

На правах рукописи

Кудров Глеб Александрович

**ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТЕКТИВНОСТЬ
ИНТРАНАЗАЛЬНЫХ ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ
ВИРУСА СЕНДАЙ ПРОТИВ SARS-COV-2-ИНФЕКЦИИ,
ВЫЗВАННОЙ АКТУАЛЬНЫМИ ВАРИАНТАМИ
КОРОНАВИРУСА**

1.5.10 - вирусология

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: **Пьянков Олег Викторович**
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: **Семенов Александр Владимирович**
доктор биологических наук, директор ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора
Шулякова Инна Вадимовна
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Ведущая организация: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Защита состоится «27» ноября 2026 г. в 11-30 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-10.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Эволюция SARS-CoV-2 в сторону вариантов линии Омикрон (включая JN.1) характеризуется максимальным иммунным уклонением при сохранении высокой трансмиссивности через верхние дыхательные пути (Yang et al., 2024). Существующие системные вакцины не обеспечивают прерывания цепей передачи вируса из-за отсутствия устойчивого мукозального иммунитета в воротах инфекции (Nakahashi-Ouchida et al., 2023) антигенного несоответствия циркулирующим штаммам ввиду изменчивости вируса (Wang et al., 2023), а также эффекта иммунного импринтинга (Uraki et al., 2026).

Одним из подходов для прерывания передачи актуальных вариантов SARS-CoV-2 является индукция мукозального иммунитета в верхних дыхательных путях посредством применения интраназальных векторных вакцинных платформ (Li et al., 2025). Вирус Сендай (SeV) штамма Москва представляет собой потенциально оптимальный вектор благодаря отсутствию патогенности для человека, цитоплазматической репликации без ДНК-фазы, высокой генетической стабильности и выраженной интерферон-опосредованной адьювантности (Ishii et al., 2022; Morimoto et al., 2023).

Выбор оптимального антигена определяет эффективность вакцины. В условиях циркуляции вариантов Омикрон изолированный RBD ограничен узким спектром эпитопов (Wang et al., 2022), тогда как полноразмерный S-белок сохраняет полный репертуар В- и Т-клеточных эпитопов (Tarke et al., 2022), включая консервативные домены S2 (Yamamoto et al., 2025), хотя это за собой несет теоретические риски в виде провоспалительного потенциала полноразмерного S-белка (Menezes et al., 2024).

Степень изученности темы исследования. К настоящему времени детально изучены морфология и антигенная структура S-белка SARS-CoV-2, включая взаимодействие RBD с рецептором ACE2 (Lan et al., 2020) и классификацию нейтрализующих антител по пяти классам эпитопов (Starr et al., 2021; Cui et al., 2024). Проанализированы ограничения системных вакцин при циркуляции линии Омикрон (Saha et al., 2025; Tscherne et al., 2025), а также подчеркнута роль мукозального иммунитета для прерывания передачи респираторных патогенов (Russell et al., 2022). Платформа

вируса Сендай успешно применялась в доклинических исследованиях против гриппа и RSV, демонстрируя способность индуцировать секреторный IgA и тканевые резидентные Т-клетки памяти при интраназальном введении (Ishii et al., 2022; Morimoto et al., 2023).

Тем не менее, ряд вопросов остается нерешенным. Отсутствуют прямые сравнительные данные о провоспалительной активности изолированного RBD и полноразмерного S-белка при локальной доставке в дыхательные пути, что необходимо для оценки безопасности. Недостаточно изучены вакцинные свойства рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего трансгены SARS-CoV-2. Кроме того, несмотря на рекомендации ВОЗ по обновлению состава вакцин до варианта JN.1, эффективность интраназальных векторных платформ против эволюционно близких субвариантов пока не изучена.

Цель исследования – оценка эффективности прототипов интраназальных векторных вакцин против COVID-19 на основе рекомбинантных вариантов вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующих антигены S-белка актуальных вариантов SARS-CoV-2.

Задачи исследования:

1. Определить безопасность рекомбинантного RBD и полноразмерного S-белка варианта Дельта SARS-CoV-2 с точки зрения их провоспалительной активности на модели *in vivo*.
2. Оценить иммуногенность и протективную эффективность вакцинного конструктора на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего трансген RBD варианта Дельта SARS-CoV-2, при однократном интраназальном введении.
3. Оценить иммуногенность и протективную эффективность вакцинного конструктора на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего трансген полноразмерного S-белка варианта Дельта SARS-CoV-2, при однократном интраназальном введении.
4. Оценить эффективность и перекрестную нейтрализующую активность вакцинного конструктора на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего трансген полноразмерного S-белка варианта JN.1 SARS-CoV-2 против различных вариантов циркулирующей линии Омикрон, при однократном интраназальном введении.

Научная новизна

1. Впервые экспериментально охарактеризован профиль безопасности рекомбинантных RBD и полноразмерного S-белка варианта Дельта SARS-CoV-2 *in vivo* при интратрахеальном введении мышам K18-hACE2. Показано, что использование эукариотической системы экспрессии (клетки CHO-K1), исключающее контаминацию бактериальными эндотоксинами, предотвращает развитие системного цитокинового шторма и острого повреждения лёгких, что объясняет расхождения с ранее опубликованными данными, полученными на препаратах из прокариотических систем.

2. Впервые на платформе вируса Сендай штамма Москва показано, что полноразмерный S-белок SARS-CoV-2 способен экспонироваться на поверхности вирионов, обеспечивая двойную презентацию антигена (внутриклеточную в процессе репликации и поверхностную на вирионах), что индуцирует комплексный мукозальный, клеточный и системный гуморальный иммунный ответ при однократном интраназальном введении.

3. Впервые при однократном интраназальном введении показано, что вакцинный конструктор на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующий ген полноразмерного S-белка варианта Дельта, способен индуцировать стерилизующий иммунитет у сирийских хомяков против варианта Дельта SARS-CoV-2.

