На правах рукописи

Литвинова Виктория Руслановна

Разработка экспериментальных вакцин на основе нуклеиновых кислот против высокопатогенного гриппа подтипа H5N8

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2026

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:	**Рудометов Андрей Павлович** кандидат биологических наук, и.о. заведующего отделом биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Официальные оппоненты:	**Васин Андрей Владимирович** доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, директор Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого **Денисов Евгений Владимирович** доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе НИИ онкологии Томского НИМЦ, заведующий лабораторией биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии Томского НИМЦ
Ведущая организация:	ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Защита состоится «05» февраля 2027 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора http://www.vector.nsc.ru.

Автореферат разослан «____» _____202_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент Ильичёва Т.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка вакцин для профилактики заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа A (H5) клады 2.3.4.4b, является актуальной задачей из-за опасений по поводу его пандемического потенциала. По состоянию на 7 июля 2026 года зафиксировано 1000 случаев заражения человека, из которых 479 привели к смертельному исходу (смертность составила 47,9 %). Сообщалось о случаях заражения данным вирусом более 70 видов диких и домашних млекопитающих, в частности близко контактирующих с человеком, например крупного рогатого скота, кошек и свиней. Также заражение высокопатогенным вирусом птичьего гриппа A (H5) привело к гибели или выбраковке более 633 миллионов голов домашней птицы во всем мире в период с 2005 по 2024 год, что нанесло серьезный экономический ущерб птицеводческой отрасли. Дальнейшая циркуляция высокопатогенного вируса гриппа A (H5) среди птиц и млекопитающих представляет угрозу появления нового варианта вируса, способного передаваться от человека к человеку, и приводит к появлению опасений по поводу возможной пандемии. В связи с этим ВОЗ призывает к активизации усилий по разработке соответствующих вакцин.

Основным поверхностным белком вируса гриппа является гемагглютинин. Он служит мишенью для нейтрализующих антител, которые блокируют проникновение вируса в клетку, и по этой причине является основным компонентом вакцин против гриппа. Важным условием обеспечения высокой эффективности вакцин на основе гемагглютинина является стабилизация белка-иммуногена в нативной префузионной конформации. Для этого используется ряд модификаций нативной последовательности: мутации в pH-чувствительных областях гемагглютинина, замена сайта протеолиза, добавление тримеризующего домена и другие. Сочетание таких модификаций позволяет правильно представить антиген иммунной системе.

Из-за высокой изменчивости вируса гриппа возникает потребность в разработке новых типов вакцинных платформ. Наиболее перспективными из них являются вакцины на основе нуклеиновых кислот – мРНК- и ДНК-вакцины. Эти вакцины обладают рядом важных преимуществ перед другими типами вакцин, включая стимуляцию гуморального и Т-клеточного ответа, скорость разработки, а также относительную простоту и универсальность крупномасштабного производства. Вакцины на основе нуклеиновых кислот не вызывают нежелательного антивекторного иммунного ответа, характерного для вакцин на основе вирусных векторов. Таким образом, вакцины на основе нуклеиновых кислот отличаются удобным производством, высокой безопасностью и эффективной активацией иммунного ответа, что делает их

подходящим инструментом для борьбы с заболеванием, вызываемым высокопатогенным вирусом гриппа А (H5).

Цель данной работы заключалась в разработке экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин против заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа А (H5), и анализе их иммуногенных и протективных свойств.

Задачи исследования

1. Провести дизайн иммуногенов на основе гемагглютинина вируса гриппа А (H5) клады 2.3.4.4b и получить экспериментальные ДНК-вакцины, кодирующие спроектированные иммуногены.
2. Провести сравнительный анализ иммуногенности экспериментальных ДНК-вакцин, введенных методом струйной инжекции, на мышах линии BALB/c.
3. Провести расширенный анализ иммуногенных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5: изучить дозозависимый эффект, исследовать формирование Т-клеточного иммунного ответа и изучить протективные свойства ДНК-вакцины в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).
4. Сконструировать ДНК-матрицу pVAX-Cas1CC-H5, кодирующую последовательность модифицированного гемагглютинина вируса гриппа А (H5); с использованием ДНК-матрицы провести синтез мРНК mRNA-H5, инкапсулировать синтезированную мРНК в липидные наночастицы.
5. Исследовать формирование гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на мРНК-вакцину mRNA-H5, вводимую мышам линии BALB/c с помощью струйной инжекции и в составе липидных наночастиц; изучить протективные свойства mRNA-H5 в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

Научная новизна, теоретическая и практическая ценность работы

Спроектирован иммуноген H5, представляющий собой модифицированный гемагглютинин штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) со стабилизирующими мутациями. На основе иммуногена H5 получена экспериментальная ДНК-вакцина pVAX-H5, обеспечивающая внутриклеточный синтез белка-антигена – гемагглютинина высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа А (H5N8). Показано, что введение ДНК-вакцины pVAX-H5, кодирующей спроектированный иммуноген H5, приводит к формированию гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей линии BALB/c и обеспечивает защиту животных от гибели при заражении штаммами вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020

(H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1). Получен патент на изобретение РФ № 2832515 от 24.12.2024.

На основе иммуногена H5 получена ДНК-матрица pVAX-Cas1CC-H5 и экспериментальная мРНК-вакцина mRNA-H5, обеспечивающая внутриклеточный синтез белка-антигена – гемагглютинина высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа A (H5N8). Показаны иммуногенные и протективные свойства mRNA-H5 в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) на мышах линии BALB/c.

Данная работа имеет значительную практическую ценность, поскольку разрабатываемые вакцины могут быть использованы как для людей в случае возникновения эпидемиологической угрозы, так и в ветеринарии для профилактики заболевания птиц. Технология получения вакцин на основе нуклеиновых кислот позволит быстро реагировать на возникновение пандемии, вызванной вирусом гриппа A (H5), поскольку в случае необходимости дает возможность быстро проводить замену целевого гена без изменения технологии производства.

Положения, выносимые на защиту

1. Последовательность гена H5, кодирующая модифицированный гемагглютинин вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) со стабилизирующими мутациями, обеспечивает правильную презентацию иммуногена иммунной системе.
2. Экспериментальная ДНК-вакцина pVAX-H5, вводимая методом струйной инжекции, обеспечивает формирование гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей линии BALB/c и защищает животных от гибели при заражении 50 $ЛД_{50}$ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).
3. Экспериментальная мРНК-вакцина mRNA-H5, кодирующая ген H5, вводимая методом струйной инжекции и в составе липидных наночастиц, обеспечивает формирование гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей линии BALB/c и защищает животных от гибели при заражении 20 $ЛД_{50}$ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждается повторяемостью и воспроизводимостью, использованием статистического анализа данных. Результаты диссертации представлены в 17 публикациях: 5 статей в рецензируемых научных журналах, в том числе входящих в перечень ВАК и соответствующих специальности Молекулярная биология, 11 тезисов

докладов на всероссийских и международных конференциях, получен 1 патент РФ на изобретение.

