

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций**

На правах рукописи

Пулькина Анастасия Александровна

**Принципы конструирования гриппозных NS векторов для презентации
протективных антигенов РС-вируса**

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Научный руководитель:
доцент, доктор биологических наук,
Васин Андрей Владимирович

Санкт Петербург – 2021

Научно-квалификационная работа выполнена в Высшей инженерно-физической школе Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», а также на базе лаборатории векторных вакцин, отдела вакцинологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Директор ВШ/Зав.каф.:	Журихина Валентина Владимировна, доктор физико-математических наук, профессор Высшей инженерно-физической школы
Научный руководитель:	Васин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, доцент, профессор Высшей школы биомедицинских систем и технологий
Рецензент:	Шурыгина Анна-Полина Сергеевна, Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева».

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является одной из основных причин возникновения тяжелых инфекций нижних дыхательных путей у младенцев и детей младшего возраста [1], а также является серьезной угрозой здоровью пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом [2, 3]. По оценкам, до начала пандемии Ковид-19, ежегодно около 3,2 миллионов госпитализаций детей были связаны с РСВ-инфекцией (РСВИ) и около 60 000 случаев РСВИ во всем мире приводили к смертельным исходам [4]. В настоящее время в ряде стран наблюдается подъем и утяжеление РСВ инфекции у детей, что связывают со снижением специфического иммунитета в результате долгого отсутствия вируса в циркуляции на фоне коронавирусной пандемии [5].

Несмотря на высокую актуальность разработки профилактических средств борьбы с РСВИ, лицензированной вакцины до сих пор не существует. Первые клинические испытания вакцины против РСВИ были проведены еще в 1960-х годах. Разработанный вакцинный препарат состоял из концентрированного инактивированного формалином вируса (ИФ-РСВ), смешанного с гидроокисью алюминия в качестве адьюванта. Внутримышечная иммунизация такой вакциной не только не формировала достаточной защиты от инфекции, но и усиливала респираторное заболевание при встрече с естественной РСВИ. По результатам третьей фазы клинических испытаний, 80% заболевших среди вакцинированных ИФ-РСВ нуждались в госпитализации, по сравнению с 5% в контрольной группе, а два привитых ребенка умерли от легочной недостаточности [6]. Феномен усиления респираторного заболевания в ответ на естественную инфекцию после вакцинации ИФ-РСВ затормозил процесс разработки РСВ вакцин.

Одной из причин недостаточной протективности ИФ-РСВ было формирование назкоафинных ненайтрализирующих антител. В связи с этим, при разработке вакцин уделяют внимание формированию антител [7], нейтрализующих вирус и способности вакцины индуцировать специфический иммунный ответ во входных воротах инфекции на уровне слизистой оболочки респираторного тракта [8].

В качестве антигенной мишени при разработке вакцин и противовирусных препаратов часто используют F-белок РСВ. Белок F является высоко консервативным мембранным гликопротеином, обеспечивает проникновение вируса в клетку-хозяина и содержит нейтрализующие эпитопы. Единственным лицензированным средством, который применяют для профилактики РСВИ у младенцев, находящихся в группе риска, являются моноклональные антитела Паливизумаб, взаимодействующие с антигеном белка F [9]. Антитела распознают эпитопы в антигенном сайте II белка F, подавляют репликацию РСВ *in*

in vivo и защищают от РСВИ [9]. Антигенный сайт II является хорошо охарактеризованной мишенью для разработки вакцин, но является конформационно зависимым [10], тогда как антигенный сайт IV, связывающийся с антителами MAb19 и 101F, не подвержен конформационным изменениям [10]. Этот эпитоп является линейным и сохраняет свою структуру в процессе слияния клеточной и вирусной оболочек [11]. Несмотря на то, что белок F является хорошо охарактеризованным объектом и содержит нейтрализующие эпитопы, было показано, что вакцинация очищенным F белком с добавлением адъюванта алюминия, приводит к усилению патологии на фоне инфекции [12] и не является альтернативой ИФ-РСВ.

При разработке вакцинных кандидатов большое внимание уделяется риску возникновения иммунопатологий, связанных с вакцинацией. Также одним из факторов развития легочной патологии, аналогичной той, что формируется при вакцинации ИФ-РСВ, может быть непропорционально высокая стимуляция Th2 CD4+ Т-клеток. Использование вирусных векторов для доставки антигена с большей вероятностью способствует индукции CD8 + Т-клеточного иммунного ответа и стимуляции Th1 CD4+ Т-клеток. К преимуществам использования вируса гриппа в качестве вектора относят: 1) доказанную безопасность живых гриппозных вакцин; 2) отсутствие ДНК стадии в репликативном цикле вируса, исключая хромосомную интеграцию вирусного генома; 3) формирование выраженного клеточного и гуморального иммунного ответа на системном и местном уровнях; 4) возможность интраназального применения и формирование защиты во входных воротах инфекции.

Высоко толерантным к вставкам трансгенов в гриппозных векторах является неструктурный белок NS1 [13, 14, 15]. Модификации белка NS1 не приводят к нарушению структуры вириона и не влияют на экспрессию белка NP. Показано, что удаление или укорочение гена NS способствует формированию аттенуированного фенотипа вируса, так как белок NS1 является антагонистом системы интерферонов I типа [16]. Так же показано, что гриппозные векторы обладают так называемым самоадъювантным эффектом за счет индукции цитокинов и стимуляции системы врожденного иммунитета [17, 18].

В представленной работе были сконструированы гриппозные NS-векторы, экспрессирующие кассету из участков белка F РСВ, содержащих Т- и В- клеточные эпитопы. Векторы различались взаиморасположением укороченного белка NS1, трансгена РСВ и сигнального пептида IgK. Получены данные о безопасности и протективной эффективности векторов на модели РСВ инфекции у мышей линии BALB/c. Определена структура оптимального вакцинного вектора.

Степень разработанности темы исследования

В 1960-х годах были проведены клинические испытания инактивированной формалином вакцины против РСВИ (ИФ-РСВ). Вакцинация серонегативных к РСВ детей до 2 лет вызывала усиление респираторного заболевания во время последующей естественной РСВИ. К иммунологическим причинам таких пагубных последствий относят формирование ненейтрализующих антител, Th2 поляризацию иммунного ответа и недостаток регуляторных Т-клеток в зоне инфекции [19]. В связи с этим, при разработке вакцинных препаратов против РСВИ учитывают имеющийся отрицательный опыт применения ИФ-РСВ, а сама вакцина используется в качестве негативного контроля при проведении доклинических исследований.

При разработке новой вакцины против РСВИ применяют несколько платформ: живые аттенуированные, субъединичные или белковые, генные и векторные вакцины. На стадии клинических испытаний сейчас находится 18 вакцин, разработанных с использованием различных подходов [20].

Живые вакцины. Теоретическим преимуществом иммунизации живой аттенуированной вакциной является имитация естественной инфекции, которая позволяет избежать избыточную поляризацию иммунного ответа в сторону Th2, но способствовать выработке местного иммунитета в виде секреторных антител sIgA и резидентных клеток памяти T_{rm}. Эти преимущества позволяют использовать такую платформу для разработки вакцин, предназначенных для иммунизации серонегативных детей. Основной проблемой при разработке живой аттенуированной вакцины является достижение баланса между вирулентностью вакцинного штамма и иммуногенностью [19]. В настоящее время на I и II фазе клинических испытаний находятся шесть вакцин подобного типа. В качестве примера можно привести вакцины National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03916185, апрель 2019), предназначенную для серонегативных детей в возрасте от 6 до 24 месяцев и вакцину Sanofi Pasteur (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04491877, июль 2020) для детей от 6 до 18 месяцев.

Субъединичные вакцины, в отличие от живых аттенуированных, формируют слабый Т-клеточный ответ, но являются более безопасными, так как не могут мутировать в «дикий» вариант штамма. Как правило, целевой группой при разработке белковых вакцин являются взрослые люди, в том числе беременные женщины. Идея безопасной субъединичной вакцины для заключается в создании максимального нейтрализующего антительного ответа, в том числе для переноса антител через плацентарный барьер. Такие антитела могут защитить новорожденных при иммунизации матерей во время беременности, а также предотвратить тяжелые осложнения РСВИ у пожилых. Приведенные в качестве примера

субъединичные вакцины GlaxoSmithKline, проходят III фазу клинических испытаний (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04886596, май 2021 и ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04605159, октябрь 2020)

РНК вакцины. Так же в качестве платформы для разработки вакцин применяют нуклеиновые кислоты или векторы, обладающие ограниченной репликативной активностью. На стадии клинических испытаний находится только одна РНК вакцина – mRNA-1345 ModernaTX, Inc. (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04528719, август 2020), предназначенная для вакцинации серопозитивных детей и пожилых.

Векторные вакцины. Три препарата, находятся на этапе клинических испытаний. К примеру, фазу IIa проходит вакцина MVA-BN-RSV Bavarian Nordic (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04752644, февраль 2021), в которой в качестве вектора использован модифицированный вирус коровьей оспы. Вакцина предназначена для пожилых. На фазу III клинических испытаний перешла векторная вакцина Janssen Vaccines & Prevention B.V. на основе аденовирусного вектора (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04908683, июнь 2021), предназначенная для пожилых старше 60 лет. Иммунизация такими вакцинами должна способствовать формированию не только антительного, но и системного Т-клеточного ответа.

Перспективным направлением при разработке вакцины против РСВИ считается применение вируса гриппа А [8, 21, 22, 23, 24, 25, 26]. Интраназальная иммунизация гриппозным вектором приводит к формированию мукозального и системного Т- и В-клеточного иммунного ответа [25]. Формирование Th1 иммунного ответа и Т-регуляторных клеток (Treg) памяти должно снизить вероятность развития эффекта усиления заболевания у вакцинированных при последующей РСВИ [19]. Так же показано, что интраназальное введение способствует формированию Т-резидентных клеток памяти (T_{rm}) в дыхательных путях, которые способны защитить от РСВИ при отсутствии антител [27].

Большинство вакцин, находящихся на стадии клинических испытаний, предназначены для индукции системного иммунного ответа посредством внутримышечной иммунизации. Однако такие вакцины практически не вызывают локальный иммунитет в слизистой оболочке респираторного тракта. Таким образом, игнорируются данные о важности T_{rm} ответа в контроле над респираторными вирусами, каким является РСВ [27, 28]. Таким образом, следует предположить, что разрабатываемые живые РСВ вакцины или векторные вакцины для интраназального применения будут лучше справляться с задачей профилактики респираторных инфекций.

Цели и задачи

Цель исследования состояла в конструировании и изучении протективных свойств гриппозных NS векторов, экспрессирующих антигены респираторно-синцитиального вируса в различных модификациях.

Для реализации данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Сконструировать набор гриппозных NS векторов, кодирующих вставку антигенов РСВ и различающихся комбинацией расположения последовательностей трансгена, сигнального пептида и неструктурного белка.
2. Изучить репродуктивную активность и особенности экспрессии трансгена РСВ при заражении культуры клеток различными вариантами гриппозного вектора.
3. Оценить безопасность полученных рекомбинантных штаммов при интраназальном введении мышам линии BALB/c.
4. Оценить протективную активность векторов в отношении инфекции респираторно-синцитиального вируса на модели мышей линии BALB/c.
5. Выявить иммунологические параметры антительного и Т-клеточного ответа, коррелирующие с профилактической эффективностью векторных конструкций у мышей линии BALB/c.
6. Сконструировать репортерный вектор, обладающий люциферазной активностью и изучить механизм транспорта NS1 белка на поверхность клеток с целью оценки возможности индукции антительного ответа к NS1 ассоциированным трансгенам.

Научная новизна

В представленной работе впервые была изучена толерантность геномного сегмента NS вируса гриппа к модификациям, связанным с расположением вставки трансгена перед последовательностью укороченного белка NS1 или после него, а также вставка сигнала секреции белка. Изучено влияние дизайна конструкции гена NS, экспрессирующего участки белка F РСВ, на протективную активность векторов в отношении инфекции респираторно-синцитиального вируса.

Теоретическая и практическая значимость

Благодаря выполненной работе были апробированы различные принципы конструирования гриппозных NS-векторов и проведен их скрининг на способность вызывать защиту от легочной патологии у мышей после РСВ-инфекции. Показано, что протективная активность векторов может не коррелировать с их способностью предотвращать репродукцию РСВ в легких. Проведенные доклинические исследования пяти сконструированных гриппозных векторов на модели РСВИ позволили выбрать один из сконструированных векторов в качестве кандидата в вакцинные штаммы.

Методология и методы исследования

Для выполнения работы были использованы молекулярно-биологические (культивирование клеточных культур, бактериальная трансформация, трансфекция клеток Vero, электрофорез в полиакриламидном геле, иммунофлуоресцентное окрашивание), молекулярно-генетические (дизайн плазмид, поиск эпитопов, полимеразная цепная реакция,

электрофорез в агарозном геле) и вирусологические (определение инфекционной активности вирусов, работа с лабораторными животными, иммуноферментный анализ, реакция гемагглютинации) методы.

