

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Олег Викторович Пьянков

Кольцово – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	23
1.1 Общие сведения о SARS-CoV-2, классификация и эволюция	23
1.1.1 Наименование вируса и референс штамм	23
1.1.2 Классификация и номенклатура	23
1.1.3 Пандемические наименования и классификация ВОЗ.....	25
1.2 Эволюция SARS-CoV-2: от патогенности (вариант Дельта) к иммунному уклонению (вариант JN.1)	27
1.2.1 Вариант Дельта: оптимизация проникновения и патогенности	28
1.2.2 Линия Омикрон: смещение тропизма и антигенный дрейф.....	29
1.2.3 Смена стратегий адаптации	31
1.3 Структурно-функциональная организация S-белка SARS-CoV-2 как мишени для вакцин	31
1.3.1 Общая структура S-белка	32
1.3.2 Функциональные домены субъединицы S1	33
1.3.3 Домены субъединицы S2.....	34
1.3.4 В-клеточные эпитопы и классификация нейтрализующих антител. 34	
1.3.5 Т-клеточные эпитопы S-белка: устойчивость к эволюции и роль в защите от тяжёлого течения инфекции.....	37
1.3.6 Антитело зависимое усиление инфекции.....	39
1.3.7 Потенциальный провоспалительный потенциал S-белка: риски и научные гипотезы.....	40
1.3.8 Преимущества полноразмерного тримерного антигена	43
1.4 Ограничения существующих системных вакцин в условиях циркуляции высокоизменчивых вариантов SARS-CoV-2	44
1.4.1 Отсутствие устойчивого мукозального иммунитета при внутримышечной вакцинации	45

1.4.2 Антигенное несоответствие между вакцинным антигеном и циркулирующими вариантами.....	46
1.4.3 Феномен иммунного импринтинга как барьер для обновления вакцинного ответа	49
1.4.4 Необходимость перехода к новой вакцинной стратегии	51
1.5 Особенности мукозального иммунитета и их значение для вакцинации	51
1.5.1 Общая организация мукозального иммунитета.....	51
1.5.2 Лимфатические узлы	52
1.5.3 Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками..	53
1.5.4 Анатомия индуктивных сайтов дыхательных путей.....	54
1.5.4.1 Верхние дыхательные пути: носовая полость и глотка (NALT)	54
1.5.4.2 Нижние дыхательные пути: трахея, бронхи и лёгкие – индуцируемые лимфоидные структуры	55
1.5.4.3 Особенности распределения индуктивных структур по дыхательному тракту	56
1.5.5 Клеточные и молекулярные механизмы адаптивного мукозального иммунитета: толерантность и защитный ответ	57
1.5.6 Корреляты защиты против респираторных патогенов	58
1.5.7 Преимущества и ограничения интраназальной доставки антигена..	60
1.6 Платформы для интраназальных вакцин против SARS-CoV-2	61
1.6.1 Живые аттенуированные вакцины	62
1.6.2 РНК- и ДНК-вакцины	63
1.6.3 Субъединичные вакцины	65
1.6.4 Вирусоподобные частицы (VLP).....	66
1.6.5 Векторные вакцины	67
1.6.5.1 Аденовирусный вектор.....	67
1.6.5.2 Векторы на основе вируса гриппа.....	69
1.6.5.3 Векторы на основе вируса болезни Ньюкасла.....	70
1.6.6 Ограничение интраназальных вакцинных платформ.....	70

1.7. Вектор Сендай как платформа для интраназальной вакцины против SARS-CoV-2.....	71
1.7.1 Биологическая характеристика и безопасность платформы	71
1.7.2 Иммунологические преимущества для мукозальной вакцинации ...	72
1.7.3 Индукция стерилизующего иммунитета.	73
1.8 Резюме к обзору литературы	73
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	75
2.1 МАТЕРИАЛЫ	75
2.1.1 Рекомбинантные вакцинные конструкторы вируса Сендай.....	75
2.1.2 Рекомбинантные белки SARS-CoV-2	75
2.1.3 Используемые штаммы SARS-CoV-2	76
2.1.4 Культуры клеток	77
2.1.5 Синтетические пептиды	78
2.1.6 Антитела и конъюгаты	79
2.1.7 Коммерческие наборы и диагностические системы	79
2.1.8 Питательные среды и вспомогательные реактивы	80
2.1.9 Растворы и буферы	80
2.1.10 Лабораторные животные, условия содержания и этический надзор	81
2.1.11 Оборудование и программное обеспечение.....	82
2.2 МЕТОДЫ	83
2.2.1 Модель оценки провоспалительной активности антигенов in vivo..	83
2.2.2 Интратрахеальное введение	84
2.2.3 Мультиплексный анализ цитокинов методом проточной цитометрии	84
2.2.4 Прижизненная компьютерная томография органов грудной клетки с AI-сегментацией	84
2.2.5 Анализ экспрессии целевых иммуногенов методом иммуноблоттинга	85
2.2.6 Однократная интраназальная иммунизация.....	86

2.2.7 Процедура отбора образцов крови и смывов у иммунизированных животных для изучения иммунного ответа.....	88
2.2.8 Определение IFN- γ методом ELISpot и внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS)	89
2.2.9 Оценка системного и мукозального гуморального ответа методом ИФА	90
2.2.10 Оценка системного гуморального ответа методом реакции нейтрализации на культуре клеток Vero E6	90
2.2.11 Определение титра вируса	91
2.2.12 Модель интраназального вирусного заражения и забор биоматериала	91
Конструкт Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M)	92
Конструкт Sen-S-JN.1(M)	92
2.2.13. ПЦР в реальном времени в биологических образцах	92
2.2.14 Гистологическая обработка и патоморфологический анализ тканей	93
2.2.15. Статистическая обработка экспериментальных данных	93
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	96
3.1. Провоспалительная активность RBD и полноразмерного белка Spike SARS-CoV-2 варианта Дельта.....	96
3.1.1 Клинический эффект RBD и S-белка при интратрахеальном введении	98
3.1.2 Системный и локальный провоспалительный цитокиновый ответ при интратрахеальном введении rRBD и rSpike белка.....	99
3.1.3 Компьютерная томография органов грудной клетки после интратрахеального введения S белка	102
3.1.4 Заключение	105
3.2 Оценка эффективности рекомбинантных вакцинных конструкторов на основе вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующих трансгены RBD и S белков варианта Дельта SARS-CoV-2.....	105

3.2.1 Характеристика рекомбинантных вариантов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M).....	107
3.2.2 Исследование вакцинных свойств рекомбинантов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) на животных моделях.....	112
3.2.2.1 Иммуногенность и протективность рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) на модели сирийского хомяка	112
3.2.2.2 Иммуногенность и протективность рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) на модели мышей линии BALB/c	116
3.2.3 Изучение вакцинных свойств рекомбинантного варианта Sen-Sdelta(M).....	119
3.2.3.1 Иммуногенность и протективность рекомбинантного варианта Sen-Sdelta(M) на модели сирийского хомяка	119
3.2.3.2 Иммуногенность и протективность рекомбинантного варианта Sen-Sdelta(M) на модели мышей линии BALB/c	123
3.3 Обоснование выбора антигена для разработки обновлённой вакцины против актуального варианта SARS-CoV-2	128
3.4 Оценка эффективности рекомбинантного вакцинного конструктора на основе вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего трансген S белка штамма JN.1 коронавируса SARS-CoV-2	129
3.4.1 Характеристика рекомбинантного варианта Sen-S JN.1(M)	129
3.4.2 Иммуногенность Sen-S-JN.1(M).....	131
3.4.2.1 Индукция специфических антител классов sIgA и IgG вакцинным конструктором Sen-S-JN.1(M) на модели мышей линии BALB/c.	132
3.4.2.2 Перекрестная нейтрализующая активность Sen-S-JN.1(M)	133
3.4.3 Протективность рекомбинантного варианта Sen-S-JN.1(M).....	135
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	137
ВЫВОДЫ	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	140
ПРИЛОЖЕНИЕ А:.....	173
ПРИЛОЖЕНИЕ Б:.....	174

ПРИЛОЖЕНИЕ В	175
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	176

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТ – антитела;
- БОЕ – бляшкообразующая единица;
- вРНК – вирусная рибонуклеиновая кислота;
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
- ДИ – доверительный интервал;
- ДК – дендритные клетки;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ЕАЭС – Евразийский экономический союз;
- ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия;
- ИД₅₀ – инфекционная доза 50 %;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- ИФН – интерферон;
- КТ – компьютерная томография;
- ЛНЧ (ЛНП) – липидные наночастицы;
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
- НТ₅₀ – нейтрализующий титр 50 %;
- ОП – оптическая плотность;
- ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром;
- ОТ-ПЦР-РВ – обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция в реальном времени;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- СГТ – среднегеометрический титр;
- ТЦИД₅₀ – тканевая цитопатическая инфекционная доза 50 %;
- ФСБТ – фосфатно-солевой буфер с добавлением Tween-20;
- ЦПД – цитопатическое действие;
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
- ACE2 – Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ангиотензинпревращающий фермент 2);

Ad – Adenovirus (аденовирус);

ADE – Antibody-Dependent Enhancement (антителозависимое усиление инфекции);

AI – Artificial Intelligence (искусственный интеллект);

BALT – Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань);

BAFF – B-cell Activating Factor (фактор активации В-клеток);

BCIP/NBT – субстрат для щелочной фосфатазы (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / Nitro blue tetrazolium);

BCMA – B-Cell Maturation Antigen (антиген созревания В-клеток);

BCR – B-Cell Receptor (В-клеточный рецептор);

BSL – Biosafety Level (уровень биологической безопасности);

CAR – Coxsackie-Adenovirus Receptor (коксаки-аденовирусный рецептор);

CD – Cluster of Differentiation (кластер дифференцировки);

CHO – Chinese Hamster Ovary (клетки яичников китайского хомячка);

CMV – Cytomegalovirus (цитомегаловирус);

ConA – Concanavalin A (конканавалин А);

COVID-19 – Coronavirus Disease 2019 (коронавирусная инфекция 2019 года)

