

Аннотация
научной-квалификационной работы аспиранта Кисакова Дениса Николаевича

Тема научно-квалификационной работы: Разработка физических методов доставки экспериментальных ДНК и мРНК вакцин против вирусов SARS-CoV-2 и клещевого энцефалита

Направление подготовки: 06.06.01 – Биологические науки.

Профиль подготовки: молекулярная биология.

Научный руководитель: док. биол. наук, профессор А.А. Ильичев.

Цель научной работы: разработка физических методов доставки экспериментальных вакцин на основе нуклеиновых кислот (ДНК и мРНК) и анализ иммуногенных и протективных свойств вакцинных конструкций, доставленных с помощью методов электропорации и струйной инъекции.

Методы проведенных исследований: клонирование, наработка и выделение плазмидной ДНК, синтез и очистка мРНК, секвенирование, иммунизация лабораторных животных методами электропорации и струйной инъекции, иммуноферментный анализ (ИФА), ELISpot, внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS), оценка вируснейтрализации, исследование протективных свойств.

Основные результаты научного исследования:

1. Оптимизирован протокол электропорации на мышах линии BALB/c на модельной плазмиде pHMGFP с учетом повышения профиля безопасности и переносимости процедуры. Оптимальные параметры представляют собой прямоугольные импульсы постоянного тока прямой и обратной полярности в количестве трех импульсов, 12 В, интервалы 30 мс и 950 мс, с ограничением по току 45 мА. Показано, что вакцина pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен приводит к значительному усилению формирования, как специфического гуморального (16-кратное увеличение среднего титра RBD специфических антител и >20-кратное превышение вируснейтрализующих антител), так и клеточного иммунного ответа (7-кратное увеличение спот образующих клеток на 10^6 клеток) по сравнению с внутримышечным введением ДНК-вакцины.
2. Сконструирован искусственный полиэпитопный Т-клеточный иммуноген против ВКЭ в формате ДНК-вакцины pVAX-AG4-ub. Показано что pVAX-AG4-ub, введенная с помощью электропорации формирует Т-клеточный иммунный ответ, обеспечивая 50% выживаемость лабораторных животных после заражения дозой 100 ЛД₅₀ ВКЭ штаммом 205.
3. Экспериментально реализован метод струйной безыгольной инъекции для доставки вакцин на основе ДНК и мРНК. В рамках исследования:

А) Разработан протокол струйной безыгольной инъекции на мышах линии BALB/c с использованием модельной плазмиды pHMGFP. Показано, что наибольшая эффективность использования метода достигается при введении вакцины под прямым углом, объем препарата 50 мкл, скорость струи - 220 метров в секунду, давление 6,5 бар, время инъекции 0,33 мс.

Б) ДНК-вакцина pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен, введённая мышам линии BALB/c с помощью струйной инъекции, обеспечивает формирование гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных и достоверно снижает вирусную нагрузку Гамма-варианта SARS-CoV-2 в тканях легких на модели мышей BALB/c. Наибольшее снижение вирусной нагрузки (на ~ 1,47 log₁₀) продемонстрировано в группе вакцинированных дозой 100 мкг pVAXrbd.

В) Впервые в РФ продемонстрирована эффективность простого и безопасного способа доставки мРНК вакцины мышам линии BALB/c с помощью струйной инъекции.

Г) Показано, что при иммунизации мышей линии BALB/c путём струйной инъекции мРНК-вакциной, кодирующей ген RBD, наблюдается >1000-кратное увеличение титра RBD-специфических антител, титр вируснейтрализующих антител более чем в 27 раз превышал таковой при в/м введении голой вакцины ($p < 0,05$). Анализ Т-клеточного иммунного ответа показал тенденцию к двукратному увеличению спот образующих клеток на 10^6 клеток по сравнению с внутримышечным введением мРНК-RBD.