Представление научного доклада: основные положения

1. Сконструировано пять рекомбинантных вирусов гриппа А, экспрессирующих в ОРС белка NS1 участки белка F РСВ, содержащие Т- и В-клеточные эпитопы. Показано, что локализация трансгена в модифицированном гене NS и включение в трансген последовательности сигнального пептида не влияет на репродуктивную активность и генетическую стабильность вируса в клеточных культурах и в системе развивающихся куриных эмбрионов.

2. Показано, что изменения конструкции, связанные с локализацией трансгена и сигнального пептида, влияют на аттенуацию и иммуногенность гриппозных векторов. Таким образом, безопасность и протективность NS-векторов возможно моделировать при помощи изменения дизайна конструкции геномного сегмента NS.

3. На модели РСВ инфекции у мышей BALB/c показано, что сконструированные гриппозные NS-векторы различаются по протективной активности. Показано, что векторы, способствующие полному подавлению репродукции РСВ в легких иммунизированных мышей после контрольного заражения, вызывают иммунопатологию в легких, в то время как другие векторы предотвращают развитие РСВ индуцированной пневмонии, не оказывая такого существенного влияния на титр патогенного вируса.

4. Определена оптимальная структура вектора, характеризующаяся наиболее выраженной безопасностью и протективной активностью. Показано, что снабжение трансгена секреторным сигнальным пептидом IgK является контрпродуктивным, поскольку стимулирует формирование легочной патологии. Наиболее эффективной с точки зрения предотвращения РСВ индуцированной пневмонии оказалась конструкция вектора, экспрессирующего трансген, сшитый с С-концом укороченного до 124 а.к. белка NS1 (PR8/NS-F).

5. С помощью конструирования люциферазного вектора показано, что трансгены, сшитые с белком NS124, обладают способностью попадать во внеклеточную среду, включая плазму крови мышей. Полученные результаты позволяют предположить, что секреция белка из клетки происходит посредством активного транспорта белка NS1 за счет взаимодействия с РНП комплексом вируса гриппа.

Апробация работы

Материалы исследования доложены на

1) Пулькина А. А., Сергеева М. В., Романовская-Романько Е.А., Стукова М.А., Егоров А.Ю. Конструирование и свойства гриппозного вектора, экспрессирующего химерный белок NS1 с люциферазной активностью // Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. 25 февраля – 2 марта 2019 г., Гатчина, С. 195-196.

2) Pulkina A., Romanovskaja-Romanko E., Vasilyev K., Stukova M., Egorov A. «Detection of hidden A/PR/8/34 specific antibodies in ferret sera by the luciferase neutralization assay» // The 1st ISIRV International Influenza Vaccine Meeting - Immunological Assays and Correlates of Protection for Next Generation Influenza Vaccines. 31 March - 2 April 2019, Siena, Italy.

3) Устный доклад на тему «Применение гриппозных векторов, обладающих биолюминесцентной активностью» в рамках Международного форума «Молодежные дни вирусологии 2020».

Публикации

По теме исследования опубликовано 6 печатных работ, в том числе 2 публикации в журналах, рекомендованных ВАК, 1 патент на изобретение.

1) Pulkina A.A., Sergeeva M.V., Krokhin A., Stukova M.A., Egorov A. Evidence for the extracellular delivery of influenza NS1 protein. *Microbiology Independent Research Journal (MIR Journal)*. 2021;8(1):27-37.

2) Сергеева М.В., Пулькина А.А., Романовская-Романько Е.А., Мустафаева А.С., Егоров А.Ю., Стукова М.А. Быстрое выявление нейтрализующих антител с применением вирусов гриппа с люциферазным репортером // *Биотехнология*, 2021, Т. 37, № 2, С. 81–91.

3) Заявка №2019138497 на выдачу патента на изобретение «Рекомбинантный штамм вируса гриппа А/PR8-NS124-Luc и способ оценки поствакцинальных нейтрализующих антител с использованием биолюминесцентной детекции» Стукова М.А., Сергеева М.В., Романовская-Романько Е.А., Пулькина А.А., Егоров А.Ю.

4) Sergeeva M.V., Pulkina A.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Mustafaeva A.S., Stukova M.A. Influenza viruses with luciferase reporter designed for vaccine-induced neutralization antibody assessment // Научная конференция OPENBIO в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2020.

5) Мустафаева А.С., Пулькина А.А., Сергеева М.В. Конструирование вирусов гриппа со вставкой гена люциферазы и их применение для анализа нейтрализующих антител // I Международная научно-практическая конференция «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий». Секция 1. Медицинская биотехнология и биофармацевтика. С. 90-94.

6) Сергеева М.В., Пулькина А.А., Романовская-Романько Е.А., Стукова М.А. Быстрый тест люциферазной нейтрализации для оценки титра антител к вирусам гриппа // Сборник Трудов X Юбилейной международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2020».

Работа поддержана:

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 билюминесцентной конструкции на основе вируса гриппа». 25.06.2020 №823.

3) Грантом Президента Российской Федерации для молодых кандидатов наук, № 075-15-2019-226

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

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

Работа с бактериями. Накопление плазмид проводили в бактериальном штамме E.coli DH5 α . Выделение свободной от эндотоксина пДНК проводили набором EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, США).

Клеточные культуры. Культуру клеток Vero (ATCC #CCL-81), адаптированную к росту в бессывороточной среде, растили в среде OptiPro (Gibco, США) с добавлением 2% GlutaMax (Gibco, США). Культуру клеток MDCK London Line (#FR-58, International Reagent Resource) культивировали в питательной среде АльфаMEM (Биолот, Россия) с добавлением 5-10% эмбриональной телячьей сыворотки Sc-Biol (Биолот, Россия). Культуру клеток A549 (ATCC #CCL-185) вели на среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 2% GlutaMAX и 10% FBS (Gibco, США). Культуру клеток Hep-2, полученную из Коллекции клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 5% сыворотки Sc-Biol.

Лабораторные животные. В работе были использованы самки мышей линий BALB/c, массой 16-20 грамм, в возрасте 6-8 недель, полученные из питомников «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России с соответствующим ветеринарным свидетельством. Все исследования были проведены согласно "Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

Сборка гриппозных векторов при помощи электропорации. Сборку штаммов проводили при помощи котрансфекции клеток Vero набором из 8 двунаправленных плазмид [29], используя прибор Nucleofector II (Амаха) и набор реагентов Nucleofector Kit V (Lonza). Через 48 часов после трансфекции в клетках наблюдалось вирусное ЦПД, что свидетельствовало о сборке вирусов.

Изучение генетической стабильности. Вирусную РНК выделяли при помощи набора RNeasy Mini kit (Qiagen, США). Для постановки ОТ-ПЦР использовали набор реагентов AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Ambion, США), праймер для обратной транскрипции: Uni12 (AGCRAAAGCAGG) [30], и подобранные праймеры NS-RT-Len (AGCAAAAGCAGGGTGACAAAG), NS-3'UTR-1 (GAAACAAGGGTGTTT TTTATTATTAAT). Анализ результатов ОТ-ПЦР проводили при помощи горизонтального

электрофореза в агарозном геле (Thermo Scientific, США). Для детекции использовали систему гель-документирования ChemiDoc (Bio-Rad, США).

Определение инфекционной активности гриппозных векторов. Титрование вирусов проводили в системе развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) и культурах клеток Vero и MDCK. Заражение проводили десятикратными падающими разведениями вирусосодержащей жидкости. РКЭ инкубировали в течение 48 часов при температуре 34°C. Зараженные 96-луночные планшеты с суточным монослоем клеток инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 часов. Для детекции вируса использовали реакцию гемагглютинации (РГА). 50% эмбриональную и тканевую инфекционную дозу (ЭИД₅₀/ТИД₅₀) рассчитывали по методу Reed-Muench [31]. Инфекционную активность выражали в lgЭИД₅₀/мл или lgТИД₅₀/мл.

Определение экспрессии химерного белка NS методом Вестерн-блот. Культуру клеток MDCK заражали вирусными штаммами в дозе 5 ТИД₅₀/клетку и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 8 часов. Клетки снимали 0,25% трипсином-ЭДТА (Sigma, США) и лизировали в буфере Лэммли с β-меркаптоэтанолом. Денатурирующий белковый ЭФ проводили в полиакриламидном геле (Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gel, Bio Rad, США), затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio Rad, США). Блокировку мембраны проводили 5% сухим молоком в фосфатно-солевом буфере (Amresco, США) с 0,1% Tween-20 (Serva, Германия). В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела 1Н7 против NS1 [32], в качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена козы антитела против мышиных IgG (Goat anti-mouse IgG(H+L), #G21040, Invitrogen, США). Окрашивание проводили с использованием набора Opti-4CN Substrate Kit (Invitrogen, США).

Определение экспрессии белков при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания. Культуру клеток Vero заражали вирусными штаммами в дозе 1 ТИД₅₀/клетку. После инкубации клеток с инокулятом при 37°C, 5% CO₂ в течение 12 часов, клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma Aldrich, США) и пермеабелизировали 0,2% тритоном X-100 (Helicon, Россия). Для блокировки использовали 5% сухое молоко. 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 pAb to MsIgG (Alexa Fluor® 488) (ab150113) и Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077). Фотографии окрашенных клеток получали с помощью флуоресцентного микроскопа с цифровой камерой Zeiss Axio Vert A1 (Carl Zeiss, США).

Иммунизация и заражение лабораторных животных. Иммунизацию мышей линии BALB/c вирусными штаммами проводили интраназально под легким эфирным наркозом в объеме 30 мкл на мышь в дозе 6,0 IgЭИД₅₀. Плацебо вводил в той же схеме. Мониторинг летальности и динамики массы тела проводили в течение двух недель после иммунизации. Забор органов для определения вирусной нагрузки осуществляли на 3 и 5 сутки. Заражение мышей штаммом РСВ А2 (IRR, #FR-294) проводили через три недели после иммунизации в дозе 6,0 Ig БОЕ/животное в объеме 30 мкл. Забор органов на высеваемость РСВ производили на 5 сутки после заражения, забор легких для изучения гистопатологии производили на 6 сутки после заражения.

Определение инфекционной активности респираторно-синцитиального вируса в легких мышей методом образования бляшек. 24-луночный планшет с 80% суточным монослоем клеток Нер2 заражали 10-кратными разведениями вирусосодержащей суспензии гомогената легких мышей по 200 мкл/л. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C, 5% CO₂, а затем вносили полужидкое агарозное покрытие, содержащее среду MEM (Gibco #11935, США) с 0,3% агарозой (NBCo, США), 2% сывороткой, 1% антибиотиком-антимикотиком и 1% GlutaMAX. Подсчет бляшек осуществляли через 4 суток после инкубации. Клетки фиксировали 80% ацетоном, блокировали 5% сухим молоком и вносили мышинные моноклональные антитела 4F2, специфичные к белку F респираторно-синцитиального вируса, предоставленные лабораторией биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева [33]. В качестве конъюгата использовали антитела, меченые пероксидазой хрена Goat anti mouse IgG (H+L) HRP (Novex, США). Для окраски использовали раствор 0.05% DAB (Serva, Германия), 0.015% перекиси водорода (Нева-Реактив, Россия) в PBS. Титр рассчитывали, как произведение усредненного числа бляшек на использованное разведение и выражали в десятичных логарифмах IgБОЕ/мл. Нижний предел чувствительности метода составлял 0,7 IgБОЕ/мл.

Гистологический анализ. Легкие инфицированных мышей фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и обезвоживали в 70% этаноле в течение 2 часов перед помещением в парафиновые блоки. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Легочную ткань оценивали на предмет тяжести воспаления и очаговых скоплений инфильтрирующих клеток по десятибалльной шкале. Выбранные группы исследовали на наличие эозинофилов и бокаловидных клеток используя окраску гематоксилин Майера, Конго красный.

Изучение Т-клеточного ответа при иммунизации гриппозными векторами мышей линии BALB/c. Животных иммунизировали в дозе 6 IgТИД₅₀ и через 10 дней после иммунизации производили забор селезенки для оценки Т-клеточного ответа к белку F РСВ.

Выделенную первичную культуру клеток селезенки высевали в 96-луночный планшет и стимулировали рекомбинантным белком F PCB (Sino Biological) в концентрации 0.5 мкг/мл в присутствии ко-стимулирующих антител к CD28 (Biolegend) в течение 6 ч при 37° С и 5% CO₂. Далее вносили ингибитор клеточного транспорта брэфельдин А и продолжали инкубацию в течение еще 12 часов. Для окрашивания использовали флуорохром-конъюгированные антитела CD8-PE/Cy7, CD4-PerCP-Cy5.5, CD44-BV510, CD62L-APC/Cy7, IFN γ -FITC, TNF α -BV421, IL2-PE и набор реагентов Cytofix/Cytoperm (BD). Чтобы отделить живые клетки от мертвых использовали маркер Zombie Red (Biolegend). Для блокирования неспецифического связывания антител использовался реагент True Stain (Biolegend).

Сбор данных осуществляли при помощи проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter). Для обработки данных использовали программу Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter). Перед проведением статистического анализа производили вычет фоновых значений уровня Т-клеточного ответа (значения, полученные для нестимулированных образцов) из значений, полученных для образцов, стимулированных рекомбинантным F-белком PCB.