D-MALT – Diffuse MALT (диффузная лимфоидная ткань слизистых);

dmLT – detoxified mutant of heat-labile toxin (детоксифицированный мутант термолабильного энтеротоксина);

EGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein (усиленный зеленый флуоресцентный белок);

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (иммуноферментный анализ);

ELISpot – Enzyme-Linked Immunospot (метод иммуноферментного анализа отдельных клеток);

FBS – Fetal Bovine Serum (фетальная бычья сыворотка);

FP – Fusion Peptide (пептид слияния);

GALT – Gut-Associated Lymphoid Tissue (кишечная лимфоидная ткань);

GISAID – Global Initiative on Sharing All Influenza Data (Глобальная инициатива по обмену данными о гриппе);

HEK – Human Embryonic Kidney (клетки эмбриональной почки человека);

HLA – Human Leukocyte Antigen (лейкоцитарный антиген человека);

HU – Hounsfield Units (единицы Хаунсфилда);

iBALT – induced BALT (индуцированная бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань);

IAVES / ICLAS – International Association / Council for Laboratory Animal Science;

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses (Международный комитет по таксономии вирусов);

IEDB – Immune Epitope Database (база данных иммунных эпитопов);

IFN – Interferon (интерферон);

Ig (IgA, IgG, IgM) – Immunoglobulin (иммуноглобулин);

IL – Interleukin (интерлейкин);

iTreg – induced Regulatory T cells (индуцированные регуляторные Т-клетки);

K18-hACE2 – трансгенные мыши линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J;

LAV – Live Attenuated Vaccine (живая аттенуированная вакцина);

LLPCs – Long-Lived Plasma Cells (долгоживущие плазматические клетки);

LPS – Lipopolysaccharide (липополисахарид);

LT – Heat-Labile Toxin (термолабильный энтеротоксин);

MALT – Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками);

MBCs – Memory B Cells (В-клетки памяти);

MDA5 – Melanoma Differentiation-Associated protein 5;

MHC – Major Histocompatibility Complex (главный комплекс гистосовместимости);

MRCA – Most Recent Common Ancestor (последний общий предок);

NALT – Nasal-Associated Lymphoid Tissue (носоглоточно-ассоциированная лимфоидная ткань);

Ni-NTA – Nickel-Nitrilotriacetic acid (никель-нитрилотриуксусная кислота);
 NLRP3 – NLR Family Pyrin Domain Containing 3;
 NTD – N-Terminal Domain (N-терминальный домен);
 O-MALT – Organized MALT (организованная лимфоидная ткань
 слизистых);
 PANGO – Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages;
 PASC – Post-Acute Sequelae of SARS-CoV-2 infection (постковидный
 синдром);
 PBCS – Polybasic Cleavage Site (полиосновной сайт расщепления);
 PBS – Phosphate-Buffered Saline (фосфатно-солевой буфер);
 PAMP – Pathogen-Associated Molecular Patterns (молекулярные паттерны,
 ассоциированные с патогенами);
 PMSF – Phenylmethylsulfonyl fluoride (фенилметилсульфонилфторид);
 RBD – Receptor-Binding Domain (рецептор-связывающий домен);
 RBM – Receptor-Binding Motif (рецептор-связывающий мотив);
 RIG-I – Retinoic acid-Inducible Gene I;
 rRBD – recombinant Receptor-Binding Domain (рекомбинантный рецептор-
 связывающий домен);
 rSpike – recombinant Spike protein (рекомбинантный шиповидный белок);
 S1PR1 – Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1;
 SARS-CoV-2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2;
 sCD40L – Soluble CD40 Ligand (растворимый лиганд CD40);
 SDS – Sodium Dodecyl Sulfate (додецилсульфат натрия);
 SeV – Sendai Virus (вирус Сендай);
 sIgA – secretory Immunoglobulin A (секреторный иммуноглобулин А);
 SPF – Specific Pathogen Free (свободные от специфических патогенов);
 TAG-CO-VAC – Technical Advisory Group on COVID-19 Vaccine
 Composition;
 TCR – T-Cell Receptor (Т-клеточный рецептор);
 Tfh – T follicular helper cells (фолликулярные Т-хелперы);

TGF- β – Transforming Growth Factor beta (трансформирующий фактор роста бета);

TLR – Toll-Like Receptor (толл-подобный рецептор);

TMPRSS2 – Transmembrane Protease Serine 2 (трансмембранная сериновая протеаза 2);

TNF- α – Tumor Necrosis Factor alpha (фактор некроза опухоли альфа);

TRM – Tissue-Resident Memory T cells (тканевые резидентные Т-клетки памяти);

VLP – Virus-Like Particle (вирусоподобная частица);

VOC – Variant of Concern (вариант, вызывающий беспокойство);

VOI – Variant of Interest (вариант, представляющий интерес);

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, стала беспрецедентным вызовом для глобального здравоохранения [1, 2]. Несмотря на массовое внедрение системных вакцин, обеспечивших значимое снижение тяжести течения и летальности, их способность прерывать цепь передачи быстро эволюционирующего вируса оказалась недостаточной [3, 4, 5]. Эволюция SARS-CoV-2 от варианта Дельта (B.1.617.2), характеризующегося высокой патогенностью и фузогенностью [6], к доминирующим субвариантам линии Омикрон, включая JN.1 (BA.2.86.1.1), сопровождалась сменой адаптационной стратегии вируса [7, 8] в сторону максимального иммунного уклонения при сохранении высокой трансмиссивности через верхние дыхательные пути [9]. В результате существующие системные вакцины сталкиваются с тремя фундаментальными ограничениями: отсутствием индукции устойчивого мукозального иммунитета во входных воротах инфекции [10, 11], антигенным несоответствием вакцинного иммуногена циркулирующим штаммам [12, 13] и феноменом иммунного импринтинга, препятствующим формированию ответа на новые эпитопы [14, 15, 16].

Для эффективного контроля передачи респираторных вирусов необходима индукция стерилизующего иммунитета на уровне слизистых оболочек дыхательных путей, обеспечиваемого секреторным IgA (sIgA) и тканевыми резидентными Т-клетками памяти (TRM) [10, 11, 17]. В этом контексте интраназальные векторные вакцины представляют собой наиболее перспективное направление [5, 18]. Среди доступных платформ вирус Сендай штамма Москва обладает уникальным сочетанием свойств: отсутствует предсуществующий иммунитет у населения, вирус непатогенен для человека, но способен ограниченно реплицироваться в респираторном эпителии, обеспечивает мощную внутреннюю адьювантность за счет индукции интерферонов I типа, реплицируется исключительно в цитоплазме и не имеет фазы ДНК, что исключает

риск интеграции в геном, и обладает высокой генетической стабильностью благодаря «правилу шести» [19, 20, 21, 22, 23, 24].

Ключевым нерешенным вопросом рационального дизайна мукозальных вакцин остается выбор оптимального антигена. Использование изолированного рецептор-связывающего домена (RBD) минимизирует риски неспецифической активации, но ограничивает спектр индуцируемых эпитопов (преимущественно классы 1-3), делая вакцину уязвимой к единичным мутациям [25, 26, 27, 28]. Полноразмерный S-белок в нативной тримерной конформации сохраняет полный репертуар В- и Т-клеточных эпитопов [29, 30], включая криптоэпипептиды классов 4–5 и консервативные участки субъединицы S2 [31], что критически важно для защиты от высокоизменчивых вариантов, таких как JN.1. Однако прямой сравнительной оценки провоспалительного потенциала, иммуногенности и протективной эффективности конструкторов на основе RBD и полноразмерного S-белка в составе вакцин при однократном интраназальном введении до настоящего времени не проводилось [5]. Таким образом, разработка и доклиническая оценка интраназальной векторной вакцины на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего актуальный антиген, является научно обоснованной и эпидемиологически необходимой задачей.

Степень разработанности темы исследования

К настоящему времени в литературе детально описаны морфология и антигенная структура S-белка SARS-CoV-2, включая кристаллографические данные о взаимодействии RBD с рецептором ACE2 [32, 33], а также классификация нейтрализующих антител по пяти классам эпитопов [26, 27]. Ограничения системных вакцин (мРНК, аденовирусных, субъединичных) в условиях циркуляции вариантов линии Омикрон проанализированы в ряде обзоров [4, 5], где подчеркивается критическая роль мукозального иммунитета для прерывания передачи респираторных патогенов [10]. Платформа вируса Сендай успешно применялась в доклинических исследованиях против гриппа и RSV, демонстрируя способность индуцировать секреторный IgA и тканевые резидентные Т-клетки памяти после интраназального введения [21, 23, 24].

В то же время существует ряд нерешенных вопросов. Во-первых, отсутствуют прямые сравнительные данные о провоспалительной активности изолированного RBD и полноразмерного S-белка при локальной доставке в дыхательные пути, что критически важно для оценки безопасности интраназальных вакцин.

Во-вторых, не до конца изучены вакцинные свойства рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего трансгены SARS-CoV-2, на чувствительных животных моделях.

Наконец, несмотря на рекомендации Технической консультативной группы ВОЗ по обновлению антигенного состава вакцин до варианта JN.1 (BA.2.86.1.1) [34], эффективность интраназальных векторных платформ, экспрессирующих данный вариант, против эволюционно близких субвариантов линии Омикрон (XBB.1.16, EG.5.1, KP.2) и их способность обеспечивать стерилизующий иммунитет в легочной ткани и носовых раковинах остаются малоизученными.

Соответственно, существует потребность в исследовании, которое:

- 1) оценило бы профиль безопасности потенциальных иммуногенов при локальной доставке в дыхательные пути;
- 2) провело бы анализ иммуногенности и протективности вакцинных конструкторов на основе RBD и полноразмерного S-белка вируса SARS-CoV-2,;
- 3) разработало и апробировало обновленный вакцинный прототип против актуального варианта JN.1, рекомендованного ВОЗ на 2025 год, оценив его перекрестную нейтрализующую активность и способность подавлять репликацию вируса во входных воротах инфекции на моделях животных.

Цели и задачи

Целью данной работы является 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 K-18hACE2. 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)/

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретически 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-ACE2) 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 протективная 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 NT₅₀). 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-РВ 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.