4. Впервые на модели трансгенных мышей K18-hACE2 доказана способность вакцинного конструктора Sen-S-JN.1(M) обеспечивать стерилизующий иммунитет против актуального варианта JN.1 при однократной интраназальной иммунизации. Установлен профиль перекрёстной нейтрализующей активности индуцированных антител в отношении эволюционно близких субвариантов линии Омикрон (XBB.1.16, BA.5.2)

Научно-практическая значимость

В работе обоснован переход от использования изолированного RBD к полноразмерному S-белку в качестве оптимальной стратегии антигенного дизайна для интраназальных векторных вакцин против SARS-CoV-2.

Показано, что умеренное и транзиторное повышение уровня IL-6 при локальной экспрессии S-белка не сопровождается развитием системного цитокинового шторма или острым

повреждением легких, что подтверждает безопасность S-белка как вакцинного иммуногена для верхних дыхательных путей.

Полученные данные расширяют представления о коррелятах защиты против респираторных вирусов, подчеркивая роль индукции секреторного IgA в защите от респираторной инфекции SARS-CoV-2.

Практическая значимость заключается в создании готового прототипа интраназальной вакцины Sen-S-JN.1(M), соответствующего рекомендациям Технической консультативной группы ВОЗ по составу вакцин против COVID-19 (май 2025 г.).

Подтверждена технологическая гибкость платформы вируса Сендай штамма Москва, позволяющая оперативно заменять трансген под актуальный циркулирующий вариант без изменения производственного процесса.

Доказана возможность однократной интраназальной иммунизации как достаточного режима для формирования комплексного иммунитета, что открывает перспективы для доклинических и клинических испытаний вакцины с целью прерывания передачи SARS-CoV-2 в популяции.

Методология и методы исследования. Для достижения цели исследования проведена иммунохимическая характеристика рекомбинантных вариантов вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующих трансгены RBD или полноразмерного S-белка вариантов дельта и JN.1. Экспрессия трансгенов подтверждена методом иммуноблоттинга в лизатах клеток LLC-MK₂ и очищенных препаратах вируса. Оценка провоспалительной активности антигенов проводилась на трансгенных мышах линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J (K18-hACE2) после интратрахеального введения рекомбинантных белков: контролировались клинические параметры (масса, температура), уровни цитокинов в сыворотке и легочной ткани методом множественной проточной цитометрии, а также проводилась прижизненная компьютерная томография с AI-сегментацией для оценки объема и плотности легочной ткани.

Иммуногенность и протективную эффективность вакцин оценивали на трех экспериментальных моделях: сирийских хомяках, мышах линии BALB/c и трансгенных мышах K18-hACE2. Гуморальный ответ исследовали с помощью ИФА (определение титров специфических IgG и sIgA в назальных смывах) и реакции нейтрализации на клетках *Vero E6* (расчет НТ₅₀). Клеточный

иммунный ответ оценивали методами ELISpot (IFN- γ) и внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с последующей проточной цитометрией (фенотипирование CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитов, экспрессия IFN- γ и IL-2). Протективность определяли по вирусной нагрузке: количественная ОТ-ПЦР-ПВ для вирусной РНК и титрование инфекционного вируса методом ТЦИД₅₀ в гомогенатах легких и носовых раковин после интраназального заражения. Патоморфологический анализ легких проводили с окраской гематоксилин-эозином. Для статистической обработки данных использовали непараметрические критерии Краскела-Уоллиса, Данна, Фридмана и Манна-Уитни с расчетом 95% доверительных интервалов (95% ДИ).

Основные положения, выносимые на защиту. В результате выполненной работы установлено:

1. RBD и полноразмерный S-белок SARS-CoV-2 (Дельта) не вызывают острого системного воспаления или повреждения лёгких у мышей K18-hACE2, проявляясь лишь транзиторным 3-кратным ростом IL-6 за 72 часа после интратрахеального введения.

2. RBD (Дельта) в составе вируса Сендай обеспечивает индукцию гуморального ответа у мышей BALB/c со значимым протективным эффектом против варианта Гамма в виде снижения концентрации вирусной РНК на 3 log₁₀ в носовых раковинах и на 1,4 log₁₀ в лёгких, не вызывая при этом защитного иммунитета на модели сирийского хомяка.

3. Полноразмерный S-белок (Дельта) в составе вируса Сендай экспонируется на поверхности вирионов и экспрессируется внутриклеточно. Однократная интраназальная иммунизация индуцирует у мышей BALB/c высокие титры нейтрализующих антител и антигенспецифический Т-клеточный ответ (IFN- γ ⁺ и IL-2⁺ CD4⁺/CD8⁺ лимфоциты), обеспечивая достоверную защиту против варианта Гамма, в виде снижения инфекционного титра вируса на 1,5 log₁₀ в лёгких и на 2,9 log₁₀ в носовых раковинах. У сирийских хомяков вакцина формирует стерилизующий иммунитет против варианта Дельта на фоне высоких титров нейтрализующих антител (CGT = 453).

4. Однократная интраназальная иммунизация конструктором Sen-S-JN.1(M) индуцирует у мышей BALB/c мукозальный (sIgA) и системный (IgG) гуморальный ответ, обладающий нейтрализующей активностью против варианта JN.1 (CGT = 279) и обеспечивающий

перекрестную нейтрализацию субвариантов ХВВ.1.16 и ВА.5.2. У трансгенных мышей K18-hACE2 вакцина обеспечивает стерилизующий иммунитет против варианта JN.1.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций обеспечивается достаточным объемом экспериментального материала, использованием адекватных и высокочувствительных модельных систем (сирийские хомяки, мыши BALB/c, трансгенные мыши K18-hACE2), воспроизводимостью экспериментов *in vivo* и *in vitro*, применением современных стандартизированных методов молекулярной биологии, иммунологии и вирусологии (ОТ-ПЦР-РВ, титрование ТЦИД₅₀, проточная цитометрия, ELISpot, ИФА, реакция нейтрализации, КТ с AI-анализом), а также корректным применением методов непараметрической статистики для оценки значимости различий. Все данные прошли внутреннюю верификацию и согласуются с современными представлениями о патогенезе SARS-CoV-2 и принципах разработки мукозальных вакцин.

Апробация результатов. Результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях OpenBio (Кольцово, 2024 и 2025 г.), Объединенном иммунологическом форуме (Псковская область, Пушкинские горы, 2024 г.).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 7 работ, включая 3 публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 3 тезиса в сборниках научных конференций и 1 патент РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения исследования, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 176 страницах, включает 20 рисунков, 2 таблицы и 4 приложения. Список литературы включает 300 источников.