Оценка люциферазной активности. Культуры клеток Vero и A549 заражали в дозе 0,005 ТИД₅₀/клетку и инкубировали в течение часа при 37°С, 5% CO₂, далее клетки отмывали и меняли среду. Измерение люциферазной активности проводили через 1, 3, 6, 9, 12 и 24 часа после смены среды в супернатанте и лизате клеток. Измерение проводили в планшетах с темными стенками с помощью набора реагентов Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega, США) и мультифотометра CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия). Для измерения люциферазной активности репортерного вектора *in vivo* мышей линии BALB/c заражали интраназально в дозе 6 logТИД₅₀/мышь. Забор органов осуществляли через 12, 24 и 48 часов. БАЛ и сыворотки анализировали на наличие люминесцентной активности с использованием описанных выше инструментов.

Трансфекция клеток Vero различными комбинациями плазмид. Различные комбинации плазмид, кодирующих геномные сегменты вируса гриппа A/PR/8/1934 и модифицированный сегмент гена NS с репортерной вставкой NanoLuc использовали для трансфекции клеток Vero. Для детекции трансгена в супернатанте и лизате клеток использовали набор реагентов Nano-Glo Luciferase Assay System. Через 6 часов после трансфекции клетки отмывали от мертвых и заменяли питательную среду. Далее клетки инкубировали в течение 18 часов при 37°С, 5% CO₂ и измеряли люциферазную активность, как описано выше.

Статистический анализ данных. Обработку первичных данных проводили с использованием программ Microsoft Office Excel 2010 и GraphPad Prism v9.0.0.

Результаты и обсуждение

1. Конструирование набора гриппозных векторов, кодирующих вставки последовательностей РСВ антигенов в NS геномном фрагменте в различных модификациях.

Чтобы изучить влияние дизайна геномного сегмента NS, модифицированного вставкой РСВ антигенов, на презентацию гетерологичной вставки, были сконструированы пять вариантов химерного гена NS, различающихся комбинацией и локализаций последовательности сигнального пептида IgK и участков белка F РСВ.

В качестве антигенных эпитопов были выбраны два высоко консервативных участка F-белка РСВ, на которые обычно формируются нейтрализующие антитела. Были выбраны два участка белка F. Первый включал в себя антигенный сайт II (255-275 а.к.), являющийся мишенью паливизумаба [11], а второй – антигенный сайт IV (422-438 а.к.), являющийся мишенью антител 101F [10]. Выбранные фрагменты содержали В-клеточные и Т-клеточные эпитопы. Нуклеотидные последовательности, кодирующие 248-290 а.к. и 409-451 а.к. белка F, были объединены в кассету Fs и оптимизированы для экспрессии в составе гриппозного вектора. Дизайн плазмид и картирование эпитопов в F-белке РСВ проводили в программе Vector NTI. Схематическое представление конструирования генных сегментов приведено на рисунке 1А. Список эпитопов, входящих в состав вставки, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Список известных эпитопов, входящих в выбранные фрагменты белка F РСВ.

Номер эпитопа	Аминокислотная последовательность эпитопа	Принадлежность	Эпитоп
956658	NNVQIVRQQSYSIMS	Человек	Т-клеточный
67390	TYMLTNSSELL	Человек, мышь	Т- и В-клеточный
57524	SELLSLINDMPITNDQKKLMS	Человек	В-клеточный
956655	NKNRGIKTFSGCD	Человек	Т-клеточный
956706	SNGCDYVSNKGVDTV	Человек	Т-клеточный

Было сконструировано две группы генных фрагментов NS. В первую группу входило три варианта геномных сегментов, сконструированных по по ранее описанной схеме – сшивание укороченного белка NS1 с трансеном [14, 34]. Геномный сегмент PR8/NS-F состоял из нуклеотидной последовательности, кодирующей первые 124 аминокислоты белка NS1 вируса гриппа A/PR/8/1934, сшитые с выбранным трансеном Fs. Геномный сегмент PR8/NS-2AF отличался от первого варианта присутствием сайта автопротеолиза 2A между последовательностью белка NS1 и участком F-белка РСВ. Геномный сегмент PR8/NS-2AKF помимо сайта 2A содержал сигнальную последовательность IgK, вставленную перед трансеном (рис.1Б).

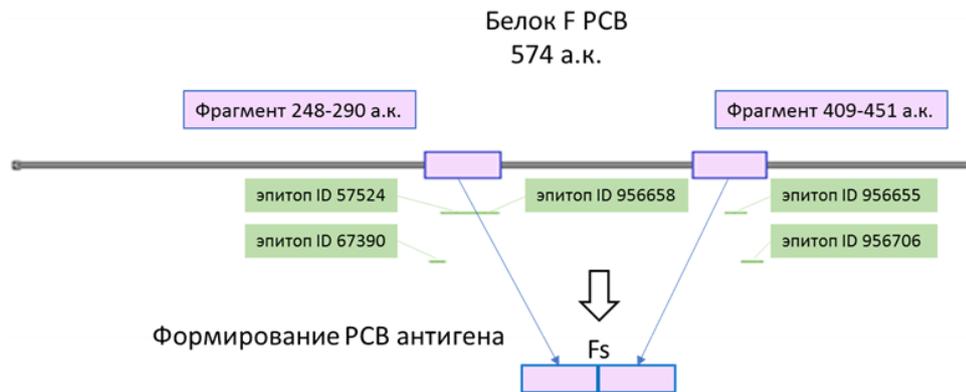
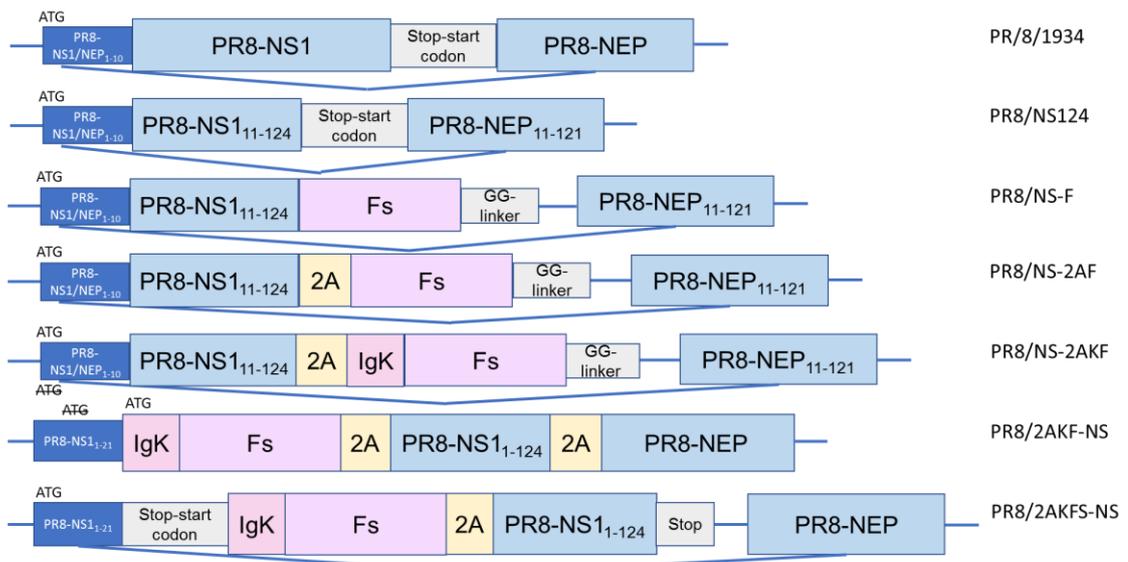
А**Б**

Рисунок 1 – Конструкция геномных сегментов NS вируса гриппа. (А) Распределение выбранных участков в F-белке РСВ. Фиолетовым выделены участки белка F РСВ, взятые в качестве вставки в гриппозные векторы. Зеленые отрезки обозначают расположение эпитопов. Для поиска эпитопов была использована база данных The Immune Epitope Database. **(Б)** Схематическое изображение геномных сегментов NS, использованных в работе.

Основным отличием второй группы сегментов от первой была вставка сигнального пептида и трансгена с N-конца укороченного NS1 белка. Для этого 5'-концевая область геномного сегмента PR8/2AKF-NS была модифицирована таким образом, что не содержала в себе старт-кодонов до иницирующего кодона последовательности IgK. Далее были вставлены последовательности трансгена Fs и укороченного белка NS1, разделенные сайтом 2A. Белок NEP синтезировался без сплайсинга и был также отделен 2A сайтом от последовательности укороченного белка NS1. Таким образом, четвертый вариант химерного гена NS не содержал в себе сайтов сплайсинга для синтеза NEP, а считывался полипротеином, который с помощью автопротеолиза разрезался на три отдельных пептида: трансген Fs, 124 аминокислоты белка NS1 и NEP. В геномном сегменте PR8/2AKFS-NS был сохранен сплайсинг для синтеза белка NEP. После немодифицированной

последовательности, кодирующей первые 21 аминокислоту, был вставлен стоп-кодон. Далее последовательно были вставлены IgK, Fs, сайт 2A, укороченная последовательность NS1 и стоп-кодон. После стоп-кодона была вставлена последовательность для синтеза белка NEP. Схематическое изображение сконструированных геномных сегментов представлено на рисунке 1Б.

Нуклеотидные последовательности модифицированных геномных сегментов NS были синтезированы и клонированы в аналог вектора рНW2000 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 трансфекции клеток Vero.

Набор гриппозных векторов, экспрессирующих последовательность РСВ антигена, был получен методом электропорации клеток Vero восьмью двунаправленными плазмидами [29]. Для сборки гриппозных векторов использовали последовательности геномных сегментов PB2, PB1, PA, NP, M, HA и NA вируса гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) и одну из пяти химерных конструкций гена NS.

Таким образом, были собраны пять вариантов гриппозных векторов, экспрессирующих участки белка F РСВ в составе OPC NS1. Векторы отличались между собой дизайном геномного сегмента NS, модифицированного вставкой Fs. Последовательность вставки трансгена и сигнального пептида IgK имели различную локализацию по отношению к укороченному белку NS1. Целью модификации векторов была попытка увеличения транспорта трансгена во внеклеточную среду для формирования антительного ответа к вставке трансгена РСВ.

2. Изучение репродуктивной активности и генетической стабильности полученных векторов

Ростовые характеристики полученных рекомбинантных штаммов оценивали в культурах клеток Vero и MDCK, и в системе РКЭ методом предельных разведений. После заражения культуры клеток инкубировали 72 часа при 37°C, 5% CO₂, РКЭ инкубировали 48 часов при 34°C. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Ростовые характеристики рекомбинантных штаммов, экспрессирующих участки белка F РСВ, в различных биологических системах.

Название штамма	Инфекционный титр в репродуктивной системе		
	Vero (lg ТИД ₅₀ /мл) \pm СО	MDCK (lg ТИД ₅₀ /мл) \pm СО	РКЭ (lg ЭИД ₅₀ /мл) \pm СО
A/PR8/NS-F	8,13 \pm 0,34	7,03 \pm 0,34	8,03 \pm 0,14

A/PR8/NS-2AF	8,23±0,51	7,72±0,4	8,20±0,75
A/PR8/NS-2AKF	7,78±0,71	7,58±0,31	8,28±0,14
A/PR8/2AKF-NS	7,33±0,50	8,00±0,33	8,83±0,60
A/PR8/2AKFS-NS	7,62±0,25	7,17±0,29	8,12±0,20

Для подтверждения генетической стабильности полученных рекомбинантных штаммов проводили ОТ-ПЦР и секвенирование. Результаты ОТ-ПЦР представлены на рисунке 2. Было показано, что длина геномных сегментов всех пяти полученных гриппозных векторов соответствовала исходно заявленной и соответствовала длине ПЦР фрагментов соответствующих плазмидных ДНК. Методом секвенирования было показано, что нуклеотидные последовательности в полученных векторах идентичны исходной последовательности. Однако в штамме PR8/2AKF-NS присутствовали три некодирующие нуклеотидные замены (данные не приведены).

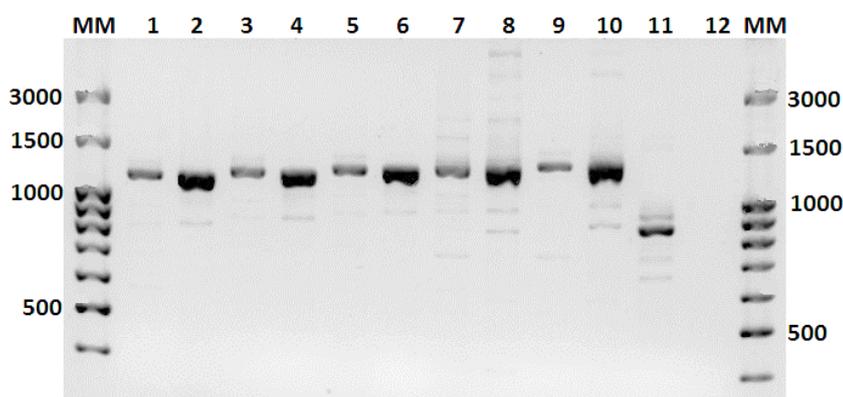


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации геномного сегмента NS гриппозных векторов. MM - маркер молекулярного веса; 1 - штамм A/PR8/NS-F; 2 – контрольная плазида рНW-PR8/NS-F; 3 – штамм A/PR8/NS-2AF; 4 – контрольная плазида рНW-PR8/NS-2AF; 5 - штамм A/PR8/NS-2AKF; 6 – контрольная плазида рНW-PR8/NS-2AKF; 7 - штамм A/PR8/2AKF-NS; 8 – контрольная плазида рНW-PR8/2AKF-NS; 9 – штамм A/PR8/2AKFS-NS; 10 – контрольная плазида рНW-PR8/2AKFS-NS; 11 – штамм A/PR8/NS124 (вектор без вставки); 12 – отрицательный контроль.

