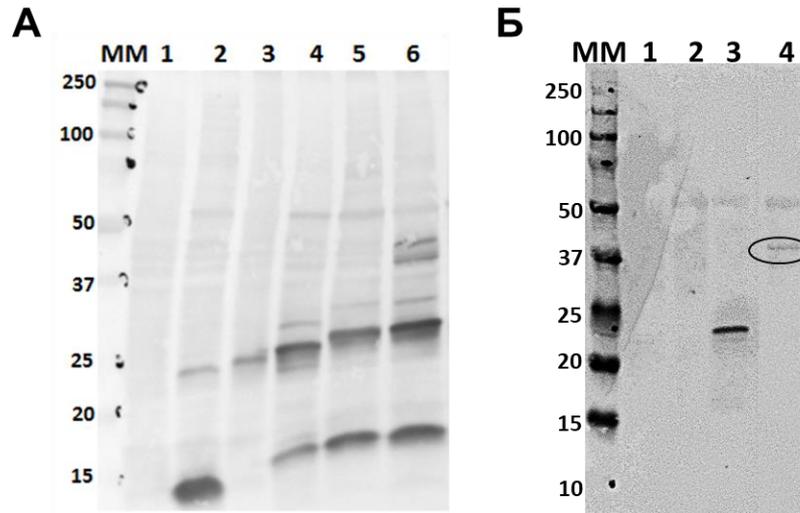


Рисунок 15 – Результаты Вестерн-блот окрашивания лизатов клеток, инфицированных в дозе 5 ТИД₅₀/клетку, антителами против NS1 (1H7) (А) или поликлональной мышиной сывороткой к фрагментам белка F PCB (Б). (А) 1 – незараженные клетки; 2 – клетки, зараженные вирусом NS124 (без вставки); 3-6 – клетки, зараженные гриппозными векторами NS-F, NS-2AF, NS-2AsF и sF-NS соответственно; MM – маркер молекулярного веса, кДа. (Б) 1 – незараженные клетки; 2 – клетки, зараженные вирусом NS124 (без вставки); 3 – клетки, зараженные гриппозным вектором NS-F; 4 – клетки, зараженные вектором sF-NS; MM – маркер молекулярного веса, кДа.

Таблица 6 – Молекулярная масса химерных белков F PCB, экспрессируемых гриппозными векторами NS-F и sF-NS, по результатам теоретических расчетов с использованием сервера ExPASy ProtParam

Название штамма	Молекулярная масса полноразмерного химерного белка, кДа	Молекулярная масса химерного белка после автопротеолиза по 2А сайту, кДа
NS124	-	-
NS-F	23,6	-
sF-NS	43,8	11,7 / 27,7

По результатам Вестерн-блот анализа было показано, что при заражении культуры клеток MDCK сконструированными рекомбинантными штаммами синтезируются химерные белки NS1 и F, молекулярная масса которых схожа с теоретически предсказанной. Молекулярная масса химерных белков при окрашивании нитроцеллюлозной мембраны сывороткой к встроенному трансгену совпала с таковой при

окрашивании антителами к белку NS1. Также было отмечено, что «автопротеолиз» по сайту 2A происходит частично, что согласуется с литературными данными [149].

Для оценки секреции во внеклеточное пространство использовали дот-блот анализ. Нитроцеллюлозную мембрану с нанесенными образцами супернатанта клеток, зараженных сконструированными векторами, окрашивали мышиной сывороткой к фрагментам белка F РСВ (248 – 290 ак и 409 – 451 ак) и вторичными антителами против мышиных IgG. Специфического окрашивания обнаружить не удалось (данные не представлены).

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки Vero растили на стеклах для конфокальной микроскопии. После достижения 100% монослоя клетки заражали векторами вируса гриппа А и инкубировали в течение 6 или 12 часов. Для окрашивания использовали мышиную сыворотку, специфичную к участкам белка F РСВ, и кроличью сыворотку, специфичную к белку NS1 вируса гриппа, а также соответствующие флуоресцентно меченные конъюгаты. Результаты окрашивания представлены на рисунке 16.

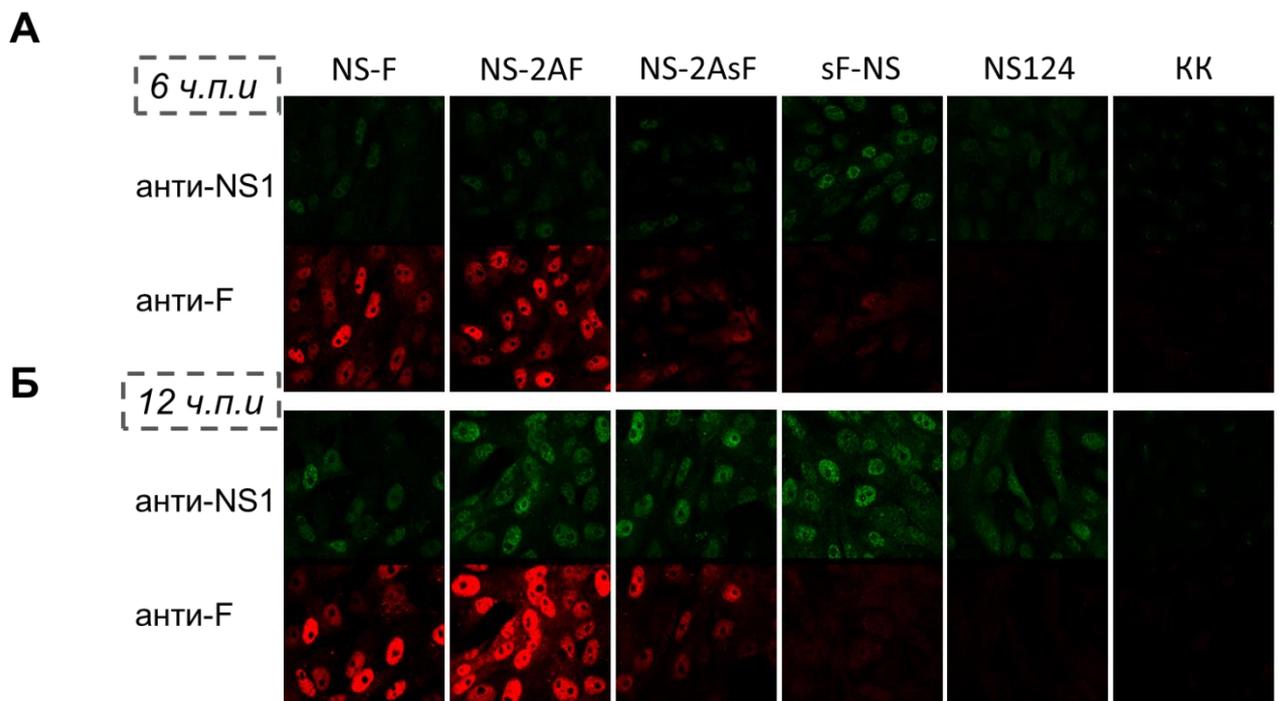


Рисунок 16 – Экспрессия белка NS1 и участков белка F РСВ гриппозными векторами *in vitro*. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили через 6 (А) и 12 (Б) часов после инфицирования рекомбинантными вирусными векторами, контрольным вирусом NS124 и контролем с неинфицированными клетками (КК). Для визуализации белка NS1(зеленая окраска) и фрагментов белка F РСВ (красная окраска) использовали поликлональные сыворотки кроликов и мышей с последующим нанесением вторичных антител, меченных красителями Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568 соответственно. Изображение получено на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 с увеличением х60.

Иммунофлуоресцентное окрашивание позволило показать, что вставка сигнального пептида IgGк в состав трансгена оказывает влияние на интенсивность окрашивания зараженных клеток на антиген F, но не оказывает воздействия на интенсивность окрашивания клеток на белок NS1. При заражении клеток векторами NS-F и NS-2AF наблюдалось цитоплазматическое накопление F трансгена с увеличением интенсивности свечения к 12 часам. При заражении клеток векторами, содержащими сигнальный пептид IgGк, удавалось зафиксировать лишь слабый РСВ-специфический сигнал.

При изучении экспрессии химерного белка NS1 при заражении клеток сконструированными векторами было показано, что молекулярная масса синтезируемых в клетках полипротеинов соответствует теоретически предсказанной. Также было отмечено частичное протелитическое расщепление по сайту 2A. Вставка сигнального пептида IgGк перед трансгеном РСВ снижает интенсивность окраски трансгена в зараженной культуре клеток, что может быть связано как с секрецией трансгена из клетки, так и с его быстрой протеасомной деградацией.

3.3. Оценка безопасности и протективной эффективности векторов вируса гриппа при однократном интраназальном введении мышам

3.3.1. Мониторинг динамики веса и оценка вирусной нагрузки в легких мышей после однократной иммунизации векторами

Для сравнения безопасности полученных векторов вируса гриппа А, мышей линии Balb/c заражали однократно интраназально под легким эфирным наркозом в дозе $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/мышь в объеме 30 мкл. Контрольная группа получала DPBS в соответствующем объеме. Патогенность штаммов оценивали на основании динамики массы тела в течении 14 дней и высеваемости вируса из легких на 3-е и 5-е сутки после заражения. Схема эксперимента и полученные результаты представлены на рисунке 17.

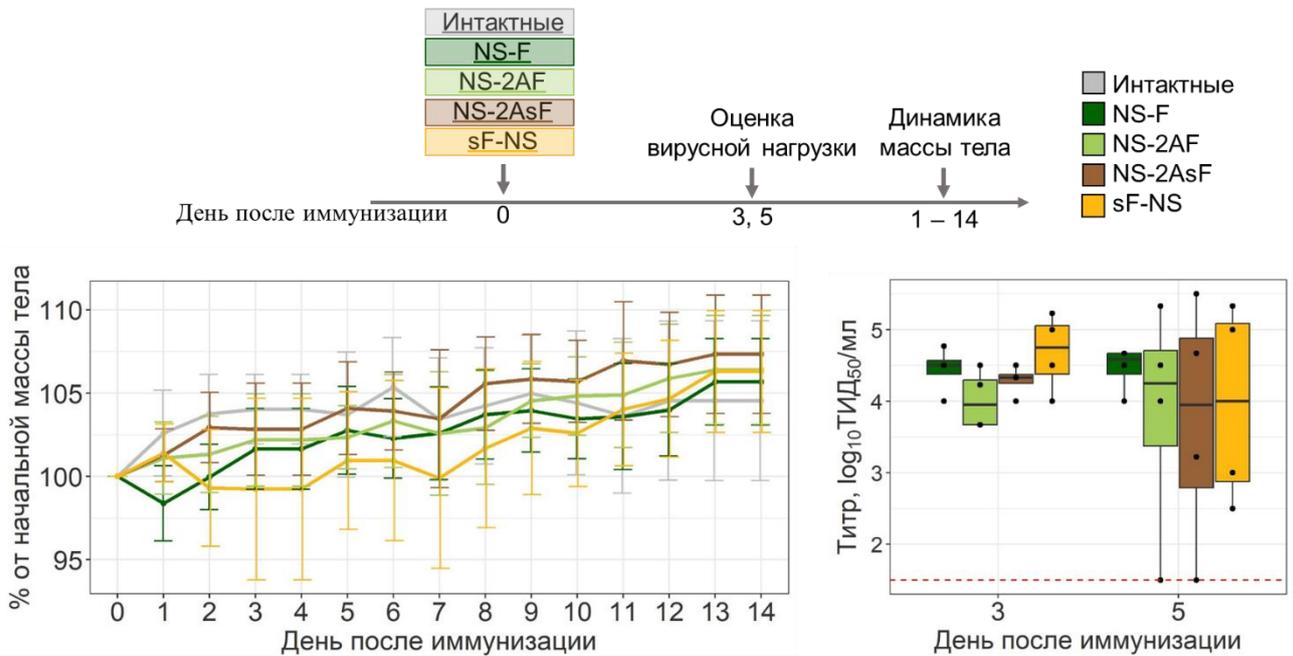


Рисунок 17 – Изучение безопасности гриппозных векторов при заражении мышей линии Balb/c. Мышей инфицировали интраназально в дозе $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/мышь сконструированными гриппозными векторами, экспрессирующими участки белка F РСВ (NS- F, NS-2AF, NS-2AsF, sF-NS), или DPBS (интактные) в объеме 30 мкл. (А) Схема проведения эксперимента. (Б) Мониторинг динамики массы тела мышей осуществляли в течение 14 дней. (среднее \pm СО, n = 7). (В) Титр вируса в гомогенатах легочной ткани определяли методом предельных разведений на клетках MDCK на 3-й и 5-й день после инфекции. Красной пунктирной линией отмечен предел чувствительности метода.

Полученные рекомбинантные векторы были одинаково безопасны при однократном интраназальном введении мышам. В группах мышей, зараженных векторами вируса гриппа А с модифицированным белком NS1, как и в группе контроля (интактные мыши), снижения массы тела животных более чем на 5% отмечено не было.

На третий и пятый день после интраназальной иммунизации оценивали вирусную нагрузку в легких мышей. Определение инфекционного вируса в легких проводили методом титрования легочной суспензии в культуре клеток MDCK. Статистически значимых различий между группами не было обнаружено. Однако на 5-й день был обнаружен большой разброс в данных.

Согласно полученным результатам, использованные в работе модификации генного сегмента NS не оказывали влияния на аттенуацию вируса для мышей. Иммунизация всеми сконструированными векторами не вызывала снижения массы тела, и демонстрировала

сходную репликативную активность вирусов в легких мышей на 3-й и 5-й день после иммунизации.

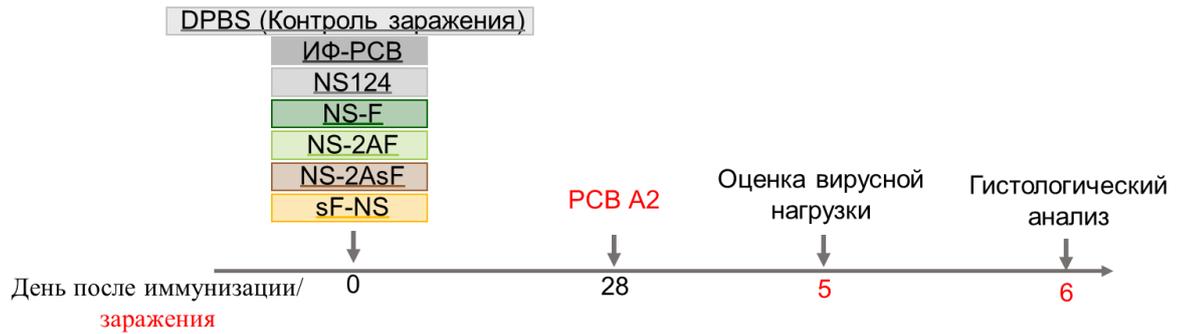
3.3.2. Оценка вирусной нагрузки в легких мышей после инфекции РСВ

Для оценки способности сконструированных гриппозных векторов индуцировать защиту от инфекции РСВ, мыши, иммунизированные гриппозными векторами в дозе $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/животное, были заражены РСВ штаммом А2 через 28 дней после иммунизации. РСВ вводили интраназально в дозе $5,0 \log_{10}$ БОЕ/мышь. В качестве контрольного препарата использовали интраназальную иммунизацию мышей DPBS (контроль заражения), вектором без вставки NS124, и иммунизацию прототипом инактивированной вакцины против РСВ, содержащей 5 мкг/100 мкл очищенного инактивированного формалином РСВ и 20 мг/100 мкл гидроксида алюминия (ИФ-РСВ). Схема и результаты эксперимента приведены на рисунке 18.

Для оценки уровня протекции штаммов проводили ежедневный мониторинг динамики массы тела зараженных животных в течение 6 дней и проводили выделение РСВ из гомогената легких на 5 день после инфекции РСВ. Значительного снижения массы тела животных (более 5%) после контрольного заражения не было обнаружено ни для одной группы животных, в том числе для контрольной группы заражения (данные не представлены).

Во всех группах животных, иммунизированных сконструированными векторами или прототипом ИФ-РСВ, было зафиксировано статистически значимое снижение вирусной нагрузки в пределах $1,5-3,0 \log_{10}$ БОЕ/мл в сравнении с контрольной группой заражения. Наибольшее снижение титра вируса было отмечено при иммунизации вектором NS-2AsF. Иммунизация прототипом ИФ-РСВ полностью предотвращала размножение РСВ в легких. В группе мышей, иммунизированных вектором без вставки трансгена F, подавления репродуктивной активности РСВ отмечено не было.

A



Б

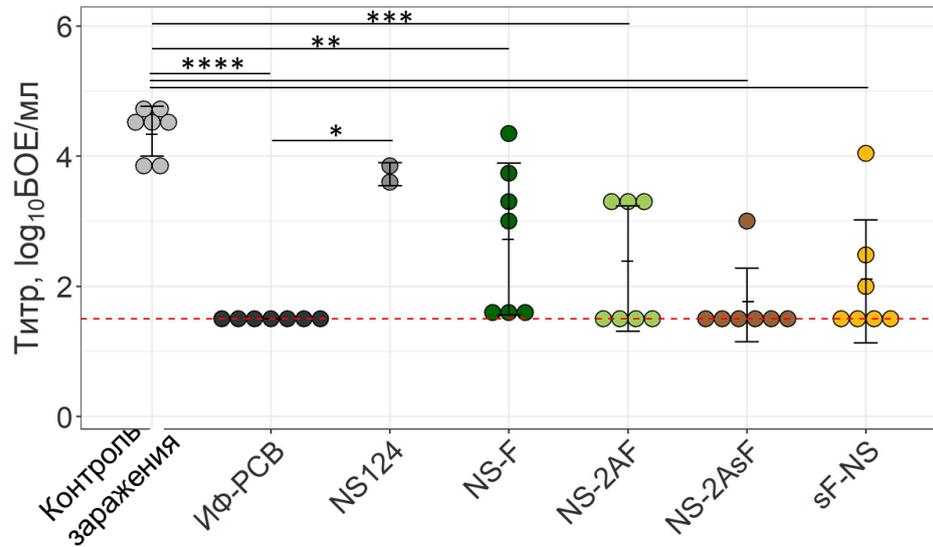


Рисунок 18 – Оценка протективной эффективности сконструированных гриппозных векторов. (А) Схема проведения эксперимента. (Б) Вирусная нагрузка в легких иммунизированных и контрольных мышей через 5 суток после интраназального заражения вирусом РСВ штамма А2. Результаты представлены в виде индивидуальных значений для каждого животного. Для сравнения групп использовали однофакторный общегрупповой дисперсионный анализ ANOVA и апостериорный тест Тьюки (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Красной пунктирной линией отмечен предел чувствительности метода.

Результаты, полученные при оценке протективных свойств сконструированных векторов, позволили сделать вывод, что дизайн конструкции генного сегмента NS влияет на эффективность снижения репликативной активности РСВ в легких мышей. Иммунизация всеми четырьмя сконструированными векторами приводила к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в легких, но рекомбинантные штаммы вируса гриппа, содержащие последовательность сигнального пептида IgGк демонстрировали более выраженное подавление репродукции РСВ в легких.

3.3.3. Гистологическая оценка срезов легочной ткани иммунизированных мышей после инфекции РСВ

Одним из основных критериев протективного действия сконструированных гриппозных векторов было отсутствие усиления респираторного заболевания, ассоциированного с вакцинацией. Для проведения гистологического анализа в качестве контрольных групп были использованы группа неиммунизированных мышей (DPBS) и мышей, иммунизированных ИФ-РСВ. ИФ-РСВ – прототип вакцинного препарата, известного своей способностью индуцировать вакциноассоциированное усиленное респираторное заболевание [118].

Заражение мышей РСВ было проведено аналогично описанной выше методике. Забор легких иммунизированных и контрольных мышей для гистологического анализа срезов ткани легкого производили на 6 сутки после заражения РСВ. Репрезентативные фотографии гистологических срезов приведены на рисунке 19А. Дополнительно был проведен полуколичественный анализ оценки процента пораженной ткани легких на срезе, а также степени поражения отдельных функциональных элементов ткани. Выраженность характерных патологических изменений ткани легких представлены на рисунке 19Б.

Гистопатологический анализ легких мышей показал различную выраженность специфических изменений, как у вакцинированных, так и у контрольных животных. Поражение ткани легкого неиммунизированных животных было схоже с описанной ранее патологией у мышей при инфекции РСВ [241]. Гистопатологические изменения преимущественно характеризовались умеренной воспалительной инфильтрацией альвеолярных перегородок с участием гранулярных лейкоцитов и скоплением альвеолярных макрофагов и лимфоцитов в просвете альвеол. Наряду с диффузно-очаговой смешанноклеточной воспалительной инфильтрацией интерстициальной, альвеолярной, перибронхиальной и в значительной степени перибронхиолярной тканей, развивались неравномерно выраженная альвеолярная эмфизема и очаговые геморрагии в ткани легких. В бронхах и бронхиолах выявлялись умеренная и выраженная гипертрофия и гиперплазия эпителия в единичных случаях с очаговой, слабо выраженной, плоскоклеточной метаплазией. В очагах выраженного перибронхиального воспаления выявлялись единичные, крупные, полиморфные, многоядерные клетки. У всех животных выявлялись умеренно выраженная гипертрофия пневмоцитов II типа, умеренно выраженный васкулит и периваскулит.