Личный вклад автора. Анализ литературы, планирование экспериментов, иммунохимическая характеристика рекомбинантных вирусов, проведение иммунобиологических исследований *in vivo* и *in vitro*, оценка вирусной нагрузки, иммунологических параметров, статистическая обработка данных и написание диссертации выполнены лично автором или с непосредственным его участием.

Использованные в работе рекомбинантные варианты вируса Сендай штамма Москва сконструированы и предоставлены сотрудниками лаборатории под руководством Кочневой Г.В. (отдел молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Рекомбинантные белки для оценки провоспалительной активности сконструированы и предоставлены сотрудниками лаборатории под руководством Щербакова Д.Н. (отдел биофизики и экологических исследований, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). ELISpot и ICS-анализ спленоцитов выполнены в лаборатории под руководством Карпенко Л.И. (отдел биоинженерии, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Мультиплексное определение цитокинов и хемокинов методом проточной цитометрии проведено совместно с сотрудниками отдела геномных исследований, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Микроскопический анализ проведен сотрудниками отдела микроскопических исследований, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провоспалительная активность RBD и полноразмерного белка Spike SARS-CoV-2 варианта Дельта

Для оценки провоспалительного потенциала рекомбинантных белков rRBD и rSpike, полученных в эукариотической системе экспрессии (клетки CHO-K1), исключающей контаминацию бактериальными эндотоксинами, проведено их интратрахеальное (и/т) введение трансгенным мышам K18-hACE2 в дозах 78 и 400 мкг/кг для rRBD, а также 78 и 1000 мкг/кг для rSpike. Такой дизайн позволил разделить эффекты, обусловленные, собственно, иммуногенным белком, от реакций на вирусный вектор и его репликацию в дыхательных путях, а также сопоставить провоспалительную активность мономерного RBD и полноразмерного S-белка при равной массовой концентрации функционального домена.

Клинический эффект при интратрахеальном введении. В ходе 72-часового клинического наблюдения достоверное повышение температуры тела (на 1,2 °C, $p=0,008$) зарегистрировано лишь в группе rSpike 1000 мкг/кг на 48-м часе; потеря массы тела во всех

группах не превышала 10% с последующим восстановлением, результаты представлены на рисунке 1.

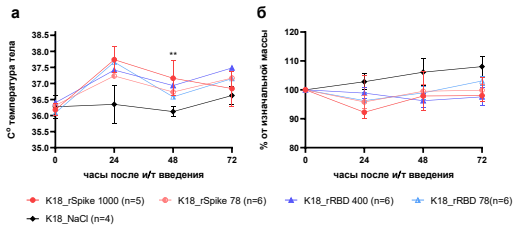


Рисунок 1 – Клинические реакции у мышей K18-hACE2 после и/т введения rSpike белка и rRBD: а – температура тела; б – динамика изменения массы тела (%). Точки – средние значения; вертикальные линии –

95% ДИ. Уровни значимости: ** $p < 0,01$ (статистическая значимость различий в тесте Данна с контролем, тест Краскела–Уоллиса).

Системный и локальный провоспалительный цитокиновый ответ. Мультиплексный анализ цитокинов (рисунок 2) показал транзиторное повышение IL-6 в сыворотке крови через 24 часа (в 1,4–1,5 раза для rRBD и в ~3 раза для rSpike) с возвратом к исходным значениям к 72-м часам; в тканях лёгких 3-кратный рост IL-6 отмечен только в группах rRBD 78 мкг/кг и rSpike 1000 мкг/кг (рисунок 2).

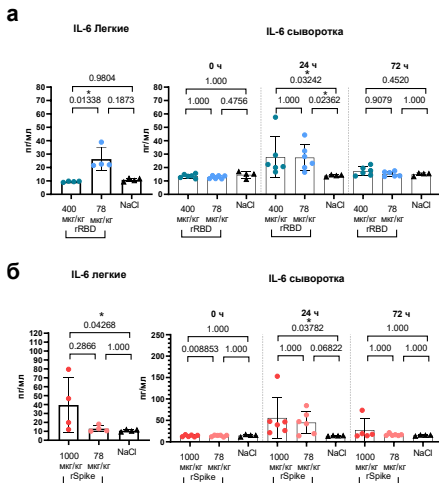


Рисунок 2 – Уровень цитокина IL-6 (пг/мл) в легких и сыворотке крови мышей K18-hACE2 после введения rRBD (а) и rSpike (б). Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (статистическая значимость различий в тесте Данна с контролем, тест Краскела–Уоллиса).

Анализ концентраций других воспалительных цитокинов: TNF- α , IFN- γ и IL-17A; регуляторных (IL-10, TGF- β), Th-ассоциированных (IL-2, IL-4, IL-13), не выявил значимых различий с

контролем (подробные данные приведены в диссертационном исследовании в приложениях А – Г).

Компьютерная томография органов грудной клетки после интратрахеального введения S-белка. Прижизненная КТ органов грудной клетки с AI-сегментацией не выявила рентгенологических признаков пневмонии (рисунок 3а). Тем не менее в группе rSpike 1000 мкг/кг обнаружено увеличение объема легких (рисунок 3б) и нормированной на объем плотности лёгочной ткани (рисунок 3в), что коррелирует с индивидуальными значениями IL-6 на пике в сыворотках крови (рисунок 3г).

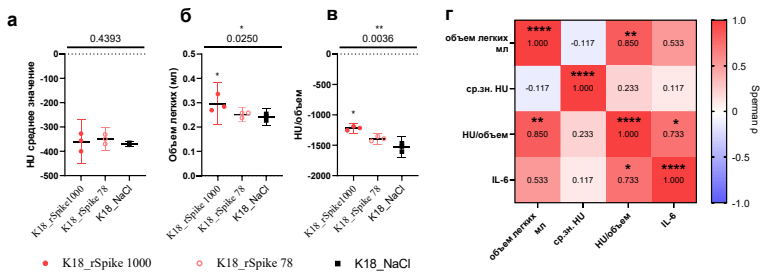


Рисунок 3 –Компьютерная томография органов грудной клетки мышей K18-hACE2 через 72 ч после интратрахеального введения rSpike: а – средняя плотность лёгких (НУ); б – объём лёгких; в – нормированная плотность; г – корреляционная матрица. Точки – индивидуальные значения, линии – медианы, 95% ДИ. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (статистическая значимость различий в тесте Данна с контролем, тест Краскела–Уоллиса).