Положения, выносимые на защиту

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 (СГТ = 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 (СГТ = 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.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов 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 материалов диссертации

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

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.

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.

Структура и объем диссертационной работы

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.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, кандидату биологических наук Пьянкову Олегу Викторовичу за осуществление научного руководства, активную поддержку в планировании, проведении и интерпретации экспериментов.

Автор благодарит сотрудников отдела «Коллекция микроорганизмов» за помощь в проведении вирусологических исследований; сотрудников лаборатории под руководством Кочневой Г.В. (отдел молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов) за предоставление рекомбинантных вариантов вируса Сендай; сотрудников лаборатории под руководством Карпенко Л.И. (отдел

биоинженерии) за помощь в проведении цитометрических исследований; сотрудников лаборатории под руководством Щербакова Д.Н. (отдел биофизики и экологических исследований) за предоставление рекомбинантных белков SARS-CoV-2; сотрудников отдела «Микроскопических исследований» за проведение патоморфологического анализа.

Также автор выражает особую благодарность Прудниковой Е.Ю. (отдел геномных исследований) за проведение мультиплексного анализа цитокинов методом проточной цитометрии; Шульгиной И.С. (отдел «Коллекция микроорганизмов») за помощь в проведении ИФА-исследований; Кочневой Г.В. за научные консультации и помощь в дизайне исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о SARS-CoV-2, классификация и эволюция

1.1.1 Наименование вируса и референс штамм

Коронавирусная инфекция 2019 года (COVID-19), вызванная вирусом SARS-CoV-2, была впервые зарегистрирована в декабре 2019 года в виде вспышки атипичной пневмонии неизвестной этиологии в городе Ухань, провинция Хубэй, Китай [1]. Первый выделенный изолят (24 декабря 2019 г.), получил наименование BetaCoV/Wuhan-Hu-1/2019 (Wuhan-Hu-1 или WH-Human 1), депонирован в GenBank как MN908947 [2]. Данный изолят стал референсом для разработки диагностических тестов и первых поколений вакцин [35, 36, 37].

Выявленное родство первых изолятов нового вируса с коронавирусом летучих мышей (89,1% гомологии) и с коронавирусом тяжелого респираторного синдрома (SARS-CoV, 73,8–74,9% в участке рецептор-связывающего домена (RBD)), вызвавшего вспышку атипичной пневмонии в 2003 году [38] предопределило наименование Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) 11 февраля 2020 года [39] нового коронавируса, как SARS-CoV-2.

До этого момента в научной литературе использовались неоднозначные рабочие обозначения: новый коронавирус 2019 года (2019-nCoV) [40, 41] и SARS-подобный коронавирус [42, 43], что создавало значительные трудности при обмене данными и координации между исследовательскими группами.

1.1.2 Классификация и номенклатура

Для дальнейшего описания проблематики эволюции вируса SARS-CoV-2 необходимо определиться с номенклатурой штаммов. В настоящее время используются несколько систем классификации: PANGO, GISAID, Nextstrain – каждая из которых имеет свои преимущества, но также риски неоднозначности и путаницы. В данной работе мы используем систему PANGO, описание которой требует исторического контекста.

Ключевая проблема любой классификации нового патогена заключается в установлении последнего общего предка (MRCA). На сегодняшний день не

кажется вполне очевидным, что в первую неделю вспышки в Ухане были получены изоляты, относящиеся к двум разным линиям (кладам).

В частности, практически одновременно с изолятом Wuhan-Hu-1 получены изоляты Wuhan/IME-WH01/2019 (GISAID: EPI_ISL_402125) и Wuhan/WH04/2020 (GISAID: EPI_ISL_406801), имеющие предковые нуклеотиды T8782 и C28144 в ORF1ab и ORF8 [44], гомологичные коронавирусам летучих мышей (RaTG13, RmYN02) [1]. Именно генотип T8782/C28144 было предложено рассматривать как предковый [45], а не C8782 и T28144, представителем которого является Wuhan-Hu-1.

Описанный полиморфизм лёг в основу ранних классификаций: Форстер с соавт. [46] выделили гаплотипы А (T8782/C28144) и В (C8782/T28144), а китайская группа [47] – генотипы L (Leu84) и S (Ser84) по ORF8, где L соответствует предковому состоянию. В этом контексте изоляты вроде Wuhan/WH04/2020 считаются более репрезентативными для реконструкции предка, чем Wuhan-Hu-1, уже несущий приобретённые мутации (гаплотип В / генотип S).

Эта дихотомия была использована Рамбо с соавторами [48] для создания филогенетической классификации, разделившей первые линии SARS-CoV-2 на А (близкие к предку) и В (с мутациями C8782C и T28144T). Эта классификация явилась базисом системы PANGO (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages), которая основывается не на отдельных мутациях, а на филогенетической структуре, географическом распространении и доказанных цепях передачи. Ветвление линий обозначается числовыми суффиксами (например, В.1, В.1.1), а при значительной дивергенции – новыми буквами (например, С.1).

Несмотря на отсутствие филогенетической близости к MRCA, штамм Wuhan-Hu-1 (GenBank: NC_045512.2 = MN908947.3) остается в качестве референсного в системе PANGO благодаря ранней публикации и широкому использованию [37]. В системе GISAID позицию референса занял гомологичный изолят hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124; гаплотип В, генотип L).

1.1.3 Пандемические наименования и классификация ВОЗ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 марта 2020 года объявила вспышку нового коронавируса (COVID-19) глобальной пандемией [49].

Первым ключевым эволюционным событием в пандемии стала фиксация замены D614G в шиповидном белке (S-белок, spike protein) SARS-CoV-2 [50]. Данная аминокислотная замена впервые была выявлена в январе 2020 года и быстро достигла высокой частоты в популяции вируса [51]. По состоянию на 30 марта 2020 года замена D614G обнаруживалась в 66% европейских образцов и в 44% от всех зарегистрированных образцов в мире [50].

Среди европейских стран данная мутация встречалась наиболее часто (87%) в Италии. К марту 2020 года Италия стала второй страной после Китая по числу случаев заболевания и летальных случаев (смертность 7,2%) [52].

Хотя D614G не определяет отдельную линию, она быстро фиксировалась в доминирующих линиях, включая B.1, и стала маркером глобально распространённых штаммов.

На территории РФ к моменту закрытия границ 27 марта 2020 года, большинство секвенированных образцов соответствовало линиям B.1, B.1.1 и B.1. *, что косвенно указывает на подавляющее большинство завозов вируса из европейских стран. Азиатские линии A, B и B.2 среди образцов из России были обнаружены только в 2% случаев [53].

К июню 2020 года вирусы, несущие замену D614G и принадлежащие к линии B.1 и её производным, стали преобладающими в большинстве стран мира. Благодаря своему глобальному распространению и полной геномной характеристике, изоляты линии B.1 (например, SARS-CoV-2/Italy-INMI1/2020) были использованы в качестве рабочих вирусных штаммов в ряде лабораторных исследований, включая оценку нейтрализующей активности антител [54] и тестирование вакцин [55].

С конца 2020 года началось появление вариантов с множественными мутациями в S-белке, существенно меняющими эпидемиологические и

иммунологические характеристики вируса. Для обозначения новых вариантов, зачастую использовали географические обозначения: например, «английский», «южноафриканский» вариант, что порождало стигматизацию и дискриминацию [56]. В целях устранения этих недостатков ВОЗ в мае 2021 года рекомендовала использовать буквы греческого алфавита для обозначения вариантов, представляющих интерес (Variants of Interest, VOI) и вызывающих беспокойство (Variants of Concern, VOC) [57].

С конца 2020 года началась динамическая смена преобладающих вариантов SARS-CoV-2, каждый из которых характеризовался новым набором мутаций в гене S-белка, обеспечивающим преимущества в передаче и иммунном уклонении [58].

Первый VOC Альфа (B.1.1.7) был выявлен в Великобритании в сентябре 2020 года и стал доминирующим к январю 2021 года. Несет ключевые мутации: N501Y, Δ69-70, P681H и D614G [59]. В исследованиях было показано, что вариант Альфа имеет существенное преимущество в передаче по сравнению с другими линиями с показателем репродукции на 50-100% выше [60] и увеличением риска госпитализации на 60% [61].

Вариант Бета (B.1.351) – обнаружен в Южной Африке в октябре 2020 года, несет три ключевые замены в RBD: K417N, E484K и N501Y [62], ассоциированных со снижением эффективности вакцин [63, 64].

Вариант Гамма (P.1) – выявлен в Бразилии в декабре 2020 года, объединяет замены E484K, K417T и N501Y, аналогичные варианту Бета, с выявленными впервые L18F и D614G [65]. Данный вариант так же, как вариант Бета, снизил эффективность вакцин [64].

Вариант Дельта (B.1.617.2) – впервые обнаружен в Индии в октябре 2020 года, стал доминирующим вариантом к июню 2021 года [6]. Данный вариант отличался высокой инфекционностью – число переболевших превысило 30% населения мира, вследствие чего коллективный иммунитет стал оказывать большее эволюционное давление.

В результате этого появились новые VOC с высокой степенью иммуноуклонения. Далее мы подробно рассмотрим эволюцию и адаптивные особенности варианта Дельта и последующих вариантов.

1.2 Эволюция SARS-CoV-2: от патогенности (вариант Дельта) к иммунному уклонению (вариант JN.1)

Вирусы постоянно сталкиваются с многоуровневыми ограничениями, которые можно разделить на базальные (физико-химические), клеточно-зависимые (рецепторный репертуар, внутриклеточные факторы) и организмо-зависимые (иммунная система хозяина). Для преодоления этих барьеров вирусы используют высокую геномную изменчивость и большую численность популяций, что обеспечивает им значительный адаптивный потенциал. Этот потенциал проявляется в фенотипических изменениях: смене клеточного тропизма, расширении или сужении круга хозяев, уклонении от иммунного ответа и других стратегиях выживания. Хотя многие адаптивные мутации несут издержки для вирусной приспособленности, эволюция часто находит компромиссные решения, позволяющие вирусу сохранять устойчивое сосуществование с хозяином [66].