Результаты диссертации представлены на 11 международных и российских конференциях, в том числе на X Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков OpenBio (Кольцово, Россия, 2023 год), на X Юбилейном Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (г. Санкт-Петербург, Россия, 2024 год, доклад отмечен первым местом в конкурсе молодых ученых), на Гомельском международном конгрессе «Инфекционные болезни, микробиология и иммунология» (г. Гомель, Беларусь, 2025 год).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа включает введение, литературный обзор, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 105 страницах, включает 32 рисунка, 4 таблицы. Список литературы состоит из 162 источников.

Личный вклад автора

Все молекулярно-биологические работы, включающие клонирование, получение и наработку экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин, анализ экспрессии целевых генов в составе ДНК-вакцин методами ОТ-ПЦР и вестерн-блот анализа, а также статистическая обработка полученных данных выполнены лично автором. Дизайн иммуногенов, работа с клеточными культурами, иммунизация лабораторных животных, анализ иммуногенности вакцин методами ИФА и ELISpot выполнены при участии автора сотрудниками отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора. Работа с живым вирусом в реакции вируснейтрализации и в анализе протективных свойств вакцин выполнена сотрудниками отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Секвенирование полученных ДНК-конструкций проведено сотрудниками центра коллективного пользования «Геномика» Института химический биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Благодарность

- Сотрудникам отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
- Сотрудникам отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
- Сотрудникам отдела микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
- Сотрудникам ЛБМХ ИХБФМ СО РАН

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. В литературном обзоре представлено описание современных вакцинных платформ, предназначенных для борьбы с заболеванием, вызываемым вирусом гриппа А (H5). Приведена краткая классификация и история появления вируса гриппа А (H5), описаны вакцинные платформы на основе нуклеиновых кислот, подходы к дизайну вакцин и их преимущества и недостатки. Также рассматриваются различные способы стабилизации целевого иммуногена для правильного представления иммунной системе.

Материалы и методы. Работа выполнена с использованием современных экспериментальных методов, в том числе были использованы методы биоинформатического анализа, молекулярно-биологические методы, методы иммунохимии, работы с клеточными культурами и работы с лабораторными животными. Статистическая обработка данных была проведена с помощью непараметрических методов анализа.

Результаты исследования и обсуждение результатов. Данная глава посвящена разработке ДНК- и мРНК-вакцин для борьбы с заболеванием, вызываемым вирусом гриппа А (H5). Описан дизайн иммуногенов, получение ДНК- и мРНК-вакцин, анализ их иммуногенных и протективных свойств.

Дизайн иммуногенов для ДНК- и мРНК-вакцин

Гемагглютинин (HA) вируса гриппа является основным действующим веществом современных лицензированных противогриппозных вакцин. В данной работе для исследований был выбран ген, кодирующий HA вируса гриппа птиц штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), циркулировавший в России в Ставропольском крае в 2020 году среди сельскохозяйственной птицы и гомологичный по гемагглютинину штамму A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), рекомендованному ВОЗ в качестве вакцинного. При проектировании аминокислотной последовательности иммуногена на основе HA в природную последовательность HA были внесены аминокислотные замены. При выборе аминокислотных мутаций мы опирались в том числе на литературные данные, полученные для других штаммов вируса гриппа А. Для стабилизации тримера HA в области pH-переключателей субъединицы HA2 были внесены следующие замены аминокислотных остатков: положительно заряженные аминокислоты H26, K51 и E103 были заменены на нейтрально заряженные W26, I51 и I103. Также H25 в субъединице HA2 был заменен на R25; R25 является высококонсервативным остатком и входит в состав важного эпитопного участка, узнаваемого широко нейтрализующими антителами.

Дополнительно для стабилизации тримера на С-конец был добавлен тримеризующий домен фибритина бактериофага T4, способствующий формированию гомотримеров гемагглютинина, с линкером GSG. Нативный

сайт протеолиза гемагглютинина вируса ВППГ KRRKR был заменен на сайт протеолиза KQTR из последовательности гемагглютинина вируса гриппа подтипа A (H3) для обеспечения меньшей эффективности расщепления HA на субъединицы. Для получения секретируемого растворимого продукта из последовательности были удалены трансмембранный и цитоплазматический домены; сигнальный пептид MENIVLLLAIVSLVK, обеспечивающий секрецию целевого белка, был взят из нативной последовательности гемагглютинина вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). В результате была спроектирована последовательность гена, кодирующего модифицированный гемагглютинин вируса гриппа A (H5N8), обозначенная как H5. Схема спроектированного иммуногена и модель спроектированного белка представлены на рисунке 1.

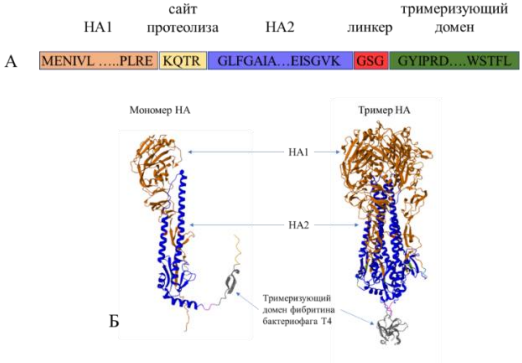


Рисунок 1 – Структура модифицированного гемагглютинина вируса гриппа A (H5N8). А – Схема аминокислотной последовательности иммуногена. HA1 – головной домен гемагглютинина; HA2 – стебель гемагглютинина; тримеризующий домен – тримеризующий домен фибритина бактериофага T4. Б – Моделирование структуры спроектированного гемагглютинина вируса гриппа A (H5N8). Оранжевым цветом обозначен головной домен гемагглютинина (субъединица HA1), синим цветом обозначен стебель гемагглютинина (субъединица HA2), зеленым обозначен тримеризующий домен фибритина бактериофага T4.

Интересным направлением является разработка вакцины, способной обеспечивать защиту против широкого спектра штаммов вируса гриппа. Стебель гемагглютинина содержит консервативные эпитопы, узнавание которых может приводить к формированию защитного иммунного ответа против различных подтипов вируса гриппа. Поэтому на основе гена H5 также была получена последовательность, кодирующая стебель гемагглютинина с тримеризующим доменом (обозначенная как H5 stebl). Также для оценки влияния на иммуногенность добавления к последовательности тримеризующего домена фибритина бактериофага T4 была получена

последовательность, кодирующая тот же фрагмент гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8), что и в последовательности H5, но без тримеризующего домена (обозначенная как H5 delT4).

Последовательности H5, H5 stebl и H5 delT4 были клонированы в составе вектора pVAX1, и таким образом были получены генетические конструкции pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4.