Введение rSpike в дозе 1000 мкг/кг вызывало лишь транзитное повышение IL-6 и незначительное диффузное уплотнение легочной ткани. В отличие от моделей с персистенцией высоких доз изолированной S1-субъединицы (Colunga Biancatelli et al., 2021), локальная экспрессия полноразмерного S-белка не приводит к системному цитокиновому шторму или острому повреждению легких, что подтверждает высокий профиль безопасности мукозальных вакцин на основе данного антигена.

Оценка эффективности рекомбинантных вакцинных конструектов на основе вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующих трансгены RBD и S белкоа варианта Дельта SARS-CoV-2

Для разработки интраназальной вакцины были выбраны два иммуногена варианта Дельта: компактный RBD, ограниченный преимущественно эпитопами 1–3 классов, и полноразмерный S-белок, сохраняющий полный репертуар В- и Т-клеточных эпитопов (включая криптические эпитопы 4–5 и домен S2) для индукции широкого перекрёстного иммунитета. Структура рекомбинантных вариантов вируса Сендай штамма Москва с трансгенами, встроенными между генами Р и М, представлена на рисунке 4.

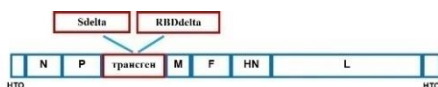


Рисунок 4 – Схема генома рекомбинантных вариантов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M).

Трансгеном для Sen-RBDdelta(M) служила синтетическая последовательность RBD варианта Дельта с сигнальным пептидом. Для Sen-Sdelta(M) ген полноразмерного S-белка варианта Дельта (линия B.1.617.2, штамм HCoV-19/Russia/MOS-2406/2021) был амплифицирован методом ОТ-ПЦР из геномной РНК.

Характеристика рекомбинантных вариантов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M). Методом иммуноблоттинга показано, что RBDdelta (~35 кДа) выявляется в аллантаоисной жидкости куриных эмбрионов (рисунок 5а, в) и культуральной среде LLC-MK₂ клеток (рисунок 5б), инфицированных Sen-RBDdelta(M), и специфически реагирует с иммунными сыворотками мыши и реконвалесцента COVID-19.

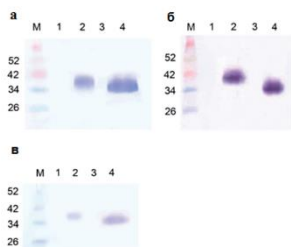


Рисунок 5 – Экспрессия трансгена RBDdelta: а, в – аллантаоисная жидкость куриных эмбрионов; б – культуральная среда клеток LLC-MK₂. Первичные антитела: сыворотка иммунной мыши (1:500, а, б) и реконвалесцента COVID-19 (1:200, в). М – маркер; 1 – отрицательный контроль (неинфицированные образцы); 2 – положительный контроль rRBD (200 нг); 3 – пустая дорожка; 4 – образцы, инфицированные Sen-RBDdelta(M).

Полученные данные подтверждают секрецию RBDdelta и его иммуноидентичность природному белку.

S-белок методом иммуноблоттинга детектирован в лизатах клеток и препаратах очищенного вируса в виде нескольких форм: полноразмерного белка (~190 кДа), продуктов расщепления S1/S2 (90–115 кДа) и тримерной конформации (>260 кДа) (рисунок 6).

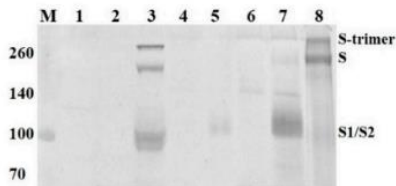


Рисунок 6 – Экспрессия трансгена Sdelta: М – маркер молекулярной массы (кДа); 1, 2, 4, 6 – отрицательные контроли (неинфицированные клетки, Sen2-EGFP(M) в лизате, среде и очищенном препарате); 3 – лизат клеток LLC-MK₂, инфицированных

Sen-Sdelta(M); 5 – культуральная среда клеток, инфицированных Sen-Sdelta(M); 7 – очищенный препарат Sen-Sdelta(M); 8 – положительный контроль S-тримера (200 нг).

В очищенных препаратах вируса S-белок практически полностью представлен процессированной S1/S2 формой, что соответствует характеру посттрансляционной модификации в очищенных препаратах SARS-CoV-2 (Plante et al., 2021).

Иммуногенность и протективность Sen-RBDdelta(M) на модели сирийского хомяка. При однократной интраназальной иммунизации хомяков Sen-RBDdelta(M) (10^7 БОЕ/животное) специфические антитела не обнаружены через 28 суток.

При заражении вариантом Дельта SARS-CoV-2 (рисунок 7) у вакцинированных хомяков выявлено достоверное снижение вирусной нагрузки в лёгких на $1,2 \log_{10}$ относительно контроля ($p = 0,0093$).

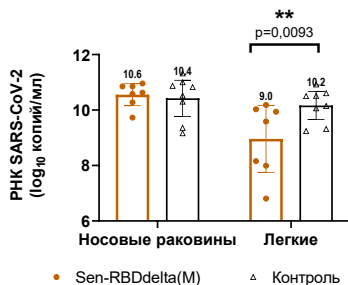


Рисунок 7 – Вирусная нагрузка ($\log_{10}$ копий/мл) на 6-е сутки после заражения вариантом Дельта SARS-CoV-2 у иммунизированных Sen-RBDdelta(M). Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ; ** $p < 0,001$ (тест Манна-Уитни).

Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ; ** $p < 0,001$ (тест Манна-Уитни).

Иммуногенность и протективность Sen-RBDdelta(M) на модели мышей BALB/c. На мышах линии BALB/c однократная интраназальная иммунизация Sen-RBDdelta(M) (10^5 БОЕ/животное) индуцировала формирование вируснейтрализующих антител с СГТ = 127 (95% ДИ: 97–166) против варианта Дельта (рисунок 8а).