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, стала яркой иллюстрацией данной динамики. С момента своего появления в конце 2019 года вирус прошёл несколько этапов эволюционной перестройки, каждый из которых сопровождался возникновением новых вариантов с уникальными биологическими свойствами. Эта эволюция определялась двумя ключевыми факторами отбора:

1. оптимизацией эффективности проникновения в клетку-хозяина и репликации;
2. уклонением от нарастающего гуморального иммунного давления в популяции.

Таким образом, в ходе пандемии последовательно доминировали варианты, представляющие собой крайние формы этих стратегий: вариант Дельта

(B.1.617.2), как образец максимальной патогенности и фузогенности, и вариант JN.1 (BA.2.86.1.1), как кульминация иммунного уклонения при сохранении высокой трансмиссивности.

1.2.1 Вариант Дельта: оптимизация проникновения и патогенности

Вариант Дельта (B.1.617.2), впервые идентифицированный в Индии в октябре 2020 года, стал доминирующим в глобальной циркуляции к середине 2021 года [6]. Его доминирование было обусловлено наличием ключевых мутаций в гене S-белка, в частности L452R и P681R, а также T478K, которые совместно обеспечили значительное преимущество в передаче и патогенности [67].

Замена L452R, локализованная в рецептор-связывающем мотиве (RBM) домена связывания с рецептором (RBD), усиливает взаимодействие с ACE2 за счёт формирования дополнительных электростатических связей с остатками E35, E37 и D38 рецептора, а также снижает связывание с нейтрализующими антителами класса 2, такими как LY-CoV555 [68, 69].

Замена T478K, также расположенная в RBM, дополнительно повышает аффинность к ACE2 и нарушает распознавание вируса рядом нейтрализующих антител, что в совокупности приводит к частичному иммунному уклонению [70].

Критически важной для фенотипа Дельта оказалась замена P681R в сочетании с ранее упомянутыми L452R и T478K. Данная замена расположена непосредственно перед полиосновным сайтом расщепления (фуриновым сайтом) на границе субъединиц S1/S2. Эта замена значительно повышает эффективность распознавания сайта фурином, ускоряя «прайминг» S-белка в транс-аппарате Гольджи [71]. В сочетании с уже присутствующей в исходном штамме Wuhan-Hu-1 вставкой PRRA, формирующей мотив RRAR↓S [72], P681R обеспечивает почти полное предварительное расщепление S-белка в продуцирующих клетках. Это, в свою очередь, облегчает последующее расщепление по сайту S2' сериновой протеазой TMPRSS2 на поверхности клетки-мишени, что является предпосылкой для TMPRSS2-зависимого пути проникновения через плазматическую мембрану [73].

Варианты с усиленным фурин/TMPRSS2-зависимым путём, такие как Дельта, эффективно реплицируются в нижних дыхательных путях, богатых TMPRSS2, и обладают высокой фузогенностью – способностью образовывать синцитии и передавать инфекцию по механизму cell-to-cell (от клетки к клетке), что ассоциировано с тяжёлым течением [71].

По данным клинического наблюдения инфицирование вариантом Дельта ассоциировано с сокращённым инкубационным периодом, повышенной вирусной нагрузкой и на 60–120% увеличенным риском госпитализации по сравнению с предыдущими вариантами [67, 74].

Таким образом, эволюционная стратегия вируса варианта Дельта была направлена на максимизацию инфекционности, эффективности клеточного проникновения и патогенности, особенно в нижних дыхательных путях. При этом иммунное уклонение имело место, но оставалось умеренным: сыворотки, полученные после вакцинации мРНК-вакцинами, всё ещё демонстрировали значимую (хотя и сниженную в 3–6 раз) нейтрализующую активность [75].

1.2.2 Линия Омикрон: смещение тропизма и антигенный дрейф

С приходом линии Омикрон (B.1.1.529) в конце 2021 года вирус резко изменил стратегию. Омикрон отличался рекордным числом мутаций в S-белке – более 30, из них 15 - в RBD, включая K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y [76]. Данная комбинация обеспечила выраженное уклонение вируса от нейтрализующих антител, формируемых как после вакцинации, так и после перенесённой инфекции предыдущими вариантами [77, 78].

Однако в отличие от варианта Дельта, вариант Омикрон сохранил исходный пролин в позиции 681 (P681) и не несёт ускоряющих расщепление S-белка фурином мутаций. Это приводит к снижению эффективности TMPRSS2-зависимого пути проникновения вируса в клетку и смещает баланс в сторону катепсин-зависимого эндосомального пути [7, 79]. Поскольку TMPRSS2 слабо экспрессирован в эпителии верхних дыхательных путей (нос, глотка), Омикрон

преимущественно реплицируется именно там. Это обуславливает его высокую трансмиссивность при снижении фузогенности и патогенности [7, 8].

Дальнейшая эволюция Омикрона – через BA.2, BA.4, BA.5, а затем через рекомбинантные линии XBB и подлинии BQ.1 – шла по пути накопления замен, усиливающих иммунное уклонение: F486V, R346T, K444T и другие. Эти замены, особенно у BQ.1.1 и XBB.1.5, приводили к почти полной потере распознавания вируса иммунными сыворотками, полученными после трёхкратной вакцинации [80].

В августе 2023 года ВОЗ сообщила о выявлении нового варианта BA.2.86, несущего более 30 мутаций в S-белке по сравнению с BA.2 и демонстрирующего высокую антигенную дивергенцию [13]. Хотя изначально он не обладал конкурентным преимуществом, уже к осени 2023 года от него возник дочерний вариант – JN.1 (BA.2.86.1.1), отличающийся единственной дополнительной заменой L455S в RBD [9].

Несмотря на кажущуюся минимальность, замена L455S оказалась решающей. Аминокислотный остаток L455 локализован в петле, критически важной для связывания антител класса 3, таких как S309 и его клинические аналоги (сотровимаб и др.). Экспериментально показано, что замена L455S снижает аффинность таких антител в 8–12 раз, что делает JN.1 устойчивым даже к сывороткам, полученным после бустеризации вакцинами на основе XBB.1.5 [9]. У части штаммов JN.1 параллельно возникает замена F456L, которая дополнительно нарушает гидрофобные взаимодействия с CDR-доменами широкого спектра нейтрализующих антител. В совокупности L455S + F456L формируют так называемый «иммунологический щит», минимизирующий распознавание вируса как постинфекционным, так и поствакцинальным иммунитетом [81].

К маю 2025 года JN.1 и его прямые потомки (KP.2, KP.3.1.1, XEC и др.) составляли подавляющее большинство циркулирующих штаммов во всех регионах мира [57]. При этом JN.1 сохраняет высокую приспособленность к репликации в верхних дыхательных путях, повышенную контагиозность и

способность к повторному заражению даже у лиц с недавней инфекцией ХВВ-линией [82].

1.2.3 Смена стратегий адаптации

Результаты ряда исследований свидетельствуют о том [8, 83, 84], что эволюция SARS-CoV-2 от варианта Дельта к JN.1 сопровождалась сменой доминирующей стратегии адаптации: если вариант Дельта характеризовался высокой фузогенностью, TMPRSS2-зависимым проникновением и тропизмом к нижним дыхательным путям, что обуславливало его высокую патогенность, то JN.1, напротив, демонстрирует преобладание эндосомального (катепсин-опосредованного) пути проникновения, репликацию преимущественно в верхних дыхательных путях, низкую фузогенность и выраженные свойства иммунного уклонения.

Наблюдаемая траектория эволюции SARS-CoV-2 требует разработки новых вакцинных стратегий.

Перед переходом к вакцинному дизайну необходимо проанализировать существующие ограничения, связанные с иммунизацией против SARS-CoV-2. В следующей главе рассматривается основной антигенный компонент, используемый в современных вакцинах, а также его патогенетическая роль в инфекции COVID-19.

1.3 Структурно-функциональная организация S-белка SARS-CoV-2 как мишени для вакцин

Ключевой молекулой, определяющей как эволюционную траекторию, так и патогенетические особенности SARS-CoV-2, является S-белок. Именно он служит основной мишенью для всех современных вакцин, а его структурные изменения лежат в основе иммунного уклонения и смены тропизма, описанных в предыдущей главе.

Основная функция S-белка заключается в инициации начального контакта с клеткой-хозяином через взаимодействие с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2), что опосредует слияние вирусной и клеточной мембран.

В связи с этим рациональный дизайн вакцин против SARS-CoV-2 неразрывно связан с пониманием структурно-функциональной организации S-белка, его конформационной динамики и антигенных особенностей. В данной главе последовательно рассмотрены: структура зрелого S-тримера; домены и ключевые функциональные мотивы; молекулярные основы взаимодействия с ACE2 и запуска слияния; В-клеточные и Т-клеточные эпитопы; классификация нейтрализующих антител; антитело-зависимое усиление инфекции и провоспалительный потенциал S-белка.

1.3.1 Общая структура S-белка

S-белок SARS-CoV-2 представляет собой классический вирусный фузионный гликопротеин класса I. Он синтезируется в виде предшественника длиной 1273 аминокислот (а/к), включающего N-концевой сигнальный пептид (а/к 1–13), который направляет полипептид в эндоплазматический ретикулум (ЭР) и удаляется сигнальной пептидазой ещё до транспорта в аппарат Гольджи. Зрелый белок на поверхности вириона состоит из 1260 аминокислот (а/к 14–1273) и существует в виде гомотримера, каждый протомер которого состоит из двух функциональных субъединиц: S1 (а/к 14–685) и S2 (а/к 686–1273) [33, 85].

В предфузионной конформации, преобладающей на поверхности зрелых вирионов (>97% тримеров) [86], S-тример представляет собой компактную структуру, где глобулярные головки S1 (три на тример) покрывают центральный «стебель», образованный спиральными доменами S2 [87]. Эта конформация метастабильна: энергетически неоптимальна и предназначена для хранения потенциальной энергии, которая высвобождается в ходе слияния мембран.