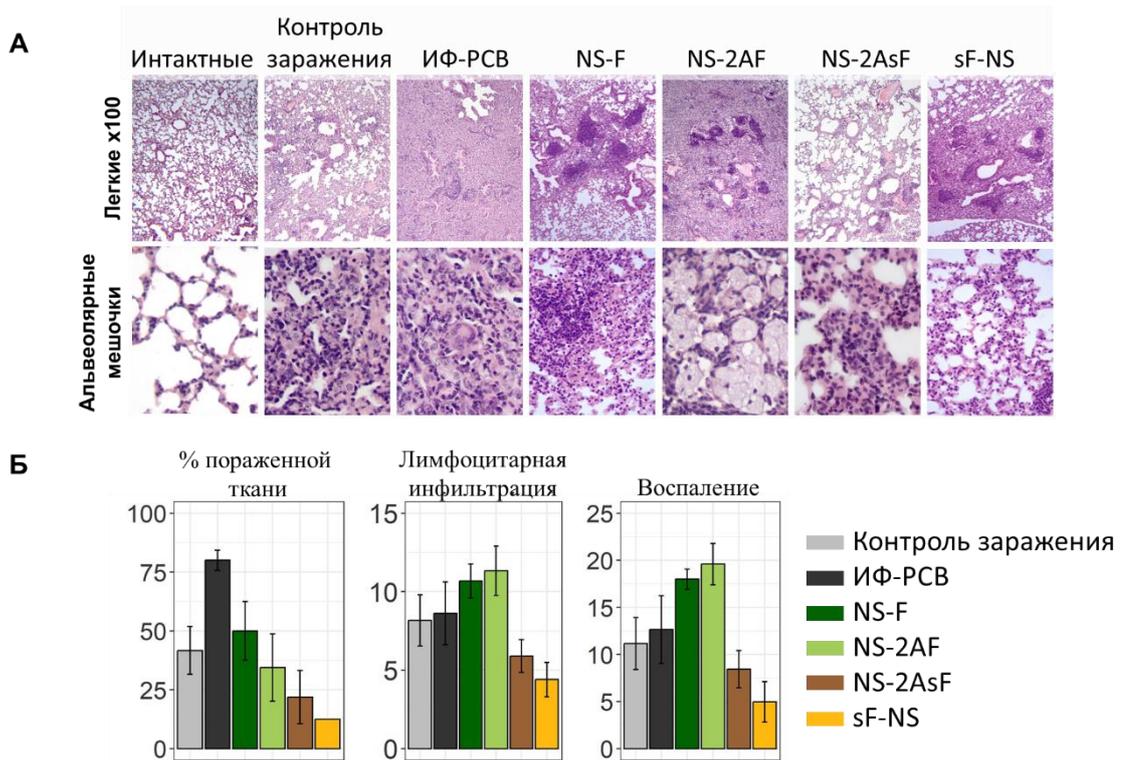


Рисунок 19 – Гистологический анализ легочной ткани иммунизированных и контрольных мышей после заражения РСВ. (А) Микрофотографии гистологических срезов легких, окрашенных гематоксилином и эозином, отражают наиболее выраженные патологические изменения у вакцинированных и контрольных мышей. (Б) Процент пораженной ткани, оценка лимфоцитарной инфильтрации и воспаления через 6 дней после заражения. Результаты представлены в виде столбчатых диаграмм (среднее \pm СО, n = 4).

Иммунизация прототипом вакцинного препарата ИФ-РСВ, как и ожидалось, вызывала наиболее выраженные патологические изменения. Поражения легочной ткани были схожи с описанными ранее [119]. Основным отличием от группы неиммунизированных мышей было вовлечение в воспалительный процесс эозинофилов. Изменения в легких характеризовались развитием выраженной бронхопневмонии, характеризовавшейся выраженной лимфоцитарно-макрофагальной и полиморфноклеточной воспалительной инфильтрацией интерстициальной ткани и альвеол. Отмечалась неравномерно выраженная альвеолярная эмфизема с чередованием участков расширения и спадения легочной ткани. У всех животных отмечались значительные воспалительные повреждения перибронхиальной и перибронхиолярной тканей. В очагах выраженного перибронхиального воспаления выявлялись многочисленные крупные полиморфные многоядерные клетки. В бронхах и бронхиолах также выявлялись умеренная и выраженная гипертрофия и гиперплазия эпителия. Также отмечалась выраженная гипертрофия и

гиперплазия бокаловидных клеток эпителия бронхов. У всех животных выявлялись умеренно выраженная гипертрофия пневмоцитов II типа, выраженный васкулит и периваскулит.

Иммунизация вектором NS-F не предотвращала развитие иммунопатологических изменений, за исключением уменьшения числа гранулярных лейкоцитов, вовлеченных в воспалительный процесс. В перибронхиальной, перибронхиолярной ткани отмечалась преимущественно лимфоцитарная воспалительная инфильтрация. Лимфоцитарные инфильтраты также определялись в интерстициальной и реже в альвеолярной тканях, с формированием микроскопической картины очаговой, слабо выраженной пневмонии. В бронхах и бронхиолах определялась слабо выраженная и умеренная гиперплазия и гипертрофия эпителия, отмечались периваскулиты, незначительная гиперемия ткани легкого, умеренно выраженная гипертрофия пневмоцитов II типа.

РСВИ в группе мышей, иммунизированных вектором NS-2AF, характеризовалась повреждением, сходными с описанной ранее группой NS-F, но сопровождалась повреждением эпителия с накоплением клеточного детрита в просвете бронхиол, образованием крупных очагов спавшейся легочной ткани, скоплением альвеолярных макрофагов в альвеолах.

Наименее выраженные воспалительные процессы и минимальная лимфоцитарная инфильтрация были зафиксированы в группе мышей, иммунизированных NS-2AsF. Отмечалась слабо выраженная, преимущественно лимфоцитарная воспалительная инфильтрация перибронхиальной, перибронхиолярной ткани. Определялась слабо выраженная гиперплазия и гипертрофия бронхиального и бронхиолярного эпителия. Отмечались умеренно выраженные периваскулиты, характеризовавшиеся наличием лимфоцитарных инфильтратов в периваскулярной ткани, незначительные инфильтраты в стенках более крупных сосудов. У животных выявлялись незначительная гиперемия ткани легкого, умеренно выраженная гипертрофия пневмоцитов II типа.

Также минимальные патологические изменения без признаков воспалительного поражения наблюдались в группе мышей, иммунизированных sF-NS. Поражения были схожи с повреждениями в группе NS-2AsF.

Гистологический анализ срезов легких мышей, иммунизированных сконструированными векторами, позволил выявить незначительные воспалительные изменения на фоне РСВИ у мышей из групп NS-2AsF и sF-NS. Наиболее тяжелые иммунопатологические изменения были отмечены у мышей, иммунизированных вектором NS-2AF, ИФ-PCB и в контрольной группе заражения. В результате гистологического

анализа срезов ткани легкого удалось выделить группы векторов, содержащих сигнальный пептид IgGк, как обладающие более выраженным протективным действием.

3.4. Изучение параметров врожденного иммунного ответа

Для определения возможных иммунологических механизмов, лежащих в основе различия протективной эффективности векторов, мы сравнили их способность стимулировать врожденный иммунный ответ в дыхательных путях. При взаимодействии вируса гриппа с PRR зараженных клеток происходит продукция цитокинов, которая определяет все последующие стадии противовирусного иммунного ответа. В рамках представленной работы был проведен анализ концентрации цитокинов в БАЛ через 24 часа после интраназальной иммунизации мышей векторами. Кроме того, в тех же образцах измеряли относительное количество копий РНК вируса гриппа для сравнения репликационной активности векторов (рис. 20).

Как показано на рисунке 20, более выраженная продукция цитокинов наблюдалась в БАЛ мышей, иммунизированных векторами со вставкой сигнального пептида IgGк. Статистически значимые различия были обнаружены для всех исследованных цитокинов в группе мышей, иммунизированных NS-2AsF, при сравнении с другими группами иммунизации или интактной группой мышей. Статистически значимых различий не было обнаружено в концентрации IL-6, IL-27 и MCP1 между группами NS-2AsF и sF-NS. При сравнении количества копий вирусной РНК в БАЛ иммунизированных мышей были выявлены статистически значимые различия между группами NS-F и sF-NS, NS-2AF и sF-NS, NS-2AF и NS-2AsF (рис. 20).

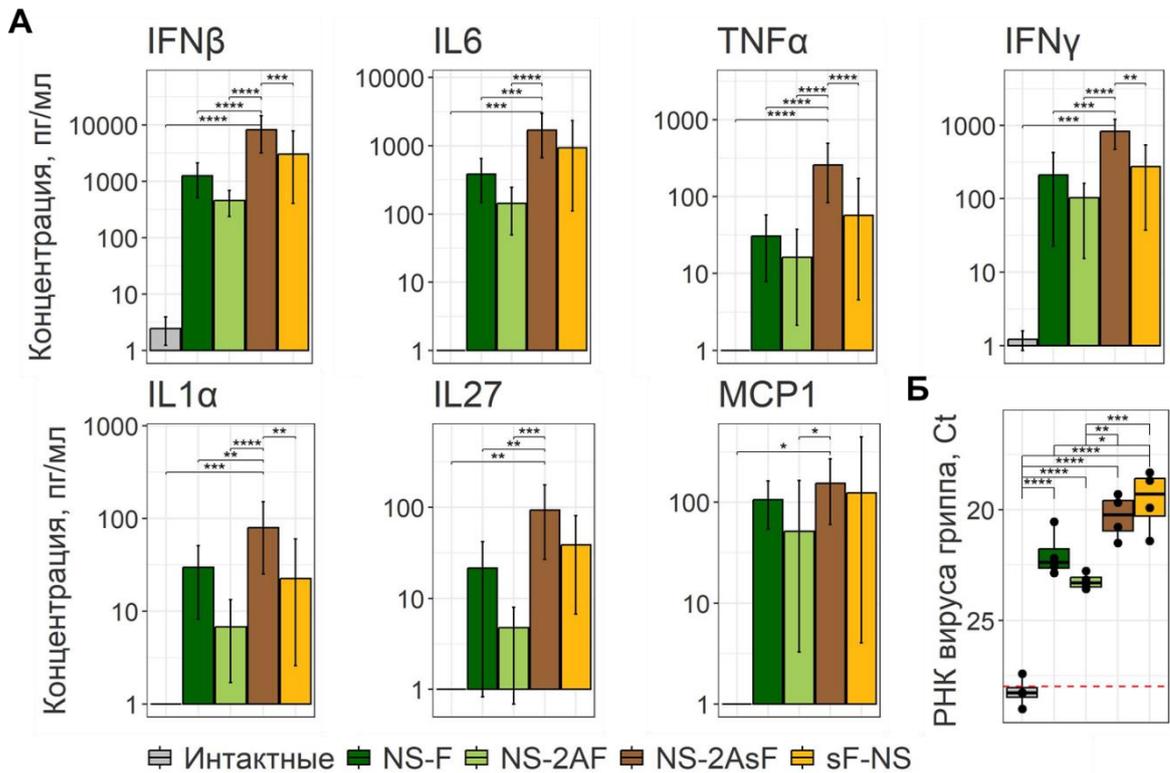


Рисунок 20 – (А) Концентрация цитокинов в БАЛ через 24 часа после иммунизации. Представлены средние значения концентрации и стандартное отклонение (среднее \pm CO, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Группы сравнивали с использованием общегруппового дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным критерием Тьюки, $n = 4$). (Б) Графики типа box-plot отражают среднее количество РНК копий вируса гриппа А в БАЛ иммунизированных мышей. Сравнение проводилось с использованием ANOVA и критерия Тьюки для определения разницы между средними значениями всех возможных пар (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, $n = 4$). Красная линия указывает предел обнаружения.

Так как вирусная РНК является патоген-ассоциированной молекулой, то концентрация цитокинов может зависеть от количества вРНК. Поэтому в рамках работы была оценено количества вирусной РНК в БАЛ и проведен корреляционный анализ. Наибольшее количество вирусной РНК в первые сутки после инфекции было отмечено в группах мышей, иммунизированных IgGк-содержащими векторами (NS-2AsF и sF-NS). Самый высокий уровень РНК вируса гриппа был отмечен в группе мышей sF-NS, наименьшее количество РНК было обнаружено в группе NS-2AF. Статистически значимые различия представлены на рисунке 20Б. Была отмечена высокая корреляция относительного количества РНК вируса гриппа А с концентрацией IFN- β ($R = -0,92$, $p < 0,0001$), IFN- γ ($R = -0,77$, $p < 0,0001$), IL-1 α ($R = -0,73$, $p < 0,0001$), IL6 ($R = -0,92$, $p < 0,0001$),

TNF- α ($R = -0,77$, $p < 0,0001$) и MCP1 ($R = -0,72$, $p < 0,0001$). Умеренная корреляция была показана для IL-27 ($R = -0,66$, $p < 0,0001$).

Таким образом, наиболее цитокиногенными оказался вектор sF-NS. В процессе исследования была обнаружена общая тенденция IgGк-содержащих векторов к более высокой репликативной активности в сравнении с векторами NS-F и NS-2AF на раннем этапе инфекции и к более эффективной стимуляции врожденного иммунного ответа за счет продукции цитокинов. Причина наиболее выраженной стимуляции выработки цитокинов в ответ на иммунизацию вектором sF-NS требует дальнейшего изучения.

3.5. Изучение параметров адаптивного иммунного ответа после однократной иммунизации векторами

Для изучения иммунологического механизма защиты от РСВИ после однократного введения гриппозных векторов, мыши Balb/c были интраназально иммунизированы сконструированными штаммами. Иммунизирующая доза для всех векторов составила $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/мышь. Антительный иммунный ответ оценивали в сыворотке крови животных на 21-й день после иммунизации. Т-клеточный иммунный ответ, специфичный к вирусу гриппа и участкам белка F РСВ, изучали в ткани легкого на 9-й и 21-й день при помощи панели флуоресцентно-меченных антител. Схема эксперимента представлена на рисунке 21.

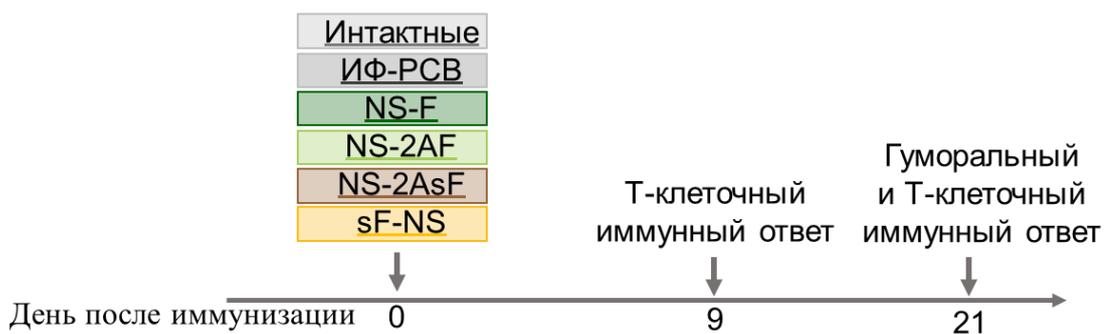


Рисунок 21 – Схема проведения эксперимента по изучению параметров адаптивного иммунного ответа после однократной иммунизации векторами.

3.5.1. Изучение антительного иммунного ответов после иммунизации векторами

Гуморальный иммунный ответ в сыворотке крови иммунизированных мышей оценивали через 21 день после иммунизации. Оценку уровня антигемагглютинирующих антител в сыворотке производили при помощи РТГА. Общий уровень IgG, специфичных к

очищенному РСВ, измеряли при помощи ИФА. Полученные результаты представлены на рисунке 22.

Как показано на рисунке 22, интраназальная иммунизация мышей сконструированными гриппозными векторами индуцировала сходный уровень антител к вирусу гриппа. Достоверных различий в титре антигемагглютинирующих антител выявлено не было. Специфических антител к РСВ у животных, иммунизированных векторами вируса гриппа, обнаружить не удалось. Титр IgG, специфичных к РСВ, в контрольной группе мышей, иммунизированных прототипом ИФ-РСВ, статистически значимо отличался от титра IgG в группах мышей, иммунизированных гриппозными векторами и неиммунизированных животных.

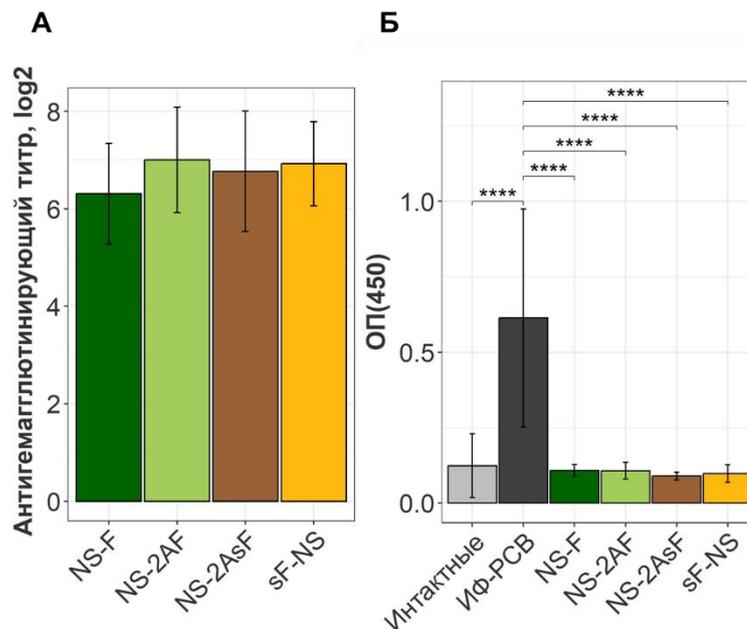


Рисунок 22 – Оценка антительного ответа при иммунизации мышей векторами вируса гриппа А. (А) Титры антигемагглютинирующих антител к вирусу гриппа А/PR/8/1934, выраженные как \log_2 (СГТ \pm СО, n = 13). (Б) Уровень сывороточных IgG, специфичных к очищенному РСВ, в сыворотках крови мышей после однократной иммунизации штаммами в дозе $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/животное и контрольными группами. При постановке ИФА сыворотку мышей разводили 1:50. На графике указана средняя оптическая плотность образцов (среднее \pm СО, n = 13). Для сравнения был применен однофакторный дисперсионный анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки (**** p < 0,0001).

Также в рамках работы была проведена оценка общего уровня антител класса IgA, специфичных к очищенному РСВ или к химерному белку F РСВ, состоящему из аминокислотных остатков 248 – 290 и 409 – 451. Уровень антител класса IgA оценивали в БАЛ иммунизированных мышей на 6-й день после экспериментального заражения РСВ А2

в дозе $5,0 \log_{10}$ БОЕ₅₀/мышь. Статистически значимых различий между группами выявлено не было и ОП (450) в ИФА не превышал 0,1.

Далее РСВ-специфичный иммунный ответ был оценен в сыворотке мышей после трехкратной интраназальной иммунизации сконструированными векторами (рис. 23) и последующего заражения РСВ штаммом А2 (рис. 23). Для проведения ИФА планшеты покрывали очищенным РСВ или химерным белком F.