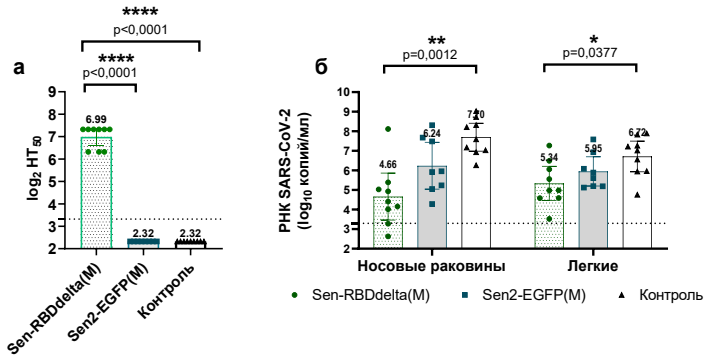


Рисунок 8 – Иммунный ответ и протективность Sen-RBDdelta(M) у мышей BALB/c: а – титры нейтрализующих антител (HT_{50}) против варианта Дельта SARS-CoV-2 в сыворотках; б – вирусная нагрузка ($\log_{10}$ копий/мл) в тканях на 5-е сутки после заражения вариантом Гамма. Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ; пунктир – порог нейтрализации ($3,32 \log_2 HT_{50}$) и ОТ-ПЦР-ПВ ($3,3 \log_{10}$ копий/мл). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (тест Данна после Краскела-Уоллиса).

При заражении вариантом Гамма SARS-CoV-2 выявлен достоверный протективный эффект: снижение концентрации вирусной РНК на $3 \log_{10}$ в носовых раковинах ($p = 0,0012$) и на $1,4 \log_{10}$ в лёгких ($p = 0,0377$) относительно контроля (рисунок 8б). В группе векторного контроля (Sen2-EGFP(M)) показатели вирусной нагрузки занимали промежуточное положение, что свидетельствует об иммуностимулирующих свойствах самого вектора - SeV.

Иммуногенность и протективность Sen-Sdelta(M) на модели сирийского хомяка. При однократной интраназальной иммунизации хомяков Sen-Sdelta(M) в дозе 10^6 БОЕ/животное у всех вакцинированных животных наблюдалась выраженная индукция гуморального ответа к 28-м суткам (рисунок 9а): СГТ нейтрализующих антител против варианта Дельта составил 453 (95% ДИ: 160–1280), против варианта Ухань – 190 (95% ДИ: 40–640).

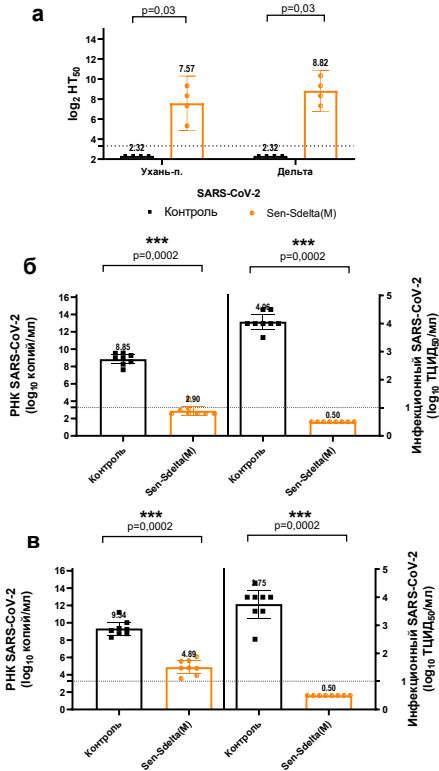


Рисунок 9 – Иммунный ответ и протективность Sen-Sdelta(M) у сирийских хомяков: а – титры нейтрализующих антител (HT₅₀) против варианта Дельта и Ухань-подобного SARS-CoV-2 в сыворотках; б,в – вирусная нагрузка (log₁₀ копий/мл) в тканях легких(б) и носовых раковинах(в) на 6-е сутки после заражения вариантом Дельта. Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ; пунктир – порог нейтрализации (3,32 log₂ HT₅₀), ОТ-ПЦР-ПВ (3,3 log₁₀ копий/мл) и инфекционного титра (1,0 log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). * p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001 (тест Манна-Уитни, для HT₅₀ применена поправка Бонферрони, p < 0,025).

При заражении вариантом Дельта SARS-CoV-2 на 6-е сутки вирусная РНК в лёгких не обнаруживалась у 7 из 8 вакцинированных хомяков (снижение на 6 log₁₀, p = 0,0002, рисунок 9б), в носовых раковинах концентрация РНК была ниже контроля на 4,5 log₁₀ (p < 0,001, рисунок 9в). Инфекционный вирус не был обнаружен ни в одном образце лёгких и носовых раковин вакцинированных животных, тогда как в контрольной группе средний инфекционный титр составил 4,06 log₁₀ ТЦИД₅₀/мл в лёгких и 3,75 log₁₀ ТЦИД₅₀/мл в носовых раковинах. Таким образом, достигнута 100% эффективность в предотвращении инфекции (стерилизующий иммунитет).

Иммуногенность и протективность Sen-Sdelta(M) на модели мышей BALB/c. Однократная интраназальная иммунизация мышей BALB/c (10⁵ БОЕ/животное) конструктором Sen-Sdelta(M)

индуцировала мощный гуморальный ответ (рисунок 10а) через 28 суток: СГТ нейтрализующих антител составил 184 (95% ДИ: 89–378) против варианта Дельта, 160 (95% ДИ: 68–286) против варианта Гамма и 120 (95% ДИ: 76–194) против варианта Ухань.