Все сконструированные рекомбинантные штаммы были генетически стабильны и обладали высокими ростовыми характеристиками. Инфекционная активность штаммов в РКЭ была более 8,0 IgЭИД₅₀/мл и более 7,0 IgТИД₅₀/мл в культурах клеток. Такие характеристики потенциально могут позволить производить достаточное количество вируса при производстве живой векторной вакцины.

3. Изучение особенности экспрессии антигена РСВ при заражении культуры клеток различными вариантами гриппозного вектора

Для оценки экспрессии химерного гена NS со вставкой трансгена Fs РСВ методом Вестерн-блот суточный монослой клеток MDCK заражали гриппозными векторами.

Окрашивание мембраны проводили с использованием антител 1Н7, специфичных к белку NS1 вируса гриппа А [32]. Результаты представлены на рисунке 3.

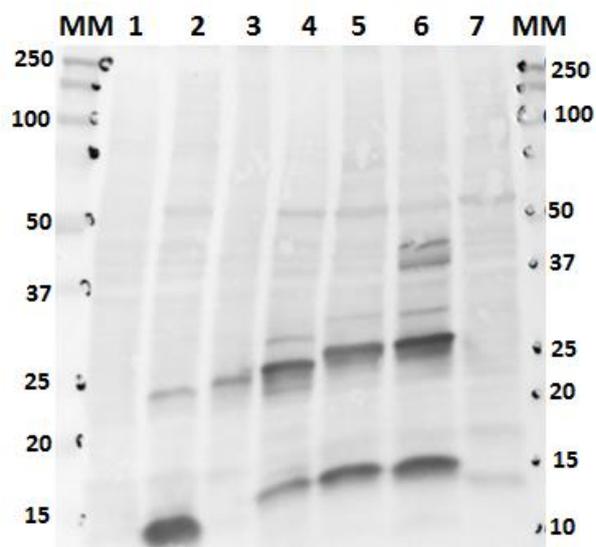


Рисунок 3 – Экспрессия химерного белка NS1 со вставкой участков белка F РСВ штаммами при заражении клеток MDCK. Результаты Вестерн-блот окрашивания антителами против NS1 (1Н7). 1 – незараженные клетки; 2 – клетки, зараженные вирусом А/PR8-NS124 (без вставки); 3-7 – клетки, зараженные гриппозными векторами А/PR8/NS-F, А/PR8/NS-2AF, А/PR8/NS-2AKF, А/PR8/2AKF-NS и А/PR8/2AKFS-NS, соответственно; MM – маркер молекулярного веса, кДа

Расчет теоретической молекулярной массы белков проводили с использованием ExPASy ProtParam [35]. Массы продуктов трансляции приведены в таблице 3. По результатам Вестерн-блота оценивали соответствие молекулярных масс экспрессируемых химерных белков NS-F, NS-2AF, NS-2AKF, 2AKF-NS, 2AKFS-NS с теоретически предсказанными, а также наличие автопротеолиза по присутствующему в конструкции сайту 2А. В качестве контроля был использован вектор А/PR8/NS124, кодирующий укороченный до 124 а.к. белок NS1.

Таблица 3 – Молекулярная масса химерных белков NS1 со вставкой участков белка F РСВ

Название штамма	Молекулярная масса полноразмерного химерного белка, кДа	Молекулярная масса продуктов трансляции после автопротеолиза по 2А сайту, кДа
A/PR8-NS124	14,2	-
A/PR8/NS-F	23,6	-
A/PR8/NS-2AF	25,3	14,2
A/PR8/NS-2AKF	27,7	14,2
A/PR8/2AKF-NS	43,8	14,2 / 27,7 / 30,4
A/PR8/2AKFS-NS	27,6	14,2

Было показано, что сконструированные гриппозные векторы экспрессируют химерные белки, которые по молекулярной массе схожи с теоретически рассчитанными. Использование метода Вестерн-блот позволило детектировать химерные полипротеины, что говорит о том, что вероятность расщепления по сайту автопротеолиза 2А составляет около 50%. Для штамма А/PR8-2АКФС-NS экспрессию химерных белков показать не удалось.

Далее для оценки экспрессии белков NS1 и F_s был использован метод иммунофлуоресцентного окрашивания. Монослой клеток Vero заражали гриппозными векторами и инкубировали в присутствии штаммов 12 часов. Для окрашивания использовали мышиную сыворотку, специфичную к участкам белка F₁ РСВ, крысиную сыворотку, специфичную к белку NS1 вируса гриппа и соответствующие флуоресцентно меченные конъюгаты. Результаты окрашивания представлены на рисунке 4.

Иммунофлуоресцентное окрашивание позволило обнаружить белок NS1 в клетках, зараженных сконструированными векторами. Наиболее интенсивное окрашивание было зафиксировано в клетках, зараженных штаммом А/PR8/2АКФ-NS, а самое низкое – при заражении штаммом А/PR8/2АКФС-NS. При окрашивании клеток на белок F_s наиболее интенсивный сигнал был обнаружен при заражении клеток векторами А/PR8/NS-F и А/PR8/NS-2АФ. В клетках, зараженных А/PR8/2АКФ-NS и А/PR8/2АКФС-NS векторами, окрашенными оказались лишь единичные клетки.

Вестерн-блот окрашивание антителами против NS1 белка позволило обнаружить химерные полипротеины, синтезируемые в клетках, при заражении сконструированными векторами. Проведенный эксперимент показал, что вероятность автопротеолиза составляет не более 50%. Иммунофлуоресцентное окрашивание позволило показать экспрессию гриппозного белка NS1 и вставленного трансгена F_s при заражении культуры клеток гриппозными векторами. Было показано, что присутствие в конструкции геномного сегмента сигнального пептида IgK снижает уровень детектируемого белка F_s, что должно быть связано с выходом трансгена из клетки.

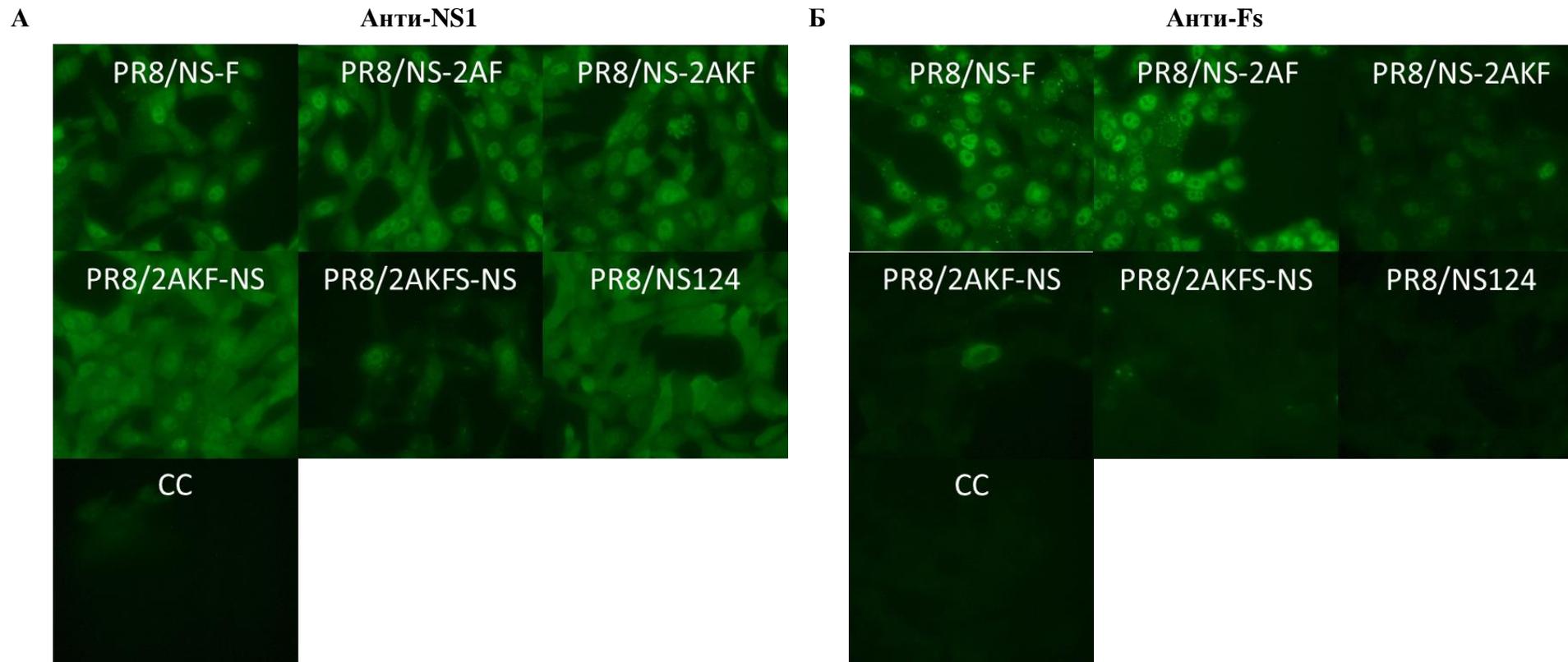


Рисунок 4 – Экспрессия белка NS1 (слева) и участков белка F РСВ (справа) гриппозными векторами при заражении клеток Vero.

4. Оценка безопасности сконструированных гриппозных векторов при интраназальном введении мышам линии BALB/c.

Для изучения специфической безопасности сконструированных векторов была использована модель мышей линии BALB/c. В качестве контроля были использованы вирус гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) «дикого» типа, штамм-вектор PR8/NS124 (H1N1), не несущий вставки, препарат плацебо (DPBS) и прототип ИФ-РСВ. Иммунизацию животных проводили в дозе 6,0 IgТИД₅₀/мышь. Иммунизацию прототипом инактивированной формалином вакцины проводили внутримышечно по 100 мкл на животное (5мкг ИФ-РСВ с добавлением 100 мкг гидроксида алюминия). Специфическую безопасность определяли по уровню вирусной нагрузки в легких на 3 и 5 сутки после иммунизации, по динамике веса в течение 14 дней после иммунизации и по учету летальности. Результаты представлены на рисунке 5.

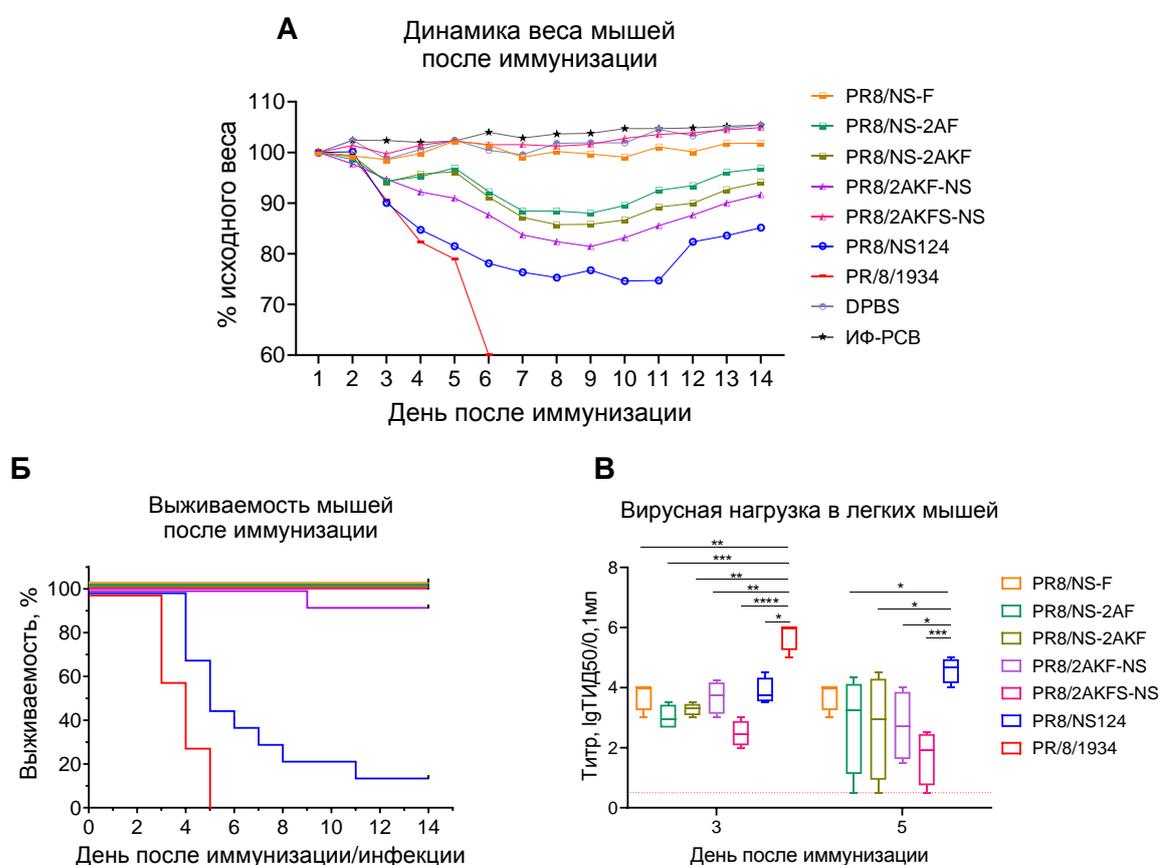


Рисунок 5 – Изучение специфической безопасности гриппозных векторов на модели мышей линии BALB/c. (А) Динамика массы тела мышей, иммунизированных гриппозными векторами A/PR8/NS-F, A/PR8/NS-2AF, A/PR8/NS-2AKF, A/PR8/2AKF-NS, A/PR8/2AKFS-NS и контрольных групп: A/PR8/1934 (H1N1), A/PR8/NS124, DPBS и ИФ-РСВ. На диаграмме приведены средние значения для группы. (Б) Летальность мышей в контрольных группах и группах мышей, иммунизированных гриппозными векторами. (В) Вирусная нагрузка в легких мышей на 3 и 5 день. Результаты представлены в виде графика бокс-плот с отмеченными минимальным/максимальным значениями, медианой и квартилями для каждой группы. Красной пунктирной линией отмечена граница чувствительности метода. Для проведения статистического анализа использовали дисперсионный анализ ANOVA с пост-тестом Даннетта (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001).