Анализ экспрессии целевых генов в составе полученных ДНК-вакцин

Экспрессия целевых генов в составе полученных плазмид была исследована путем трансфекции эукариотических клеток HEK293 плазмидами pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4 и последующего анализа трансфицированных клеток и культуральной среды методами ОТ-ПЦР и вестерн-блот анализа соответственно. Размеры продуктов ОТ-ПЦР соответствовали теоретически рассчитанным размерам спроектированных генов – ~1650 п. о., ~1600 п. о. и ~750 п. о. (рисунок 2А). Вестерн-блот анализ показал наличие целевого белка в культуральной среде по подвижности продукта на уровне 75 kDa после трансфекции клеток плазмидами pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 (рисунок 2Б). По итогам анализа экспрессии было показано, что плазмиды pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 обеспечивают синтез целевой РНК и целевых белков в эукариотических клетках.

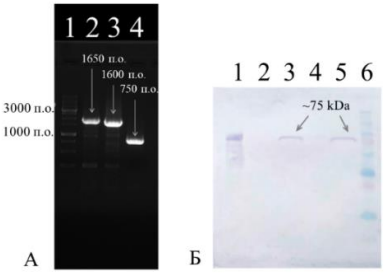


Рисунок 2 – Анализ экспрессии целевых генов в составе плазмид pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4. А – Электрофореграмма разделения продуктов ОТ-ПЦР. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2 – продукты ОТ-ПЦР, полученные с тотальной РНК из клеток, трансфицированных плазмидой pVAX-H5, 3 – продукты ОТ-ПЦР, полученные с тотальной РНК из клеток, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 delT4, 4 – продукты ОТ-ПЦР, полученные с тотальной РНК из клеток, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 stebl. Б – Вестерн-блот анализ. 1 – рекомбинантный белок гемагглютинина HA/H5 вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), 2 – культуральная среда с чистых клеток HEK293, 3 – культуральная среда с клеток HEK293, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 delT4, 4 – культуральная среда с клеток HEK293, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 stebl, 5 – культуральная среда с клеток HEK293, трансфицированных плазмидой pVAX-H5, 6 – маркер молекулярных масс Precision Plus Protein Dual Color Standards.

Анализ иммуногенных и протективных свойств полученных ДНК-вакцин

Для анализа иммуногенности полученных экспериментальных ДНК-вакцин была проведена иммунизация лабораторных животных (мыши линии BALB/c) полученными ДНК-конструкциями. Экспериментальные ДНК-вакцины вводили животным методом безыгольной струйной инжекции (СИ). СИ представляет собой внутрикожную инъекцию под высоким давлением и обеспечивает высокую проницаемость клеточной мембраны для нуклеиновых кислот, что значительно повышает иммуногенность вакцины.

После двукратной иммунизации сыворотки животных были исследованы в ИФА, в качестве антигена для ИФА был использован рекомбинантный гемагглютинин HA/H5. Титры специфических антител были выявлены в группах животных, иммунизированных ДНК-конструкциями pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4; средние титры составили 1:219000 и 1:73000 соответственно (рисунок 3А). Далее сыворотки иммунизированных мышей были исследованы в реакции вируснейтрализации на культуре клеток MDCK-SIAT1. В результате было установлено, что сыворотки животных, иммунизированных ДНК-вакцинами pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4, способны нейтрализовать живой вирус гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); средний 50 % нейтрализующий титр составил 1:7700 и 1:4000 соответственно (рисунок 3Б). Так, показано, что экспериментальные ДНК-вакцины pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 индуцируют у иммунизированных животных формирование специфических к рекомбинантному гемагглютинину антител, обладающих вируснейтрализующей активностью.

В группе животных, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAX-H5 stebl, не было показано формирования специфических к гемагглютинину антител. Отсутствие гуморального иммунного ответа согласуется с результатами вестерн-блот анализа, показавшими, что целевой белок, продуцируемый с ДНК-конструкции pVAX-H5 stebl, не транслируется или не выходит из клетки с достаточной эффективностью. Также есть данные, что при удалении головного домена гемагглютинина из нативной последовательности требуется оптимизация аминокислотной последовательности для формирования правильной конформации целевого белка-иммуногена на основе стебля HA.

По результатам эксперимента для дальнейшей работы была выбрана конструкция pVAX-H5, несущая модифицированный гемагглютинин вируса гриппа A (H5N8) с тримеризующим доменом, так как в случае pVAX-H5 наблюдалась тенденция к увеличению титра специфических к гемагглютинину и вируснейтрализующих антител.

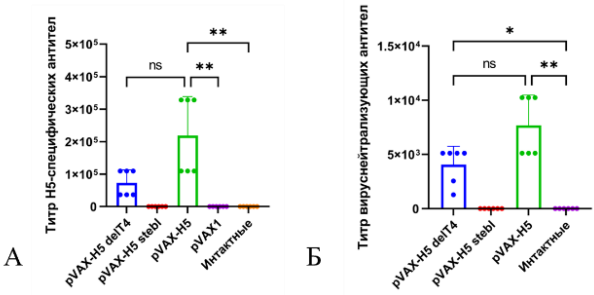


Рисунок 3 – Анализ иммуногенности ДНК-конструкций pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4 на мышах линии BALB/c. pVAX-H5 delT4 – группа животных, иммунизированных ДНК-конструкцией pVAX-H5 delT4; pVAX-H5 stebl – группа животных, иммунизированных ДНК-конструкцией pVAX-H5 stebl; pVAX-H5 – группа животных, иммунизированных ДНК-конструкцией pVAX-H5; pVAX1 – группа животных, иммунизированных вектором pVAX1; Интактные – группа животных, не подвергавшихся никаким манипуляциям. А – Результаты ИФА сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных ДНК-конструкциями, кодирующими гемагглютинин вируса гриппа и его фрагменты. Данные представлены как среднее ± с. о. Б – Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Данные представлены как среднее ± с. о (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Следующим этапом работы стало исследование дозозависимого эффекта ДНК-вакцины pVAX-H5. Мыши линии BALB/c были дважды иммунизированы 1, 10, 50, 100 или 200 мкг pVAX-H5 с использованием СИ. Все дозы вакцины pVAX-H5 вызывали формирование специфических антител к рекомбинантному гемагглютинину HA/H5 вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (рисунок 4А). Средние титры для разных доз составили: 1 мкг – 1:11000, 10 мкг – 1:30000, 50 мкг – 1:61000, 100 мкг – 1:70000, 200 мкг – 1:30000. Все дозы вакцины вызывали также формирование нейтрализующих антител в отношении штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (рисунок 4Б). Согласно результатам сравнительного анализа иммуногенности, высокий уровень специфических антител к рекомбинантному гемагглютинину наблюдался при введении дозы 50 мкг и 100 мкг вакцины. Примечательно, что более высокая доза pVAX-H5 (200 мкг) не привела к увеличению титра антител по сравнению с дозой 100 мкг (разница статистически незначима, но в случае с дозой 200 мкг наблюдается тенденция к снижению). Наблюдаемый эффект может быть связан с тем, что чужеродная ДНК обладает адъювантными свойствами и активирует врожденный иммунитет, что, в свою очередь, может негативно влиять на экспрессию целевого гена и на специфическую иммуногенность. Таким образом, увеличение дозы может быть нецелесообразным или даже

вредным в случае с ДНК-вакцинами, вводимыми методом СИ. Исходя из полученных данных для дальнейших исследований была выбрана доза 100 мкг ДНК-вакцины pVAX-H5.