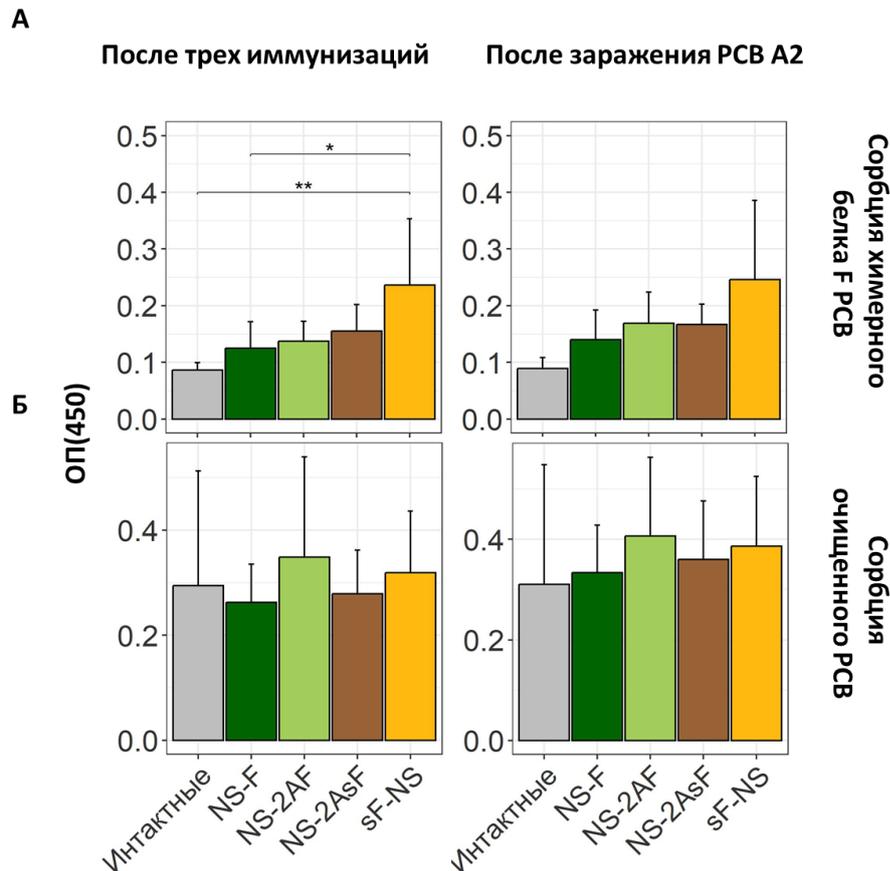


Рисунок 23 – Оценка антительного ответа при трехкратной интраназальной иммунизации мышей векторами вируса гриппа А в дозе $6,0 \log$ ТИД₅₀/животное (слева) и последующем заражении РСВ А2 в дозе $5,0 \log$ БОЕ₅₀/мышь (справа). (А) Уровень сывороточных IgG, специфичных к химерному белку F РСВ, состоящему из фрагментов F_{248–290} и F_{409–451}, (Б) или к очищенному РСВ. При постановке ИФА сыворотку мышей разводили 1:50. На графике указана средняя оптическая плотность образца (среднее \pm СО, n = 8). Для сравнения групп был использован однофакторный дисперсионный анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки (*: p<0,05; **: p<0,01).

Как показано на рисунке 23 трехкратная иммунизация вектором sF-NS приводила к статистически значимому приросту антител класса IgG, специфичных к химерному белку F, при сравнении с группой интактных мышей и NS-F. Однако уровень оптической плотности

не превышал 0,4, что может свидетельствовать о накоплении низкого уровня антител. Возможно, причиной того, что нам не удалось обнаружить сывороточных антител класса IgG, специфичных к РСВ, является то, что нам не удалось подобрать условия для постановки ИФА. Также причиной отсутствия антительного ответа к трансгену может быть его быстрая протеасомная деградация в зараженных клетках, не позволяющая сформироваться специфическим антителам, или недостаточной иммуногенности В-клеточного эпитопа. Гуморальный иммунный ответ к трансгену РСВ в сыворотках крови животных требует дальнейшего изучения.

Таким образом, на данном этапе работы было показано, что дизайн генного сегмента NS не оказывал влияния на уровень антительного иммунного ответа, формируемого к вирусу гриппа A/PR/8/1934. Включение сигнального пептида к вставленному трансгену не позволило увеличить уровень сывороточных IgG, специфичных к очищенному РСВ, при однократной интраназальной иммунизации мышей линии Balb/c.

3.5.2. Изучение Т-клеточного иммунного ответов после однократной иммунизации векторами

Уровень антиген-специфичного Т-клеточного иммунного ответа оценивался при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов IFN- γ , IL-10, IL-2 и TNF- α флуоресцентно-мечеными антителами после стимуляции клеток вирусом гриппа A/Guandong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09 (рис. 24, 25) или пептидом F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ (рис. 26, 27). Изучали общую долю цитокин-продуцирующих клеток в популяциях эффекторных (T_{em}) и тканерезидентных (T_{rm}) CD8⁺ Т-лимфоцитов и CD4⁺ Т-лимфоцитов (рис. 24 – 27, диаграммы box-plot), а также процент популяций, экспрессирующих один, два, три или четыре цитокина одновременно от общего числа CD8⁺/CD4⁺ Т-клеток (рис. 24 – 27, столбчатые диаграммы). В качестве контрольной группы были использованы интактные мыши.

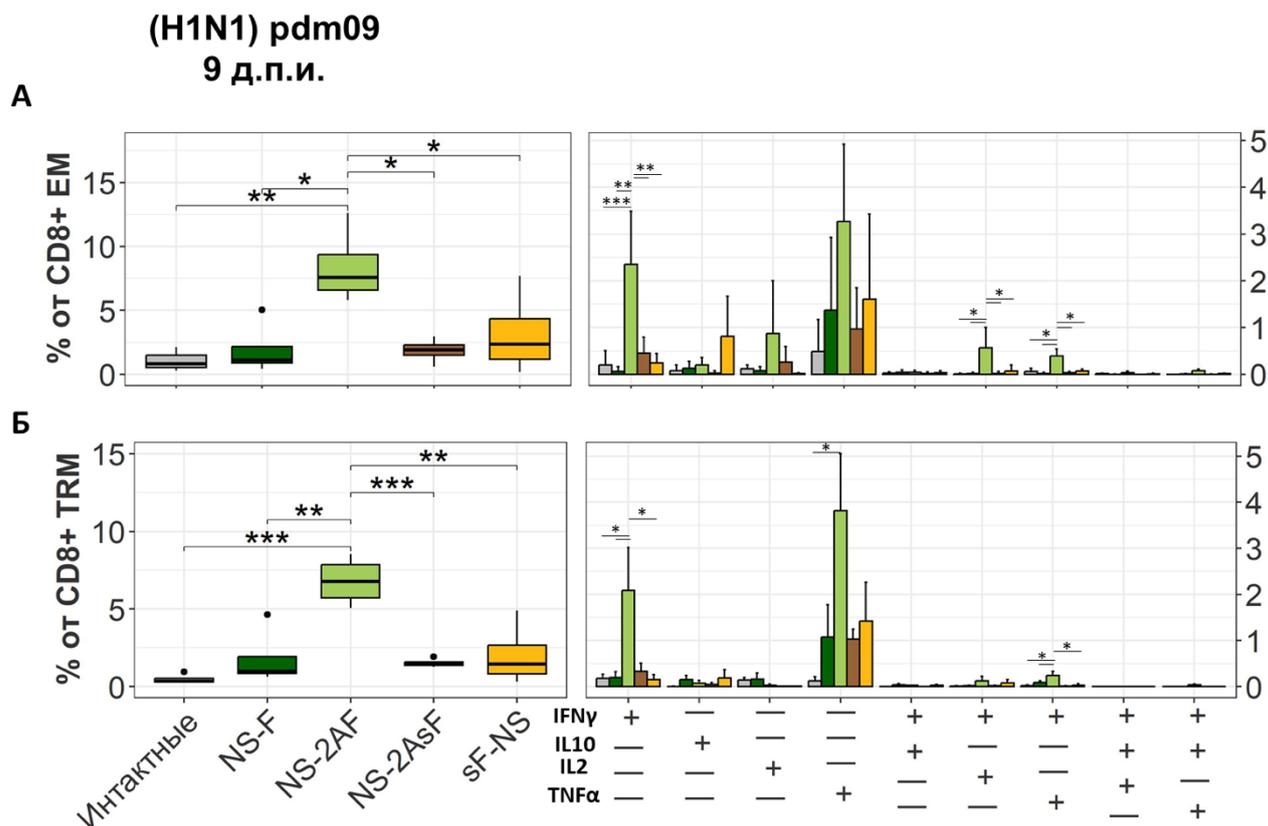


Рисунок 24 – Популяционный состав цитокин-продуцирующих эффекторных (EM) (А) и тканерезидентных (TRM) (Б) CD8 + Т лимфоцитов мышей, иммунизированных рекомбинантными гриппозными векторами. Графики отражают уровень иммунного ответа CD8 + Т-лимфоцитов, специфических к вирусу гриппа (H1N1)pdm09 в легких через 9 дней после интраназальной иммунизации штаммами. Рестимуляция *in vitro* проводилась фармсубстанцией (H1N1)pdm09 в течение 24 часов. Диаграммы box-plot слева представляет собой процент специфических Т клеток от общей популяции Т лимфоцитов. Столбчатые диаграммы справа представляют процент различных субпопуляций цитокин-продуцирующих Т клеток (среднее \pm CO, n = 5). Группы сравнивали с использованием общегруппового дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001).

При исследовании Т-клеточного иммунного ответа, специфичного к вирусу гриппа А (H1N1)pdm09, было выявлено формирование как CD8+ , так и CD4+ популяций Т клеток. Наиболее выраженный иммунный ответ был отмечен при интраназальном введении вектора NS-2AF. Статистически значимые различия по общему числу цитокин-продуцирующих Trm и Tem Т клеток были обнаружены при сравнении группы мышей, иммунизированных вектором NS-2AF, с остальными экспериментальными группами. В составе цитокин-продуцирующих CD8+ как Tem, так и Trm клеток доминирующее

положение занимали популяции, экспрессирующие IFN- γ или TNF- α (рис. 24). Для популяции CD4⁺ как Tem, так и Trm клеток наиболее представленной были субпопуляции клеток, продуцирующих IFN- γ (рис. 25).

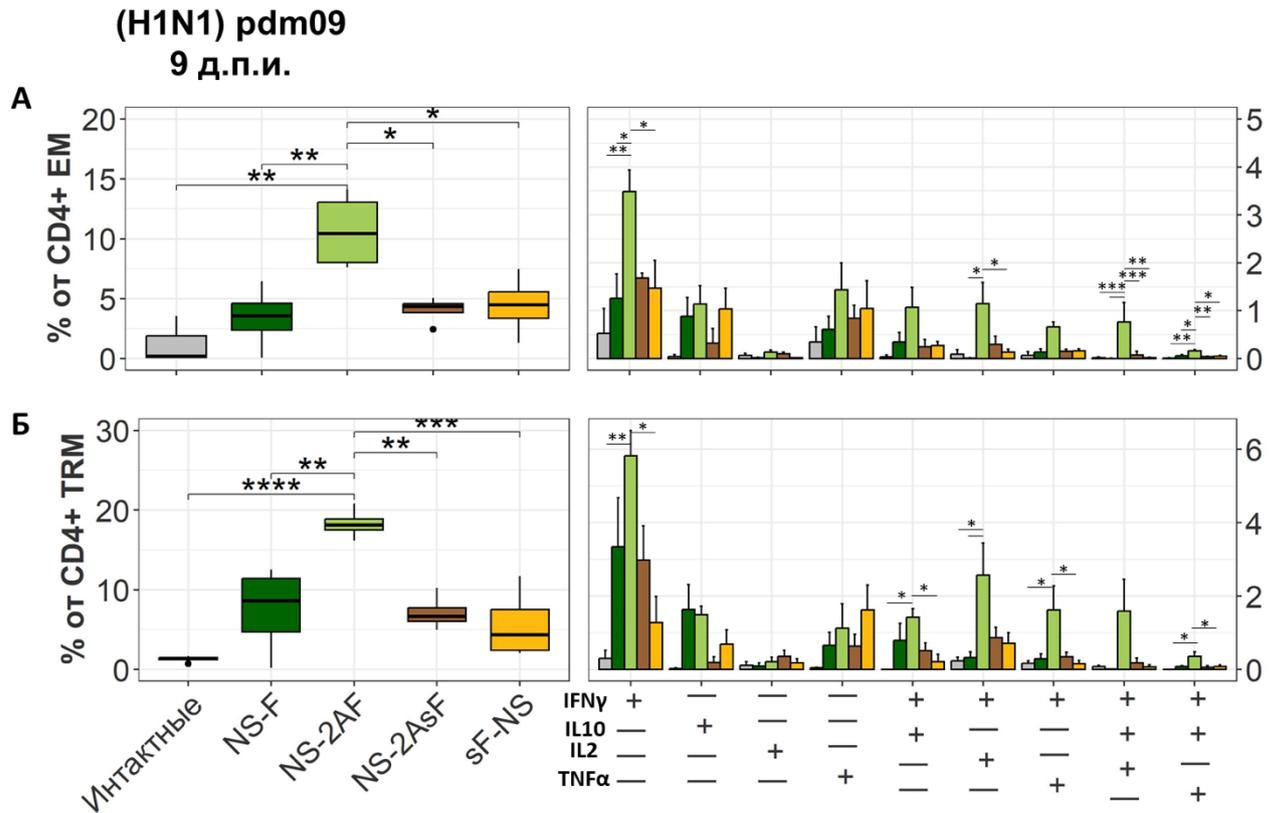


Рисунок 25 – Популяционный состав цитокин-продуцирующих эффекторных (EM) (А) и тканерезидентных (TRM) (Б) CD4⁺ Т лимфоцитов мышей, иммунизированных рекомбинантными гриппозными векторами. Графики отражают уровень иммунного ответа CD4⁺ Т-лимфоцитов, специфических к вирусу гриппа (H1N1)pdm09 в легких через 9 дней после интраназальной иммунизации штаммами. Рестимуляция *in vitro* проводилась штаммом (H1N1)pdm09 в течение 24 часов. Диаграммы box-plot слева представляет собой процент специфических Т клеток от общей популяции Т лимфоцитов. Столбчатые диаграммы представляют процент различных субпопуляций цитокин-продуцирующих Т клеток (среднее \pm CO, n = 5). Группы сравнивали с использованием общегруппового дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001).

Также было обнаружено, что в легких иммунизированных животных на 9 день после интраназального введения векторов формировался выраженный CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ на пептид F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ. Среди антиген-специфичных эффекторных CD8⁺ Т лимфоцитов преобладали популяции монопродуцентов, секретирующих один цитокин

(IFN- γ , или IL-10, или TNF- α) и двойных продуцентов, секретирующих IFN- γ и TNF- α . Статистически значимые различия с интактной группой неиммунизированных животных были отмечены при сравнении уровня антиген-специфических CD8 + T_h у группы животных, иммунизированных вектором NS-2AsF. Различия преимущественно были обусловлены более высоким уровнем CD8+ T_h, продуцирующих IFN- γ в ответ на рестимуляцию F₂₄₉₋₂₅₈ PCV.

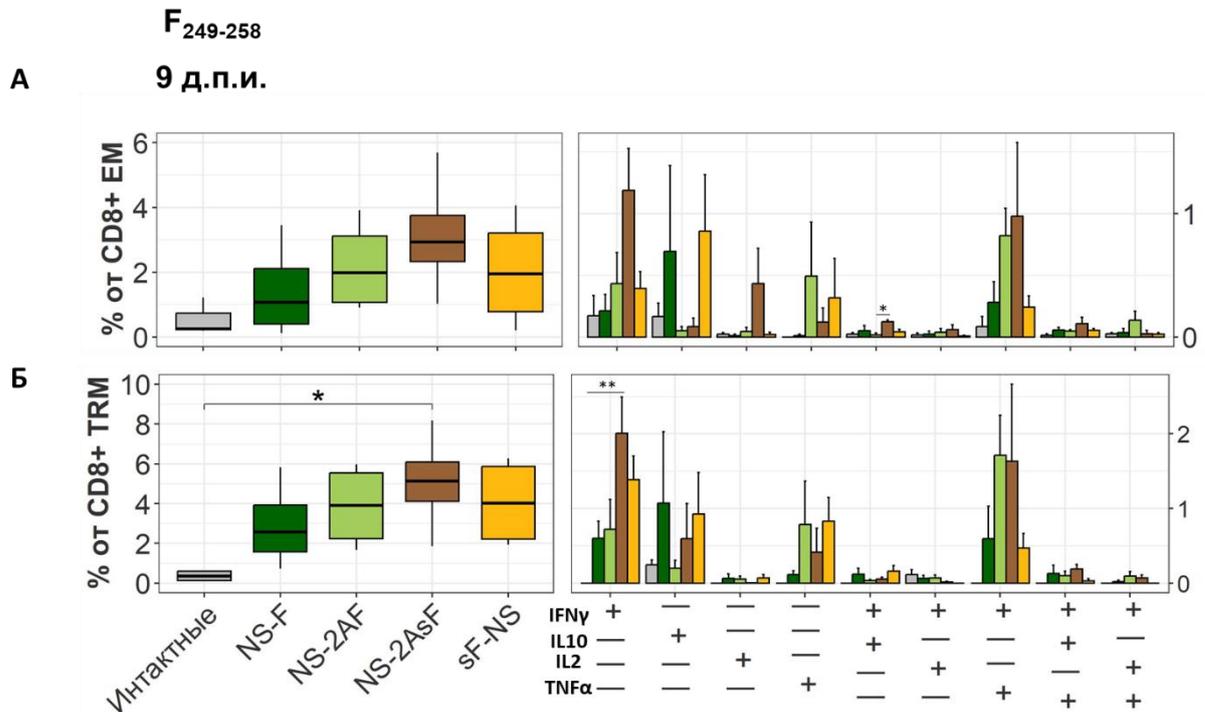


Рисунок 26 – Популяционный состав цитокин-продуцирующих эффекторных (EM) (А) и тканерезидентных (TRM) (Б) CD8 + Т лимфоцитов в легких мышей, иммунизированных рекомбинантными гриппозными векторами. Графики отражают уровень иммунного ответа CD8 + Т-лимфоцитов, специфических к белку F PCV через 9 дней после интраназальной иммунизации штаммами. Рестимуляция *in vitro* проводилась пептидом F₂₄₉₋₂₅₈ PCV в течение 6 часов. Диаграммы box-plot слева представляет собой процент специфических Т клеток от общей популяции Т лимфоцитов. Столбчатые диаграммы представляют процент различных субпопуляций цитокин-продуцирующих Т клеток (среднее \pm CO, n = 5). Группы сравнивали с использованием общегруппового дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки (*: p<0,05; **: p<0,01).

Через 21 день после однократной иммунизации различия в антиген-специфическом Т-клеточном иммунном ответе между группами не только сохранялись, но и становились более выраженными (рис. 27). Общее число цитокин-продуцирующих эффекторных Т

клеток в группах NS-2AsF и sF-NS статистически значимо отличалось от групп NS-2AF и NS-F соответственно. Мыши, иммунизированные штаммами со вставкой сигнального пептида, обладали повышенным уровнем полифункциональных Т лимфоцитов в легких.

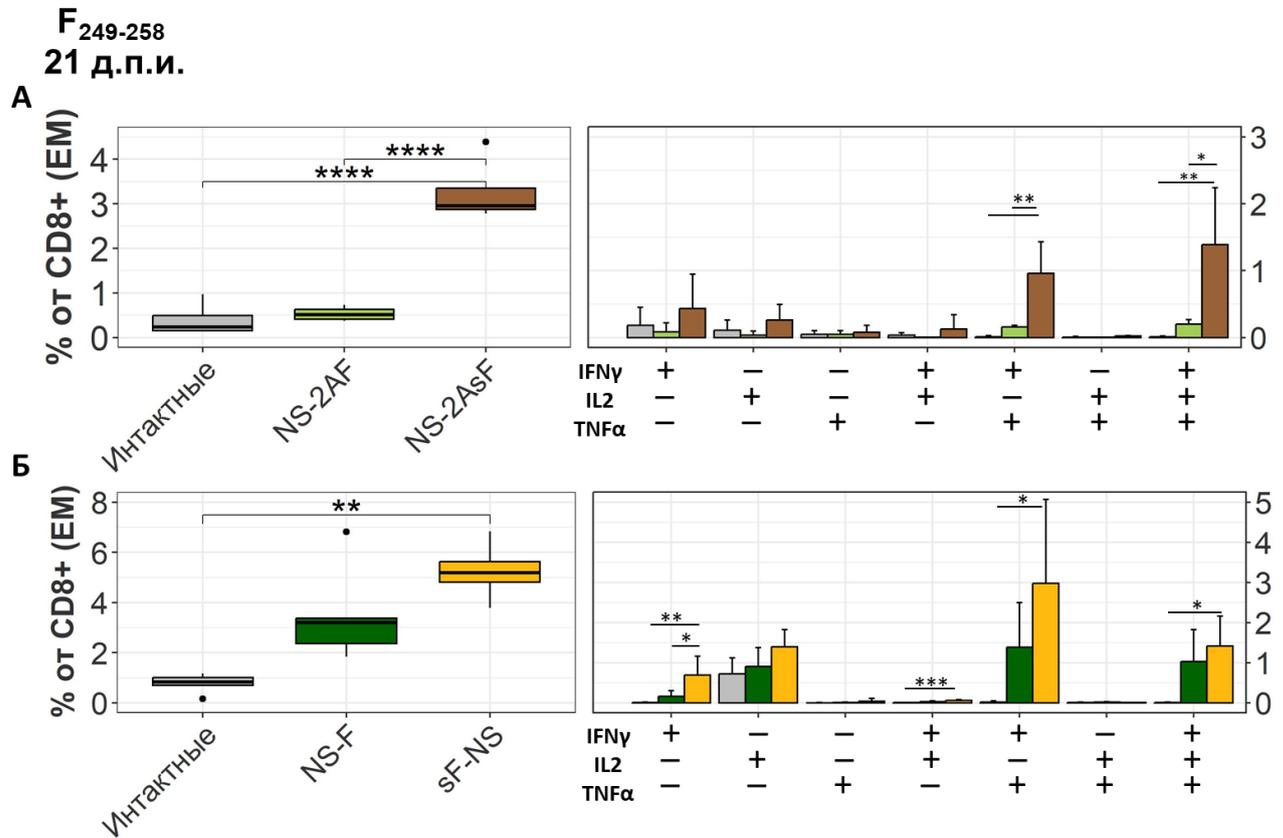


Рисунок 27 – Популяционный состав цитокин-продуцирующих эффекторных CD8 + Т лимфоцитов мышей, иммунизированных рекомбинантными гриппозными векторами. Графики отражают уровень иммунного ответа эффекторных CD8 + Т лимфоцитов, специфических к белку F РСВ легких через 21 день после интраназальной иммунизации штаммами NS-F и sF-NS (А); NS-2AF и NS-2AsF (Б). Рестимуляции *in vitro* проводилась пептидом F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ в течение 6 часов. Диаграммы box-plot слева представляет собой процент специфических Т клеток от общей популяции Т лимфоцитов. Столбчатые диаграммы представляют процент различных субпопуляций цитокин-продуцирующих эффекторных CD8 + Т клеток (среднее \pm СО, n = 5). Группы сравнивали с использованием общегруппового дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001).