В группах A/PR8/NS-F и A/PR82AKFS-NS, как и в группе плацебо (DPBS) и ИФ-PCB снижения веса отмечено не было. Максимальная потеря веса в группах A/PR8/NS-2AF и A/PR8/NS-2AKF была отмечена к 6 суткам после иммунизации и достигала 12% и 15% от исходной массы тела соответственно. Наиболее патогенным штаммом среди сконструированных был вектор A/PR8/2AKF-NS. В этой группе потеря массы тела достигала 20% от исходной к 8 суткам после иммунизации. Все пять сконструированных гриппозных векторов были менее патогенны для мышей, чем вектор без вставки и вирус дикого типа (рис. 5А). В группе A/PR8/NS124 снижение веса достигало 25% на 6 сутки после иммунизации, а в группе A/PR/8/1934 инфекция носила летальный характер.

При учете летальности (рис. 5Б) в экспериментальных группах, гибель одного животного была зафиксирована в группе A/PR8/2AKF-NS. В остальных экспериментальных группах летальности отмечено не было. В контрольных группах A/PR8/NS124 и A/PR/8/1934 летальность достигала 85% и 100% соответственно.

Вирусную нагрузку в легких иммунизированных мышей оценивали на 3 и 5 день. Титры гриппозных векторов в легких на 3 день после иммунизации были достоверно ниже, чем титры вируса «дикого» типа (рис. 5В). На 5 день после иммунизации вирусная нагрузка у мышей, иммунизированных 2-5 векторами, статистически достоверно отличалась от вирусной нагрузки в легких мышей, зараженных «пустым» вектором.

Согласно полученным результатам, сконструированные гриппозные векторы обладают более выраженным аттенуированным фенотипом в сравнении с вектором без вставки. Иммунизация векторами A/PR8/NS-F и A/PR8/AKFS-NS не вызывала снижения массы тела, а векторами A/PR8/NS-2AF, A/PR8/NS-2AKF и A/PR8/AKF-NS - варьировалась от 12% до 20%. Самая низкая вирусная нагрузка в легких мышей была отмечена при иммунизации вектором A/PR8/AKFS-NS. Вирусная нагрузка в легких мышей, иммунизированных вектором A/PR8/NS-F, на 5 день статистически значимо не отличалась от вектора без вставки, но на динамике массы тела это не сказывалось.

5. Оценка протективной активности векторов в отношении инфекции респираторно-синцитиального вируса.

Для оценки защитных свойств векторов в отношении РСВИ, мышей линии BALB/c иммунизировали разработанным векторами в дозе 6,0 lg ТИД₅₀/животное и через 28 дней заражали вирусом РСВ А2 в дозе 6 lg БОЕ/животное. В течение 6 дней после заражения следили за динамикой веса животных. На 5 день после заражения производили забор органов на вирусовыделение. Протективные свойства вакцинных штаммов оценивали по снижению вирусной нагрузки в легких в сравнении с контрольной группой заражения.

При оценке динамики веса животных после заражения значительного снижения массы тела не было зафиксировано ни для одной группы, в том числе в контрольной группе заражения (данные не представлены). Полученные данные свидетельствуют о том, что иммунизация сконструированными векторами не влечет за собой усиления инфекции, как это было описано литературе [26].

При оценке вирусной нагрузки в легких было отмечено снижение вирусного титра во всех группах иммунизированных мышей. Уровень снижения вирусного титра был в пределах 1-3 lg БОЕ/мл и был статистически значим по сравнению с контрольной группой заражения для всех штаммов, кроме А/PR8/2AKFS-NS. Наибольшее снижение титра вируса было отмечено при иммунизации вектором А/PR8/NS-2AKF. Иммунизация прототипом ИФ-РСВ полностью предотвращала размножение РСВ в легких. Данные представлены на рисунке 6.

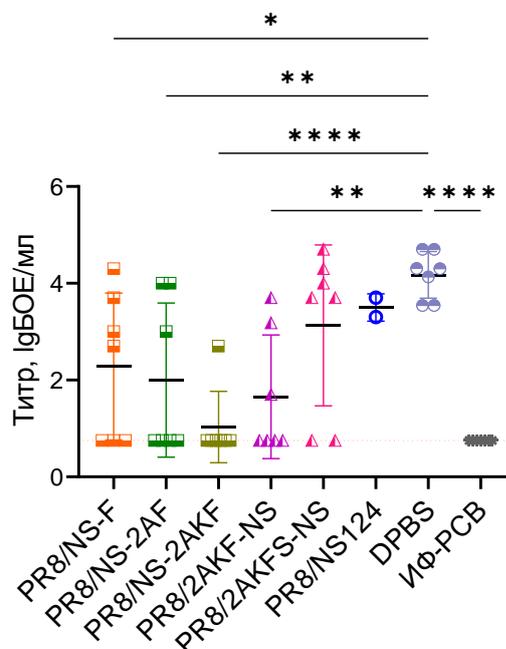


Рисунок 6 – Вирусная нагрузка в легких иммунизированных и контрольных мышей через 5 суток после интраназального заражения вирусом РСВ А2. Результаты представлены в виде индивидуальных значений для каждого животного с отмеченной медианой для каждой группы. Указаны результат общегруппового дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного теста Даннета (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

Согласно полученным результатам, иммунизация гриппозными векторами А/PR8/NS-F, А/PR8/NS-2AF, А/PR8/NS-2AKF и А/PR8/АKF-NS достоверно значимо снижала репликативную активности РСВ в легких мышей, в сравнении с группой контроля инфекции.

6. Гистологическая оценка легких иммунизированных мышей после инфекции респираторно-синцитиального вируса.

Для оценки состояния легких иммунизированных и контрольных мышей после РСВИ проводили гистологический анализ срезов, окрашенных гематоксициллином и эозином. Забор органов производили на 6 сутки после заражения. Репрезентативные фотографии гистологических срезов приведены на рисунке 7. Также была проведена визуальная оценка степени поражения отдельных функциональных элементов ткани. Выраженность характерных патологических изменений ткани легких представлены на рисунке 8.

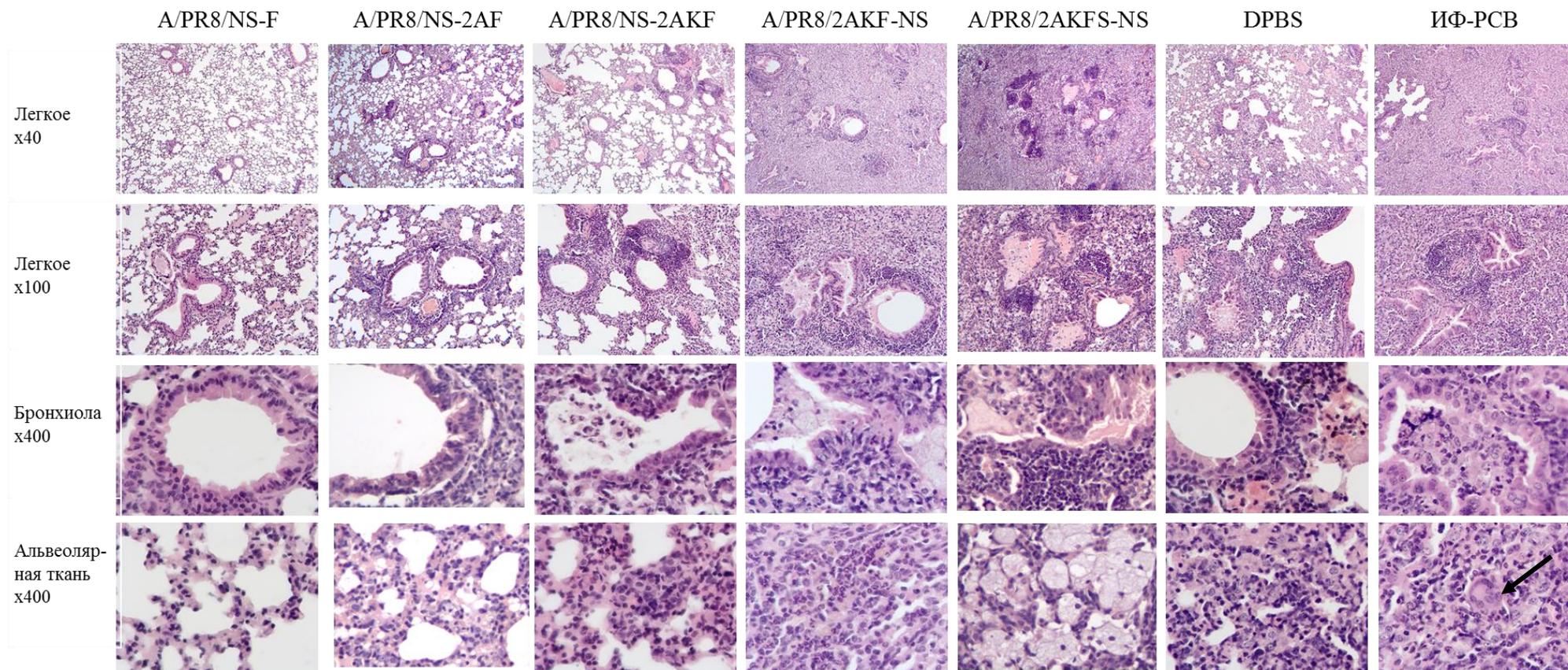


Рисунок 7 - Микроскопическое строение легких мышей после РСВИ. Представлены репрезентативные фотографии парафиновых срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Стрелкой отмечена многоядерная клетка.

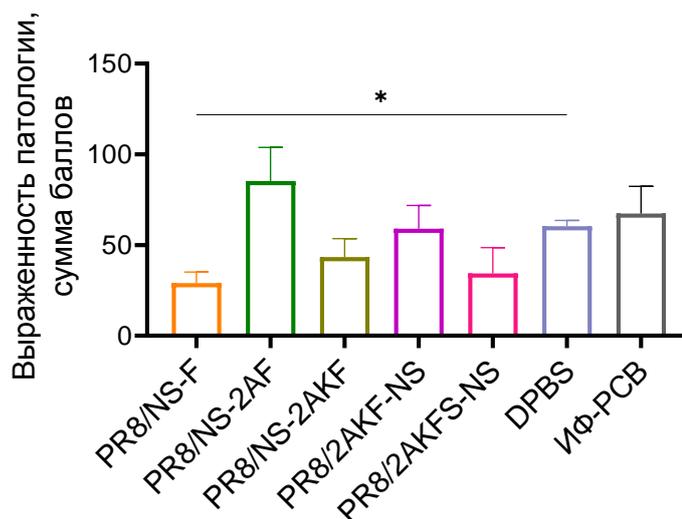


Рисунок 8 – количественная оценка повреждения легких, выраженная в условных единицах. Результаты представлены в виде гистограммы средних значений со стандартными отклонениями. Статистический анализ проводился с помощью двухфакторного дисперсионного анализа, с использованием апостериорного теста Даннетта (* $p < 0,05$)

Анализ гистологических срезов показал разную степень выраженности патологических изменений в легких иммунизированных мышей на фоне инфекции. Суммарная количественная оценка повреждения легких позволила выделить группу мышей, иммунизированных вектором A/PR8/NS-F. Двухфакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Даннетта показал статистически значимые различия ($p=0,0364$) между контрольной группой заражения и группой мышей, иммунизированных вектором A/PR8/NS-F.

Легкие мышей из групп A/PR8/NS-F, A/PR8/NS-2AKF, A/PR8/2AKF-NS, DPBS и ИФ-РСВ были выбраны для дополнительного гистологического исследования на присутствие эозинофилов и бокаловидных клеток.