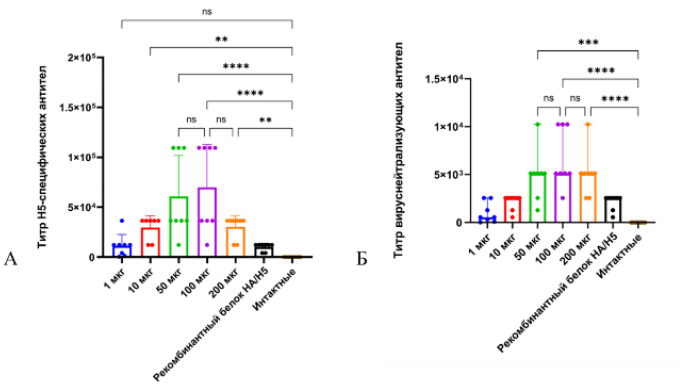


Рисунок 4 – Анализ дозозависимого эффекта pVAX-H5. 1 мкг – группа животных, иммунизированных 1 мкг pVAX-H5; 10 мкг – группа животных, иммунизированных 10 мкг pVAX-H5; 50 мкг – группа животных, иммунизированных 50 мкг pVAX-H5; 100 мкг – группа животных, иммунизированных 100 мкг pVAX-H5; 200 мкг – группа животных, иммунизированных 200 мкг pVAX-H5; Рекомбинантный белок HA/H5 – группа животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5 вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); Интактные – группа животных, не подвергавшихся никаким манипуляциям. А – Результаты ИФА сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных разными дозами ДНК-вакцины pVAX-H5. Данные представлены как среднее ± с. о. Б – Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Данные представлены как медиана с диапазоном (** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$; **** $p < 0{,}0001$).

Далее было проведено подробное исследование формирования гуморального и клеточного иммунного ответа на ДНК-вакцину pVAX-H5, введенную лабораторным животным с помощью СИ в дозе 100 мкг. С помощью ИФА титры специфических антител были выявлены в группе животных, иммунизированных pVAX-H5, средний титр составил 1:97000 (рисунок 5А). С помощью реакции вируснейтрализации было установлено, что сыворотки животных, иммунизированных ДНК-вакциной pVAX-H5, способны нейтрализовать живой вирус гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); средний 50 % нейтрализующий титр составил 1:1600 (рисунок 5Б).

Для оценки способности полученной вакцинной конструкции индуцировать специфический клеточный иммунитет через 14 дней после второй иммунизации у мышей извлекали селезёнки, которые были

гомогенизированы и исследованы с помощью метода ELISpot. Ответ оценивали по способности спленоцитов отвечать выделением IFN-γ на стимуляцию пептидами, входящими в состав НА. С помощью ELISpot было показано, что только в группе мышей, иммунизированных ДНК-вакциной, активируется специфический клеточный иммунитет, выраженный в значительном повышении количества спленоцитов, продуцирующих IFN-γ (рисунок 5В).

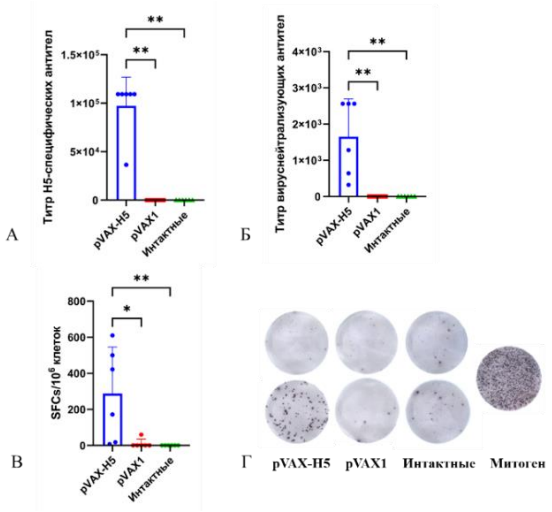


Рисунок 5 – Анализ иммуногенных свойств 100 мкг ДНК-вакцины pVAX-H5. pVAX-H5 – группа животных, иммунизированных pVAX-H5; pVAX1 – группа животных, иммунизированных исходным вектором pVAX1; Интактные – группа животных, не подвергавшихся никаким манипуляциям. А – Результаты ИФА сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных ДНК-вакциной pVAX-H5. Данные представлены как среднее ± с. о. Б – Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Данные представлены как среднее ± с. о. В – Количество спленоцитов, экспрессирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определённое методом ELISpot. Каждый столбик представляет собой среднее число клеток, образующих пятна IFN-γ (SFCs), на миллион стимулированных спленоцитов. Данные представлены как среднее ± с. о. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Г – Репрезентативные изображения лунок ELISpot (верхний ряд: спленоциты, не стимулированные пептидами; нижний ряд: спленоциты, стимулированные пулом пептидов или митогеном).

Таким образом, было показано эффективное формирование вирус-специфического гуморального и клеточного иммунных ответов на ДНК-вакцину pVAX-H5 в дозе 100 мкг у мышей линии BALB/c.

Следующим этапом работы было исследование вируснейтрализующих свойств иммунных сывороток и протективных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5 в отношении различных штаммов вируса гриппа. Сыворотки животных, иммунизированных 100 мкг pVAX-H5, были проанализированы в реакции вируснейтрализации в отношении четырех штаммов вируса гриппа А (H5) клады 2.3.4.4b. В результате было показано, что ДНК-вакцина pVAX-H5 на основе НА штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) вызывала выработку антител, которые нейтрализовали как штамм A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), так и штаммы A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1). Сыворотки реагировали со всеми штаммами вируса, при этом титры в отношении A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1) варьировались от 1:160 до 1:1280. Самые низкие титры нейтрализующих антител были выявлены в отношении вируса гриппа A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) (1:40-1:80), что может быть связано с более низким антигенным сходством этого штамма с вакцинным штаммом (рисунок 6).

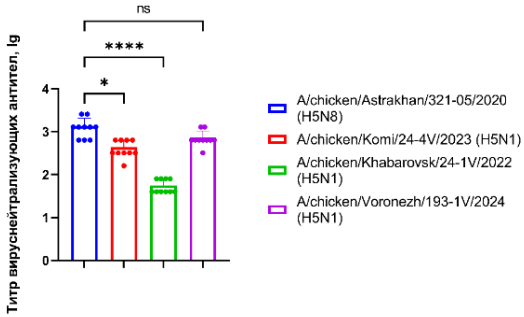


Рисунок 6 – Вируснейтрализующая активность сывороток мышей, иммунизированных 100 мкг ДНК-вакцины pVAX-H5 методом СИ в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1). Данные представлены как среднее ± с. о. (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).