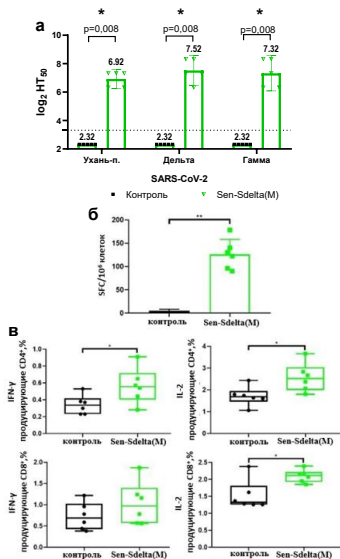


Рисунок 10 – Клеточный и гуморальный иммунный ответ у мышей BALB/c после иммунизации Sen-Sdelta(M): а – титры нейтрализующих антител (HT₅₀) против Ухань-подобного штамма, вариантов Дельта и Гамма; б – количество IFN-γ-продуцирующих спленоцитов (ELISpot); в – процент специфических IFN-γ- и IL-2-продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (ICS). Точки – индивидуальные значения; на панелях а, в – столбцы со средними и 95% ДИ; на панели б – боксы с медианами и 95% ДИ; пунктир – порог нейтрализации (3,32 log₂ HT₅₀) *p < 0,05, ** p < 0,01 (тест Манна-Уитни, для HT₅₀ применена поправка Бонферрони, * p < 0,0167).

Т-клеточный ответ, оценённый методами ELISpot и ICS, показал значимое (p < 0,01) увеличение количества IFN-γ-продуцирующих CD4⁺ Т-хелперных клеток (126 спотов на 10⁶ спленоцитов, рисунок 10б) и высокий уровень IL-2-продуцирующих клеток для обеих популяций Т-лимфоцитов (рисунок 10в), что свидетельствует об эффективной индукции полноценного адаптивного ответа вакцинным конструктором Sen-Sdelta(M).

При заражении вариантом Гамма SARS-CoV-2 в лёгких вакцинированных мышей концентрация вирусной РНК снизилась на 1,4 log₁₀ (p < 0,001), инфекционный титр – на 1,5 log₁₀ (p = 0,002), причём у 62,5% животных инфекционный вирус не обнаружен (рисунок 11а). В носовых раковинах концентрация РНК снизилась на 1,5 log₁₀ (p = 0,007), инфекционный титр – на 2,9 log₁₀ (p = 0,003), у 87,5% животных инфекционный вирус не выявлялся (рисунок 11б).

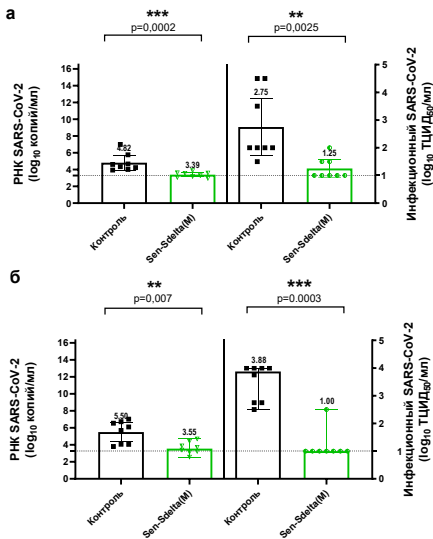


Рисунок 11 – Вирусная нагрузка на 6-е сутки после заражения вариантом Дельта SARS-CoV-2 у иммунизированных Sen-Sdelta(M) сирийских хомяков: а – лёгкие; б – носовые раковины. Слева – концентрация вирусной РНК (log₁₀ копий/мл); справа – инфекционный титр (log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ; пунктир – пороги ОТ-ПЦР-РВ (3,3 log₁₀ копий/мл) и инфекционного титра (1,0 log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). ** p < 0,01, *** p < 0,001 (тест Манна-Уитни).

Оценка эффективности рекомбинантного вакцинного конструктора Sen-S-JN.1(M), экспрессирующего трансген S-белка варианта JN.1 коронавируса SARS-CoV-2

В связи с доминированием к 2024 году варианта JN.1 (BA.2.86.1.1), обладающего повышенной контагиозностью и способностью к иммунному уклонению за счёт мутации L455S в RBD, было принято решение использовать экспрессию полноразмерного S-белка данного варианта в обновлённой конструкции Sen-S-JN.1(M). В качестве иммуногена использован полноразмерный S-белок штамма hCoV-19/Russia/NVS-SRC-4559/2024 (JN.1, GISAID: EPI_ISL_19035845). Схематичное изображение структуры рекомбинанта представлено на рисунке 12а.

S(JN.1) экспрессируется в виде мономера, тримера и S1/S2 формы (рисунок 12), аналогично варианту Дельта. Инкорпорация в вирионы в зрелой процессированной S1/S2-форме (дорожка 6) соответствует природному SARS-CoV-2 (Plante et al., 2021) и ранее наблюдалась в Sen-Sdelta(M).

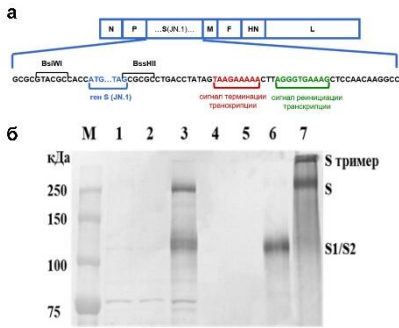


Рисунок 12 – Характеристика рекомбинантного варианта Sen-S-JN.1(M): а – схема генома с инсерцией трансгена S(JN.1), (данные Зайнутдинова С.С.); б – иммуноблоттинг S(JN.1). М – маркер; 1, 2, 4, 5 – отрицательные контроли (лизат неинфицированных и инфицированных Sen2-EGFP(M) клеток LLC-MK₂, очищенный препарат Sen2-EGFP(M), аллантоисная жидкость); 3 – лизат

клеток LLC-MK₂, инфицированных Sen-S-JN.1(M); 6 – очищенный препарат Sen-S-JN.1(M); 7 – S-тример (500 нг, положительный контроль).

Иммуногенность Sen-S-JN.1(M). Уровни секреторных IgA (sIgA) в назофарингеальных смывах против штамма JN.1 определяли на 14-е и 28-е сутки после интраназальной иммунизации мышей Sen-S-JN.1(M) (рисунок 13).