Наличие эозинофилов и бокаловидных клеток является маркером иммунопатологии при вакцинации ИФ-РСВ. По результатам исследования было показано статистически значимое повышение количества эозинофилов и бокаловидных клеток в группе ИФ-РСВ (рис. 9, 10), что согласуется с описанными в литературе моделями [36]. Так же было отмечено статистически значимое повышение количества эозинофилов в группе A/PR8/2AKF-NS. Это может быть свидетельством поляризации Th2 иммунного ответа при вакцинации.

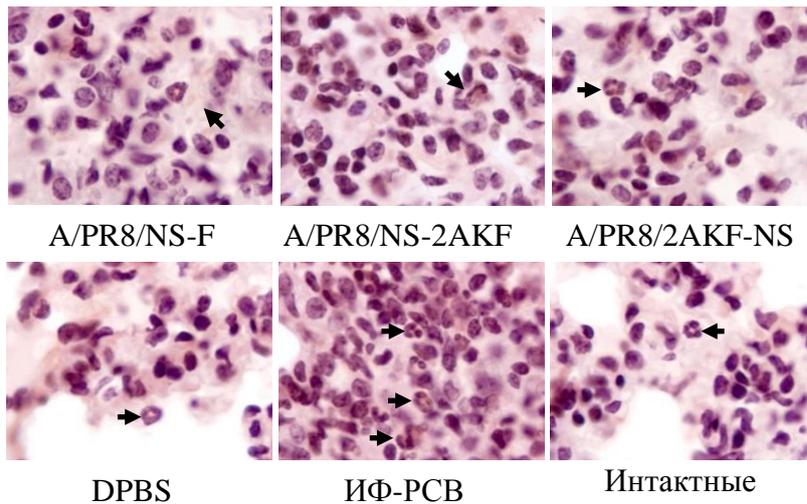
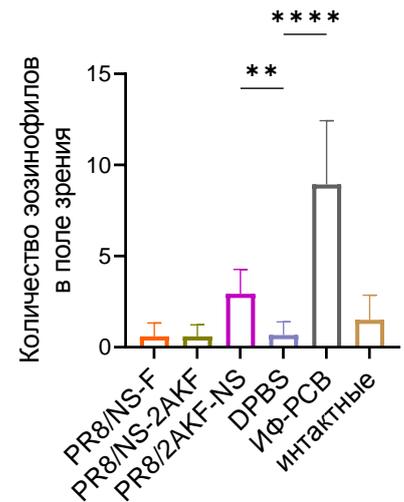
А**Б**

Рисунок 9 – Гистологическое исследование на присутствие эозинофилов в срезах легких иммунизированных и контрольных мышей через 6 суток после интраназального заражения вирусом РСВ А2. (А) Репрезентативные фотографии срезов легких мышей. Эозинофилы отмечены стрелками. Окраска: гематоксилин Майера, Конго красный. Увеличение 1000х. **(Б)** Количество эозинофилов в поле зрения. Результаты представлены в виде гистограммы средних значений со стандартными отклонениями. Указаны результат общегруппового дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного теста Даннетта (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

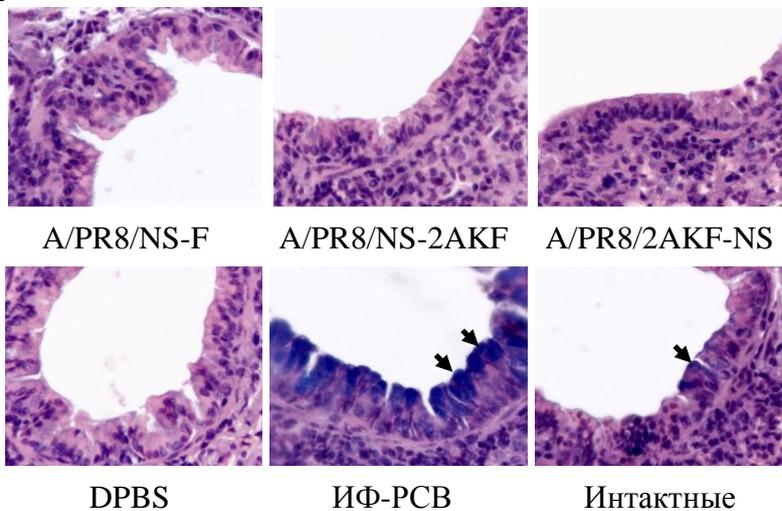
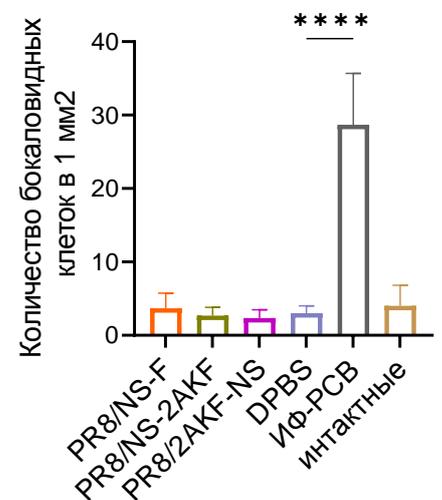
А**Б**

Рисунок 10 - Гистологическое исследование на присутствие бокаловидных клеток в срезах легких иммунизированных и контрольных мышей через 6 суток после интраназального заражения вирусом РСВ А2. (А) Репрезентативные фотографии срезов легких мышей. Бокаловидные клетки отмечены стрелками. Окраска: альциановый синий, докраска гематоксилин-эозином. Увеличение 400х. **(Б)** Количество бокаловидных клеток в 1 мм² эпителия в срезах легких мышей. Результаты представлены в виде гистограммы средних значений со стандартными отклонениями. Указаны результат общегруппового дисперсионного анализа ANOVA и апостериорного теста Даннетта (**** $p < 0.0001$).

Гистологический анализ срезов легких мышей, иммунизированных сконструированными векторами, выявил незначительные воспалительные изменения на фоне РСВИ у мышей из групп

A/PR8/NS-F, A/PR8/NS-2AF и A/PR8/NS-2AKF. Наиболее тяжелые гистопатологические изменения были отмечены у мышей, иммунизированных векторами A/PR8/2AKF-NS и A/PR8/2AKFS-NS, ИФ-PCB и в контрольной группе заражения. Суммарная количественная оценка повреждения легких позволила выделить вектор A/PR8/NS-F в качестве перспективного вакцинного кандидата. Было отмечено, что вставка сигнального пептида IgK перед трансгеном Fs ведет к формированию легочной патологии, схожей с патологией, возникающей при иммунизации ИФ-PCB. Причиной усиления инфекции после вакцинации такими штаммами могут быть иммунологические механизмы, связанные, например, с формированием ненейтрализующих антител или поляризацией Th2 иммунного ответа.

7. Оценка антительного и Т-клеточного иммунного ответа при иммунизации мышей полученными гриппозными векторами.

Для изучения механизма формирования патологических изменений в легких иммунизированных мышей на фоне РСВИ провели анализ В- и Т-клеточного иммунного ответов.

Для оценки антительного ответа к гриппозным векторам в сыворотках крови мышей использовали метод иммуноферментного анализа и реакции торможения гемагглютинации. Результаты представлены на рисунке 11.

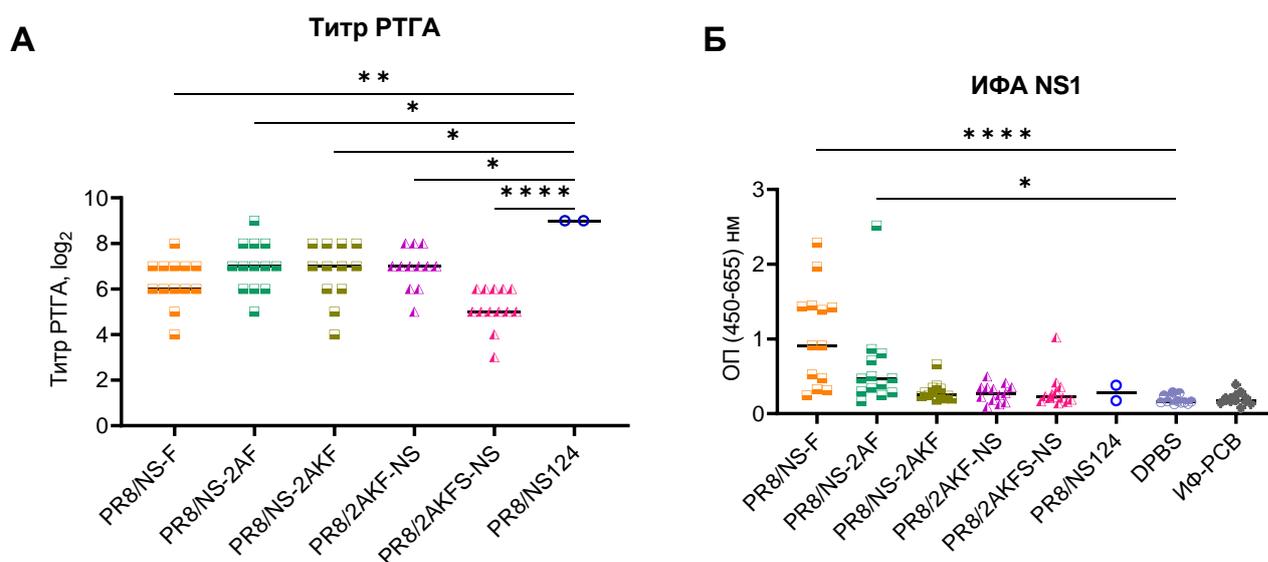


Рисунок 11 – Оценка антительного ответа при иммунизации мышей полученными гриппозными векторами. (А) Титры антигемагглютинирующих антител к вирусу PR/8/1934. Индивидуальные титры антигемагглютинирующих антител выражены как log₂. СГТ представлены горизонтальными линиями для каждой группы. (Б) Уровень сывороточных IgG, специфичных к белку NS1 гриппозного вектора. При постановке ИФА сыворотку мышей разводили 1:50. График отражают индивидуальные значения ОП для каждого образца. Для каждой группы приведена медиана значений. Для сравнения был применен двухфакторный дисперсионный анализа ANOVA с апостериорным критерием Даннетта (* p<0.05, ** p<0.01, **** p<0.0001).

Результаты РТГА свидетельствуют о формировании антигемагглютинирующих антител к вирусу гриппа А/PR/8/1934 при иммунизации гриппозными векторами. Достоверных отличий

между группами выявлено не было, но были зафиксированы достоверные различия с контрольной группой вектора без вставки. Анализ антительного ответа к белку NS1 при помощи ИФА показал статистически значимый более выраженный ответ среди мышей, привитых штаммами PR8/NS-F и PR8/NS-2AF в сравнении с животными группы плацебо (DPBS). Полученные результаты говорят о том, что разработанные гриппозные векторы при иммунизации мышей формируют одинаковый антительный ответ к гемагглюнину вируса гриппа А, но уровень сывороточных IgG, специфичных к белку NS1, различается.

Для оценки формирования антительного ответа к трансгену Fs РСВ использовали ИФА (рис. 12).

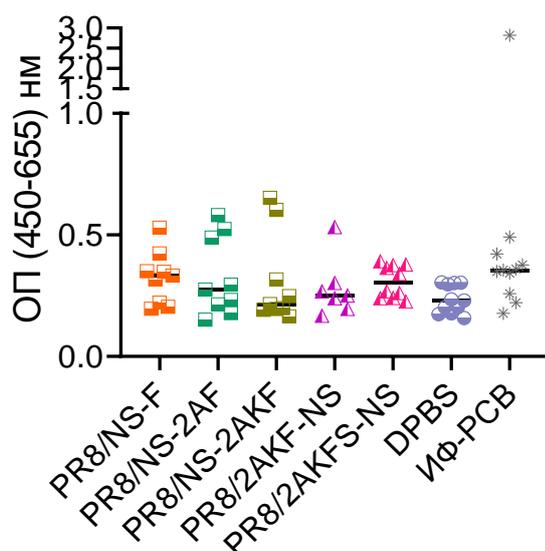


Рисунок 12 – Уровень сывороточных IgG, специфичных к белку F РСВ. В качестве антигена был использован рекомбинантный белок Fs, состоящий из последовательности выбранных в качестве вставки участков белка F РСВ. При постановке ИФА сыворотку мышей разводили 1:50. График отражает индивидуальные значения ОП для каждого образца. Для каждой группы приведена медиана значений. Для сравнения был применен двухфакторный дисперсионный анализа ANOVA с апостериорным критерий Даннетта.

Формирования специфических антител у животных, иммунизированных гриппозными векторами, против F-белка обнаружить не удалось. Результаты ИФА на Fs антиген не показали статистически значимых различий между экспериментальными группами и контрольной группой плацебо. Показано, что иммунизация мышей ИФ-PCB не способствует формированию антительного ответа к выбранным участкам белка F РСВ. Возможно, причиной того, что нам не удалось обнаружить сывороточных антител класса IgG, специфичных к участкам белка F РСВ, является то, что нам не удалось подобрать условия для постановки ИФА. Антительный ответ к трансгену РСВ в сыворотках крови животных требует дальнейшего изучения.

Для оценки способности гриппозных векторов формировать Т-клеточный ответ, был измерен уровень внутриклеточной продукции цитокинов IL-2, TNF- α IFN- γ клетками CD4⁺. В

качестве контрольных групп были использованы мыши, иммунизированные прототипом ИФ-PCB и интактные мыши.