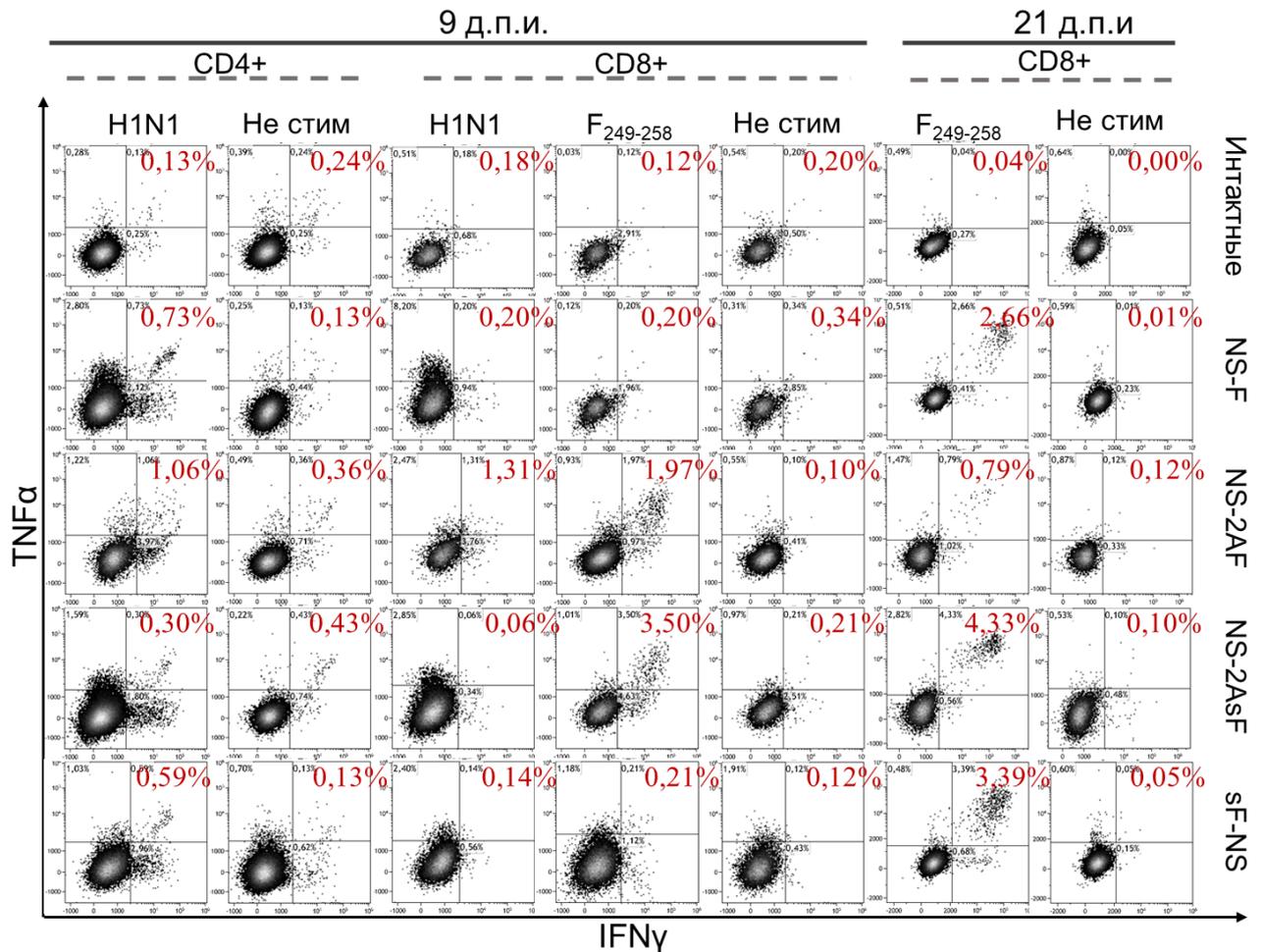


Рисунок 28 – Репрезентативные графики проточной цитометрии по экспрессии IFN- γ и TNF- α эффекторными Т клетками.

В целом, на основании полученных данных можно заключить, что векторы, содержащие сигнальный пептид, стимулируют формирование более выраженного ответа эффекторных и тканерезидентных CD8⁺ Т клеток памяти, специфичных к вставленному трансгену. В то же время иммунизация вектором NS-2AF стимулировала формирование более выраженного ответа CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточного ответа, специфичного к вирусу гриппа А. Интраназальная иммунизация мышей сконструированными векторами не способствовала формированию антиген-специфических антител класса IgG.

3.6. Изучение параметров иммунного ответа в ходе РСВ инфекции у иммунизированных животных

3.6.1. Изучение антительного иммунного ответов после иммунизации векторами

Гуморальный иммунный ответ в сыворотке крови иммунизированных мышей оценивали через 6 дней после экспериментального заражения РСВ. Общий уровень IgG, специфичных к очищенному РСВ, измеряли при помощи ИФА. Полученные результаты представлены на рисунке 29.

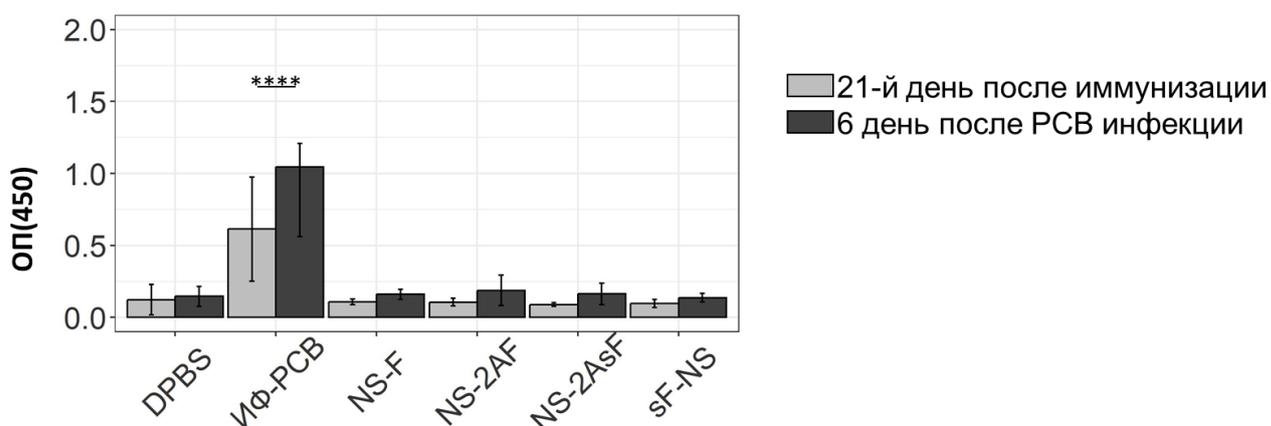


Рисунок 29 – Уровень сывороточных IgG, специфичных к очищенному РСВ, в сыворотках крови иммунизированных и контрольных мышей на 21 день после иммунизации и 6 день после экспериментальной РСВИ. При постановке ИФА сыворотку мышей разводили 1:50. На графике указана средняя оптическая плотность образцов (среднее \pm CO, n = 4). Для сравнения был применен однофакторный дисперсионный анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки (****: $p < 0,0001$).

РСВ-специфичного гуморального иммунного ответа на 6 день после РСВИ у мышей, иммунизированных гриппозными векторами, обнаружить не удалось. Тогда как в группе мышей, иммунизированных ИФ-РСВ, был отмечен статистически значимый прирост уже на 6 день после заражения.

3.6.2. Изучение Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных в ходе инфекции РСВ

Также мы оценили Т-клеточный иммунный ответ в легких иммунизированных животных на 6-е сутки после экспериментального заражения РСВ. На рисунке 30 показано процентное содержание антиген-специфичных эффекторных (А) и тканерезидентных (Б)

CD8⁺ Т клеток, продуцирующих цитокины IFN- γ , IL-2, IL-10, после повторной стимуляции *in vitro* пептидом F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ.

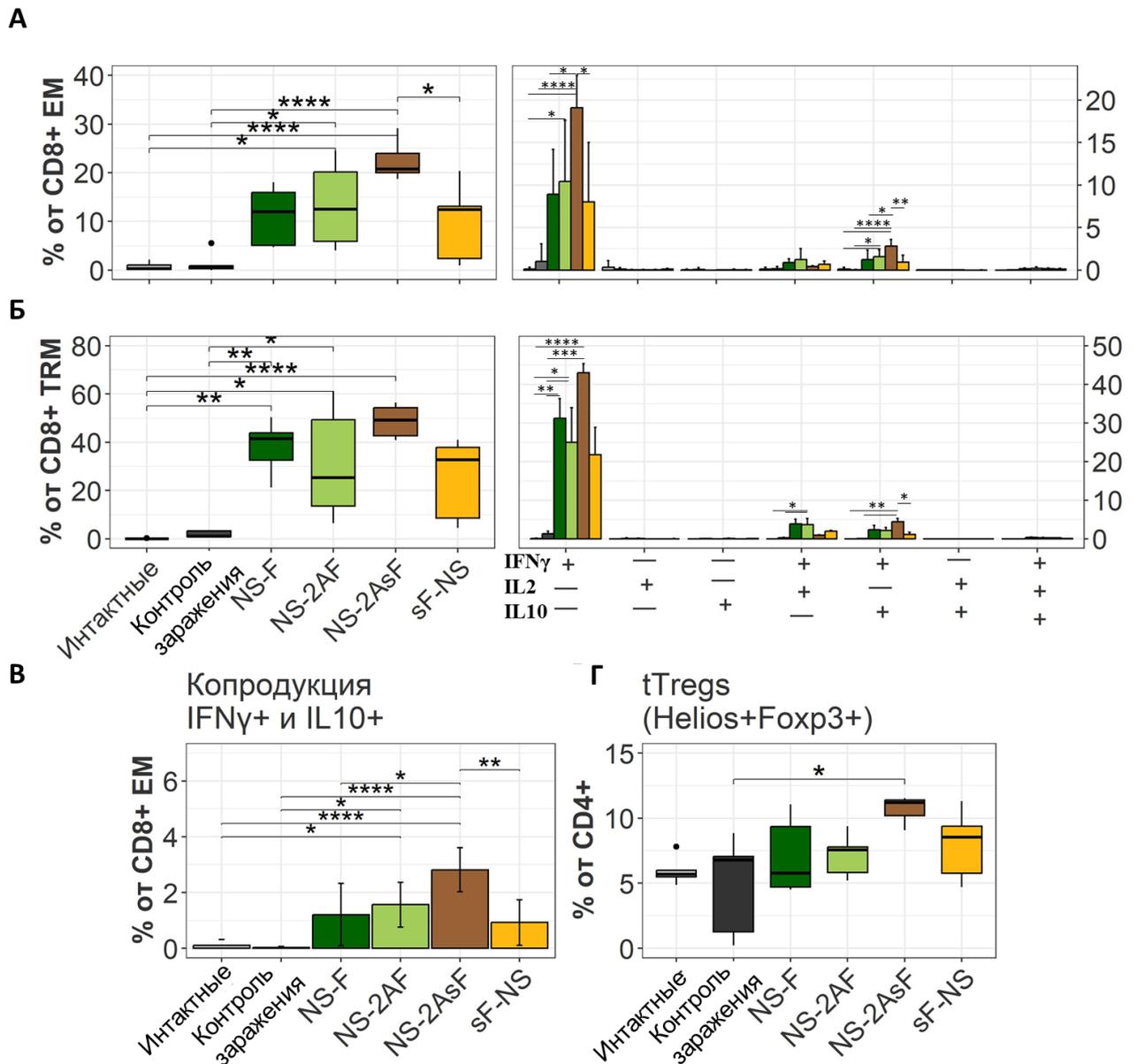


Рисунок 30 – Т-клеточный иммунный ответ у мышей через 6 дней после инфекции РСВ. Диаграммы box-plot слева представляют собой процент эффекторных (EM) (А) и тканерезидентных (TRM) (Б) CD8⁺ Т лимфоцитов, продуцирующих цитокины IFN- γ /IL-2/IL-10 в легких мышей. Столбчатые диаграммы справа представляют процент различных популяция цитокин-продуцирующих CD8⁺ Т лимфоцитов от общего числа. Рестимуляция *in vitro* проводилась пептидом F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ. (В) Процент эффекторных РСВ-специфичных CD8⁺ Т лимфоцитов, продуцирующих одновременно цитокины IFN- γ и IL-10. (Г) Уровень регуляторных Т клеток в легких мышей, иммунизированных векторами вируса гриппа, после инфекции РСВ. Группы сравнивали с использованием общегруппового

дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; $n = 5$).

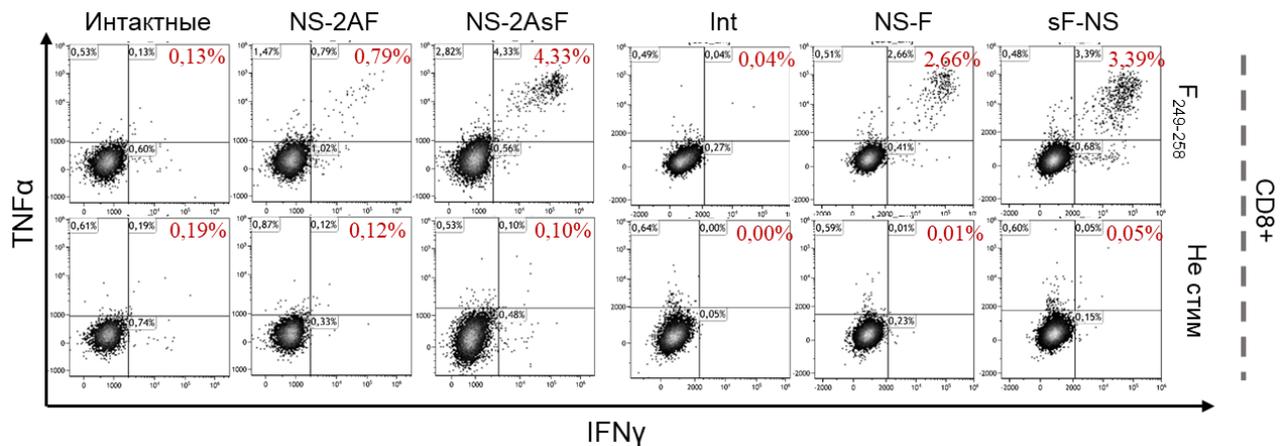


Рисунок 31 – Репрезентативные графики проточной цитометрии.

Все группы мышей, иммунизированных сконструированными векторами, продемонстрировали высокий уровень CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа при рестимуляции *in vivo* пептидом F₂₄₉₋₂₅₈. При этом в группе контроля заражения (DPBS) увеличения числа РСВ-специфичных CD8⁺ Т клеток не было обнаружено. Было обнаружено статистически значимое увеличение специфического ответа эффекторных и тканерезидентных Т клеток в группе вектора NS-2AsF (рис. 30), совпадающее с тенденцией, наблюдаемой после иммунизации. При оценке способности векторов обеспечивать формирование популяции Т клеток, способных к копродукции IFN- γ и IL-10, было показано, что вектор NS-2AsF наиболее эффективно стимулирует продукцию этих клеток (рис. 30B), играющих важную роль в защите от вакцино-ассоциированного усиления тяжести заболевания при инфекции РСВ.

Также в ходе работы было оценено влияние вакцинации на накопление Treg клеток в легких при заражении РСВ. Для этого было проведено внутриклеточное окрашивание на факторы транскрипции FOXP3 и Helios (рис. 30Г). Было показано, что иммунизация векторами, содержащими последовательность сигнального пептида IgGк, приводила к более выраженному накоплению клеток Helios⁺FOXP3⁺Treg в легких мышей. Была показана статистически значимая разница между NS-2AsF и группой контроля заражения.

В результате исследования антиген-специфического CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа в легких иммунизированных мышей на фоне заражения РСВ было показано, что иммунизация вектором NS-2AsF наиболее эффективно стимулирует формирование РСВ-специфичных Т клеток. Также в этой группе мышей было отмечено увеличенное

содержание популяции CD8⁺ Т лимфоцитов, продуцирующих одновременно IFN- γ и IL-10 и Helios⁺Foxp3⁺Treg в легких. Полученные результаты согласуются с данными, полученными в результате исследования вирусывыделения и гистологического анализа.

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ

РСВ – одна из наиболее частых причин возникновения острых респираторных заболеваний нижних дыхательных путей младенцев и детей младшего возраста. От 50% до 69% младенцев подвергаются инфекции в течение первого года жизни [76, 97], и практически все к возрасту 2 лет [76]. РСВ является причиной 50-90% бронхолитов, 5-40% пневмоний, 10-30% трахеобронхитов. Характерной чертой РСВИ является риск отдаленных иммунопатологических последствий. До 70% детей в возрасте до 1 года, госпитализированных с бронхолитами, обусловленными РСВ, подвержены рецидивирующим эпизодам бронхообструкции в течение последующих 6-12 лет [105] и повышенному риску развития бронхиальной астмы [57].

Несмотря на то, что РСВ представляет наибольшую опасность в раннем детском возрасте, до пандемии COVID-19 он был второй после гриппа причиной заболевания дыхательных путей у взрослых. Реинфекции РСВ подвергается от 5% до 10% взрослых в год [53, 54]. Также РСВ является важной причиной заболеваемости и смертности среди пожилых людей старше 65 лет [53].

При разработке вакцин против респираторных вирусов, таких как РСВ целесообразно достижение двух целей: 1) формирование мукозального иммунитета слизистых оболочек верхних дыхательных путей, выступающего в качестве барьера при аэрогенном заражении; 2) стимуляция сбалансированного иммунного ответа, предотвращающего развитие эффекта усиления заболевания у вакцинированных при встрече с патогеном [19].

Для индукции антиген-специфичного иммунного ответа, ассоциированного со слизистой оболочкой дыхательных путей, предпочтительным является интраназальный путь введения вакцин. Это позволяет сформировать РСВ-специфичные секреторные IgA и тканерезидентные Т клетки памяти. Согласно литературным данным, уровень IgA, специфичных к РСВ, коррелирует со снижением вирусной нагрузки и тяжести течения заболевания при РСВИ [84]. Образование специфичных тканерезидентных Т клеток памяти позволяет быстрее реагировать на инвазию патогена, останавливая распространение инфекции из верхних дыхательных путей в легкие. Увеличение популяции CD8+ T_{fm} также коррелирует со снижением титра вируса в дыхательных путях и тяжести течения инфекции [111].