Далее было исследовано защитное действие ДНК-вакцины pVAX-H5 при заражении иммунизированных животных 50 $ЛД_{50}$ штаммов вируса гриппа А (H5) клады 2.3.4.4b. Мыши линии BALB/c были двукратно иммунизированы с помощью СИ. Через 14 дней после второй иммунизации мышей заражали 50 $ЛД_{50}$ штамма вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) или 50 $ЛД_{50}$ штамма вируса гриппа A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1). Все иммунизированные ДНК-вакциной животные после заражения вирусом гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) выжили, и у них отсутствовали

клинические признаки заболевания. При этом животные, иммунизированные вектором pVAX1, погибли или были усыплены из-за сильной (более 20 %) потери веса или неврологических симптомов к 10-му дню после заражения, что свидетельствует об отсутствии у pVAX1 способности активировать неспецифический иммунитет, приводящий к защите животных от гибели. Контрольные животные также погибли или были усыплены к 10-му дню после заражения (рисунок 7А). При заражении летальной дозой штамма вируса гриппа A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) все вакцинированные животные также выжили, в то время как все контрольные животные погибли или были усыплены к 9-му дню после заражения (рисунок 7Б). Эти результаты показывают, что ДНК-вакцина эффективно индуцирует перекрестный защитный иммунитет *in vivo*, который, в частности, был обеспечен эффективным формированием Т-клеточного ответа.

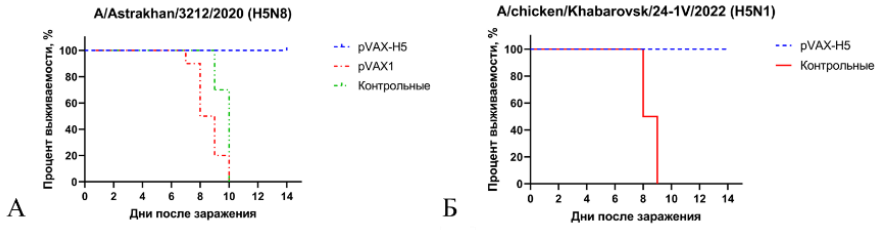


Рисунок 7 – Анализ протективных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5 на гомологичном и гетерологичном штамме вируса гриппа. pVAX-H5 – группа животных, иммунизированных 100 мкг ДНК-вакцины pVAX-H5 с помощью СИ; pVAX1 – группа животных, иммунизированных исходным вектором pVAX1; Контрольные – группа животных, не подвергавшихся иммунизациям. А – Кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8). Б – Кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).

Таким образом, было показано, что ДНК-вакцина pVAX-H5 индуцирует у мышей линии BALB/c формирование высоких уровней гуморального и клеточного иммунных ответов и обеспечивает протективный иммунитет в отношении штаммов A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).

Получение мРНК-вакцины mRNA-H5

Следующий раздел работы посвящен разработке прототипа мРНК-вакцины для профилактики заболевания, вызываемого вирусом гриппа А (H5). В качестве иммуногена была использована та же структура белка НА и кодирующий его ген H5, что и в ДНК-вакцине pVAX-H5.

Для создания мРНК-вакцины необходимо получить ДНК-матрицу, кодирующую ген целевого антигена, с которой будет транскрибироваться мРНК *in vitro*. Для получения ДНК-матрицы спроектированный ген H5 был клонирован в составе экспрессионной кассеты pVAX-Cas1, содержащей нетранслируемые области α-глобина человека, модифицированный T7-промотор (5'-TAATACGACTCACTATAG-3'), необходимый для котранскрипционного присоединения аналога кэпа, область, необходимую для котранскрипционного присоединения поли(А)-хвоста длиной 100 нуклеотидов, и сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линеаризации ДНК-матрицы. В результате была получена ДНК-матрица для синтеза мРНК, названная pVAX-Cas1CC-H5.

Перед синтезом мРНК ДНК-матрица была линеаризована с использованием эндонуклеазы рестрикции EcoRI, продукты рестрикции были проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением целевого продукта размером ~4850 п. о. из геля (рисунок 8А). С линеаризованной ДНК-матрицы был проведен синтез целевой мРНК-вакцины mRNA-H5 с котранскрипционным кэпированием и полиаденилированием и с использованием смеси нуклеотидов с N1-метилпсевдоуридином; продукты синтеза были проверены с помощью электрофореза (рисунок 8Б). Показано, что размер полученной мРНК mRNA-H5 соответствует теоретическому расчету (~1900 о.), а также показана целостность продукта синтеза.

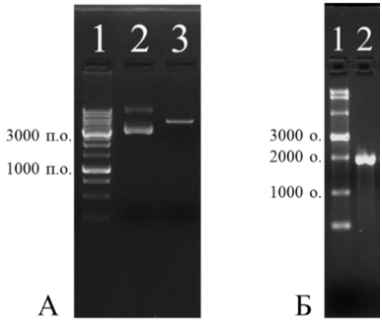


Рисунок 8 – Получение мРНК-вакцины mRNA-H5. А – Электрофореграмма разделения продуктов обработки ДНК-матрицы pVAX-Cas1CC-H5 эндонуклеазой рестрикции. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2 – плазмидная ДНК-матрица pVAX-Cas1CC-H5, 3 – плазмидная ДНК-матрица pVAX-Cas1CC-H5, обработанная эндонуклеазой рестрикции EcoRI. Б – Электрофореграмма разделения продуктов синтеза мРНК-вакцины mRNA-H5. 1 – маркер молекулярной массы ssRNA Ladder, 2 – мРНК mRNA-H5.

Получение мРНК mRNA-H5, инкапсулированной в LNP

Для эффективного действия мРНК-вакцины необходимо, чтобы мРНК попадала в клетки-мишени и продуцировала достаточное количество белка. Поэтому разработка эффективных систем доставки является необходимой и крайне важной задачей. LNP являются самой распространенной системой доставки мРНК, обеспечивающей эффективное проникновение мРНК в клетки.

Полученную мРНК mRNA-H5 инкапсулировали в LNP для дальнейшей иммунизации мышей. Аналогичным образом были получены LNP без мРНК в качестве контроля. Полученные комплексы были охарактеризованы методами электронной микроскопии и динамического светорассеяния (рисунок 9).