Ключевой особенностью S-белка SARS-CoV-2 является наличие полиосновного сайта расщепления (polybasic cleavage site, PBCS) на границе S1/S2. В отличие от SARS-CoV и большинства других бета-коронавирусов, у SARS-CoV-2 в геноме присутствует вставка PRRA (а/к 682–685), формирующая мотив RRAR, который распознаётся клеточными проконвертинами (в первую очередь – фурином) в транс-аппарате Гольджи [72]. Так называемое

«прайминговое» расщепление не приводит к диссоциации S1 и S2, но повышает конформационную гибкость тримера и облегчает последующее протеолитическое расщепление по сайту S2' при контакте с клеткой-мишенью, что является ключевым этапом для инициации слияния мембран. Именно этот сайт определяет выбор между двумя путями проникновения в клетку и, как следствие, тропизм и патогенность вируса.

1.3.2 Функциональные домены субъединицы S1

Субъединица S1 отвечает за распознавание и связывание с клеточным рецептором ACE2. Она включает два основных домена: N-терминальный домен (NTD, а/к 14–305) и рецептор-связывающий домен (RBD, а/к 319–541).

Первоначально NTD рассматривался только как структурный элемент. Однако было показано, что он содержит высокоиммуногенный «NTD-суперсайт» – конформационный эпитоп, распознаваемый нейтрализующими антителами [68]. Тем не менее, этот сайт уязвим к мутациям: уже у варианта Альфа (B.1.1.7) делеция Δ69–70 разрушает его структуру, у линии Омикрон наблюдается глубокая деградация NTD-суперсайта через комбинацию замен (A67V, T95I) и делеций (Δ142–144), что делает NTD-направленные антитела практически неэффективными [88].

RBD – это ключевой функциональный и антигенный домен всего S-белка. RBD содержит рецептор-связывающий мотив (RBM, а/к 438–506), непосредственно контактирующий с внеклеточным доменом ACE2. Связывание опосредуется набором гидрофобных и электростатических взаимодействий с такими аминокислотными остатками ACE2, как K31, E35, D38, Y41, Q42, L79, M82, K353 и D355 [32]. Основные контактные остатки RBD включают Y449, Y453, L455, F456, A475, F486, N487, Y489, Q493, Q498, N501, G502 и Y505, а также K417, расположенный за пределами RBM, но участвующий в интерфейсе связывания [89].

Критически важной особенностью RBD является его конформационная динамика: каждый протомер в тримере может находиться в одном из двух

состояний – «вниз» (down, закрытое, недоступное для ACE2) или «вверх» (up, открытое, связывающееся с ACE2) [90]. Динамическое равновесие между этими состояниями регулируется как внутримолекулярными взаимодействиями, так и мутациями (например, D614G смещает равновесие в сторону «up»-конформации, увеличивая аффинность к ACE2 и инфекционность вируса).

1.3.3 Домены субъединицы S2

Субъединица S2 отвечает за слияние вирусной и клеточной мембран. После диссоциации S1 и расщепления по сайту S2' S2 претерпевает конформационные перестройки, в ходе которых [91]:

- пептид слияния (FP, а/к 788–806) встраивается в клеточную мембрану;
- гептадные повторы HR1 (а/к 912–984) и HR2 (а/к 1163–1213) образуют шестиспиральный пучок (6-HB), который стягивает вирусную и клеточную мембраны, обеспечивая их слияние;
- трансмембранный домен (а/к 1213–1237) и цитоплазматический хвост (а/к 1237–1273) обеспечивают закрепление белка в вирусной мембране.

Субъединица S2 более консервативна по сравнению с S1, её последовательность практически не изменяется у различных вариантов вируса, включая JN.1, что делает её потенциальной мишенью для разработки вакцин и моноклональных антител [92]. Однако нейтрализующая активность таких антител остаётся предметом активного изучения и дискуссии [93]. При меньшей изменчивости даже точечные мутации, такие как D950N (вариант Дельта) и Q954H (вариант Омикрон), приводят к антигенному дрейфу [94].

1.3.4 В-клеточные эпитопы и классификация нейтрализующих антител

Гуморальный иммунный ответ на вирус формируется специфическими для этого вируса В-клетками (В-лимфоцитами), распознающими определённые участки вирусных белков – В-клеточные эпитопы. Под В-клеточным эпитопом понимают фрагмент молекулы антигена, способный специфически связываться либо с В-клеточным рецептором (BCR) на поверхности В-лимфоцита, либо с секретируемым антителом [95]. В-клеточные эпитопы могут быть линейными –

представляющими собой непрерывную последовательность аминокислот, или конформационными – образующимися за счёт трёхмерной укладки [96].

Функция антител включает два функциональных репертуара [97]: когнитивный (распознавание антигена через Fab-фрагмент) и эффекторный (активация клеточных и молекулярных систем через Fc-фрагмент).

Способность антител блокировать инфекционность вируса *in vitro* получила название нейтрализующей активности. Эта функция традиционно рассматривается как основной суррогатный коррелят защиты, обеспечиваемой вакцинацией, ввиду высокой связи с клиническим эффектом [98].

Хотя реакция нейтрализации *in vitro* остаётся наиболее распространённым методом оценки гуморального ответа, растущее число исследований указывает на необходимость учёта Fc-опосредованных эффекторных функций, особенно в контексте защиты от высокоиммуноуклоняющихся вариантов [99, 100]. В частности, показано, что антитела, направленные против консервативных эпитопов, часто сохраняют более выраженную Fc-опосредованную эффекторную активность по сравнению с антителами, нацеленными на гипервариабельные участки, преимущественно обладающие нейтрализующей, но не эффекторной функцией [101, 102].

В настоящее время основным ограничением в изучении Fc-опосредованных функций антител остается отсутствие стандартных методов исследования *in vitro* и установление корреляционной связи *in vivo* [99]. В связи с этим, несмотря на растущее внимание к Fc-опосредованным механизмам, основной фокус исследований по-прежнему сосредоточен на нейтрализующих антителах, направленных против ключевых доменов S-белка и позволяющих оценивать эффективность вакцин-индуцированного гуморального ответа с точки зрения антигенной изменчивости.

Функционально важные, они же нейтрализующие, B-клеточные эпитопы S-белка SARS-CoV-2 распределены неравномерно. Основная масса потенциальных нейтрализующих антител направлена против рецептор-связывающего домена (RBD) в субъединице S1. Дополнительно выявлены антитела к N-терминальному

домену (NTD), однако их эпитопы легко разрушаются делециями у вариантов Омикрон (см. раздел 1.2.2). Субъединица S2, как сказано ранее, содержит консервативные эпитопы, индуцирующие кросс-реактивные, но слабонейтрализующие антитела.

Наиболее детально изучены антитела к RBD, которые по структурным и функциональным признакам подразделяются на пять классов [25, 26, 27, 103].

Класс 1: связываются с RBD только в «up»-конформации и напрямую конкурируют с ACE2 (например, C102, C105). Их эпитопы локализованы в RBM и разрушаются мутациями E484K, Q493R и др.

Класс 2: связываются с RBD в любой конформации, частично перекрывая сайт связывания ACE2 (например, COVA2-39). Также чувствительны к мутациям в RBM.

Класс 3: связываются вне ACE2-сайта, на более консервативных участках RBD, не зависят от конформации (например, C135, S309). Устойчивы к большинству мутаций у вариантов Дельта и ранних изолятов Омикрон.

Класс 4: связываются вне ACE2-сайта, требуют «up»-конформации RBD для доступа к эпитопу; эпитоп частично перекрывается с сайтом связывания ACE2 и демонстрирует умеренную консервативность среди бетакоронавирусов (до 86%), включая SARS-CoV-2.

Класс 5: распознают криптоэпитопы, недоступные в стабильной нативной конформации тримера. Данные эпитопы становятся доступными только при динамических перестройках или частичной диссоциации тримера. Антитела класса 5 обладают широкой перекрёстной нейтрализующей активностью и устойчивы к большинству известных мутаций [28].

Эволюция SARS-CoV-2 отражает последовательное устранение уязвимых эпитопов: у вариантов Бета и Гамма (E484K) разрушены эпитопы классов 1–2; у варианта Дельта (L452R) снижено распознавание антителами класса 2; у Омикрон BA.1 (G446S, E484A, Q493R) устранены почти все эпитопы классов 1–2. Адаптация JN.1 (L455S) целенаправленно нацелена на эпитопы класса 3: аффинность антител типа S309 к JN.1 снижена в 8–12 раз [9].

Следует отметить, что антитела классов 4–5 редко индуцируются изолированным RBD или мономером белка S, поскольку их эпитопы формируются только в контексте динамической конформации нативного тримера [31]. Это может объяснять ограничение эффективности RBD-вакцин против современных иммуноуклоняющихся вариантов.

Таким образом, классификация нейтрализующих антител по типам В-клеточных эпитопов отражает не только различия в пространственной локализации связывания, но и функциональные последствия этого связывания – способность блокировать ключевой этап вирусной инфекции и устойчивость к вирусной эволюции.

1.3.5 Т-клеточные эпитопы S-белка: устойчивость к эволюции и роль в защите от тяжёлого течения инфекции

В отличие от В-клеточных эпитопов, преимущественно локализованных в RBD и NTD, Т-клеточные эпитопы S-белка SARS-CoV-2 распределены широко по всей его длине, включая высококонсервативную субъединицу S2.

Т-клеточный эпитоп – это короткий пептид, образующийся в результате внутриклеточного протеолитического процессинга вирусного белка и презентации на мембране клеток его фрагментов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС; HLA у человека). Необходимость презентации эпитопов через МНС кардинально отличает Т-клеточный ответ от гуморального: В-клетки распознают преимущественно поверхностные (до 90%) [29] и часто изменчивые конформационные эпитопы на нативном вирусе, тогда как Т-клетки «видят» внутренние, линейные пептиды, представленные на поверхности инфицированных или антиген-презентирующих клеток, после внутриклеточной деградации вирусных белков [104].

Каждый пептид связывается с молекулой главного комплекса гистосовместимости МНС и распознаётся Т-клеточным рецептором (TCR) соответствующей Т-клетки [104]. Длина эпитопа строго ограничена типом МНС:

для МНС класса I ($CD8^+$ Т-клетки) длина составляет 8–10 аминокислот, для МНС класса II ($CD4^+$ Т-клетки) – 13–17 аминокислот.