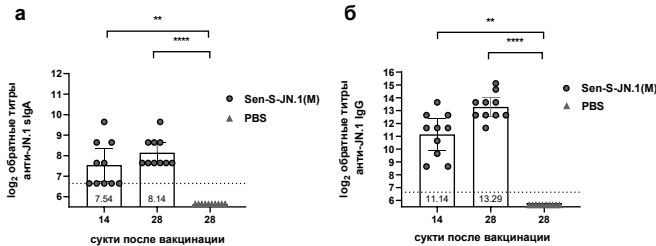


Рисунок 13 – Динамика накопления sIgA (а) и IgG (б) у мышей BALB/c после интраназальной иммунизации Sen-S-JN.1(M) в дозе 10⁵ БОЕ/животное (ИФА, антиген JN.1): а – sIgA в назофарингеальных смывах; б – IgG в сыворотке крови. Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ; пунктир – порог ИФА (6,64 log₂). ** p < 0,01, **** p < 0,0001 (тест Данна после Краскела–Уоллиса).

На 14-е сутки регистрировался специфический мукозальный ответ (СГТ sIgA = 187, 95% ДИ: 108–322), к 28-м суткам возросший до 283 (95% ДИ: 199–402) (рисунок 13а). Параллельно развивался системный ответ: СГТ IgG увеличился с 2263 (95% ДИ: 966–5298) до 10 026 (95% ДИ: 5955–16 880) (рисунок 13б). Таким образом, однократное интраназальное введение Sen-S-JN.1(M) эффективно индуцирует мукозальный и системный гуморальный ответ.

В сыворотках, отобранных на 28-е сутки после иммунизации, определены титры нейтрализующих антител против гомологичного штамма JN.1 с СГТ = 279 (95%ДИ: 177–439) (рисунок 14).

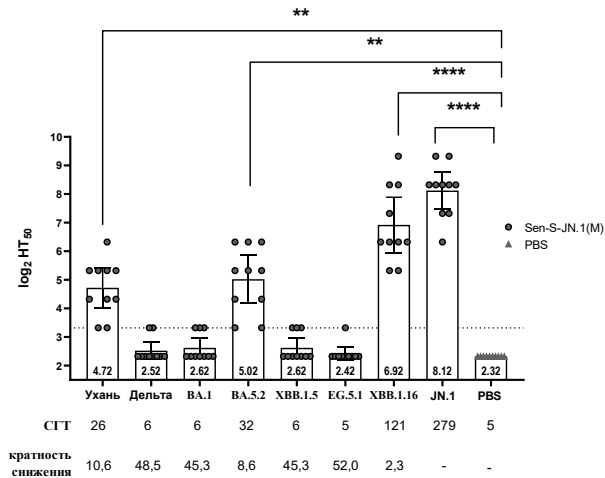


Рисунок 14 – Перекрёстная нейтрализующая активность сывороток мышей BALB/c на 28-е сутки после интраназальной иммунизации Sen-S-JN.1(M) против вариантов SARS-CoV-2 ($\log_2$ HT₅₀). Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ; пунктир – порог нейтрализации (3,32 $\log_2$ HT₅₀). ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (тест Данна после Краскела–Уоллиса).

Значимо выраженная перекрестная нейтрализующая активность иммунных сывороток была выявлена в отношении субвариантов XBB.1.16 и BA.5.2, а также Ухань-подобного штамма ($p < 0,01$) (рисунок 14). Против вариантов Дельта, BA.1, XBB.1.5 и EG.5.1 нейтрализация была снижена в 45,3–52,0 раза и достоверно не отличалась от контроля ($p > 0,05$), что обусловлено наличием у этих вариантов замены T478K. Таким образом, Sen-S-JN.1(M) формирует значимую перекрестную защиту против эволюционно близких субвариантов Омикрон, подтверждая перспективность JN.1-содержащих вакцин.

Протективность Sen-S-JN.1(M). Оценку протективного эффекта проводили на трансгенных мышах линии K18-hACE2, восприимчивых к субвариантам Омикрона. Через 28 суток после однократной интраназальной иммунизации мышей заражали

интраназально вирусом SARS-CoV-2 (вариант JN.1) в дозе 10^3 ТЦИД₅₀ с последующим исследованием вирусной нагрузки на 5-е сутки (рисунок 15).

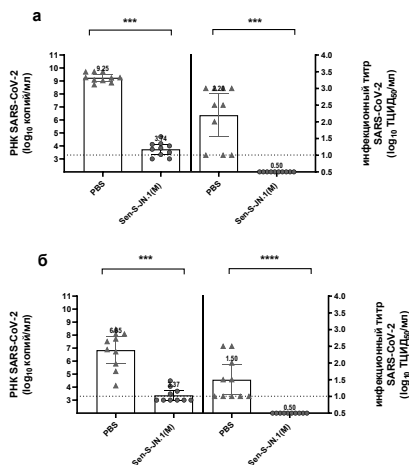


Рисунок 15 – Вирусная нагрузка на 5-е сутки у иммунизированных Sen-S-JN.1(M) мышей K18-hACE2 после заражения вариантом JN.1 SARS-CoV-2: а – лёгкие; б – носовые раковины. Слева – концентрация вирусной РНК (log₁₀ копий/мл); справа – инфекционный титр (log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). Точки – индивидуальные значения, столбцы – средние, линии – 95% ДИ; пунктир – пороги ОТ-ПЦР-РВ (3,3 log₁₀ копий/мл) и инфекционного титра (1,0 log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). *** p < 0,001; **** p < 0,0001 (тест Манна-Уитни).

Результаты показали, что уровень вирусной РНК у иммунизированных животных был значимо снижен относительно контроля (p < 0,001) на 5,5 log₁₀ в тканях лёгких и на 3,5 log₁₀ в тканях носовых раковин (рисунок 15). Инфекционный SARS-CoV-2 не обнаружен ни в одном образце тканей вакцинированных мышей, тогда как в контрольной группе инфекционный титр составил 2,2 и 1,5 log₁₀ ТЦИД₅₀/мл в лёгких и носовых раковинах соответственно (p < 0,001 и p < 0,0001).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе решена актуальная научно-практическая задача экспериментальной оценки прототипов однократных интраназальных векторных вакцин на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва против SARS-COV-2-инфекции, вызванной различными вариантами коронавируса.