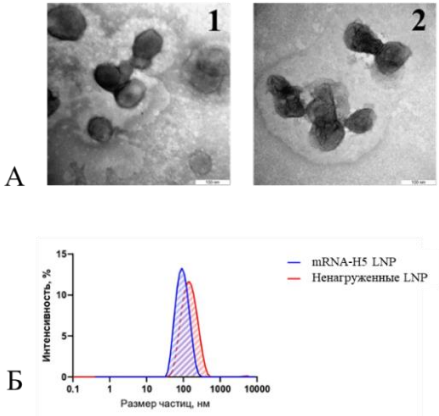


Рисунок 9 – Получение и характеристика комплексов mRNA-H5 LNP. А – Электронная микрофотография комплексов: 1 – mRNA-H5 LNP; 2 – ненагруженные LNP. Б – Динамическое рассеяние света: профили распределения по размерам наночастиц, полученных с мРНК или без нее.

Анализ с помощью метода динамического рассеяния света (таблица 1) показал, что как в случае комплекса mRNA-H5 LNP, так и в случае ненагруженных LNP была сформирована монодисперсная суспензия наночастиц (PdI = 0,149 ± 0,01 и 0,175 ± 0,01 соответственно). Средний гидродинамический диаметр mRNA-H5 LNP составил 93,5±0,8 нм, для ненагруженных LNP же этот параметр был выше – 131,6±1,6 нм, что может быть следствием того, что в отсутствие мРНК наночастица спонтанно самособирается случайным образом, что может приводить к увеличению средних размеров. Профиль распределения частиц (рисунок 9Б) показывает, что наблюдается один пик, указывающий на отсутствие фракций с другими размерами частиц или примесей.

Таблица 1 – Физические характеристики полученных LNP

Препарат	Средний размер частицы, нм	PdI	ζ -потенциал, мВ
mRNA-H5 LNP	93,5±0,8	0,149 ± 0,01	-0,02±0,26
Ненагруженные LNP	131,6±1,6	0,175 ± 0,01	1,15±0,26

Значение ζ-потенциала частиц mRNA-H5 LNP в трёх разных сериях измерений составило −0,02 ± 0,26 мВ, что согласуется с теоретическим расчетом. Наличие слабого заряда может указывать на то, что отрицательно заряженные молекулы мРНК были почти полностью упакованы в LNP. Это также было подтверждено анализом Quant-iT RiboGreen RNA, в котором было показано, что эффективность инкапсуляции составила более 90 %. Для подтверждения образования наночастиц была проведена электронная микроскопия (рисунок 9А).

Анализ иммуногенных и протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5

Несмотря на высокую эффективность доставки с помощью LNP, их использование может вызывать нежелательные побочные эффекты, такие как аллергические реакции, патологии почек, перикардит, миокардит и другие. Поэтому разработка усовершенствованных, но при этом простых и безопасных методов доставки является актуальной задачей. В данной работе была исследована эффективность мРНК-вакцины mRNA-H5 при доставке с помощью такого физического метода, как СИ, и проведено сравнение с ее эффективностью при доставке в составе LNP.

Было проведено исследование иммуногенных и протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5 на мышах линии BALB/c. Мыши были дважды проиммунизированы мРНК-вакциной mRNA-H5 в дозе 30 мкг с помощью СИ и мРНК-вакциной mRNA-H5 в дозе 10 мкг в составе LNP. В качестве положительного контроля также вводили рекомбинантный белок HA/H5. Наличие специфических к HA антител в сыворотках крови исследовали с помощью ИФА. Титры специфических антител были выявлены в группах животных, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 с помощью СИ и в составе LNP, а также в группе животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5; средние титры составили 1:400000, 1:765000 и 1:93000 соответственно (рисунок 10А).

Сыворотки крови иммунизированных мышей далее исследовали в реакции вируснейтрализации в культуре клеток MDCK-SIAT1 в отношении вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Было показано, что сыворотки животных, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 с

помощью СИ и в составе LNP, а также сыворотки животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5, обладают вируснейтрализующей активностью; средние 50 % нейтрализующие титры составили 1:1900, 1:3400 и 1:1100 соответственно (рисунок 10Б).

Формирование Т-клеточного иммунитета у мышей было исследовано с помощью метода ELISpot. Для этого у иммунизированных мышей извлекали селезёнки, которые были гомогенизированы и исследованы с помощью метода ELISpot. Ответ оценивали по их способности выделять IFN-γ в ответ на стимуляцию пептидами, входящими в состав HA. Было показано, что в группах мышей, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 и рекомбинантным белком HA/H5, активируется специфический клеточный иммунитет, выраженный в значительном повышении количества спленоцитов, продуцирующих IFN-γ (рисунок 10В).

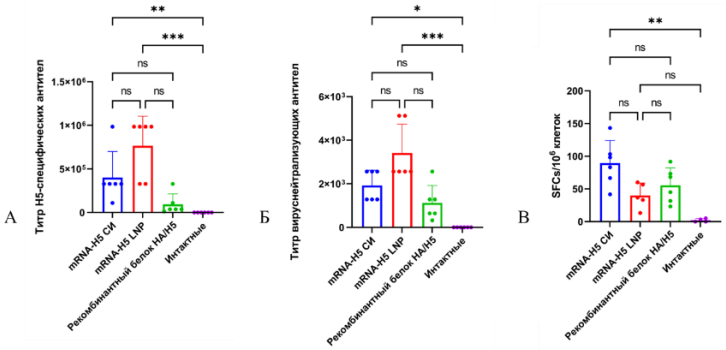


Рисунок 10 – Анализ иммуногенности мРНК-вакцины mRNA-H5 на мышах линии BALB/c. mRNA-H5 СИ – группа животных, иммунизированных 30 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 с помощью СИ; mRNA-H5 LNP – группа животных, иммунизированных 10 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 в составе LNP; Рекомбинантный белок HA/H5 – группа животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5; Интактные – группа животных, не подвергавшихся каким-либо манипуляциям. А – Результаты ИФА сывороток мышей, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5. Б – Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток мышей в отношении вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). В – Количество спленоцитов, экспрессирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определённое методом ELISpot. Каждый столбик представляет собой среднее число SFCs на миллион стимулированных спленоцитов. Данные представлены как среднее ± с. о. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности активации вирус-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 в случае доставки методом СИ или в комплексе с LNP. При этом статистических

различий между доставкой mRNA-H5 методом СИ и в комплексе с LNP показано не было, но наблюдалась тенденция к более высокому уровню гуморального ответа в случае LNP, а также к более высокому уровню клеточного ответа в случае СИ.