Развитие патологии респираторного тракта при РСВИ возникает по ряду причин. Одна из них – способность РСВ модулировать качество адаптивного иммунного ответа, способствуя развитию ответа по Th2- и Th17-типу, сопровождающегося повышенной продукцией секрета эпителиальной тканью слизистых оболочек, гиперреактивностью

дыхательных путей и инфильтрацией нейтрофилов [80, 124, 159]. Определение направления развития иммунного ответа происходит за счет множества различных элементов: взаимодействия антигенпрезентирующих клеток с наивными Т клетками, цитокинового окружения, запускаемых сигнальных каскадов и типа антигена. Для эффективного клиренса внутриклеточного патогена предпочтительным является формирование иммунного ответа по типу Th1. Использование вакцинных платформ, доставляющих антиген внутриклеточно, с большей вероятностью будет приводить к стимуляции Th1-поляризованного иммунного ответа и индукции CD8 + Т-клеточного иммунитета.

Еще одной причиной повреждения ткани легкого может быть несбалансированный иммунный ответ цитотоксических Т клеток [124, 214]. Одним из механизмов, способных предотвратить развитие CTL-опосредованной иммунопатологии в легких, является формирование субпопуляций CD8+ и CD4+ РСВ-специфичных Т клеток, одновременно продуцирующих IFN- γ и IL-10 [151]. Также подавлять развитие иммунопатологии при РСВИ могут регуляторные Т клетки [31, 47, 159]. Таким образом, эффективная вакцина против РСВ должна способствовать дифференцировке Т-хелперов в Th-1 клетки, индуцировать формирование антиген-специфичных CD8+ Т лимфоцитов, ассоциированных со слизистой оболочкой дыхательных путей. Формируемый цитотоксический иммунный ответ должен быть сбалансирован активностью Treg клеток и субпопуляцией CD8+ и CD4+ Т лимфоцитов, продуцирующих одновременно IFN- γ и IL-10.

Имеющиеся в настоящее время данные об использовании экспериментальных вакцин на основе рекомбинантных аттенуированных векторов вируса гриппа позволяют надеяться на осуществимость указанных выше целей. Интраназальное введение гриппозных векторов приводит к формированию иммунного ответа, ассоциированного со слизистой оболочкой дыхательных путей, поляризуя иммунный ответ в сторону Th1 [61, 220, 235]. К тому же ранее было продемонстрировано, что в ткани легкого мышей, иммунизированных векторами вируса гриппа, наблюдается повышенное содержание Т-регуляторных лимфоцитов, способных регулировать воспалительный процесс [2]. Более того, иммунизация вектором вируса гриппа А, доставляющим протективные антигены РСВ, способна сформировать защитный иммунный ответ одновременно от двух наиболее опасных респираторных вирусных инфекций. Антигенное разнообразие подтипов вируса гриппа позволяет создавать актуализированные вакцинные штаммы, избегая негативного эффекта предсуществующего иммунитета. Вместе с тем, до сих пор не установлена структура оптимального вектора на основе вируса гриппа.

К настоящему времени в литературе описаны различные способы модификации

генных сегментов вируса гриппа А [41, 61, 73, 125, 128, 129, 139, 140, 220, 235]. Векторы вируса гриппа А с модифицированным белком NS1 известны своей ярко выраженной способностью стимулировать Т-клеточный иммунный ответ, благодаря самоадьювантному действию при мукозальном применении [2, 58, 235]. Однако формирование гуморального иммунного ответа к протективному антигену, слитому с белком NS1, может быть ограничено внутриклеточной локализацией неструктурного белка и отсутствием механизма эффективной презентации В-клеткам. В то же время, возможность формирования гуморального иммунного ответа к полноразмерному белку NS1 вируса гриппа описана в литературе [197]. Более того, было показано, что полноразмерный белок NS1 штамма вируса гриппа А/WSN (H1N1) обнаруживается на поверхности клеток уже через 4 часа после заражения [221]. Однако нет информации о том, выходит ли укороченный белок NS1₁₂₄ выходить во внеклеточное пространство.

В связи с этим первой задачей представленного диссертационного исследования была оценка эффективности внеклеточного транспорта трансгена NanoLuc, слитого с укороченным до 124 аминокислот белком NS1 вируса гриппа А. Для этого был сконструирован рекомбинантный репортерный вектор вируса гриппа, экспрессирующий нанолуциферазу NanoLuc [89] с открытой рамки считывания усеченного белка NS1₁₂₄. При слиянии фермента с белком NS1 активность люциферазы не нарушалась. При заражении культуры клеток Vero в дозе 0,005 ТИД₅₀/клетку люминесцентный сигнал в супернатанте клеток был обнаружен уже через 6 часов. Обнаруженная люциферазная активность в культуральной жидкости скорее всего не связана с гибелью клеток, так как согласно литературным данным, начало апоптоза в инфицированных вирусом гриппа клетках Vero задерживается по сравнению с IFN-компетентными клеточными линиями и начинается через 35 часов после заражения в дозе 2-4 ТИД₅₀/клетку [275]. При заражении мышей люминесцентная активность была обнаружена в БАЛ и сыворотке крови уже через 12 часов. При этом вирусная РНК в сыворотке крови была обнаружена только у одного животного через 48 часов. Это свидетельствует о том, что рекомбинантный репортерный белок не попадал в плазму крови в составе вирионов, а доставлялся отдельно или в результате лизиса зараженных клеток. В результате первой части исследования был сделан вывод, что трансген, ассоциированный с укороченным до 124 аминокислотных остатков может выходить во внеклеточное пространство и потенциально может праймировать В-клеточный иммунный ответ, однако, уровень поверхностной экспрессии может быть недостаточен для развития эффективного антительного ответа. В клеточных культурах детектируемый уровень люминесцентной активности вне клеток оказался в 100-1000 раз меньше, чем в цитоплазме зараженных клеток. В связи с этим, при конструировании гриппозных

векторов, экспрессирующих трансген РСВ, были использованы модификации, стимулирующие транспорт встроенного антигена во внеклеточное пространство.

Трансген РСВ был сформирован из двух высоко консервативных участков белка F РСВ (248–290 и 409–451 аминокислоты), находящихся в антигенных сайтах связывания нейтрализующих антител Palivizumab и 101F [164, 238]. Концепция использования эпитопа F_{243–294} в составе гриппозного вектора для формирования нейтрализующих антител была описана ранее [139]. Lee с соавторами сконструировали вектор вируса гриппа А с модифицированным НА, экспрессирующим участок белка F РСВ F_{243–294}. Однократная интраназальная иммунизация мышей этим вектором индуцировала формирование нейтрализующих антител, специфичных к РСВ, снижала вирусную нагрузку в легких в отсутствие легочной гистопатологии.

Были сконструированы четыре варианта векторов вируса гриппа А с химерным белком NS1: NS-F, NS-2AF, NS-2AsF и sF-NS. Модификации заключались в дополнении последовательности трансгена сигналом «автопротеолиза» 2А, последовательностью сигнального пептида IgGк; или в изменении взаимного расположения трансгена F и укороченного белка NS1. Сконструированные векторы могли быть разделены на две группы. Первая группа (NS-F и NS-2AF) была сконструирована для экспрессии трансгена F, накапливающегося в цитоплазме зараженных клеток. Во второй группе векторов (NS-2AsF и sF-NS) перед последовательностью трансгена F был встроен сигнальный пептид IgGк легкой цепи к иммуноглобулину IgG мыши, индуцирующий транспорт интересующего антигена во внеклеточное пространство.

Собранные рекомбинантные штаммы оказались генетически стабильны по результатам ОТ-ПЦР и секвенирования в течение пяти последовательных пассажей в системе РКЭ и обладали высокими ростовыми характеристиками в РКЭ – от 8,0 до 9,0 log₁₀ ЭИД₅₀/мл, и в клеточных культурах – от 7,0 до 8,0 log₁₀ ТИД₅₀/мл. Таким образом, использованные стратегии встраивания трансгена F в генный сегмент NS не оказывали влияния на репродуктивную активность векторных конструкций *in vitro*.

При изучении экспрессии химерных белков NS1 и F в клетках, инфицированных сконструированными векторами, были отмечены существенные различия. При заражении культуры клеток векторами NS-F и NS-2AF было продемонстрировано внутриклеточное распределение белка NS1₁₂₄ и трансгена F, с преимущественной локализацией химерных белков в ядре клеток, что соответствует нормальному распределению NS1 белка вируса гриппа через 6-12 часов при естественной гриппозной инфекции [79]. В то же время в клетках, инфицированных конструкцией NS-2AsF, интенсивность окрашивания трансгена была снижена, а в культуре клеток, зараженной вирусом sF-NS, трансген практически не

детектировался. Было выдвинуто предположение, что отсутствие трансгена в цитоплазме обусловлено его транспортом из клетки, однако, в супернатанте зараженных клеток РСВ-антиген также не был обнаружен. Стоит отметить, что сигнальные последовательности, помимо секреции рекомбинантных белков, выполняют ряд других задач [95]. В связи с этим, для конструкций, содержащих IgGк, обнаружение трансгена может быть затруднено посттрансляционными модификациями, которые не позволяют антителам распознавать трансген, или быстрой протеасомной деградацией трансгена. Тем не менее, Вестерн-блот анализ лизата клеток, зараженных векторами NS-F, NS-2AF, NS-2AsF и sF-NS, подтвердил экспрессию химерных белков с молекулярными массами, схожими с теоретически предсказанными.

Было проведено сравнение безопасности полученных векторов вируса гриппа А с модифицированным белком NS1 при однократной интраназальной иммунизации мышей. Векторы продемонстрировали схожий уровень аттенуации у мышей, не вызывая снижения массы тела в течение 14 дней более чем на 5% и демонстрируя сходную вирусную нагрузку в легких животных на 3-й и 5-й дни после иммунизации.

Результаты экспериментов с контрольным заражением РСВ животных, однократно интраназально иммунизированных сконструированными штаммами, позволили сделать несколько выводов. Во-первых, иммунизация всеми четырьмя гриппозными конструкциями приводила к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в легких зараженных животных, в сравнении с неиммунизированными животными. При этом наиболее эффективными оказались конструкции NS-2AsF или sF-NS, дополненные последовательностью сигнального пептида. Тем не менее, подавление репликативной активности вируса не может быть корректным критерием оценки эффективности вакцины против РСВ. На примере внутримышечной иммунизации ИФ-РСВ вакциной известно, что подавление размножения вируса может быть достигнуто за счет разрушения легочной ткани.

Во-вторых, иммунизация гриппозными векторами не приводила к формированию вакцино-ассоциированного усиления тяжести инфекции. Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее. В ряде работ было показано, что векторы вируса гриппа А, экспрессирующие участки белков РСВ, снижают вирусную нагрузку в легких мышей при РСВИ, не усиливая тяжести заболевания [139, 140, 161].

В-третьих, вакцинные штаммы, содержащие сигнальный пептид перед трансгеном F, демонстрировали большую профилактическую эффективность в отношении экспериментальной РСВ инфекции. Только у мышей, иммунизированных векторами NS-2AsF или sF-NS, наблюдались минимальные патологические изменения в легких, тогда как

у мышей в группах NS-F и NS-2AF наблюдались поражения, характерные для модели РСВ-инфекции у мышей. Таким образом, иммунизация мышей векторами со вставкой сигнального пептида обеспечивала защиту от РСВИ, которая характеризовалась сниженным по сравнению с неиммунизированной группой или группами NS-F и NS-2AF уровнем репликации и менее выраженными иммунопатологическими изменениями. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стратегия встраивания трансгена в вектор вируса гриппа оказывает влияние на профилактическую эффективность вакцинного кандидата в защите от РСВ инфекции.

Изучение индукции гетерологичной и гомологичной защиты от вирусов гриппа сконструированными штаммами в рамках представленного исследования не проводилось, так как ранее этот вопрос было всесторонне изучен как для вируса гриппа с укороченным до 124 аминокислот белком NS1 [2], так и для векторов вируса гриппа А, экспрессирующих чужеродные последовательности в ОРС химерного гена NS [129].

Чтобы понять механизм, лежащий в основе изменения эффективности векторов, мы проанализировали параметры врожденного и адаптивного иммунного ответа после иммунизации и после контрольного заражения. Наиболее эффективная стимуляция врожденного иммунного ответа через сутки после вакцинации была обнаружена в группах мышей, иммунизированных векторами NS-2AsF и sF-NS. Как и ожидалось, иммунизация сконструированными векторами индуцировала Th1-смещенный иммунный ответ. В представленной работе в группах NS-2AsF и sF-NS был обнаружен повышенный уровень цитокинов IL-6 и IL-27 в БАЛ мышей в сравнении с группами NS-F и NS-2AF. В опубликованной ранее работе было отмечено, что у мышей, иммунизированных вектором вируса гриппа с укороченным до 124 ак белком NS1 уровень IL-6 существенно выше, чем в группе животных, получивших вирус дикого типа [2]. Ранняя продукция IL-6 играет важную роль в регуляции иммунных ответов за счет секреции IL-27, который, в свою очередь, способствует созреванию локальных Treg клеток [193]. Этот механизм может быть важен для снижения вирус-специфической иммунопатологии. Примечательно, что на фоне РСВИ в группах мышей, иммунизированных векторами NS-2AsF и sF-NS, было обнаружено более выраженное накопление Treg клеток.

Изучение адаптивного иммунного ответа у мышей, иммунизированных векторами вируса гриппа, не позволило обнаружить антительный иммунный ответ к антигену РСВ. Ни один из использованных в работе способов модификации гриппозных векторов не позволили сформировать антительный ответ к трансгену в сыворотке крови или БАЛ иммунизированных животных. В литературе имеются разные данные о влиянии вставки сигнального пептида перед вакцинным антигеном. Так, в одной из работ сообщалось, что

добавление сигнального пептида к вакцинному кандидату против вируса Денге на основе рекомбинантного модифицированного вируса коровьей оспы Анкара способствовало развитию гуморального ответа на целевой белок у иммунизированных мышей [195]. В то же время модификация рекомбинантного аденовирусного вектора сигнальной последовательностью IgGк не приводила к увеличению титра трансген-специфических антител, но индуцировала формирование специфических цитокин-продуцирующих CD4+ Т-клеток [62]. В нашем эксперименте отсутствие антиген-специфических антител может быть связано со следующими причинами: быстрая протеасомная деградация химерного белка в цитоплазме, неэффективная секреция трансгена во внеклеточное пространство или недостаточная иммуногенность В-клеточного эпитопа. К тому же наличие защитного эффекта иммунизации при отсутствии антительного ответа подчеркивает важность Т-клеточного иммунного ответа в защите от РСВИ

При исследовании Т-клеточного ответа в легких на 9-й день после иммунизации мы обнаружили, что векторы индуцировали сопоставимые РСВ-специфичные иммунные ответы на эпитоп F₂₄₉₋₂₅₈. Однако статистически значимое увеличение F₂₄₉₋₂₅₈-специфических CD8+ T_{гм} в легких было выявлено группе животных, иммунизированных вектором NS-2AsF. При этом доля монопродуцентов IFN- γ как CD8+ T_{гм}, так и CD8+ T_{ем} в группе мышей, иммунизированных вектором NS-2AsF, также была выше, хотя статистически значимых различий выявлено не было.

Важным наблюдением было то, что Т-клеточный ответ на антигены вируса гриппа в группе NS-2AsF был слабее, чем в группе NS-2AF. Эти векторы различаются между собой лишь присутствием сигнальной последовательности IgGк перед трансгеном. Таким образом, вставка сигнального пептида позволила изменить иерархию эпитопов вектора вируса гриппа и встроенной гетерогенной последовательности в сторону последней.

В дополнительном эксперименте РСВ-специфический ответ был оценен на 21-й день после однократной интраназальной иммунизации. Выявленная на этот временной срок разница в специфическом ответе CD8+ Т клеток на эпитопе F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ была более выраженной и позволила выделить оба вектора, дополненных сигнальной последовательностью IgGк, как наиболее иммуногенные. Суммируя полученные данные по изучению Т-клеточного ответа в легких иммунизированных мышей можно сделать вывод, что присоединение сигнального пептида IgGк к вакцинному антигену позволяет сфокусировать иммунный ответ CD8+ Т клеток на эпитоп РСВ, за счет лучшей презентации антигена в контексте МНС I. Наши результаты согласуются с литературными данными, где отмечалось, что встраивание сигнальной последовательности перед вакцинным антигеном усиливает Т-клеточный иммунный ответ на встроенный чужеродный антиген [62, 195, 250]

и способно иммунорецессивные этипоты вставки сделать более доминантными [66]. Этот результат свидетельствует о том, что иммуногенность трансгена в составе гриппозного вектора может быть усилена путем введения гидрофобных фланкирующих последовательностей, таких как сигнальный пептид иммуноглобулина. Это может позволить преодолеть одну из проблем при конструировании векторных вакцин, а именно эффект доминирования антигенов вектора над антигенами вставки.

Иммунофлуоресцентное окрашивание F-антигена в клетках, зараженных векторами со вставкой IgGк, продемонстрировало снижение количества вакцинного антигена в цитоплазме, что свидетельствует о том, что более высокая T-клеточная иммуногенность векторов, модифицированных путем добавления сигнальной последовательности, может быть обусловлена сочетанием ряда различных механизмов. Улучшенная презентация эпитопа F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ в контексте МНС I может быть связана с несколькими причинами. Во-первых, при успешной секреции из инфицированной клетки пептид может стать доступным для кросс-презентации антигенов CD8⁺ T лимфоцитам дендритными клетками. Некоторые эпитопы РСВ, в том числе F₂₄₉₋₂₅₈, использованный в нашей работе, могут быть представлены только в ходе кросс-презентации молекулами МНС-I, когда праймирование F₂₄₉₋₂₅₈-специфических лимфоцитов происходит экзогенно. Возможно, это происходит по лизосомальному пути деградации белков, независимо от протеасом и транспортеров, связанных с процессингом антигена (TAP) [109, 110]. Это может быть причиной более высокой иммуногенности векторов, содержащих сигнальный пептид IgGк. Во-вторых, нельзя исключить, что сигнальный пептид, особенно с пролином на N-конце, экспонированным после расщепления по сайту 2A, может быть субоптимальным для эффективной доставки белка в эндоплазматический ретикулум; нарушение пространственной конформации полипептидной цепи белка может способствовать его деградации на протеасомах с последующей TAP-зависимой или независимой эндогенной презентацией [181]. Известно, что искусственные белки, содержащие гидрофобные последовательности, могут быть нестабильными и подвергаться ускоренной деградации в протеасомах и последующей презентации пептидов на МНС I [36, 101, 181]. Так как сигнальные пептиды, помимо их секреторной функции, могут оказывать ряд других эффектов на распределение белков [95], то возможно, что улучшенная иммуногенность векторов NS-2AsF и sF-NS может быть результатом ряда описанных механизмов.

Также в рамках работы был оценен адаптивный иммунный ответ на фоне экспериментальной РСВИ. Полученные данные о выделении вируса РСВ из легких мышей коррелировали с данными о T-клеточном иммунном ответе на РСВ антиген. Более выраженный иммунный ответ эффекторных и тканерезидентных CD8⁺ T-лимфоцитов был

обнаружен в группе мышей, иммунизированных вектором NS-2AsF. Однако защита, опосредованная векторами, содержащими сигнальный пептид IgGк, может быть связана не только с амплитудой Т-клеточного ответа на антиген РСВ, но и с популяционным составом цитокин-продуцирующих CD8⁺ Т лимфоцитов. Иммунизация вектором NS-2AsF стимулировала образование наибольшего процента эффекторных CD8⁺ Т-клеток, одновременно продуцирующих IFN- γ и IL-10. Формирование такой субпопуляции Т клеток способствует достижению тонкого баланса между элиминацией вируса и контролем иммунного ответа в дыхательных путях, путем саморегуляции противовоспалительных эффектов IFN- γ за счет синтеза IL-10 [151, 236].

Также важную роль в уравнивании повышенного CD8⁺ цитотоксичного Т-клеточного ответа, который способствует повреждению тканей, играют Treg клетки [31, 39, 159]. Наиболее выраженное накопление Treg клеток на фоне РСВИ было также отмечено в группе мышей, иммунизированных NS-2AsF. Полученные результаты коррелировали с результатами морфологического исследования легких. Наши данные показывают, что вектор, дополненный сигнальным пептидом IgGк, более эффективно запускает накопление Treg клеток в легких мышей при последующем заражении РСВ. Учитывая, что антиген-зависимая дифференцировка Treg клеток подразумевает опосредованную МНС-II презентацию внеклеточных антигенов, наши результаты согласуются с теоретическими ожиданиями повышения эффективности векторов, содержащих IgGк, в индукции образования Treg. Однако вопрос специфичности Treg клеток к РСВ-антигену заслуживает дальнейшего изучения.