Хотя последовательности Т- и В-клеточных эпитопов могут частично перекрываться, их функциональные роли в иммунном ответе кардинально различаются из-за специфичности взаимодействия МНС с TCR. Среди $CD4^+$ Т-клеток ключевую роль в поддержке В-клеточного ответа играют фолликулярные хелперные Т-клетки (Tfh) [105], тогда как $CD8^+$ цитотоксические лимфоциты обеспечивают элиминацию инфицированных клеток и защиту от тяжёлого течения, что было продемонстрировано при инфекции SARS-CoV-2 [106].

Проведенные за время пандемии исследования показали высокую консервативность Т-клеточных эпитопов. В частности, установлено, что Омикрон BA.1 может ослаблять ответ $CD4^+$ Т-клеток на мутировавшие участки S-белка, однако общий Т-клеточный ответ на S-белок сохраняется на уровне около 80% от исходного [30, 107]. Тем не менее, вирус способен уклоняться от Т-клеточного ответа за счёт мутаций, нарушающих связывание пептидов с определёнными аллелями HLA или их внутриклеточный процессинг [108]. Это значительно усложняет интерпретацию результатов большинства исследований, поскольку спектр уклонения зависит от индивидуального HLA-профиля.

Несмотря на мутационную изменчивость, иммунный охват Т-клеточных эпитопов остаётся значительно более широким благодаря их многочисленности и линейной структуре. Согласно Tarke et al. [109] устойчивость Т-эпитопов к антигенному дрейфу объясняется тремя ключевыми факторами:

1. Широкое распределение эпитопов по всему протеому вируса, включая структурные (S, M, N) и неструктурные белки (ORF1ab), что снижает вероятность одновременной утраты множества эпитопов;

2. Низкая частота мутаций в регионах, кодирующих Т-клеточные эпитопы, по сравнению с RBD/NTD, где мутации прямо направлены на уклонение от нейтрализующих антител;

3. Высокая консервативность внутренних доменов S2, которые практически не изменяются даже при глубоком антигенном перестроении RBD.

Таким образом, совокупность данных свидетельствует, что использование полноразмерного S-белка в качестве антигена обеспечивает более широкий и сбалансированный иммунный ответ по сравнению с изолированным RBD, поскольку включает как конформационные В-клеточные эпитопы, так и многочисленные консервативные Т-клеточные эпитопы, особенно в домене S2 [29]. Это создаёт основу для формирования долгоживущей иммунной памяти и перекрёстной защиты против эволюционно удалённых вариантов вируса.

Однако с увеличением размера антигена связаны теоретические риски, требующие рассмотрения: антителозависимое усиление инфекции (ADE) и гипервоспалительная иммунная патология.

1.3.6 Антитело зависимое усиление инфекции

Одной из потенциальных проблем для вакцин и терапевтических антител является риск усугубления тяжести инфекции за счет антителозависимого её усиления (Antibody-Dependent Enhancement, ADE) [110]. ADE – это феномен, при котором субнейтрализующие или ненейтрализующие антитела способствуют, а не блокируют, проникновение вируса в клетки-мишени.

Известны два основных механизма ADE [110]:

1. FcγR-опосредованное поглощение вирусно-антительных комплексов миелоидными клетками (например, моноцитами, макрофагами), что может усиливать внутриклеточную репликацию. Данный механизм описан для вируса лихорадки Денге [111] и вируса кошачьего инфекционного перитонита [112].

2. Иммунопатологический путь, при котором иммунные комплексы вызывают чрезмерную активацию комплемента и Fc-рецепторов, приводя к гипервоспалению и повреждению тканей. Такой механизм наблюдался при испытаниях вакцин против респираторно-синцитиального вируса (RSV) [113] и вируса кори [114], где формирование иммунных комплексов сопровождалось усилением респираторного заболевания (enhanced respiratory disease, ERD),

проявляющимся в виде острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) – клиническом проявлении, потенциально опосредованном ADE [115].

ОРДС и цитокиновый шторм действительно являются ключевыми патогенетическими компонентами тяжёлого течения COVID-19, а также его предшественников – SARS-CoV-1 и MERS-CoV [116]. Некоторые исследования выявили корреляцию между уровнями специфических IgG и активацией моноцитов у пациентов с тяжёлым COVID-19 [117]. Однако в данных работах не учитывался предшествующий иммунный статус (вакцинация или перенесённая инфекция), что делает невозможным вывод о причинно-следственной связи с ADE.

Экспериментальные данные *in vitro* показали, что ADE теоретически возможен для SARS-CoV-2 в определённых клеточных линиях (например, макрофагах) при использовании отдельных моноклональных антител или сывороток с низкой нейтрализующей активностью [115]. Тем не менее ни одно масштабное эпидемиологическое исследование не подтвердило реализацию ADE у человека [3, 118]. Напротив, имеющиеся данные свидетельствуют о защитном эффекте предшествующей иммунизации: даже при прорывных инфекциях, вызванных высокоиммуноуклоняющимися вариантами (включая JN.1), вакцинированные лица демонстрируют значительно более низкий риск госпитализации и летального исхода по сравнению с непривитыми [3, 115, 118].

Таким образом, несмотря на теоретическую обоснованность гипотезы ADE, её реализация при вакцинации против SARS-CoV-2 не подтверждена ни в клинических, ни в популяционных исследованиях. Тем не менее, мониторинг потенциального риска ADE остаётся важным компонентом доклинической оценки, особенно при разработке моноклональных антител и новых вакцинных платформ.

1.3.7 Потенциальный провоспалительный потенциал S-белка: риски и научные гипотезы

Хотя эпидемиологические данные не подтверждают реализацию ADE при вакцинации против SARS-CoV-2 (см. раздел 1.3.5), остаётся вопрос о потенциальном провоспалительном эффекте самого S-белка, особенно при локальной экспрессии в дыхательных путях. За годы пандемии накопились данные, указывающие на возможную самостоятельную роль S-белка в патогенезе воспалительных и эндотелиальных нарушений, ассоциированных с тяжёлым течением COVID-19 [119, 120] и постковидным синдромом (PASC) [121].

Экспериментальные исследования выявили провоспалительный эффект рекомбинантного S1 в условиях искусственной персистенции при интратрахеальном введении [122]. Следует отметить, что эти результаты получены на трансгенных мышах K18-hACE2, в которых человеческий ACE2 экспрессируется в атипичных тканях, что усиливает патологический ответ и ограничивает экстраполяцию результатов на естественную инфекцию или вакцинацию у человека.

В настоящее время рассматриваются три взаимоисключающих механизма провоспалительной активности S-белка:

1. прямая активация врождённого иммунитета через Toll-подобные рецепторы (TLR);
2. взаимодействие с микробными компонентами (например, липополисахаридами, LPS);
3. зависимость от предварительной активации мононуклеаров.

Ниже рассматривается каждый из этих путей с учётом ограничений экспериментальных моделей. Полученные данные не опровергают безопасность существующих вакцин, но подчёркивают необходимость оценки провоспалительного потенциала платформ, обеспечивающих локальную экспрессию антигена.

1. Активация через TLR

В ряде исследований *in vitro* сообщалось о провоспалительной активности рекомбинантного S-белка, включая стимуляцию макрофагов, НК-клеток [123, 124] и эндотелиальных клеток [125]. Однако было показано, что препараты

рекомбинантного S-белка, полученные в прокариотических системах (например, *E. coli*), нередко содержат следовые количества бактериальных эндотоксинов. В то же время белки, экспрессированные в эукариотических клетках (HEK293, CHO), обычно свободны от эндотоксинов, что снижает риск ложноположительных результатов [126].

Помимо этого, опубликованы результаты исследований, в которых рекомбинантный S-белок не активировал моноциты [127, 128] и не обладал провоспалительным эффектом. Стоит отметить, что в упомянутых исследованиях также был использован S-белок как из прокариотической [127], так и эукариотической [128] системы экспрессии. Таким образом, роль продуцента и связанного с ним эндотоксина остается не решённой.

Тем не менее, отсутствие выраженного воспаления при бессимптомных формах COVID-19 указывает на то, что провоспалительный эффект S-белка, вероятно, требует дополнительных факторов риска (например, нарушения барьерной функции слизистых, микробной транслокации или предсуществующего воспаления), что делает его контекст-зависимым, а не универсальным свойством. В связи с этим в научном сообществе до сих пор не достигнут консенсус относительно патогенной значимости этого эффекта при естественной инфекции.

2. Взаимодействие с LPS.

В N-терминальном домене (NTD) S-белка был идентифицирован структурный мотив с высокой аффинностью к бактериальным LPS, что теоретически может способствовать ко-активации TLR4 при совместном присутствии микробных компонентов и S-белка [129, 130]. Это подчёркивает, что при разработке вакцин использование эукариотических систем экспрессии может минимизировать риск артефактного воспаления.

3. Зависимость от предварительной активации мононуклеаров.

Отдельного внимания заслуживает работа, в которой показано, что для запуска NLRP3-инфламмосомы под действием S-белка требуется предварительная «прайминговая» активация макрофагов в ходе инфекции SARS-CoV-2 [131].

Остаётся неясным, насколько широкий спектр воспалительных сигналов (цитокины или бактериальные эндотоксины) способен обеспечивать необходимый прайминг, что требует дальнейшего изучения в контексте безопасности вакцин и патогенеза тяжелого COVID-19.

Таким образом, хотя некоторые полученные *in vitro*-данные указывают на потенциальную способность S-белка индуцировать воспаление, эта активность проявляется преимущественно в искусственных условиях (высокие концентрации, персистенция, наличие эндотоксинов или предварительная активация клеток). В контексте векторных или мРНК-вакцин, где экспрессия антигена кратковременна и локализована, риск системного или патологического воспаления представляется минимальным.

С учётом вышеизложенного, безопасность платформ, обеспечивающих локальную экспрессию S-белка в дыхательных путях, не может быть автоматически экстраполирована из данных по системным вакцинам. При разработке интраназальных вакцин целесообразно проводить прямую оценку провоспалительного потенциала *in vivo* – в частности, анализ уровней IL-6, TNF- α и маркеров эндотелиальной активации в бронхоальвеолярном лаваже после иммунизации модельных животных.