Через 10 дней после иммунизации клетки селезенки стимулировали рекомбинантным F-белком PCB и при помощи проточной цитофлуориметрии оценивали долю полифункциональных CD4+T-клеток в селезенке. Результаты исследования приведена на рисунке 13.

Селезенки CD4+, полифункциональные

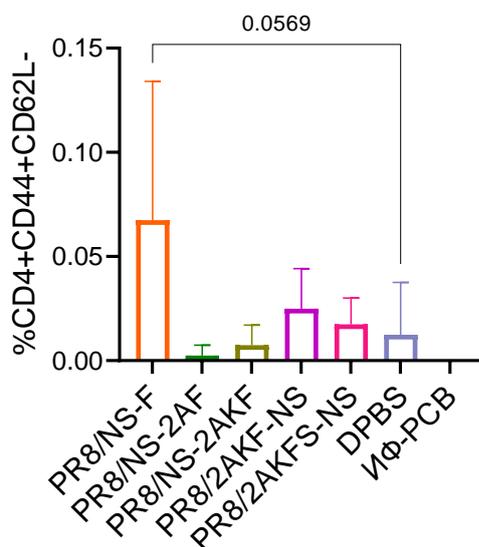


Рисунок 13 – Относительное содержание цитокин-продуцирующих полифункциональных эффекторных CD4+-Т-лимфоцитов памяти (%). Результаты представлены в виде гистограммы средних значений со стандартными отклонениями. Для сравнения был применен двухфакторный дисперсионный анализа ANOVA с апостериорным критерий Даннетта.

Показано, что после однократной интраназальной иммунизации рекомбинантным штаммом A/PR8/NS-F, доля цитокин-продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов при специфической стимуляции была выше, чем в контрольной группе животных ($p = 0.0569$). Остальные векторы демонстрировали низкую способность формировать полифункциональные Т хелперы.

Проведенные исследования В- и CD4+ Т-клеточного иммунного ответа позволяют выделить штамм A/PR8/NS-F, как наиболее иммуногенный из сконструированных, хотя это противоречит принятой догме о цитозольной и ядерной локализации белка NS1.

8. Конструирование гриппозного вектора с люциферазным репортером для изучения механизма поверхностной экспрессии белка NS1.

Проведенные исследования позволили выделить вектор A/PR8/NS-F, как самый перспективный вакцинный кандидат. Иммунизация сконструированным вектором A/PR8/NS-F достоверно снижала титр PCB в легких, не стимулировала развития патологии в легких зараженных мышей и индуцировала ответ полифункциональных Т-клеток. Также было отмечена, что иммунизация конструкцией A/PR8/NS-F способствует формированию более высокого уровня сывороточных IgG, специфичных к белку NS1 вируса гриппа, чем иммунизация вектором

без вставки или другими сконструированными векторами. Это наблюдение побудило нас более тщательно исследовать модель конструкции A/PR8/NS-F и изучить вероятность выхода белка NS1, ассоциированного с трансгеном, на поверхность клетки.

Для дальнейших исследований нами был сконструирован люциферазный вектор A/PR8-NS124-Luc со вставкой последовательности белка люциферазы NanoLuc [37], идентичный инструкции вектора A/PR8/NS-F. Нуклеотидная последовательность, кодирующая люциферазу NanoLuc, была оптимизирована по GC-составу для экспрессии в составе гриппозного вектора и сшита с укороченной до 124 аминокислот N-концевой областью NS1 белка вируса гриппа A/PR/8/1934 (H1N1). Гетерологичная последовательность не содержала в себе никаких секреторных сигналов. Карты гена и белка представлены на рисунке 14.

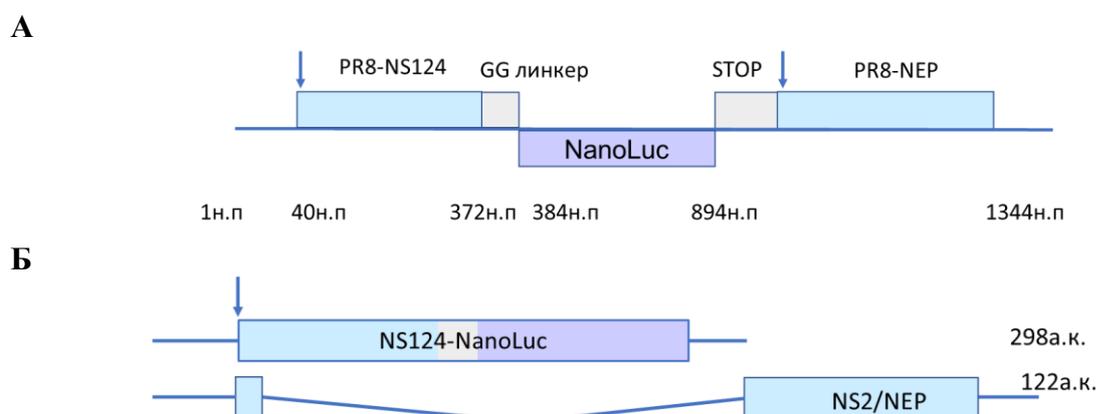


Рисунок 14 – Схематическое представление модифицированного геномного сегмента NS вируса A/PR8-NS124-Luc (А) и синтезируемого с него белка (Б).

Для сборки гриппозного вектора A/PR8-NS124-Luc проводили трансфекцию клеток Vero [29] плазмидами, кодирующими белки вируса гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) и модифицированной плазмидой, кодирующей репортерный белок. Полученный люциферазный вектор A/PR8-NS124-Luc был генетически стабилен и обладал высокими репродуктивными характеристиками в РКЭ ($8,28 \pm 0,29 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл), Vero ($7,59 \pm 0,63 \log_{10}$ ТИД₅₀/мл) и MDCK ($7,75 \pm 0,43 \log_{10}$ ТИД₅₀/мл).

Для оценки экспрессии трансгена NanoLuc штаммом A/PR8-NS124-Luc культуры клеток Vero и A549 заражали в дозе 0,005 ТИД₅₀/клетку. Люциферазную активность оценивали в супернатантах и клеточных лизатах в течение 24 ч после заражения. Результаты представлены на рисунке 15.

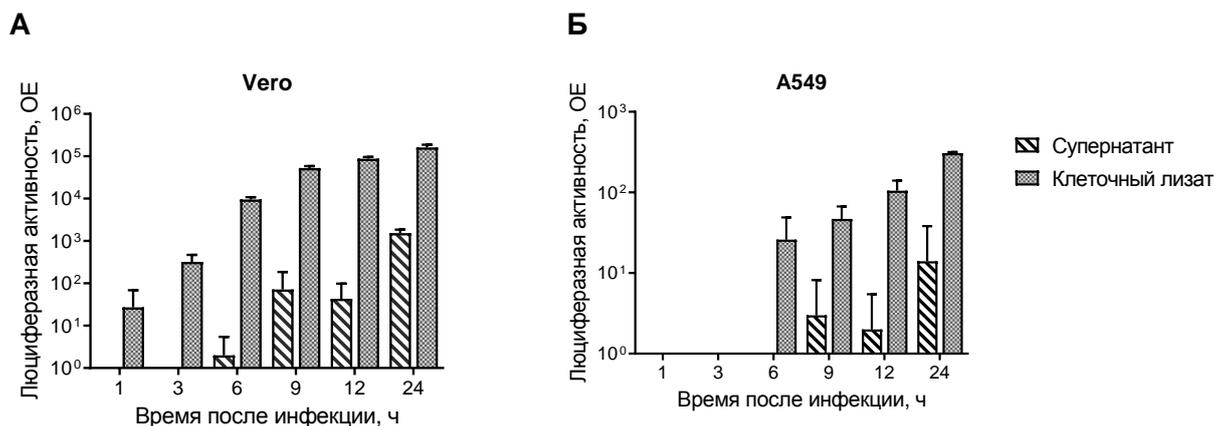


Рисунок 15 – Люциферазная активность репортерного штамма A/PR8-NS124-Luc. Люциферазный сигнал был измерен в супернатанте и клеточном лизате на ранних этапах инфекции в клеточных культурах Vero (А) и A549 (Б). Клетки заражали в дозе 0,005 ТИД₅₀/клетку и инкубировали при 37 °С.

Биолюминесцентный сигнал в зараженной культуре клеток удалось зафиксировать как в клеточном лизате, так и в супернатанте. В супернатанте инфицированных клеток Vero и A549 сигнал был обнаружен уже через 6 и 9 часов после инфекции соответственно. К 24 часам сигнал нарастал и в супернатанте и в клеточном лизате для обеих клеточных культур.

Чтобы проверить гипотезу *in vivo*, мышей линии BALB/c заражали интраназально в дозе 6 lgТИД₅₀/мышь и через 12, 24 и 48 часов после инфекции оценивали репродуктивную и люциферазную активность вируса в гомогенатах легких, БАЛ и сыворотке. Для оценки виремии сыворотку исследовали на присутствие вирусной РНК, используя ОТ-ПЦР в реальном времени. В качестве контрольного вируса в эксперименте был использован вектор PR8-NS124. Результаты представлены на рисунке 16.

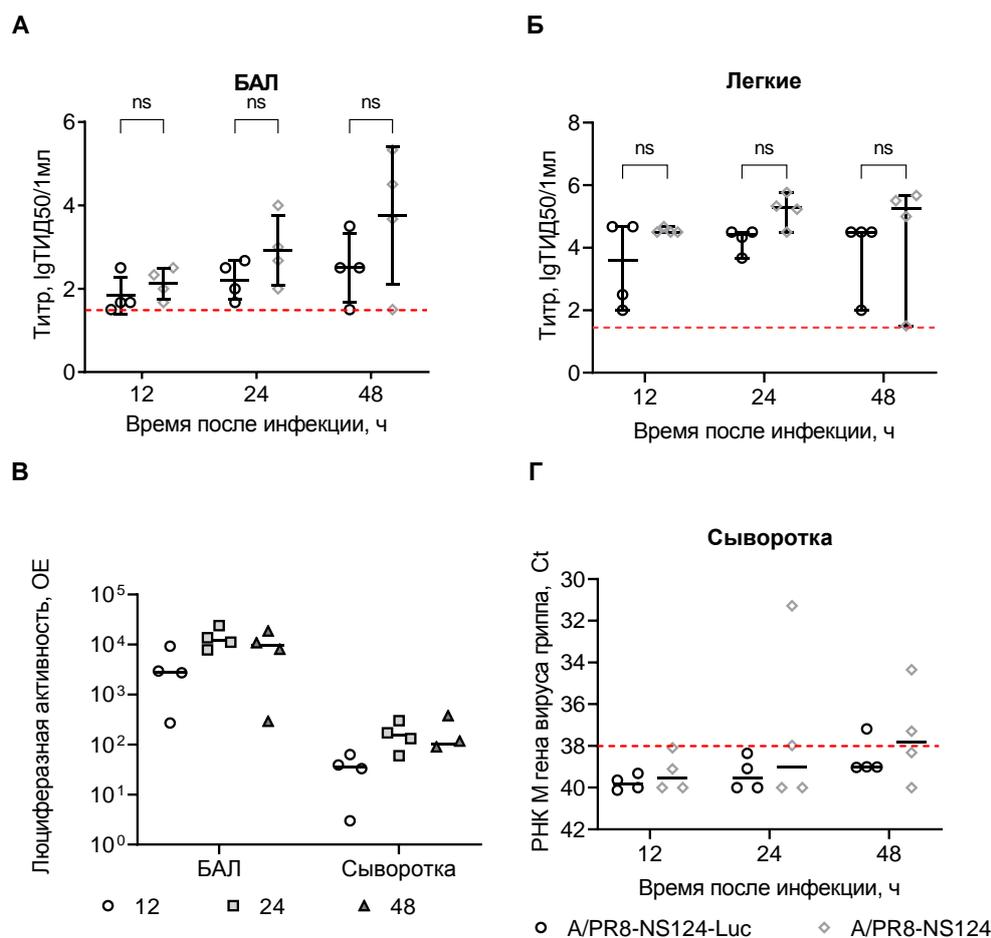


Рисунок 16 – Определение присутствия вируса в органах зараженных мышей. Вирусная нагрузка в БАЛ (А) и легких (Б) мышей, зараженных рекомбинантными вирусами A/PR8-NS124-Luc (черные круги) и A/PR8-NS124 (серые ромбы). Различия между группами анализировали двухфакторным дисперсионным анализом с пост-тестом Бонферрони. Красной линией обозначен предел чувствительности метода. (В) Измерение люциферазной активности в БАЛ и сыворотке. (Г) Наличие РНК вируса гриппа в сыворотке. Все образцы со значениями Ct выше красной пунктирной линии ($Ct_{max} = 38$) считаются положительными на вирус гриппа А.

Статистически значимых различий в репродукции репортерного штамма A/PR8-NS124-Luc и пустого вектора A/PR8-NS124 в БАЛ и ткани легких мышей обнаружено не было. Люциферазный сигнал в БАЛ и сыворотке зараженных мышей был детектирован у всех животных уже через 12 часов, но вирусная РНК в группе мышей, зараженных репортерным штаммом, была обнаружена лишь у одной мыши через 48 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 белок NS1 с трансгеном NanoLuc.