В заключение, представленные в текущем исследовании результаты подчеркивают важность изучения различных стратегий оптимизации вирусных векторов с целью фокусирования иммунного ответа на встроенном антигене. В работе продемонстрировано, что включение сигнального пептида IgGк в трансген, состоящий из участков белка F РСВ, повышает защитную эффективность векторов вируса гриппа А с модифицированным белком NS1 в отношении инфекции РСВ. В качестве оптимальной была выявлена структура вектора NS-2AsF. Иммунизация вектором NS-2AsF вызывала формирование повышенного числа антиген-специфичных эффекторных и тканерезидентных CD8⁺ Т клеток памяти. Примечательно, что на фоне экспериментальной РСВИ, у мышей из группы NS-2AsF был выявлен не только самый выраженный ответ трансген-специфичных CD8⁺ Т лимфоцитов, но и были обнаружены субпопуляции Т клеток, участвующих в регуляции иммунного ответа, Treg клетки и ко-продуценты IFN- γ и IL-10. Выявленная оптимальная структура вектора с модифицированным белком NS1 может быть использована для экспрессии других трансгенов.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования

Полученные в рамках исследования результаты предлагают способ оптимизации структуры гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для увеличения иммуногенности используемого трансгена. Результаты диссертационного исследования подчеркивают важность изучения влияния дизайна конструкции гриппозных векторов на стимулируемый иммунный ответ, и демонстрируют возможность тонкой настройки формируемого в результате вакцинации иммунитета. В свете полученных данных представляется необходимым дальнейшее изучение способов оптимизации дизайна гриппозного вектора, направленных на формирование антительного ответа уже после однократного интраназального введения.

ВЫВОДЫ

1. На примере репортерного вектора NanoLuc показано, что трансген, слитый с укороченным белком NS1₁₂₄, может транспортироваться во внеклеточное пространство зараженных клеток *in vitro* и *in vivo*.
2. Сконструированные векторы вируса гриппа А, экспрессирующие участки белка F РСВ в составе геномного фрагмента NS, различались по интенсивности накопления трансгена в цитоплазме зараженных клеток в зависимости от наличия и расположения последовательности сигнального пептида IgGк.
3. Все полученные вирусы имели сходный уровень аттенуации для мышей, но отличались по параметрам иммуногенности. В частности, вектор NS-2AsF, содержащий последовательность сигнального пептида IgGк после последовательности NS1, обладал повышенной способностью формирования CD8⁺ Т-клеточного ответа на эпитоп трансгена при однократной интраназальной иммунизации мышей.
4. Независимо от дизайна векторной конструкции, однократная интраназальная иммунизация мышей подавляла репродукцию РСВ в легких зараженных мышей, но только векторы с сигнальным пептидом IgGк значительно снижали выраженность патологических изменений в легких.
5. Вектор NS-2AsF демонстрировал наиболее выраженную способность формирования ответа антиген-специфических CD8⁺ Т клеток, в том числе субпопуляции CD8⁺ Т клеток, продуцирующих IL-10 и IFN- γ , и накопления CD4⁺ регуляторных Т клеток в легких мышей, инфицированных РСВ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ак – аминокислота
- БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
- БОЕ - бляшкообразующие единицы
- ВИЧ - вирус иммунодефицита человека
- ГАЕ - гемагглютинирующие единицы
- ДК - дендритные клетки
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- дцРНК – двухцепочечная РНК
- ЕС – Европейский союз
- ИФА - иммуноферментный анализ
- ИФ-РСВ – инактивированный формалином респираторно-синцитиальный вирус
- ОП(450) - оптическая плотность проб при длине волны 450 нм
- ОРВИ - острая респираторная вирусная инфекция
- ОРС – открытая рамка считывания
- ОРЗ – острое респираторное заболевание
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РГА - реакция гемагглютинации
- РКЭ - развивающиеся куриные эмбрионы
- РНК - рибонуклеиновая кислота
- РНП – рибонклеокапсид
- РСВ – респираторно-синцитиальный вирус
- РСВИ – инфекция респираторно-синцитиального вируса
- РТГА - реакция торможения гемагглютинации
- ТИД₅₀ – 50% тканевая инфекционная доза
- ЭИД₅₀ – 50% эмбриональная инфекционная доза
- ЭПР – эндоплазматический ретикулум
- CTL - цитотоксические лимфоциты
- DPBS - натрий-фосфатный буфер
- ERD – (Enhanced Respiratory Disease) усиление тяжести течения заболевания
- FDA - (The United States Food and Drug Administration) управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
- IFN - интерферон

IL - интерлейкин
ISG - интерферон-стимулируемые гены
MDCK – Madin–Darby canine kidney
MHC - молекулы главного комплекса гистосовместимости
NEP/NS2 - белок ядерного экспорта
NK - естественные киллеры
NLR - NOD-подобные рецепторы
NS1 - неструктурный белок 1
NS124 – вирус гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), кодирующий укороченный до 124 аминокислот белок NS1
PAMPs - (pathogen-associated molecular patterns) паттерны, ассоциированные с патогенами
PBST - (phosphate-buffered saline with Tween 20) фосфатно-солевой буфер с Твин-20
PI3K – фосфоинозитид-3-киназа
PKR - протеин киназа R
PRR - паттерн-распознающие рецепторы
RDE - (Receptor destroying enzyme) рецептор - разрушающий фермент
TLRs - (toll-like receptors) толл-лайк рецепторы
Tem - эффекторные Т клетки памяти
Th - Т-хелперы
TLR - Toll-подобные рецепторы
TNF - фактор некроза опухолей
Treg – Т-регуляторные лимфоциты
T_h1 – тканерезидентные Т клетки памяти
ts - температурочувствительный фенотип

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов, А.А. Иммунопрофилактика респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у детей / А. А. Баранов, Л. С. Намазова-Баранова, И.В. Давыдова, и др. // Педиатрическая фармакология. Издательство «Педиатр». - 2015. - V. 12. - № 5.
2. Васильев, К.А. Усиление иммуногенности антигенных детерминант вирусов гриппа А путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1: дис. канд. биол. наук: 03. 02. 02 / Васильев Кирилл Александрович. - СПб., 2020. - 155 с.
3. Давыдова, И.В. Отдаленные последствия респираторно-синцитиальной вирусной инфекции, перенесенной в раннем детском возрасте / И. В. Давыдова // Педиатрия. – 2018. – V. 97. - № 6. – с. 156–161.
4. Карпова, Л.С. Распространенность РС-вирусной инфекции и других ОРВИ не гриппозной этиологии у детей и взрослых в регионах России в 2014–2016 годах / Л.С. Карпова, Е.А. Смородинцева, Т.И. Сысоева и др. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 2. - № 99. - С. 16-26.
5. Кривицкая, В.З. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция. Особенности патогенеза, стратегия профилактики и лечения / В.З. Кривицкая // Вопросы современной педиатрии – 2013. – V. 12. - № 2. – с. 35-43.
6. Кривицкая, В.З. Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу / В.З. Кривицкая, Е.Р. Петрова, Е.В. Сорокин и др. // Биотехнология. – 2016. - Т. 32. - № 1. - С. 65-75.
7. Никонова, А.А. Иммунный ответ на инфекцию, вызванную респираторно-синцитиальным вирусом (orthopneumovirus) / А.А. Никонова, И.Ю. Исаков, В.В. Зверев // Инфекция и иммунитет - 2021. - №2.
8. Соминина, А.А. Особенности этиологии респираторных вирусных инфекций у госпитализированных больных в зависимости от демографических, социально-экономических факторов и предшествующей вакцинации / А.А. Соминина, М.М. Писарева, Ж.В. Бузицкая и др. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 3. - № 82. – С. 74-83.
9. Цыбалова Л.М. Значение РС-вирусной инфекции в эпидемиологии и этиологии ОРВИ у детей младшего возраста / Л.М. Цыбалова, Е.А. Смородинцева, Л.С. Карпова и др. // Лечащий врач –2015. – № 4. – С. 56-62.
10. 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. Muñoz-Durango et al. // EClinicalMedicine. - 2020.- V. 27. – p. 100517

11. Acosta, P. Brief History and Characterization of Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease / Acosta P., Caballero M.T., Polack F.P. // *Clin. Vaccine Immunol.* - 2016.- V.23.- p. 189–195
12. Anderson, L.J. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development / L.J. Anderson, P.R. Dormitzer, D.J. Nokes et al. // *Vaccine.* – 2013. –No.31. P. 209-15.
13. Belshe, R. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children / R. Belshe, P. Mendelman, Treanor et al. // *N Engl J Med.* - 1998. – V. 338. – p. 1405-1412.
14. Belshe, R. Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine / R. Belshe, M.S. Lee, R.E. Walker et al. // *Expert Rev Vaccines.* - 2004. - V.3. – p. 643-54.
15. Bergeron, H.C. Immunopathology of RSV: An Updated Review. / H.C. Bergeron, R.A. Tripp // *Viruses* – 2021. - V. 13. - № 12. – p. 2478.
16. Bian, C. Influenza virus vaccine expressing fusion and attachment protein epitopes of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in BALB/c mice / C. Bian, S. Liu, N. Liu et al. // *Antiviral Res.* – 2014. - V. 104. – p. 110-117.
17. Bloom-Feshbach, K. Latitudinal variations in seasonal activity of influenza and respiratory syncytial virus (RSV): a global comparative review / K. Bloom-Feshbach, W.J. Alonso, V. Charu et al. // *PLoS One* – 2013. – V. 8. - № 2. – e54445.
18. Bont, L. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity / L. Bont, C.J. Heijnen, A. Kavelaars et al // *J Infect Dis.* – 2001. – V. 184 - № 3. – p. 355-358.
19. Boyoglu-Barnum, T. Biology of Infection and Disease Pathogenesis to Guide RSV Vaccine Development / T. Boyoglu-Barnum, L.J. Chirkova, L.J. Anderson // *Front. Immunol.* – 2019. - vol. 10. - p. 1675.
20. Bukreyev, A. The secreted form of respiratory syncytial virus G glycoprotein helps the virus evade antibody-mediated restriction of replication by acting as an antigen decoy and through effects on fc receptor-bearing leukocytes / A. Bukreyev, L. Yang, J. Fricke et al. // *J Virol* – 2008. – V. 82. – 12191.
21. Caini, S. A comparative analysis of the epidemiology of influenza and respiratory syncytial virus in Russia, 2013/14 to 2018/19 / S. Caini, K. Stolyarov, A. Sominina et al. // *J Glob Health* – 2022. – V. 12. – p. 04009.
22. 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.

23. Castrucci, M.R. Protection against Lethal Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Infection by Immunization of Mice with an Influenza Virus Containing an LCMV Epitope Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes / M.R. Castrucci, S. Hou, P.C. Doherty et al. // *Journal of Virology* – 1994. – V. 68. - № 6. - p. 3486-3490.
24. Chadha, M. Human respiratory syncytial virus and influenza seasonality patterns-Early findings from the WHO global respiratory syncytial virus surveillance / M. Chadha, S. Hirve, C. Bancej et al // *Influenza Other Respir Viruses* – 2020. – V. 14 - № 6. – p. 638-646.
25. 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.
26. Checchia, P.A. Mortality and morbidity among infants at high risk for severe respiratory syncytial virus infection receiving prophylaxis with palivizumab: a systematic literature review and meta-analysis / P.A. Checchia, L. Nalysnyk, A.W. Fernandes et al // *Pediatr Crit Care Med.* – 2011. – V. 12 - № 5. – p. 580-588.
27. Chen, J.A live attenuated virus-based intranasal COVID-19 vaccine provides rapid, prolonged, and broad protection against SARS-CoV-2 / J. Chen, P. Wang, L. Yuan et al // *Sci Bull (Beijing)* – 2022. – V. 67 - № 13. – p. 1372-1387.
28. 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
29. 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.
30. Chien, C. Y. Biophysical Characterization of the Complex Between Double-Stranded RNA and the N-Terminal Domain of the NS1 Protein From Influenza A Virus: Evidence for a Novel RNA-Binding Mode / C.Y. Chien, Y. Xu, R. Xiao et al // *Biochemistry* – 2004. – V. 43 - № 7. – p. 1950–1962.
31. Christiaansen, A.F. CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection / A.F. Christiaansen, C.J. Knudson, K.A. Weiss et al // *The Immunol Res.* – 2014. – 59 - № 1. – p. 109–1–17.
32. Collins, P.L. Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus / P.L. Collins, R.A. Olmsted, M.K. Spriggs et al // *Proc Natl Acad Sci USA* // 1987. – V. 84. - № 15. – p. 5134–5138.

33. Collins, P.L. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis / P.L. Collins, B.S. Graham // *J Virol.* – 2008. – V. 82. – p. 2040–2055.
34. Collins, P.L. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus / P.L. Collins, R.A. Karron//. In *Fields Virology: Sixth Edition* – Vol. 1 – 2013.
35. Corbett, K.S. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness / K.S. Corbett, D.K. Edwards, S.R. Leist et al // *Nature* – 2020. – V. 586. – p. 567-571.
36. Cosma, G.L. Kinetically distinct processing pathways diversify the CD8+ T cell response to a single viral epitope / G.L. Cosma, J.L. Lobby, E.J. Fay et al // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2020. – V. 117. -- № 32. – p. 19399-19407.
37. Cottingham, M.G. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths / M.G. Cottingham, M.W. Carroll. // *Vaccine* - 2013. – V. 31. № 39. - p. 4247-4251.
38. Crank, M.C. A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans / M.C. Crank, T.J. Ruckwardt, M. Chen// *Science (New York, N.Y.)* – 2019. – V. 365. – № 6452. – p. 505-509.
39. Culley, F.J. Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood / F.J. Culley, J. Pollott, P.J. Openshaw. // *J Exp Med.* – 2002. – V. 196. – № 10. – p. 1381–1386.
40. Cunningham, C.K. Evaluation of Recombinant Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccines RSV/DeltaNS2/Delta1313/I1314L and RSV/276 in RSV-Seronegative Children / C.K. Cunningham, R.A. Karron, P. Muresan// *J Infect Dis* – 2022. – V. 226. – № 12. – p. 2069-2078.
41. De Baets, S. Recombinant influenza virus carrying the respiratory syncytial virus (RSV) F85-93 CTL epitope reduces RSV replication in mice / S. De Baets, B. Schepens, K. Sedeyn et al // *J Virol.* – 2013. – V. 87. – № 6. – p. 3314–33.
42. de Goede, A.L. Characterization of recombinant influenza A virus as a vector for HIV-1 p17Gag / A.L. de Goede, P.H. Boers, L.J. Dekker et al // *Vaccine* – 2009. – V. 27. – № 42. - p. 5735-5739.
43. de Vries, R.D. Viral vector-based influenza vaccines / R.D. de Vries, G.F. Rimmelzwaan. // *Hum Vaccin Immunother* – 2016. – V. 12. – № 11. - p. 2881-2901.
44. Delestrain, C. Impact of COVID-19 social distancing on viral infection in France: A delayed outbreak of RSV / C. Delestrain, K. Danis, I. Hau et al // *Pediatr Pulmonol.* – 2021. – V. 56. - № 12. – p. 3669-3673.

45. Deng, S. An intranasal influenza virus-vectored vaccine prevents SARS-CoV-2 replication in respiratory tissues of mice and hamsters / S. Deng, Y. Liu, R.C. Tam et al // *Nat Commun.* – 2023. – V. 14. - № 1. – p. 2081.
46. DiNapoli, J.M. Impairment of the CD8⁺ T cell response in lungs following infection with human respiratory syncytial virus is specific to the anatomical site rather than the virus, antigen, or route of infection / J.M. DiNapoli, B.R. Murphy, P.L. Collins et al // *Viol J.* – 2008. – V. 5. – p.105.
47. Durant, L.R. Regulatory T cells prevent Th2 immune responses and pulmonary eosinophilia during respiratory syncytial virus infection in mice / L.R. Durant, S. Makris, C.M. Voorburg et al // *J Virol.* – 2013. – V. 87. - № 20. – p. 10946-10954.
48. 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.
49. Eichinger, K.M. Data describing IFN γ -mediated viral clearance in an adult mouse model of respiratory syncytial virus (RSV) / K.M. Eichinger, K.M. Empey // *Data Brief.* – 2017. – V. 14. – p. 272-277.
50. Eisfeld, A.J. At the centre: Influenza A virus ribonucleoproteins / A.J. Eisfeld, G. Neumann, Y. Kawaoka // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2015. - V. 13. - № 1. - p. 28–41.
51. El Saleeby, C.M. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children / C.M. El Saleeby, A.J. Bush, L.M. Harrison et al // *J Infect Dis.* – 2011. – № 204. - p. 996–1002.
52. England, C.G. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence / C.G. England, E. B. Ehlerding, W. Cai // *Bioconjug Chem.* – 2016. - V. 27. - № 5. – p.1175-1187.
53. Falsey, A.R. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults / A.R. Falsey, P.A. Hennessey, M.A. Formica et al // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – V. 352. p. 1749-1759.
54. Falsey, A.R. Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection / A.R. Falsey, H.K. Singh, E.E. Walsh // *J. Med. Virol.* – 2006. - V. 78. - № 11. - p. 1493–1497.
55. Fausther-Bovendo, H. Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important? / H. Fausther-Bovendo, G.P. Kobinger // *Hum Vaccin Immunother.* – 2014.- V. 10. - № 10. – p. 2875-2884.
56. Fearn, R. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus / R. Fearn, P.L. Collins // *J Virol.* – 1999. – V. 73. - № 1. – p. 388–397.

57. Feldman, A.S. Toward primary prevention of asthma. Reviewing the evidence for early-life respiratory viral infections as modifiable risk factors to prevent childhood asthma / A.S. Feldman, Y. He, M.L. Moore et al // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2015. – Vol. 191. - № 1. - p. 34-44.
58. Ferko, B. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes / B. Ferko, J. Stasakova, J. Romanova et al // *J Virol.* – 2004. – V. 78. - № 23. – p. 13037–13045.
59. Ferko, B. Live attenuated influenza virus expressing human interleukin-2 reveals increased immunogenic potential in young and aged hosts / B. Ferko, C. Kittel, J. Romanova et al // *J Virol.* – 2006. – V. 80. - № 23. – p. 11621–11627.
60. Flandorfer, A. Chimeric Influenza A Viruses with a Functional Influenza B Virus Neuraminidase or Hemagglutinin / A. Flandorfer, A. Garcia-Sastre, C.F. Basler et al // *Journal of Virology* – 2003. – V. 77. - № 17. - p. 9116-9123.
61. Flórido, M. Epitope-specific CD4+, but not CD8+, T-cell responses induced by recombinant influenza A viruses protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection / M. Flórido, R. Pillay, C.M. Gillis et al // *Eur J Immunol.* – 2015. – V. 45. - № 3. – p. 780–7–93.
62. Fonseca, J.A. Inclusion of the murine IgG κ signal peptide increases the cellular immunogenicity of a simian adenoviral vectored *Plasmodium vivax* multistage vaccine / J.A. Fonseca, J.N. McCaffery, J. Caceres et al // *Vaccine* – 2018. – V. 36. – p. 2799–2808.
63. Fonseca, W. A recombinant influenza virus vaccine expressing the F protein of respiratory syncytial virus / W. Fonseca, M. Ozawa, M. Hatta et al. // *Arch Virol.* – 2014. – V. 159. - № 5. – p. 1067-77.
64. Forbes, N. Identification of adaptive mutations in the influenza A virus non-structural 1 gene that increase cytoplasmic localization and differentially regulate host gene expression / N. Forbes, M. Selman, M. Pelchat et al // *PLoS One* - 2013. - V. 8. - № 12. - p. e84673.
65. Frost, E.L. Cutting edge: resident memory CD8 T cells express high-affinity TCRs / E.L. Frost, A.E. Kersh, B.D. Evavold et al // *J. Immunol.* – 2015. – V. 195. - № 8. - p. 3520-3524.
66. Fu, T.M. An endoplasmic reticulum-targeting signal sequence enhances the immunogenicity of an immunorecessive simian virus 40 large T antigen cytotoxic T-lymphocyte epitope / T.M. Fu, L.M. Mylin, T.D. Schell et al // *J Virol.* – 1998. – V. 72. - № 2. – p. 1469-81.
67. Fuentes, S. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein / S. Fuentes, K.C. Tran, P. Luthra et al // *J Virol.* – 2007. – V. 81. – p.8361–8366.
68. Fulton, R.B. Foxp3+ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection / R.B. Fulton, D.K. Meyerholz, S.M. Varga. // *J Immunol.* – 2010. – V. 185. - № 4. – p.2382-2392.