1.3.8 Преимущества полноразмерного тримерного антигена

Таким образом, структурно-функциональный анализ S-белка SARS-CoV-2 демонстрирует, что только полноразмерный тримерный антиген способен обеспечить полный спектр В- и Т-клеточных эпитопов, необходимых для защиты от быстро эволюционирующих вариантов, таких как JN.1.

Хотя теоретически полноразмерный S-белок может обладать повышенным провоспалительным потенциалом по сравнению с RBD, ни ADE, ни системное воспаление не подтверждены в клинических или популяционных исследованиях. В то же время прямые сравнительные данные по локальной экспрессии этих антигенов в респираторном тракте отсутствуют, что создаёт научную

необходимость в экспериментальной оценке их иммуногенности и безопасности при интраназальной доставке.

1.4 Ограничения существующих системных вакцин в условиях циркуляции высокоизменчивых вариантов SARS-CoV-2

Разработка и массовое внедрение вакцин против SARS-CoV-2 стало одним из самых больших достижений в истории современной медицины, которое значительно снизило тяжесть заболевания и смертности во время пандемии SARS-CoV-2 [3]. Уже в первые месяцы 2021 года были зарегистрированы и развернуты вакцинные платформы на основе мРНК: BNT162b2 [35], mRNA-1273[132], рекомбинантных вирусных векторов: ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) [133], Ad26.COV2.S [134], Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) [135], рекомбинантных белков: NVX-CoV2373[136]; пептидов: ЭпиВакКорона [137] и инактивированных вирусов: CoronaVac [138], BBIBP-CorV[139]. В Российской Федерации с августа 2020 года применялась векторная вакцина «Спутник V» , а также субъединичные вакцины «ЭпиВакКорона» и инактивированная «КовиВак» [140].

Несмотря на различия в технологии, все эти препараты демонстрировали высокую эффективность против госпитализации и летального исхода при инфекции, вызванной Ухань-подобным штаммом и его ранними производными [35, 132, 133], а также против тяжелого течения Альфа и Дельта VOC [141]. Однако по мере появления новых вариантов, особенно начиная с Дельта (B.1.617.2) и Омикрон (B.1.1.529), выявились фундаментальные ограничения стратегии, основанной на использовании антигена исходного штамма (Wuhan-Hu-1) [142] и внутримышечной (системной) иммунизации [4, 5].

Эти ограничения обусловлены тремя ключевыми факторами:

- отсутствие индукции иммунитета во входных воротах инфекции, что не предотвращает циркуляцию патогена;
- антигенным несоответствием между вакцинным антигеном и циркулирующими вариантами;
- феноменом иммунного импринтинга (original antigenic sin).

Настоящая глава последовательно рассматривает данные ограничения и обосновывает разработку альтернативных платформ, в частности, интраназальных вакцин на основе актуальных антигенов, что и составляет предмет настоящего исследования.

1.4.1 Отсутствие устойчивого мукозального иммунитета при внутримышечной вакцинации

Верхние дыхательные пути являются основным очагом репликации SARS-CoV-2 и ключевым источником его передачи. Для блокирования инфекции на этом уровне необходим локальный иммунный ответ, в первую очередь – секреторный IgA (sIgA) и тканевые резидентные Т-клетки памяти (TRM) [10].

Исследования демонстрируют, что мукозальные антитела класса IgA обладают более высокой нейтрализующей активностью по сравнению с системными IgG, а также способны не только предотвращать проникновение вируса через слизистую, но и ограничивать его дальнейшее распространение [143, 144]. У лиц, перенёсших естественную инфекцию, мукозальный иммунный ответ сохраняется в течение длительного времени (до 8 месяцев) [145], что превышает среднее время циркуляции нейтрализующих IgG. Особенно высокая защита наблюдается при гибридном иммунитете (после комбинации вакцинации и инфекции), что дополнительно подчёркивает роль местного иммунитета в контроле над вирусом [146].

В то же время при системной (внутримышечной) вакцинации индукция мукозального иммунитета оказывается значительно сниженной или отсутствует, что показано в исследовании различных платформ: мРНК, векторных и субъединичных вакцин [147, 148, 149]. В результате реплицирующийся вирус продолжает обнаруживаться в верхних дыхательных путях даже у полностью вакцинированных лиц [150, 151, 152, 153]. В сочетании с высокой изменчивостью SARS-CoV-2 все это способствует прорывным инфекциям и реинфекциям [154].

Математическое моделирование Rella et al. указывает на парадоксальный риск: наибольшая вероятность закрепления устойчивых иммуноуклоняющихся

штаммов возникает именно в условиях высокого охвата вакцинацией при сохраняющейся передаче вируса [155]. Данный вывод пересекается с эмпирическими данными, полученными ранее для других вирусных инфекций [156, 157] и в последующем получил подтверждение в ходе эпидемиологического мониторинга и анализа геномной изменчивости SARS-CoV-2 [158, 159].

Таким образом, отсутствие устойчивого мукозального иммунитета при внутримышечной вакцинации объясняет сохраняющуюся передачу вируса даже среди вакцинированных лиц, что создаёт условия для дальнейшей эволюции SARS-CoV-2 под давлением иммунного отбора.

В связи с этим ряд исследователей приходит к единому заключению: для эффективного прерывания цепи передачи SARS-CoV-2 необходимо целенаправленное формирование иммунного ответа непосредственно в слизистой оболочке дыхательных путей [10, 160, 161, 162] .

1.4.2 Антигенное несоответствие между вакцинным антигеном и циркулирующими вариантами

Центральным ограничением эффективности системных вакцин против SARS-CoV-2 стало антигенное несоответствие – постепенное, а затем ускоренное расхождение между антигенной структурой вакцинного иммуногена и реального циркулирующего вируса. Данное расхождение обусловлено высокой частотой мутаций S-белке, что приводит к феномену, известному как антигенный дрейф (см. раздел 1.2.2).

Первоначальные вакцины, созданные на основе Ухань-подобного штамма (Wuhan-Hu-1, линия B.1) обеспечивали существенную защиту от тяжелого заболевания и госпитализации. В частности, двукратная вакцинация Pfizer-BioNTech (BNT162b2) была примерно на 88% эффективна против симптоматической инфекции, вызванной вариантом Дельта, по сравнению с более чем 95% эффективностью против исходного штамма [163].

Однако, проблема снижения эффективности вакцин стала особенно острой с появлением варианта Омикрон (B.1.1.529 / BA.1) и его многочисленных

потомков. Эффективность вакцин, ориентированных на Wuhan-Hu-1 (BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1) против симптоматической инфекции, вызванной BA.1, снизилась до 30%. При этом защита от тяжёлого течения сохранялась на уровне 80-90%, особенно после бустерной вакцинации [118]. Данное снижение эффективности напрямую связано с потерей нейтрализующей способности сывороток. Исследования *in vitro* показали, что нейтрализующая активность сывороток крови людей, иммунизированных Ухань-ориентированными вакцинами, снижалась в 22-35 раз против BA.1 по сравнению с исходным штаммом. В некоторых случаях, особенно против последующих сублиний, нейтрализация полностью отсутствовала [165].

В ответ на эту угрозу была реализована тактика обновления антигенной составляющей вакцин. В 2022 году были разработаны и внедрены бивалентные вакцины, сочетающие антигены Ухань-подобного штамма и субвариантов Омикрон BA.1 или BA.4/BA.5. Эти обновлённые формулы показали повышенную эффективность в восстановлении титра нейтрализующих антител против циркулирующих в то время вариантов SARS-CoV-2 [166, 167].

Однако эволюционная изменчивость вируса продолжала опережать разработку вакцин. К моменту широкого развёртывания бивалентных вакцин глобальное доминирование перешло к ХВВ – рекомбинантному варианту, возникшему в результате рекомбинации между линиями BA.2.75 и BJ.1. ХВВ нёс дополнительные мутации в RBD, такие как F486S и R493Q, которые ещё больше ослабляли эффективность антител, индуцированных вакцинами как с антигеном Ухань-подобного штамма, так и с антигеном BA.1/BA.5-вариантов [4].

Следующим шагом в борьбе с иммунным уклонением стала разработка моновалентных вакцин на основе ХВВ.1.5 (осень 2023 г.), что временно восстановило нейтрализующую активность против ХВВ-линий SARS-CoV-2 [168]. Однако уже к концу 2023 года доминирующим стал вариант JN.1 – потомок BA.2.86 с дополнительной мутацией L455S в RBD. Эта мутация существенно ослабляет распознавание вируса перекрёстно-реактивными антителами, включая антитела класса 3 (см. раздел 1.2.2), что подчеркивает

необходимость использовать криптоические и конформационные эпитопы, входящие в состав полноразмерного S-белка (см. раздел 1.3.4). Исследования показывают, что сыворотки, полученные после вакцинации ХВВ.1.5-вакцинами, демонстрируют снижение нейтрализующего титра против JN.1 в 8-12 раз по сравнению с гомологичным вариантом ХВВ.1.5 [169].

В апреле 2024 года Техническая консультативная группа ВОЗ по составу вакцин против COVID-19 (TAG-CO-VAC) оценила циркулирующие субварианты и рекомендовала использовать моновалентную линию JN.1 в качестве антигена для будущих составов вакцин против COVID-19 поскольку ожидалось, что следующий появляющийся субвариант будет эволюционировать из JN.1[34].

В 2024–2025 гг. были зарегистрированы обновлённые моновалентные вакцины, основанные на штамме Омикрон JN.1 (компания Novovax), а также его потомке – KP.2 (компания Moderna и Pfizer) [170]. Внедрение данных вакцин совпало с распространением сублиний JN.1, таких как KP.3.1.1 и ХЕС, что можно считать удачным совпадением с прогнозом ВОЗ [14]. TAG-CO-VAC подтвердила, что моновалентные варианты JN.1 или KP.2 остаются подходящими вакцинными антигенами, а LP.8.1 был определен как подходящий альтернативный антиген [171].

Не исключено, что вакцины с использованием актуального антигена могут не справиться с контролем передачи инфекции SARS-CoV-2 [4], поскольку дублируют стратегию антигенного отбора, уже происходящего в популяции с начала пандемии. По сути, это представляет собой замкнутый круг из адаптации вируса к иммунитету, и адаптации вакцины к адаптированному вирусу. Потенциальным выходом из этого круга является резкое снижение циркуляции вируса вследствие повышения защитной эффективности вакцины. Это требует новых подходов.