Чтоб исследовать механизм транспорта белка NS1 на поверхность клетки, была проведена серия трансфекций клеток Vero различной комбинацией плазмид, кодирующих гены и белки вируса гриппа A/PR/8/1934 (H1N1). Накопление репортерного белка в супернатанте клеток оценивали через 18 часов после отмывки. Для трансфекции были использованы следующие

комбинации плазмид: 1) NS-Luc; 2) NS-Luc + NP; 3) NS-Luc + POL (PB2, PB1, PA); 4) NS-Luc + NP + POL; 5) NS-Luc + M; 6) NS-Luc + NP + M + POL. Результаты представлены на рисунке 17.

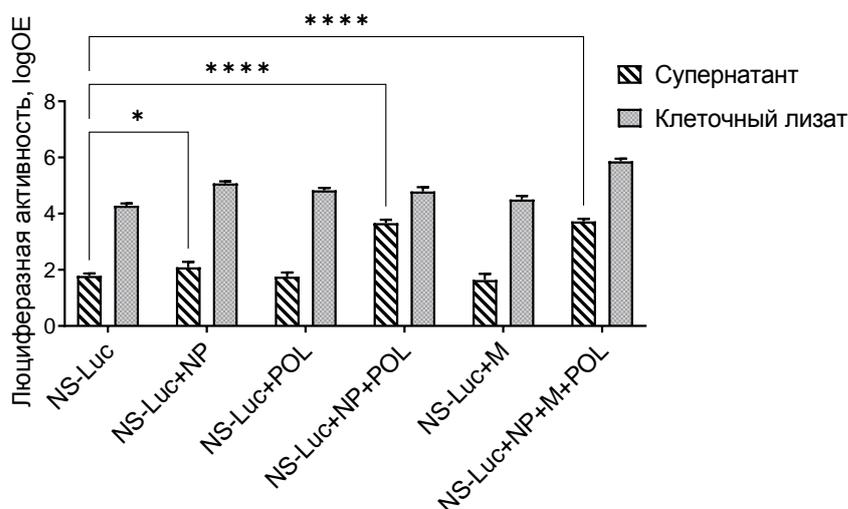


Рисунок 17 – Накопление белка NS-Luc в супернатанте и клеточном лизате за 18 часов. Для сравнения групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Даннета (* <0,05, **** <0,0001).

Было показано, что присутствие в клетках полного РНП-комплекса, состоящего из белков PB2, PB1, PA и NP, способствовало увеличению люциферазного сигнала в супернатанте клеток в 100 раз. Проведенные исследования позволяют предположить, что выход укороченного белка NS1 из клетки происходит посредством взаимодействия с РНП-комплексом.

Обнаружение репортерного штамма A/PR8-NS124-Luc, повторяющего конструкцию A/PR8/NS-F, во внеклеточном пространстве предполагает, что формирование Т-хелперного и антительного ответа к трансгенам, ассоциированным с белком NS1, может осуществляться за счет механизмов доставки небольшого количества неструктурного белка NS1 за пределы зараженных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЫВОДЫ

1. Сконструированы пять различных вариантов гриппозных векторов, экспрессирующих участки F-белка РСВ. Дизайн модифицированных геномных сегментов NS различался наличием или отсутствием сигнальной последовательности IgK и расположением трансгена по отношению к последовательности, кодирующей белок NS1.

2. Дизайн геномных сегментов NS не оказал влияния на генетическую стабильность и ростовые характеристики полученных векторов.

3. Вставка сигнала IgK в последовательность гена NS способствует снижению уровня детектируемого белка Fs в зараженных клетках.

4. Полученные векторы характеризуются различным уровнем аттенуации для мышей линии BALB/c, но являются более аттенуированными, чем вектор без вставки.

5. Иммунизация сконструированными векторами в различной степени снижает вирусную нагрузку в легких мышей при заражении РСВ. Снижение титра вируса в легких мышей не коррелирует с развитием легочной патологии. Иммунизация векторами, экспрессирующими выбранный участок белка F РСВ и содержащими в своей последовательности сигнал IgK, ведет к формированию легочной патологии, схожей с патологией, возникающей при иммунизации ИФ-РСВ. Однократная иммунизация векторами A/PR8/NS-F и A/PR8/NS-2AF, не содержащими сигнального пептида перед вставкой трансгена Fs, ведет к снижению легочной патологии.

6. Формирование сывороточных IgG, специфичных к F-белку РСВ в ответ на иммунизацию, обнаружить не удалось, при этом CD4⁺ Т-клеточный ответ полифункциональных лимфоцитов был обнаружен при иммунизации мышей вектором A/PR8/NS-F. Оба параметра иммуногенности требуют дальнейшего изучения.

7. Люциферазная активность репортерного вектора A/PR8-NS124-Luc, моделирующего структуру вектора A/PR8/NS-F, обнаруживается во внеклеточном пространстве как *in vitro*, так и *in vivo*. Это является возможным механизмом презентации трансгена для антительного и Т-хелперного ответа к трансгену, ассоциированному с белком NS1. При помощи репортерного гена NS-Luc был продемонстрирован возможный механизм выхода белка NS1 на поверхность клетки, который обуславливается взаимодействием белка NS1 с комплексом РНП вируса гриппа.

Таблица 4 – Сводная таблица кратких характеристик разработанных гриппозных векторов.

Название штамма	Высокая репликативная активность	Экспрессия трансгена Fs	Аттенуация для мышей	Отсутствие гистопатологии	Формирование специфичных к Fs IgG	Полифункциональные CD4+ лимфоциты	Снижение титра репликации РСВ
PR8/NS-F	+	+	+	+	?	+	+
PR8/NS-2AF	+	+	+	+	?	-	+
PR8/NS-2AKF	+	+	-	+	?	-	+
PR8/2AKF-NS	+	-	-	-	?	-	+
PR8/2AKFS-NS	+	-	+	-	?	-	-

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Respiratory syncytial virus activity—United States, July 2008–December 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59:230–233.
2. Falsey AR, McElhaney JE, Beran J et al. Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. *J Infect Dis*. 2014 Jun 15;209(12):1873-81. doi: 10.1093/infdis/jit839. Epub 2014 Jan 29. PMID: 24482398; PMCID: PMC4038137.
3. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 May 1;375(9725):1545-55. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60206-1. PMID: 20399493; PMCID: PMC2864404.
4. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, et al. RSV Global Epidemiology Network. 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. *Lancet*. 2017 Sep 2;390(10098):946-958. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30938-8. Epub 2017 Jul 7. PMID: 28689664; PMCID: PMC5592248.
5. Agha R, Avner JR. Delayed Seasonal RSV Surge Observed During the COVID-19 Pandemic. *Pediatrics*. 2021 Jun 9:e2021052089. doi: 10.1542/peds.2021-052089. Epub ahead of print. PMID: 34108234.
6. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969 Apr;89(4):422-34. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120955. PMID: 4305198.
7. Domachowske JB, Anderson EJ, Goldstein M. The Future of Respiratory Syncytial Virus Disease Prevention and Treatment. *Infect Dis Ther*. 2021;10(Suppl 1):47-60. doi:10.1007/s40121-020-00383-6
8. Lee YN, Hwang HS, Kim MC, et al. Recombinant influenza virus expressing a fusion protein neutralizing epitope of respiratory syncytial virus (RSV) confers protection without vaccine-enhanced RSV disease. *Antiviral Res*. 2015 Mar;115:1-8. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.12.009. Epub 2014 Dec 13. PMID: 25513755; PMCID: PMC4323669.
9. Impact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*. 1998;102(3):531–537.
10. McLellan J.S., Chen M., Chang J.S., et al. Structure of a major antigenic site on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in complex with neutralizing antibody 101F. *J Virol*. 2010; 84(23): 12236-44.

11. Swanson K.A., Settembre E.C., Shaw C.A., et al. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(23): 9619-24.
12. Murphy BR, Olmsted RA, Collins PL., et al. Passive transfer of respiratory syncytial virus (RSV) antiserum suppresses the immune response to the RSV fusion (F) and large (G) glycoproteins expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol*. 1988 Oct;62(10):3907-10. doi: 10.1128/JVI.62.10.3907-3910.1988. PMID: 3047432; PMCID: PMC253544.
13. Sereinig S, Stukova M, Zabolotnyh N., et al. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Aug;13(8):898-904. doi: 10.1128/CVI.00056-06. PMID: 16893990; PMCID: PMC1539114.
14. Stukova MA, Sereinig S, Zabolotnyh NV., et al. Vaccine potential of influenza vectors expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006 May-Jul;86(3-4):236-46. doi: 10.1016/j.tube.2006.01.010. PMID: 16677861.
15. Kittel C, Ferko B, Kurz M., et al. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol*. 2005 Aug;79(16):10672-7. doi: 10.1128/JVI.79.16.10672-10677.2005. PMID: 16051859; PMCID: PMC1182655.
16. García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*. 1998 Dec 20;252(2):324-30. doi: 10.1006/viro.1998.9508. PMID: 9878611.
17. Stasakova J, Ferko B, Kittel C., et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol*. 2005 Jan;86(Pt 1):185-195. doi: 10.1099/vir.0.80422-0. PMID: 15604446.
18. Vasilyev K.A., Yukhneva M.A., Shurygina A.S., et al. Enhancement of the immunogenicity of influenza A virus by the inhibition of immunosuppressive function of NS1 protein. *Microbiology Independent Research Journal (MIR Journal)*. 2018;5(1):48-58.
19. Openshaw PJM, Chiu C, Culley FJ, Johansson C. Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr 26;35:501-532. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052206. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28226227.
20. <https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>
21. De Baets S, Schepens B, Sedeyn K, et al. Recombinant influenza virus carrying the respiratory syncytial virus (RSV) F85-93 CTL epitope reduces RSV replication in mice. *J Virol*. 2013 Mar;87(6):3314-23. doi: 10.1128/JVI.03019-12. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23302879; PMCID: PMC3592148.

22. Zhang P, Gu H, Bian C, et al. Characterization of recombinant influenza A virus as a vector expressing respiratory syncytial virus fusion protein epitopes. *J Gen Virol.* 2014 Sep;95(Pt 9):1886-1891. doi: 10.1099/vir.0.064105-0. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24914066.
23. Bian C, Liu S, Liu N, et al. Influenza virus vaccine expressing fusion and attachment protein epitopes of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in BALB/c mice. *Antiviral Res.* 2014 Apr;104:110-7. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.01.022. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24509239.
24. Третьяк Т.С., Исакова-Сивак И.Н., Кореньков Д.А., и др. Анализ ростовых характеристик векторных вакцин против респираторно-синцитиального вируса, *Медицинский Академический журнал*, том 16 №4, 2016, с.171-172.
25. Kotomina T, Korenkov D, Matyushenko V, et al. 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. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(12):2964-2970. doi: 10.1080/21645515.2018.1502529. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30024831; PMCID: PMC6343631.
26. Fonseca W, Ozawa M, Hatta M, et al. A recombinant influenza virus vaccine expressing the F protein of respiratory syncytial virus. *Arch Virol.* 2014 May;159(5):1067-77. doi: 10.1007/s00705-013-1932-z. Epub 2013 Dec 1. PMID: 24292020; PMCID: PMC4013198.
27. Kinnear E, Lambert L, McDonald JU, et al. Airway T cells protect against RSV infection in the absence of antibody. *Mucosal Immunol.* 2018 Jan;11(1):249-256. doi: 10.1038/mi.2017.46. Epub 2017 May 24. Erratum in: *Mucosal Immunol.* 2017 Aug 30;: PMID: 28537249.
28. Zens KD, Chen JK, Farber DL. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection. *JCI Insight.* 2016 Jul 7;1(10):e85832. doi: 10.1172/jci.insight.85832. PMID: 27468427; PMCID: PMC4959801.
29. Hoffmann E, Webster RG. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *J Gen Virol.* 2000 Dec;81(Pt 12):2843-2847. doi: 10.1099/0022-1317-81-12-2843. PMID: 11086114.
30. Zhou B., Donnelly M.E., Scholes D.T. et al. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. *J Virol.* 2009; 83(19):10309-13.
31. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 1938; 27(3), 493-7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
32. Krivitskaya V. Z., Sorokin E. V., Tsareva T. R., et al. Generation and Characterization of the Monoclonal Antibody Panel Specific to the NS1 Protein of the Influenza A Virus. *Appl Biochem Microbiol* (2018) 54: 756. doi: 10.1134/S0003683818070049.

33. Кривицкая В.З., Петрова Е.Р., Сорокин Е.В., и др. Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу. Биотехнология. 2016. Т. 32. № 1. С. 65-75.
34. Sergeeva M; Romanovskaya-Romanko E; Zabolotnyh N; et al. Mucosal Influenza Vector Vaccine Carrying TB10.4 and HspX Antigens Provides Protection against Mycobacterium tuberculosis in Mice and Guinea Pigs. Vaccines 2021, 9, 394.
35. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607.
36. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. Vaccine. 2017 Jan 11;35(3):469-480. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.11.054. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27908639; PMCID: PMC5244256.
37. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. ACS Chem Biol. 2012 Nov 16;7(11):1848-57. doi: 10.1021/cb3002478. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22894855; PMCID: PMC3501149.

Аспирант _____ Пулькина Анастасия Александровна