69. Fulton, R.B. Aged mice exhibit a severely diminished CD8 T cell response following respiratory syncytial virus infection / R.B. Fulton, K.A. Weiss, L.L. Pewe et al // *J Virol.* – 2013. – V. 87. - № 23. – p. 12694-12700.
70. García, M. A. The dsRNA Protein Kinase PKR: Virus and Cell Control / M.A. García, E.F. Meurs, M. Esteban // *Biochimie* – 2007. – V. 89. - № 6-7. – p. 799–811.
71. García-Sastre, A. Influenza A Virus Lacking the NS1 Gene Replicates in Interferon-Deficient Systems / A. García-Sastre, A. Egorov, D. Matassov et al // *Virology* – 1998. – V. 252. - № 2. – p. 324–330.
72. Garulli, B. Mucosal and Systemic Immune Responses to a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Epitope Induced upon Vaginal Infection with a Recombinant Influenza A Virus / B. Garulli, Y. Kawaoka, M.R. Castrucci // *Journal of Virology* – 2003. – V. 78. - № 2. - p. 1020-1025.
73. Garulli, B. Induction of antibodies and T cell responses by a recombinant influenza virus carrying an HIV-1 Tat Δ 51-59 protein in mice / B. Garulli, G. Di Mario, M. G. Stillitano et al // *Biomed Res Int.* – 2014. – 904038.
74. Gasteiger, E. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook* / E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker et al // *Humana Press* – 2005. - p. 571-607.
75. Gerlach, T. Recombinant influenza A viruses as vaccine vectors / T. Gerlach, H. Elbahesh, G. Saletti et al. // *Expert Rev Vaccines* – 2019. – V. 18. – № 4. – p. 379-392.
76. Glezen, W.P. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus / W.P. Glezen, L.H. Taber, A.L. Frank et al // *Am J Dis Child.* – 1986. – № 140. - p. 543–546.
77. 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.
78. Graham, B.S. Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development / B.S. Graham // *Immunol. Rev.* - 1991. – V. 239. - № 1. - p. 149–166.
79. Greenspan, D. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein / D. Greenspan, P. Palese, M. Krystal // *J Virol.* - 1988. – V. 62. – p. 3020-3026.
80. Griffiths, C. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment / C. Griffiths, S.J. Drews, D.J. Marchant // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2017. – V. 30. - p. 277-319.

81. Grifoni, A. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals / A. Grifoni, D. Weiskopf, S.I. Ramirez et al // *Cell* – 2020. -V. 181. - № 7. – p. 1489-1501.
82. Groppo R. Effect of genetic background and delivery route on the preclinical properties of a live attenuated RSV vaccine / R. Groppo, J. DiNapoli, K. Il Jeong et al // *PLoS One* – 2018. – V. 13. – № 6. – p. e0199452.
83. GSK. Available online: <https://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/us-fda-approves-gsk-s-arexvy-the-world-s-first-respiratory-syncytial-virus-rsv-vaccine-for-older-adults/>. (accessed on 16.06.2023).
84. Habibi, M.S. Mechanisms of Severe Acute Influenza Consortium Investigators. Impaired Antibody-mediated Protection and Defective IgA B-Cell Memory in Experimental Infection of Adults with Respiratory Syncytial Virus / M.S. Habibi, A. Jozwik, S. Makris et al // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2015. – Vol. 191. - № 9. - p. 1040-9.
85. Hai, R. Influenza viruses expressing chimeric hemagglutinins: globular head and stalk domains derived from different subtypes / R. Hai, F. Krammer, G.S. Tan et al // *J Virol*. – 2012. – V. 86. - № 10. – p. 5774-5781.
86. Hale, B.G. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses / B.G. Hale, R.E. Randall, J. Ortín et al. // *J Gen Virol*. – 2008. – V. 89. – p. 2359-2376.
87. Hall, C.B. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding / C.B. Hall, R.G. Douglas, J.M. Jr, Geiman. // *J Pediatr*. – 1976. – V. 89. - № 1. – p. 11–15.
88. Hall, C.B. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function / C.B. Hall, K.R. Powell, N.E. MacDonald et al // *N Engl J Med*. – 1986. – № 315. p. 77– 81.
89. Hall, M.P. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate / M.P. Hall, J. Unch, B.F. Binkowski et al // *ACS Chem Biol*. – 2012. – V. 7. - № 11. – p.1848-1857.
90. Hanley, L.L. Roles of the respiratory syncytial virus trailer region: Effects of mutations on genome production and stress granule formation / L.L. Hanley, D.R. McGivern, M.N. Teng et al // *Virology* - 2010
91. Harker, J.A. Interleukin 18 coexpression during respiratory syncytial virus infection results in enhanced disease mediated by natural killer cells / J.A. Harker, A. Godlee, J.L. Wahlsten et al // *J. Virol*. – 2010. – V. 84. - № 8. - p. 4073–4082.
92. Hatada, E. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro / E. Hatada, R. Fukuda // *J Gen Virol*. - 1992. – V. 73. – Pt. 12. – p. 3325-3329.

93. He, Q. Live-attenuated influenza viruses as delivery vectors for Chlamydia vaccines / Q. He, L. Martinez-Sobrido, F.O. Eko et al // *Immunology* – 2007. – V. 122. - № 1. - p. 28-37.
94. Heaton, N.S. In vivo bioluminescent imaging of influenza a virus infection and characterization of novel cross-protective monoclonal antibodies / N.S. Heaton, V.H. Leyva-Grado, G.S. Tan et al // *J Virol.* – 2013. – V. 87. - № 15. - p. 8272-8281.
95. Hegde, R.S. The surprising complexity of signal sequences / R.S. Hegde, H.D. Bernstein // *Trends Biochem Sci.* – 2006. – V. 31. – p. 563–71.
96. Heidema, J. CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections / J. Heidema, M.V. Lukens, W.W. van Maren et al // *J Immunol.* – 2007. – V. 179. - № 12. – p. 8410–8417.
97. Henderson, F.W. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children / F.W. Henderson, A.M. Collier, W.A. Clyde et al. // *N Engl J.* – 1979. – № 300. - p. 530–534.
98. Hervé, P.L. Epicutaneous immunization using synthetic virus-like particles efficiently boosts protective immunity to respiratory syncytial virus / P.L. Hervé, V. Dhelft, A. Zuniga et al // *Vaccine* – 2021. – V. 39. – p. 4555-4563
99. 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.
100. Holmgren, J. Mucosal immunity and vaccines / J. Holmgren, C. Czerkinsky // *Nat Med.* – 2005. – V. 11. - № 4 Suppl. - S45-S53.
101. Huang, L. Hydrophobicity as a driver of MHC class I antigen processing / L. Huang, M.C. Kuhls, L.C. Eisenlohr // *EMBO J.* – 2011. – V. 30. - № 8. – p. 1634-44.
102. Humphreys, I.R. Novel viral vectors in infectious diseases / I.R. Humphreys, S. Sebastian // *Immunology* – 2018. – V. 153. - № 1. – p. 1-9.
103. Hussain, F. RSV bronchiolitis season 2021 has arrived, so be prepared! / F. Hussain, S. Kotecha, M.O. Edwards // *Arch Dis Child.* – 2021. – V. 106. - № 12. - e51.
104. Hutchinson, E.C. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture / E.C. Hutchinson, P.D. Charles, S.S. Hester et al. // *Nat. Commun.* – 2014. – V. 5. – p. 4816
105. Hyvärinen, M.K. Lung function and bronchial hyper-responsiveness 11 years after hospitalization for bronchiolitis / M.K. Hyvärinen, A. Kotaniemi-Syrjänen, T.M. Reijonen et al // *Acta Paediatr.* – 2007. –V. 96. - № 10. - p.1464-9.

106. Icosavax Inc Icosavax Provides corporate update and anticipated. Globe Newswire. <https://www.globenewswire.com/news-release/2022/01/07/2363089/0/en/Icosavax-Provides-Corporate-Update-and-Anticipated-Milestones-for-2022.html>
107. 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.
108. Ji, Z.X. NS1: A Key Protein in the "Game" Between Influenza A Virus and Host in Innate Immunity / Z.X. Ji, X.Q. Wang, X.F. Liu et al // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2021. – V. 11. - 670177.
109. Johnstone, C. Relevance of viral context and diversity of antigen processing routes for respiratory syncytial virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes / C. Johnstone, S. Guil, B. García-Barreno et al // *J Gen Virol.* – 2008. – V. 89. – p. 2194–2203.
110. Johnstone, C. Exogenous, TAP-independent lysosomal presentation of a respiratory syncytial virus CTL epitope / C. Johnstone, M. Ramos, B. García-Barreno et al // *Immunol Cell Biol.* – 2012. – V. 90. - № 10. – p. 978-982.
111. 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.
112. 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.
113. Kaler, J. Respiratory Syncytial Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathophysiology, and Manifestation / J. Kaler, A. Hussain, K. Patel et al // *Cureus.* – 2023. – V. 15. - № 3. - e36342.
114. Kampmann, B. Bivalent Prefusion F Vaccine in Pregnancy to Prevent RSV Illness in Infants / B. Kampmann, S.A. Madhi, I. Munjal et al // *N Engl J Med.* – 2023. – V. 388. - № 16. – p. 1451-1464.
115. 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.
116. Karron, RA. Live-attenuated Vaccines Prevent Respiratory Syncytial Virus-associated Illness in Young Children / R.A. Karron, J.E. Atwell, E.J. McFarland et al // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2021. – V. 203. - № 5. – p. 594-603.

117. Kawasaki, Y. Serum regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted concentrations and eosinophils in respiratory syncytial virus infection / Y. Kawasaki, M. Hosoya, H. Kanno H. et al // *Pediatr. Int.* – 2006. – V. 48. – № 3. – p. 257–260.
118. 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. *Chin J*, 1969.
119. Kim, K.H. Alum adjuvant enhances protection against respiratory syncytial virus but exacerbates pulmonary inflammation by modulating multiple innate and adaptive immune cells / K.H. Kim, Y.T. Lee, H.S. Hwang et al // *PLoS One* – 2015. - № 10. – p. e0139916.
120. 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.
121. 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.
122. 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. // *J Virol.* – 2005. – V. 79. - № 16. – p. 10672-7.
123. Knuchel, M.C.. Relevance of a pre-existing measles immunity prior immunization with a recombinant measles virus vector / M.C. Knuchel, R.R. Marty, T.N. Morin et al. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2013. – V. 9. - № 3. – p. 599-606.
124. Knudson, C.J.. RSV vaccine-enhanced disease is orchestrated by the combined actions of distinct CD4 T cell subsets / C.J. Knudson, S.M. Hartwig, D.K. Meyerholz, et al. // *PLoS Pathog.* – 2015. – V. 11. - e1004757.
125. Kobayashi, H. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine / H. Kobayashi, K. Iwatsuki-Horimoto, M. Kiso et al. // *Vaccine* – 2013. – V. 31. - № 52. – p. 6239–62–46.
126. Koch, H.G. Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life // H.G. Koch, M. Moser, M. Müller // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2003. – V. 146. – p. 55–94.
127. Kotelkin, A. The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response / A. Kotelkin, I.M. Belyakov, L. Yang et al // *J Virol.* – 2006. -V. 80. – p. 5958–5967.

128. Kotomina, T. Live attenuated influenza vaccine viral vector induces functional cytotoxic T-cell immune response against foreign CD8+ T-cell epitopes inserted into NA and NS1 genes using the 2A self-cleavage site / T. Kotomina, D. Korenkov, V. Matyushenko et al. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2018. -V. 14. - № 12. – p. 2964–2970.
129. Kotomina, T. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both pathogens without inflammatory disease / T. Kotomina, I. Isakova-Sivak, V. Matyushenko et al // *Antiviral Res.* – 2019. – V. 168. – p. 9–17.
130. Krarup, A. A highly stable pre-F RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism / A.A. Krarup, D. Truan, P. Furmanova-Hollenstein et al // *Nat Commun.* -2015. – p. 68143.
131. Krivitskaya, V.Z.. Generation and Characterization of the Monoclonal Antibody Panel Specific to the NS1 Protein of the Influenza A Virus / V. Z. Krivitskaya, E. V. Sorokin, T. R. Tsareva, et al // *Appl Biochem Microbiol.* – 2018. – V. 54. – p. 756.
132. Krug, RM. Functions of the Influenza A Virus NS1 Protein in Antiviral Defense / R. M. Krug // *Curr. Opin. Virol.* – 2015. – V. 12. – p. 1–6.
133. Kuznetsova, I. Adaptive mutation in nuclear export protein allows stable transgene expression in a chimaeric influenza A virus vector / I. Kuznetsova, A.P. Shurygina, B. Wolf et al. // *J Gen Virol.* – 2014. – V. 95. - № 2. - p. 337-49.
134. Kwilas, S. Respiratory syncytial virus grown in Vero cells contains a truncated attachment protein that alters its infectivity and dependence on glycosaminoglycans / S. Kwilas, R.M. Liesman, L. Zhang et al // *J Virol.* – 2009. – V. 83. - № 20. – p. 10710–10718.
135. 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.
136. Langley, W.A. Induction of neutralizing antibody responses to anthrax protective antigen by using influenza virus vectors: implications for disparate immune system priming pathways / W.A. Langley, K.C. Bradley, Z.N. Li et al. // *J Virol.* – 2010. – V. 84. - № 16. – p.8300-7.
137. Le Bert, N.. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls / N. Le Bert, A.T. Tan, K. Kunasegaran et al. // *Nature* – 2020. – V. 584. – p. 457–462.
138. Lee, N. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections / N. Lee, G.C. Lui, K.T. Wong et al. // *Clin Infect Dis.* – 2013. – № 57. – p. 1069–1077.

139. 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
140. Lee, Y.N. Recombinant influenza virus carrying the conserved domain of respiratory syncytial virus (RSV) G protein confers protection against RSV without inflammatory disease / Y.N. Lee, H.S. Hwang, M.C. Kim et al. // *Virology* – 2015. – V. 476. – p. 217–225.
141. 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, C. Li et al // *J Immunol.* – 2016. – V. 196. - № 4. – p. 1721–1731.
142. Li, F. Natural killer cells are involved in acute lung immune injury caused by respiratory syncytial virus infection / F. Li, H. Zhu, R. Sun et al. // *J. Virol.* – 2012. – V. 86. – № 4. – p. 2251–2258.
143. Li, S. Chimeric influenza virus induces neutralizing antibodies and cytotoxic T cells against human immunodeficiency virus type 1 / S. Li, V. Polonis, H. Isobe et al. // *J Virol.* – 1993. – V. 67. - № 11. – p. 6659-66.
144. Li, S. Influenza A Virus Transfectants with Chimeric Hemagglutinins Containing Epitopes from Different Subtypes / S. Li, J.L. Schulman, T. Moran et al. // *Journal of Virology* – 1992. – V. 66. - № 1. – p. 399-404.
145. Li, S. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8⁺ T-cell-mediated protective immunity against malaria / S. Li, M. Rodrigues, D. Rodriguez et al. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1993. – V. 90. - № 11. – p. 5214-8.
146. 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.
147. Li, Z.N. Chimeric influenza virus hemagglutinin proteins containing large domains of the *Bacillus anthracis* protective antigen: protein characterization, incorporation into infectious influenza viruses, and antigenicity / Z.N. Li, S.N. Mueller, L. Ye et al. // *J Virol.* – 2005. – V. 79. -№ 15. – p. 10003-10012.
148. 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

149. Lin, J. Impact of Signal Peptides on Furin-2A Mediated Monoclonal Antibody Secretion in CHO Cells / J. Lin, S.H. Neo, S.C.L. Ho et al. // *Biotechnol J.* – 2017. – V. 12. - № 9. - 10.
150. Liu, K. Dendritic Cells/ Liu K. // *Encyclopedia of Cell Biology* – 2016. – p. 741–9.
151. Loebbermann, J. IL-10 regulates viral lung immunopathology during acute respiratory syncytial virus infection in mice / J. Loebbermann, C. Schnoeller, H. Thornton et al. // *PLoS One* – 2012. – V. 7. - № 2. – p. e32371.
152. Lozano, R. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 / R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman et al. // *Lancet* – 2012. V. 380. – p. 2095–2128.
153. 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.
154. Luczo, JM. Molecular pathogenesis of H5 highly pathogenic avian influenza: the role of the haemagglutinin cleavage site motif / J.M. Luczo, J. Stambas, P.A. Durr et al. // *Rev Med Virol.* – 2015. – V. 25. - № 6. – p. 406-430.
155. Machado, A.V. Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter / A.V. Machado, N. Naffakh, Werf Svd, et al. // *Virology* – 2003. – V. 313. - № 1. - p. 235-249.
156. Machado, A.V. Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: induction of heterospecific B and T cell responses in mice / A.V. Machado, N. Naffakh, S. Gerbaud et al. // *Virology* – 2006. – V. 345. - № 1. - p. 73-87.
157. Machado, A.V. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity / A.V. Machado, B.C. Caetano, R.P. Barbosa et al. // *Vaccine* – 2010. – V. 28. - № 18. - p. 3247-3256.
158. Maeda, Y. Live bivalent vaccine for parainfluenza and influenza virus infections / Y. Maeda, M. Hatta, A. Takada et al. // *J Virol.* – 2005. – V. 79. - № 11. – p. 6674–6679.
159. Mangodt, T.C. The role of Th17 and Treg responses in the pathogenesis of RSV infection / T.C. Mangodt, M.A. Van Herck, S. Nullens et al. // *Pediatr Res.* – 2015. – V. 78. – p. 483–491.
160. Martina, B.E. A recombinant influenza A virus expressing domain III of West Nile virus induces protective immune responses against influenza and West Nile virus / B.E. Martina, P. van den Doel, P. Koraka et al. // *PLoS One* – 2011. – V. 6. - № 4. – p. e18995.

161. Matyushenko, V. Conserved T-cell epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) delivered by recombinant live attenuated influenza vaccine viruses efficiently induce RSV-specific lung-localised memory T cells and augment influenza-specific resident memory T-cell responses / V. Matyushenko, T. Kotomina, I. Kudryavtsev et al. // *Antiviral Res.* – 2020. – V. 182. – p.104864.
162. Mazur, N.I. Respiratory syncytial virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape / N.I. Mazur, J. Terstappen, R. Baral et al. // *Lancet Infect Dis.* – 2023. – V. 23. - № 1. – p. e2-e21.
163. McGill, A. Detection of human respiratory syncytial virus genotype specific antibody responses in infants / A. McGill, J. Greensill, R. Marsh et al. // *J. Med. Virol.* – 2004. – V. 74. – № 3. – p. 492–498.
164. McLellan, J.S. Structure of a major antigenic site on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in complex with neutralizing antibody 101F / J.S. McLellan, M. Chen, J.S. Chang et al. // *J Virol.* – 2010. – V. 84. - № 23. - p. 12236-44.
165. Meissa announces 1st dosing in phase 2 study of intranasal live attenuated vaccine candidate for RSV. <https://www.meissavaccines.com/post/meissa-announces-1st-dosing-in-phase-2-study-of-intranasal-live-attenuated-vaccine-candidate-for-rsv>. Date accessed: April 12, 2022
166. Mergulhao, F. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli* / F. Mergulhao, D.K. Summers, G.A. Monteiro // *Biotechnol Adv.* – 2005. – V. 23. № 3. – p. 177-202.
167. Miyahira, Y. Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8+ responses in mice / Y. Miyahira, A. García-Sastre, D. Rodriguez et al. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1998. – V. 95. - № 7. – p. 3954-9.
168. Modjarrad, K. WHO RSV Vaccine Consultation Expert Group. WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development Report from a World Health Organization Meeting held on 23-24 March 2015 / K. Modjarrad, B. Giersing, D.C. Kaslow et al. // *Vaccine* – 2016. – V. 34. - № 2. – p. 190-197.
169. Moghaddam, A. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines / A. Moghaddam, W. Olszewska, B. Wang et al. // *Nat Med.* – 2006. – V. 12. - № 8. – p. 905–907.
170. Morabito, K.M. Intranasal administration of RSV antigen-expressing MCMV elicits robust tissue-resident effector and effector memory CD8+ 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.