Через 14 дней после второй иммунизации мыши были заражены интраназально 20 $ЛД_{50}$ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) для анализа протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5. В течение 14 дней после заражения регистрировали физиологические реакции и смертность животных. По результатам эксперимента выживаемость всех животных, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5, составила 100 %, клинические признаки заболевания отсутствовали. Выживаемость в группе контрольных животных составила 0 %, наблюдались явные признаки заболевания (рисунок 11). Так, были показаны протективные свойства мРНК-вакцины mRNA-H5 в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

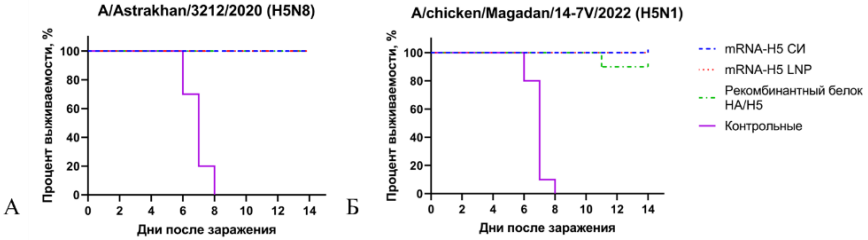


Рисунок 11 – Анализ протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5 на мышах линии BALB/c. mRNA-H5 СИ – группа животных, иммунизированных 30 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 с помощью СИ; mRNA-H5 LNP – группа животных, иммунизированных 10 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 в составе LNP; Рекомбинантный белок HA/H5 – группа животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5; Контрольные – группа животных, не подвергавшихся иммунизациям. А – Кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8). Б – Кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

Таким образом, было показано, что мРНК-вакцина mRNA-H5 индуцирует формирование высоких уровней гуморального и клеточного иммунных ответов и обеспечивает протективный иммунитет у мышей линии BALB/c при доставке методом СИ или в комплексе с LNP.

Заключение.

Вирус высокопатогенного гриппа А (H5) представляет собой серьезную угрозу из-за пандемического потенциала, а также наносит

серьезный экономический ущерб птицеводческой отрасли. Для эффективной борьбы с заболеванием необходима разработка гибких вакцинных платформ, к которым относятся вакцины на основе нуклеиновых кислот. Они обладают рядом преимуществ, к которым относятся масштабируемое производство с возможностью замены целевого гена, высокая безопасность и эффективная активация иммунного ответа. Эти особенности делают их удобной платформой для борьбы с заболеванием, вызываемым высокопатогенным вирусом гриппа А (H5).

В данном исследовании были разработаны экспериментальные ДНК- и мРНК-вакцины против заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа А (H5). В качестве иммуногена был выбран ген, кодирующий НА вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), циркулировавший в России в Ставропольском крае в 2020 году среди сельскохозяйственной птицы и гомологичный по гемагглютинину штамму A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), рекомендованному ВОЗ в качестве вакцинного. Для стабилизации иммуногена и его корректного представления иммунной системе были внесены точечные замены в pH-чувствительных областях НА, удалены трансмембранный и цитоплазматический домены для получения секретируемого белка, а также полиосновный сайт протеолиза высокопатогенного вируса гриппа был заменен на моноосновный сайт. Были сконструированы варианты иммуногенов с добавлением тримеризующего домена фибритина бактериофага Т4 (последовательность H5) и без него (последовательность H5 delT4), а также последовательность на основе стеблевого домена НА (последовательность H5 stebl).

Получены экспериментальные ДНК-вакцины pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4, для pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 продемонстрирован синтез целевых РНК и белков в эукариотических клетках HEK293. На мышах линии BALB/c показано формирование вирус-специфического гуморального ответа для pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4, а также показано, что наиболее высокие титры антител индуцирует конструкция pVAX-H5. С помощью анализа дозозависимого эффекта была выбрана доза 100 мкг pVAX-H5, при которой наблюдалась эффективная индукция вируснейтрализующего гуморального ответа. ДНК-вакцина pVAX-H5 в дозе 100 мкг также вызывала формирование Т-клеточного иммунного ответа.

Была показана вируснейтрализующая активность иммунных сывороток мышей, иммунизированных pVAX-H5, в отношении штаммов вируса гриппа клады 2.3.4.4b A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1). Протективные свойства pVAX-H5 были исследованы в отношении штаммов A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1). В обоих случаях выживаемость

иммунизированных животных составила 100 %. Показанные протективные свойства вакцины, вероятно, были достигнуты благодаря эффективному формированию не только гуморального, но и Т-клеточного иммунного ответа, что, в свою очередь, было обеспечено стабилизацией целевого иммуногена и его правильным представлением иммунной системе в формате ДНК-вакцины.

На основе последовательности H5 была получена ДНК-матрица pVAX-Cas1CC-H5 для синтеза мРНК, включающая нетранслируемые области α-глобина человека; модифицированный T7-промотор, необходимый для котранскрипционного присоединения аналога кэпа; область, необходимую для котранскрипционного присоединения поли(A)-хвоста длиной 100 нуклеотидов; и сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линеаризации ДНК-матрицы. С линеаризованной ДНК-матрицы был проведен синтез целевой мРНК-вакцины mRNA-H5 с включением N1-метилпсевдоуридина. Для иммунизации mRNA-H5 инкапсулировали в LNP, а также применяли в «голом» виде в случае доставки методом СИ.

На мышах линии BALB/c показана высокая эффективность активации вирус-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа в случае доставки mRNA-H5 методом СИ или в комплексе с LNP, при этом в случае LNP наблюдалась тенденция к более высокому уровню гуморального ответа, а в случае СИ – к более высокому уровню клеточного ответа. Были показаны протективные свойства mRNA-H5 в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1), при этом выживаемость составила 100 %.

Полученные ДНК-вакцина pVAX-H5 и мРНК-вакцина mRNA-H5 являются перспективными вакцинными кандидатами для доклинических исследований в качестве препарата для профилактики заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа A (H5).

Выводы:

1. На основе модифицированного гемагглютинина вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) проведен дизайн трех иммуногенов H5, H5 stebl и H5 delT4 со стабилизирующими мутациями; получены экспериментальные ДНК-вакцины pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4.
2. Показано формирование вирус-специфического гуморального иммунного ответа для экспериментальных ДНК-вакцин pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4, введенных методом струйной инжекции мышам линии BALB/c; установлено, что наиболее высокие титры специфических к гемагглютинину антител индуцирует pVAX-H5.
3. Установлено, что доза 100 мкг pVAX-H5 обеспечивает эффективную индукцию вируснейтрализующего гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у мышей линии BALB/c; показана

вируснейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении штаммов вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1); продемонстрирована 100 % выживаемость иммунизированных мышей при заражении 50 $ЛД_{50}$ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).