В ходе исследования обосновано преимущество использования полноразмерного S-белка в качестве вакцинного

иммуногена по сравнению с RBD фрагментом при конструировании векторных вакцин на основе вируса Сендай. Доказано, что интратрахеальное введение рекомбинантного S-белка не вызывает системного цитокинового шторма или острого повреждения легких. Показано, что вакцинные конструкторы Sen-Sdelta(M) и Sen-S-JN.1(M), несущие трансген полноразмерного S-белка SARS-CoV-2, обеспечивают как его внутриклеточную экспрессию, так и экспонирование на мембране рекомбинантных вирионов. Двойная презентация S-антигена SARS-CoV-2 обеспечивает его эффективное узнавание иммунной системой и индукцию как мукозального, так и системного (клеточного и гуморального) специфического иммунитета при интраназальном введении вакцин, имитируя природную SARS-CoV-2 инфекцию.

Так Sen-Sdelta(M), экспрессирующий трансген S-белка варианта Дельта SARS-CoV-2, индуцирует высокие титры нейтрализующих антител и обеспечивает стерилизующий иммунитет на модели сирийского хомяка. На модели трансгенных мышей K18-hACE2 продемонстрировано, что однократная интраназальная иммунизация Sen-S-JN.1(M), экспрессирующим трансген S-белка доминирующего на 2025 год варианта JN.1 (линия BA.2.86.1.1), обеспечивает значимое подавление репликации РНК SARS-CoV-2 в легких и полости носа мышей при полном отсутствии инфекционного вируса в дыхательных путях. Sen-S-JN.1(M) также индуцирует высокий уровень секреторных IgA в назофарингеальных смывах мышей BALB/c, что критически важно для прерывания передачи инфекции. Выявлена перекрестная нейтрализующая активность Sen-S-JN.1(M) против субвариантов XBB.1.16 и BA.5.2, подтверждающая актуальность данного антигенного дизайна.

Полученные результаты подтверждают высокую эффективность платформы вируса Сендай штамма Москва для создания вакцин, способных индуцировать стерилизующий иммунитет против современных вариантов SARS-CoV-2 уже при однократном интраназальном введении.

ВЫВОДЫ

1. Интратрахеальное введение рекомбинантных RBD и полноразмерного S-белка варианта Дельта SARS-CoV-2 не вызывает системного цитокинового шторма и острого повреждения лёгких у

трансгенных мышей K18-hACE2. Выявлена лишь транзиторная локальная воспалительная реакция (3-х кратное повышение IL-6 с возвратом к исходным значениям к 72-м часам) без рентгенологических признаков пневмонии, что подтверждает безопасность данных иммуногенов для мукозальной доставки.

2. Вакцинный конструктор Sen-RBDdelta(M) при однократном интраназальном введении не обеспечивает детектируемой индукции нейтрализующих антител у сирийских хомяков и лишь частичную защиту (снижение РНК вируса в лёгких на $1,2 \log_{10}$) при заражении вариантом Дельта. На модели мышей BALB/c конструктор индуцирует умеренные титры нейтрализующих антител (СГТ = 127), что снижает концентрацию РНК вируса на 3 $\log_{10}$ в носовых раковинах и на $1,4 \log_{10}$ в лёгких при заражении вариантом Гамма.

3. Конструктор Sen-Sdelta(M), экспрессирующий полноразмерный S-белок варианта Дельта, обеспечивает двойную презентацию антигена (внутриклеточную и на поверхности вирионов). Однократная интраназальная иммунизация индуцирует высокие титры нейтрализующих антител (СГТ = 453 у хомяков; 184 у мышей), антиген-специфический Т-клеточный ответ ($\text{IFN-}\gamma^+$ и IL-2^+ CD4^+ и CD8^+ лимфоциты). Вакцина формирует стерилизующий иммунитет у сирийских хомяков при заражении вариантом Дельта, а у мышей BALB/c обеспечивает достоверное снижение инфекционных титров на $1,5 \log_{10}$ (лёгкие) и на $2,9 \log_{10}$ (носовые раковины) при заражении вариантом Гамма.

4. Обновлённый конструктор Sen-S-JN.1(M) при однократном интраназальном введении индуцирует у мышей BALB/c мукозальный (sIgA) и системный (IgG) гуморальный ответ, демонстрируя перекрёстную нейтрализацию субвариантов ХВВ.1.16 и ВА.5.2 (СГТ против гомологичного варианта JN.1 составляет 279). Иммунизация трансгенных мышей K18-hACE2 обеспечивает стерилизующий иммунитет против варианта JN.1: вирусная РНК снижается на $5,5 \log_{10}$ в легких и на $3,5 \log_{10}$ в носовых раковинах при полном отсутствии инфекционного вируса, что подтверждает потенциал платформы вируса Сендай для прерывания передачи актуального варианта SARS-CoV-2.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Кудров Г.А.**, Зайнутдинов С.С., Гражданцева А.А., Шиповалов А.В., Сиволобова Г.Ф., Семенова А.В., и др. Интраназальная вакцина против COVID-19 на основе рекомбинантного варианта вируса Сендай (Paramyxoviridae: Respirovirus) штамма Москва // Вопросы вирусологии. 2023. Т. 68. №. 3. С. 215-227. DOI: 10.36233/0507-4088-172

2. Kochneva G.V., **Kudrov G.A.**, Zainutdinov S.S., Shulgina I.S., Shipovalov A.V., Zaykovskaya A.V., et al. Immunogenicity and protective efficacy of a single intranasal dose vectored vaccine based on Sendai virus (Moscow strain) against SARS-CoV-2 Variant of Concern. // Vaccines. 2024. V. 12. 783. DOI:10.3390/vaccines12070783

3. **Кудров Г.А.**, Зайнутдинов С.С., Зайковская А.В., Шульгина И.С., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., и др. Перекрестная нейтрализующая активность живой интраназальной вакцины на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва против разных вариантов SARS-CoV-2// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2025. Т. 43. №. 4. С. 39-47. DOI:10.17116/molgen20254304139.

Патенты

Кочнева Г.В., Зайнутдинов С.С., **Кудров Г.А.**, Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А и др. Рекомбинантный штамм Sen-Sdelta(M) вируса Сендай, продуцирующий S белок SARS-CoV-2 и используемый для получения интраназальной вакцины против COVID-19// Патент РФ № 2837536C1. Опубл. в БИ №10 от 01.04.2025.