171. Morokutti, A. Intranasal vaccination with a replication-deficient influenza virus induces heterosubtypic neutralising mucosal IgA antibodies in humans / A. Morokutti, T. Muster, B. Ferko // *Vaccine* – 2014. – V. 32. - № 17. – p. 1897-1900.
172. 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.
173. Munir, S. Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response / S. Munir, P. Hillyer, C. Le Nouën et al. // *PLoS Pathog.* – 2011. – V. 7. – p. e1001336.
174. 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.
175. Muster, T. Mucosal model of immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a chimeric influenza virus / T. Muster, B. Ferko, A. Klima et al. // *J Virol.* – 1995. – V. 69. - № 11. – p. 6678-6686.
176. Nagai, K. Structure, function and evolution of the signal recognition particle / K. Nagai, C. Oubridge, A. Kuglstatter et al. // *EMBO J.* – 2003. – V. 22(14). – p. 3479–3485.
177. 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.
178. Nemeroff, M. E. Influenza Virus NS1 Protein Interacts With the Cellular 30 kDa Subunit of CPSF and Inhibits 3'end Formation of Cellular Pre-mRNAs / M. E. Nemeroff, S.M. Barabino, Y. Li et al. // *Mol. Cell* – 1998. – V. 1. - № 7. – p. 991–1000.
179. Noah, D.L. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs / D.L. Noah, K.Y. Twu, R.M. Krug // *Virology* - 2003. – V. 307. – p. 386-395.
180. Noor, A. Respiratory syncytial virus vaccine: where are we now and what comes next? / A. Noor, L.R. Krilov // *Expert Opin Biol Ther.* – 2018. – V. 18. - № 12. – p. 1247-1256.
181. Oliveira, C.C. Alternative Antigen Processing for MHC Class I: Multiple Roads Lead to Rome / C.C. Oliveira, T. van Hall. // *Front Immunol.* – 2015. – V. 6. – p. 298.
182. Olmsted, R.A. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G

- glycoproteins to host immunity / R.A. Olmsted, N. Elango, G.A. Prince et al. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1986. - V. 83. – p. 7462–7466.
183. Ostler, T. Virus clearance and immunopathology by CD8(+) T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma / T. Ostler, W. Davidson, S. Ehl // *Eur J Immunol.* – 2002. – V. 32. - № 2. – p. 2117–2123.
184. Owji, H. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications / H. Owji, N. Nezafat, M. Negahdaripour et al. // *European Journal of Cell Biology* – 2018. – V. 97. - № 6. – p. 422–441.
185. Ozawa, M. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene / M. Ozawa, S.T. Victor, A.S. Taft et al. // *J Gen Virol.* – 2011. – V. 92(Pt 12). – p. 2879–2888.
186. Palese, P. Shaw M.L. Orthomyxoviridae. The viruses and their replication // In: *Fields Virology 5th Edition*. Knippe D.M., Howley P.H. (Eds). Lippincott Williams and Wilkins, PA, USA. - p. 1647-1689. - 2007.
187. Park, MS. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian influenza and Newcastle disease / M.S. Park, J. Steel, A. Garcia-Sastre et al. // *PNAS* – 2006. – V. 03. - № 21. – p. 8203-8
188. PATH. RSV Vaccine and mAb Snapshot PATH. 2023. <https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>
189. Pemberton, RM. Cytotoxic T cell specificity for respiratory syncytial virus proteins: fusion protein is an important target antigen / R.M. Pemberton, M.J. Cannon, P.J. Openshaw et al. // *J Gen Virol.* – 1987. – V. 68. – p. 2177–2182.
190. Pica, N. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses / N. Pica, R. Hai, F. Krammer et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences* - 2012. - V. 109. - № 7. - p. 2573–2578.
191. Price, G.E.. The Role of Alpha/Beta and Gamma Interferons in Development of Immunity to Influenza A Virus in Mice / G.E. Price, A. Gaszewska-Mastarlarz, D. Moskophidis // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. - № 9. – p. 3996–4003.
192. Prince, G.A.. Vaccine-enhanced respiratory syncytial virus disease in cotton rats following immunization with Lot 100 or a newly prepared reference vaccine / G.A. Prince, S.J. Curtis, K.C. Yim et al. // *J Gen Virol.* – 2001. – № 82. – p. 2881–2888.
193. Pyle, C.J. IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology. / C.J. Pyle, F.I. Uwadiae, D.P. Swieboda et al. // *Early PLoS Pathog.* – 2017. – V. 13. - № 9. – p. e1006640.

194. Qiu, Y.. The Influenza Virus NS1 Protein Is a Poly(a)-Binding Protein That Inhibits Nuclear Export of mRNAs Containing Poly(a) / Y. Qiu, R.M. Krug, // *J. Virol.* - 1994. – V. 68. - № 4. – p. 2425–2432.
195. Quinan, B.R. An intact signal peptide on dengue virus E protein enhances immunogenicity for CD8(+) T cells and antibody when expressed from modified vaccinia Ankara / B.R. Quinan, I.E. Flesch, T.M. Pinho et al. // *Vaccine* – 2014. – V. 32. - № 25. – p. 2972-2979.
196. Reed, L.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L.J. Reed, H. Muench // *Am J Epidemiol.* – 1938. – V. 27. - № 3. - p. :493–497.
197. Robertson, A.H. Detection of anti-NS1 antibodies after pandemic influenza exposure: Evaluation of a serological method for distinguishing H1N1pdm09 infected from vaccinated cases / A.H. Robertson, M. Mahic, M. Savic et al. // *Influenza Other Respir Viruses* – 2020. – V. 14. - № 3. – p. 294-301.
198. Rodrigues, M. Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity / M. Rodrigues, S. Li, K. Murata et al. // *J Immunol.* – 1994. – V. 153. - № 10. – p. 4636-4648.
199. Romanova, J. Live cold-adapted influenza A vaccine produced in Vero cell line / J. Romanova, D. Katinger, B. Ferko, et al. // *Virus Res.* - 2004. –V. 103. – p. 187-193.
200. Rosenberg, H.F.. Respiratory viruses and eosinophils: exploring the connections / H.F. Rosenberg, K.D. Dyer, J.B. Domachowske // *Antiviral Res.* – 2009. - V. 83. - № 1. - p. 1–9.
201. Rosendahl Huber, S.. T cell responses to viral infections - opportunities for Peptide vaccination / S. Rosendahl Huber, J. van Beek, J. de Jonge et al. // *Front Immunol.* – 2014. – V. 5. – p. 171.
202. Rostad, C.A. A recombinant respiratory syncytial virus vaccine candidate attenuated by a low-fusion F protein is immunogenic and protective against challenge in cotton rats / C.A. Rostad, C.C. Stobart, B.E. Gilbert et al. // *J Virol.* – 2016. – V. 90. – p. 7508–7518.
203. 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.
204. Ruckwardt, T.J. Immunological lessons from respiratory syncytial virus vaccine development / T.J. Ruckwardt, K.M. Morabito, B.S. Graham // *Immunity* – 2019. – V. 51. – № 3. – p. 429–442.
205. 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.
206. Russell, C.D. Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection / Russell CD, Unger SA, Walton M, et al // *Clin Microbiol Rev.* – 2017. – V. 30(2). – p. 481-502.
207. Ryskeldinova, S. Registered Influenza Viral Vector Based Brucella abortus Vaccine for Cattle in Kazakhstan: Age-Wise Safety and Efficacy Studies / S. Ryskeldinova, N. Zinina, Z. Kydyrbayev et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2021. – V. 11. – p. 669196.
208. Saletti, G. Influenza vaccines: 'tailor-made' or 'one fits all' / G. Saletti, T. Gerlach, G.F. Rimmelzwaan. // *Curr Opin Immunol.* - 2018. – V. 53. - p. 102-110.
209. 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.
210. 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.
211. Scheltema, N. Global respiratory syncytial virus-associated mortality in young children (RSV GOLD): a retrospective case series / N.M. Scheltema, A. Gentile, F. Lucion et al. // *Lancet Glob Health* – 2017. – V. 5. – № 10. e984-e991.
212. Schenkel, J.M. T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses / J.M. Schenkel, K.A. Fraser, L.K. Beura et al. // *Science* -2014. – V. 346. - № 6205. – p. 98-101.
213. Schirmbeck, R. The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens / R. Schirmbeck, J. Reimann, S. Kochanek et al. // *Mol. Ther.* – 2008. – V. 16. – p. 1609–1616.
214. 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.
215. Schmidt, M.E. Cytokines and CD8 T cell immunity during respiratory syncytial virus infection / M.E. Schmidt, S.M. Varga // *Cytokine* – 2020. – V. 133. – p. 154481.
216. Schmoele-Thoma, B. Vaccine Efficacy in Adults in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study / B. Schmoele-Thoma, A.M. Zareba, Q. Jiang et al. // *N Engl J Med.* – 2022. – V. 386. - № 25. – p. 2377-2386.
217. Schöne, D. Immunodominance of Adenovirus-Derived CD8+ T Cell Epitopes Interferes with the Induction of Transgene-Specific Immunity in Adenovirus-Based Immunization / D.

- Schöne, C.P. Hrycak, S. Windmann et al. // *J Virol.* – 2017. – V. 91. - № 20. – p. e01184-17.
218. Schrauwen, E.J. The multibasic cleavage site in H5N1 virus is critical for systemic spread along the olfactory and hematogenous routes in ferrets / E.J. Schrauwen, S. Herfst, L.M. Leijten et al. // *J Virol.* - 2012. – V. 86. - № 7. - p. 3975-3984.
219. Selman, M. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing / M. Selman, S.K. Dankar, N.E. Forbes et al. // *Emerg Microbes Infect.* – 2012. – V. 1. - № 11. – p. e42.
220. Sereinig, S. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge / S. Sereinig, M. Stukova, N. Zabolotnyh et al. // *Clin Vaccine Immunol.* – 2006. – V. 13. - № 8. - p. 898-904.
221. Shaw, M.W. Surface expression of a nonstructural antigen on influenza A virus-infected cells / M.W. Shaw, E.W. Lamon, R.W. Compans. // *Infect Immun.* – 1981. – V. 34. - № 3. – p. 1065-7.
222. Sheerin, D. Inclusion of a dual signal sequence enhances the immunogenicity of a novel viral vectored vaccine against the capsular group B meningococcus / D. Sheerin, C. Dold, L. Silva-Reyes et al. // *Cell Biosci.* – 2022. – V. 12. - № 1. – p. 86.
223. 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* – 2017. – V. 390. – № 10098. – p. 946-958.
224. Shi, T. Global Disease Burden Estimates of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Respiratory Infection in Older Adults in 2015: A Systematic Review and Meta-Analysis / T. Shi, A. Denouel, A.K. Tietjen et al. // *J Infect Dis.* – 2020. – V. 222. – p. 577-583.
225. Shinya, K. Characterization of a Neuraminidase-Deficient Influenza A Virus as a Potential Gene Delivery Vector and a Live Vaccine / K. Shinya, Y. Fujii, H. Ito et al. // *Characterization Journal of Virology* – 2004. – V. 78. - № 6. - p. 3083-3088.
226. Simoes, E.A. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries / E.A. Simoes, X. Carbonell-Estrany // *Pediatr. Infect. Dis.* – 2003. – V.22. - p.13-20.
227. Smit, J. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus / J. Smit, B.D. Rudd, N.W. Lukacs // *J. Exp. Med.* - 2006. – V. 203. – p. 1153–1159.

228. Smith, C.L. Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara / C.L. Smith, F. Mirza, V. Pasquetto, et al. // *J. Immunol.* – 2005. – p. 1758431-8437.
229. Sridhar, S. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza / S. Sridhar, S. Begom, A. Bermingham et al. // *Nat Med.* – 2013. – V. 19. - № 10. – p. 1305-1312.
230. Srikiatkachorn, A. Virus-specific memory and effector T lymphocytes exhibit different cytokine responses to antigens during experimental murine respiratory syncytial virus infection / A. Srikiatkachorn, T.J. Braciale // *J Virol.* – 1997. – V. 71. - № 1. – p. 678-685.
231. Stasakova, J. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels 139 of interleukins 1 β and 18 / J. Stasakova, B. Ferko, C. Kittel et al. // *J. Gen. Virol. Microbiology Society* - 2005. - V. 86. - № 1. – p. 185–195.
232. Stevenson, H.P. A gamma-herpesvirus sneaks through a CD8 T cell response primed to a lytic-phase epitope / H.P. Stevenson, G.T. Belz, M.R, Castrucci et al // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1999. – V. 96. - p. 9281–9286.
233. 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.
234. 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.
235. Stukova, M.A. Vaccine potential of influenza vectors expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein / M.A. Stukova, S. Sereinig, N.V. Zabolotnyh et al. // *Tuberculosis* – 2006. – V. 86. - № 34. – p. 236–246.
236. Sun, J. Autocrine regulation of pulmonary inflammation by effector T-cell derived IL-10 during infection with respiratory syncytial virus / J. Sun, A. Cardani, A.K. Sharma et al. // *PLoS Pathog.* – 2011. – V. 7. - № 8. – p. e1002173.
237. Sun, Y. The innate immune response to RSV: Advances in our understanding of critical viral and host factors / Y. Sun, C.B. López // *Vaccine* – 2017. – V. 35. - № 3. – p. 481-488.
238. Swanson, K.A. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers / K.A. Swanson, E.C. Settembre, C.A. Shaw et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011. – V. 108. - № 23. – p. 9619-24.

239. Tabynov, K. Novel influenza virus vectors expressing Brucella L7/L12 or Omp16 proteins in cattle induced a strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection / K. Tabynov, Z. Kydyrbayev, S. Ryskeldinova et al. // *Vaccine*. – 2014. – V. 32. - № 18. - p. 2034-41.
240. Tan, H.X. Recombinant influenza virus expressing HIV-1 p24 capsid protein induces mucosal HIV-specific CD8 T-cell responses / H.X. Tan, B.P. Gilbertson, S. Jegaskanda et al. // *Vaccine* - 2016. -V. 34. - № 9. - p. 1172-1179.
241. Taylor, G. Respiratory syncytial virus infection in mice / G. Taylor, E.J. Stott, M. Hughes et al. // *Infect. Immun.* – 1984. – V. 43. – p. 649–655.
242. Teng, M.N. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo / M.N. Teng, P.L. Collins // *J Virol.* – 2002. – V. 76. – p. 6164–6171
243. Torrey, H.L. Evaluation of the protective potential of antibody and T cell responses elicited by a novel preventative vaccine towards respiratory syncytial virus small hydrophobic protein / H.L. Torrey, V. Kaliaperumal, Y. Bramhecha et al. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2020. – V. 16. – p. 2007-2017.
244. Tran, V. Highly sensitive real-time in vivo imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread / V. Tran, L.A. Moser, D.S. Poole et al. // *J Virol.* - 2013. – V. 87. - № 24. – p. 13321-13329.
245. 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.
246. Ura, T. Current Vaccine Platforms in Enhancing T-Cell Response / T. Ura, M. Takeuchi, †. Kawagoe et al. // *Vaccines (Basel)*. – 2022. – V. 10. - № 8. – p. 1367.
247. Van Royen, T. How RSV Proteins Join Forces to Overcome the Host Innate Immune Response / T. Van Royen, I. Rossey, K. Sedeyn et al. // *Viruses* – 2022. – V. 14. - № 2. – p. 419.
248. van Summeren, J. Low levels of respiratory syncytial virus activity in Europe during the 2020/21 season: what can we expect in the coming summer and autumn/winter / J. van Summeren, A. Meijer, G. Aspelund et al. // *Euro Surveill.* – 2021. – V. 26. - № 29. – p. 2100639.
249. Varga, S.M. The adaptive immune response to respiratory syncytial virus / S.M. Varga, T.J. Braciale // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2013. – V. 372. – p. 155-171.
250. Vatakis, D. The signal peptide sequence impacts the immune response elicited by a DNA epitope vaccine / D. Vatakis, M. McMillan // *Clin Vaccine Immunol.* – 2011. – V. 18. - № 10. – p. 1776-80.

251. Verdijk, P. First-in-human administration of a live-attenuated RSV vaccine lacking the G-protein assessing safety, tolerability, shedding and immunogenicity: a randomized controlled trial / P. Verdijk, J.L. van der Plas, E.M.J. van Brummelen et al. // *Vaccine* – 2020. – V. 38. – p. 6088-6095
252. Volmer, R. Nucleolar localization of influenza A NS1: striking differences between mammalian and avian cells / R. Volmer, B. Mazel-Sanchez, C. Volmer et al. // *Virol. J. BioMed Central* - 2010. - V. 7. - № 1. - p. 63.
253. Volz, A. Protective efficacy of Modified Vaccinia virus Ankara in preclinical studies / A. Volz, G. Sutter // *Vaccine* – 2013. – V. 31. - № 39. – p. 4235-4240.
254. Wagner, R. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections / R. Wagner, M. Matrosovich, H.D. Klenk. // *Rev Med Virol.* – 2002. – V. 12. - № 3. - p. 159-166.
255. Walsh, E. Humoral and Mucosal Immunity in Protection from Natural Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults / E. Walsh, A.R. Falsey // *The Journal of Infectious Diseases.* – 2004. – V. 190. – p. 373–378.
256. Walsh, E.E. Efficacy and Safety of a Bivalent RSV Prefusion F Vaccine in Older Adults / E.E. Walsh, G. Pérez Marc, A.M. Zareba et al. // *N Engl J Med.* – 2023. – V. 388. - № 16. – p. 1465-1477.
257. Wang, Y. Vaccinia virus CD8+ T-cell dominance hierarchies cannot be altered by prior immunization with individual peptides / Y. Wang, I.E. Flesch, D.C. Tschärke // *J Virol.* – 2009. – V. 83. - № 17. – p. 9008-9012.
258. Wang, W. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids / W. Wang, K. Riedel, P. Lynch // *RNA.* – 1999. – V. 5. – p. 195-205.
259. Webster, R.G. Determination of the Number of Nonoverlapping Antigenic Areas on Hong Kong (H3N2) Influenza Virus Hemagglutinin with Monoclonal Antibodies and the Selection of Variants with Potential Epidemiological Significance / R.G. Webster, W.G. Laver // *Virology* – 1980. – V. 104. – p. 139-148.
260. Weiss, K.A. Multiple CD4+ T cell subsets produce immunomodulatory IL-10 during respiratory syncytial virus infection / K.A. Weiss, A.F. Christiaansen, R.B. Fulton et al. // *J Immunol.* – 2011. – V. 187. - № 6. – p. 3145-3154.
261. 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.

262. 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.
263. Wiegand, M.A. A respiratory syncytial virus vaccine vectored by a stable chimeric and replication-deficient sendai virus protects mice without inducing enhanced disease / M.A. Wiegand, G. Gori-Savellini, C. Gandolfo et al. // *J Virol.* – 2017. – V. 91. – p. e02298-e02316.
264. Wiley, D.C. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation / D.C. Wiley, I.A. Wilson, J.J. Skehel. // *Nature* – 1981. – V. 289. - p. 373-378.
265. Wilkinson, T.M. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans / T.M. Wilkinson, C.K. Li, C.S. Chui et al. // *Nat Med.* – 2012. – V. 18. - № 2. – p. 274-280.
266. Wolschek, M. Establishment of a chimeric, replication-deficient influenza A virus vector by modulation of splicing efficiency / M. Wolschek, E. Samm, H. Seper et al. // *J Virol.* – 2011. – V. 85. - № 5. – p. 2469-73.
267. 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.
268. Wu, R. A live bivalent influenza vaccine based on a H9N2 virus strain / R. Wu, Y. Guan, Z. Yang et al. // *Vaccine* – 2010. – V. 28. - № 3. - p. 673-680.
269. Xia, N. The efficacy and safety of an intranasal spray COVID-19 vaccine in a randomized double-blind placebo-controlled phase III trial during Omicron period / N. Xia, F. Zhu, S. Huang et al. // *Research Square* - 2023
270. Yang, P. Recombinant influenza virus carrying human adenovirus epitopes elicits protective immunity in mice / P. Yang, T. Li, N. Liu et al. // *Antiviral Res.* – 2015. – V. 121. - p. 145-151.
271. Zang, Y. Eliciting neutralizing antibodies against the membrane proximal external region of HIV-1 Env by chimeric live attenuated influenza A virus vaccines / Y. Zang, D. Du, N. Li et al. // *Vaccine* – 2015. – V. 33. - № 32. – p. 3859-3864.
272. Zhang, L. Intranasal influenza-vectored COVID-19 vaccine restrains the SARS-CoV-2 inflammatory response in hamsters / L. Zhang, Y. Jiang, J. He et al. // *Nat Commun.* – 2023. – V. 14. - № 1. – p. 4117.

273. Zhang, P. Characterization of recombinant influenza A virus as a vector expressing respiratory syncytial virus fusion protein epitopes / P. Zhang, H. Gu, C. Bian et al. // *J Gen Virol.* - 2014. – V. 95. - № 9. – p. 1886-91.
274. Zhang, S. Immunogenicity of an influenza virus-vectored vaccine carrying the hepatitis C virus protein epitopes in mice / S. Zhang, F. Sun, T. Ren et al. // *Antiviral Res.* – 2017. – V. 145. – p. 168-174.
275. Zhirnov, O.P. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis / O.P. Zhirnov, T.E. Konakova, T. Wolff et al. // *J Virol.* – 2002. – V. 76. - № 4. – p. 1617-25.
276. Zhou, B. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. / B. Zhou, M.E. Donnelly, D.T. Scholes et al. // *J Virol.* – 2009. – V. 83. - №. 19. – p. 0309-13.
277. 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.