4. Получена экспериментальная мРНК-вакцина mRNA-H5 с использованием разработанной ДНК-матрицы pVAX-Cas1CC-H5, кодирующей иммуноген H5; проведена инкапсуляция mRNA-H5 в липидные наночастицы со средним гидродинамическим диаметром частиц 93,5±0,8 нм и эффективностью инкапсуляции >90 %.
5. Показано формирование специфического гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на мРНК-вакцину mRNA-H5, введенную мышам линии BALB/c как с помощью струйной инжекции, так и в составе липидных наночастиц; показана вируснейтрализующая активность сывороток иммунизированных мышей в отношении штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); продемонстрирована 100 % выживаемость иммунизированных мышей при заражении 20 $ЛД_{50}$ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

СТАТЬИ:

1. Старостина Е.В., Шарабрин С.В., Рудометов А.П., **Литвинова В.Р.**, Боргоякова М.Б., Бажан С.И., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Иммунный ответ на ДНК- и мРНК-вакцины, кодирующие искусственные иммуногены вируса гриппа //Российский иммунологический журнал. – 2022. – Т. 25. – №. 3. – С. 321-326.
2. **Litvinova V.R.** et al. mRNA vaccine platform: mRNA production and delivery //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2023. – Т. 49. – №. 2. – С. 220-235.
3. **Litvinova V.R.** et al. DNA vaccine encoding a modified hemagglutinin trimer of avian influenza a virus H5N8 protects mice from viral challenge //Vaccines. – 2024. – Т. 12. – №. 5. – С. 538.
4. Yakovlev V.A.; **Litvinova V.R.**; Rudometova N.B.; Borgoyakova M.B.; Tigeeva E.V.; Starostina E.V.; Ivanova K.I.; Gudymo A.S.; Danilchenko N.V.; Perfilyeva O.N.; et al. Immunogenic and Protective Properties of mRNA Vaccine Encoding Hemagglutinin of Avian Influenza A/H5N8 Virus, Delivered by Lipid Nanoparticles and Needle-Free Jet Injection //Vaccines. – 2025. – Т. 13. – №. 8. – С. 883.
5. **Литвинова В.Р.** и др. Иммуногенность экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих гемагглютинин и стебель гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8) //Сибирский научный медицинский журнал. – 2025. – Т. 45. – №. 1. – С. 100-108.

ТЕЗИСЫ:

1. **Литвинова В. Р.**, Шарабрин С. В. Получение мРНК, кодирующих антигены вируса гриппа //Химия: Материалы 59-й международной научной студенческой конференции. – 2021. – С. 27.
2. **Литвинова В.Р.**, Рудомётов А.П., Шарабрин С.В., Рудомётова Н.Б., Новопашина Д.С., Карпенко Л.И. Повышение эффективности трансляции мРНК, кодирующих GFP, за счет включения в их состав модифицированных нуклеотидов и оптимизации нетранслируемых областей //Сборник тезисов IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков (OpenBio-2022). – 2022. – С. 570.
3. **Литвинова В.Р.**, Рудомётов А.П., Кисакова Л.А., Кисаков Д.Н., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А. Разработка вакцин на основе нуклеиновых кислот против высокопатогенного гриппа подтипа H5N8 //Материалы российской научно-практической конференции

«Управляемые и другие социально значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика», Журнал инфектологии. – 2023. – Т. 15. – №1. – С. 96-97.

4. **Литвинова В.Р.**, Рудомётова Н.Б., Кисакова Л.А., Кисаков Д.Н., Боргоякова М.Б. Получение ДНК-иммуногена, кодирующего гемагглютинин вируса гриппа подтипа H5N8 //Материалы XIV Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «АВИЦЕННА–2023», посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.Е. Яворовской Том I. – 2023. – С. 384-385.
5. **Литвинова В.Р.**, Рудомётова Н.Б., Кисакова Л.А., Кисаков Д.Н., Боргоякова М.Б., Фандо А.А., Тигеева Е.В., Яковлев В.А., Иванова К.И., Марченко В.Ю., Ильичева Т.Н., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А., Рудомётов А.П. Получение и оценка иммуногенности экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих фрагменты гемаглютинина вируса гриппа подтипа A/H5N8 //Материалы Гомельского международного конгресса «Инфекционные болезни, микробиология и иммунология», Журнал инфектологии. – 2023. – Т. 15. – №3. – С. 95.
6. **Литвинова В.Р.**, Рудомётов А.П., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Задорожный А.М., Рудомётова Н.Б., Фандо А.А., Тигеева Е.В., Яковлев В.А., Иванова К.И., Марченко В.Ю., Ильичева Т.Н., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А. Иммуногенные свойства экспериментальной ДНК-вакцины, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа подтипа A/H5N8 //Сборник тезисов X международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов (OpenBio 2023). – 2023. – с. 179.
7. Кисакова Л.А., **Литвинова В.Р.**, Красникова С.И., Яковлев В.А., Макарова К.П., Кисаков Д.Н. Анализ иммуногенности мРНК-конструкций, кодирующих белок гемагглютинина вируса гриппа, инкапсулированных в липидные наночастицы //Материалы X Юбилейного конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, Журнал инфектологии. – 2024. – Т. 16. – № 2. – С. 52.
8. **Литвинова В.Р.**, Рудомётов А.П., Кисаков Д.Н., Яковлев В.А., Кисакова Л.А., Боргоякова М.Б., Рудомётова Н.Б., Тигеева Е.В., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А. Получение и исследование иммуногенности экспериментальной мРНК-вакцины, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа подтипа A(H5N8) //Материалы X Юбилейного конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, Журнал инфектологии. – 2024. – Т. 16. – № 2. – С. 64.

9. **Литвинова В.Р.**, Рудомётова Н.Б., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Макарова К.П., Вахитов Д.И., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А., Рудомётов А.П. Разработка экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих поверхностные белки вируса гриппа подтипа А (H5Nx) //Сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 80-летию со дня рождения академика РАН О. И. Киселева. – 2025. – С. 47.
10. **Литвинова В.Р.**, Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Рудометова Н.Б., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Карпенко Л.И., Рудометов А.П. Иммуногенность кандидатной мРНК-вакцины для профилактики заболевания, вызванного высокопатогенным вирусом гриппа A/H5Nx //Материалы III Гомельского международного конгресса «Инфекционные болезни, микробиология и иммунология», Журнал инфектологии. – 2025. – Т. 17. – №3. – С. 103-104.
11. **Литвинова В.Р.**, Рудометова Н.Б., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Кисаков Д.Н., Карпенко Л.И., Рудометов А.П. Разработка и оценка иммуногенности мРНК-вакцины, кодирующей ген гемагглютинина высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа A/H5N8 //Сборник тезисов XII Международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины (OpenBio-2025). – 2025. – С. 675.

ПАТЕНТЫ:

1. Патент РФ № 2832515, МПК C07K 14/11 C07K 19/00 C12N 15/62 C12N 15/85 A61K 39/145 A61K 48/00 A61P 31/16. Ген H5, кодирующий стабилизированную форму белка гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8), рекомбинантная плазмидная ДНК pVAX-H5, содержащая ген H5 и обеспечивающая его экспрессию, и стабилизированная форма белка гемагглютинина вируса гриппа А (H5/N8), продуцируемая рекомбинантной плазмидной ДНК pVAX-H5 в организме животных и индуцирующая специфический иммунный ответ против высокопатогенного вируса гриппа А (H5N8) : № 2024106471 : заявл. 11.03.2024 : опубл. 24.12.2024 / Рудомётов А.П., Рудомётова Н.Б., Боргоякова М.Б., **Литвинова В.Р.** [и др.].