Однако, даже при обновлении антигена до актуального варианта, эффективность вакцин ограничивается фундаментальным свойством иммунной системы – иммунным импринтингом, который препятствует формированию ответа на новые эпитопы, появившиеся в ходе эволюции вируса. Ниже

рассматривается, как этот феномен снижает гибкость адаптивного иммунитета и ограничивает защиту от новых вариантов.

1.4.3 Феномен иммунного импринтинга как барьер для обновления вакцинного ответа

При первом контакте с антигеном (будь то инфекция или вакцинация) в лимфоидных органах запускается реакция герминативного центра. Под контролем фолликулярных Т-хелперных клеток наивные В-клетки, распознавшие антиген, претерпевают клональную экспансию, соматическую гипермутацию и созревание аффинности, а также переключение изотипа антител [172]. В результате формируются два типа долгоживущих эффекторных клеток:

1. В-клетки памяти (MBCs), которые циркулируют или находятся в лимфоидных тканях и остаются в состоянии покоя до повторной встречи с тем же или родственным антигеном;
2. долгоживущие плазматические клетки (LLPCs), которые мигрируют в костный мозг, где устойчиво продуцируют высокоспецифичные антитела – подробно данный процесс описан в нескольких обзорах [14, 173].

При повторной экспозиции антигенно-родственному, но не идентичному патогену (например, новому варианту SARS-CoV-2), именно В-клетки памяти становятся основными участниками вторичного ответа. Они обладают высоким аффинитетом к консервативным эпитопам, общим для обоих антигенов, и способны быстрее захватывать вводимый антиген по сравнению с наивными В-клетками, распознающими новые, уникальные эпитопы. Это приводит к доминированию перекрёстно-реактивного ответа за счёт подавления *de novo* иммунного ответа на вариант-специфичные структуры [174].

Данный феномен, известный как иммунный импринтинг (*original antigenic sin*, первоначальный антигенный грех), был впервые описан для вируса гриппа в 1960-х годах [175]. Концепция заключается в том, что иммунная система «помнит» первый встреченный антиген и при повторных столкновениях

реактивирует ту же самую память, что смещает выработку антител в сторону ранее встречавшихся эпитопов [176].

В контексте SARS-CoV-2 данный эффект стал наблюдаться при появлении штаммов Омикрон. В ответ на снижение эффективности вакцин, как было описано ранее (см раздел 1.3.1), были использованы бустерные вакцины с гетерологичными антигенами S-белка, что привело к усилению нейтрализующего ответа антител против новых вариантов. Однако наблюдался сильно импринтированный иммунный ответ, поскольку титры нейтрализующих антител против исходного вируса Wuhan-Hu-1 также увеличились после бустерной вакцинации, что подробно описано в обзоре Uraiki et al. (2026 г) [14].

Особого внимания в данном обзоре [14] заслуживает описанная работа Johnston et al. [16], в которой было показано, что при бустерной вакцинации ХВВ.1.5-вакциной у ранее вакцинированных Wuhan-Hu-1 мРНК-вакциной более 80% нейтрализующих антител были продуцированы В-клетками памяти, специфичными к RBD штамма Ухань, а не новым эпитопам JN.1. Аналогичные данные получены в ряде других исследований [12, 177, 178, 179]. В одном из недавних исследований Dadonaite et al. было показано, что у младенцев и детей, получивших две дозы вакцины против Ухань-подобных штаммов, последующее заражение вариантом ХВВ вызывало преимущественное усиление антител к RBD штамма Ухань, а не к ХВВ-специфичным эпитопам [15].

Примечательно, что повторные естественные инфекции, в отличие от вакцинации, могут частично преодолевать импринтинг. В работе Yisimayi et al. показано, что многократное заражение Омикрон-линиями может «перезаписать» иммунную память и сформировать вариант-широкий ответ, включая нейтрализацию JN.1 [180]. Однако в условиях массовой вакцинации, где естественные инфекции носят эпизодический характер, такой перезаписи не происходит, и импринтинг сохраняется как ключевой барьер.

Таким образом, стратегия, основанная на внутримышечной бустеризации обновлёнными вакцинами, имеет принципиальные ограничения в условиях быстрой антигенной эволюции SARS-CoV-2. Ограниченная способность

обновлённых бустерных вакцин преодолевать иммунный импринтинг подчёркивает необходимость альтернативных подходов. К ним относятся увеличение кратности и объема бустерных доз, адъюванты, активирующие дендритные клетки [181], направленная эволюция антигенов в сторону иммуносубдоминантных эпитопов [182].

Наиболее перспективным направлением, получившим широкое распространение, является разработка мукозальных вакцин. Формирование иммунного ответа непосредственно в слизистой дыхательных путей может способствовать генерации локального пула В-клеток памяти, частично независимого от системного импринтинга, что открывает путь к распознаванию новых эпитопов [14, 15].

1.4.4 Необходимость перехода к новой вакцинной стратегии

Совокупность представленных данных определяет направление дальнейших исследований: разработка интраназальных вакцин, экспрессирующих полноразмерный S-белок актуальных вариантов, таких как JN.1

1.5 Особенности мукозального иммунитета и их значение для вакцинации

1.5.1 Общая организация мукозального иммунитета

Антитела класса IgG обеспечивают защиту против патогенов в системном кровотоке и тканевых жидкостях. Однако, наибольший по площади барьер между организмом и внешней средой – слизистые оболочки [183, 184] – требует дополнительной защиты [185, 186]. Это обусловлено особенностями строения слизистого эпителия, наличием слизистого слоя и локальным значением pH, которые ограничивают пассивный трансэпителиальный транспорт сывороточных иммуноглобулинов [187]. В связи с этим доставка антител на слизистые требует активных механизмов, таких как рецептор-опосредованный транцитоз через FcRn [188]. Данное ограничение обуславливает дополнительные эволюционно-сформированные механизмы защиты слизистых оболочек.

Первичным барьером в слизистых служит слизь, производимая бокаловидными клетками эпителия. Слизь выполняет следующие функции:

формирование физико-химического барьера; обеспечение среды для доставки антимикробных пептидов, компонентов комплемента и других факторов врождённого иммунитета [189, 190]. Непосредственную барьерную функцию обеспечивают эпителиальные клетки, чьи плотные соединения между собой ограничивают размер проникающих через эпителий молекул. Движение ресничек реснитчатых клеток обеспечивают мукоцилиарный клиренс – синхронное однонаправленное движение ресничек в направлении противоположном току воздуха в полости носа обеспечивает скорость элиминации инородных частиц в 10-20 минут [191]. Все это дополняется наличием комменсальной микрофлоры, которая конкурирует с патогенами за ресурсы и пространство, ограничивая их колонизацию в слизистой [192].

Адаптивное звено иммунитета в слизистых оболочках обеспечивается несколькими типами лимфоидных образований: инкапсулированные дренирующие лимфатические узлы (ЛУ); лимфоидные ткани слизистой оболочки, непосредственно связанные со слизистыми тканями; лимфоидные ткани, ассоциированные с жировой тканью, и непрограммируемые, эктопически индуцированные третичные лимфоидные ткани [193].

1.5.2 Лимфатические узлы

Брыжеечные, шейные и медиастинальные ЛУ имеют схожее бобовидное строение. Антигены поступают в них через афферентные сосуды в субкапсулярный синус, фильтруются макрофагами и дендритными клетками и проникают в Т-клеточную зону. В корковом слое В-фолликулы локализованы периферически, а Т-зона – центрально. Лимфоциты попадают в узел через высокоэндотелиальные венулы и выходят из него через мозговые тяжи и отводящие лимфатические сосуды, а затем через грудной проток в систему кровообращения. Антиген в афферентные лимфатические сосуды может попасть при преодолении эпителиального барьера в подслизистую, которая богата макрофагами и дендритными клетками, или же за счет пассивного дренажа в

лимфоток. Данный механизм обеспечивает системный гуморальный и цитотоксический ответ при инфицировании слизистых [194].

1.5.3 Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками

В отличие от лимфоузлов лимфоидные ткани непосредственно в слизистых не инкапсулированы и лишены афферентных лимфатических сосудов. Вместо этого антигены захватываются с поверхности слизистой оболочки через специализированный эпителиальный слой, известный как куполообразный эпителий или фолликулярно-ассоциированный эпителий [193]. Для выделения способности индуцировать адаптивный ответ непосредственно в слизистой, обеспечивая местный иммунный ответ, был выделен термин – лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) [195]. Функционально MALT подразделяется на индуктивные и эффекторные сайты [196].

Индуктивные сайты обеспечивают захват, презентацию антигенов и активацию антиген-специфических лимфоцитов [195]. Анатомически индуктивные сайты разделяют на организованную MALT(organized MALT, O-MALT) – глоточные миндалины и Пейеровы бляшки и диффузную лимфоидную ткань (diffuse MALT, D-MALT), не имеющую чётких анатомических границ [197].

Эффекторные сайты не имеют четких морфологических границ и представляют собой диффузные скопления лимфоцитов в собственной пластинке. Эффекторную функцию в слизистых обеспечивают дифференцированные Т-лимфоциты и плазматические клетки, продуцирующие секреторный иммуноглобулин А (sIgA) – ключевой фактор гуморального иммунитета слизистых [11].

MALT тесно функционально связана с системным адаптивным ответом. За счет региональных лимфатических узлов, дренирующих слизистые и MALT антиген из слизистой может предоставляться для индукции системного адаптивного ответа. Путь активированных в MALT эффекторных клеток принципиально не отличается от ЛУ, после активации и пролиферации они

выходят в выносящую лимфу через эффекторные лимфатические сосуды, достигают системного кровотока через грудной лимфатический проток, а затем экстравазируются в эффекторные сайты слизистых.

Процесс направленной миграции лимфоцитов («гоминг») регулируется экспрессией специфических молекул адгезии и хемокиновых рецепторов. Для кишечного компартмента ключевую роль играет пара $\alpha 4\beta 7$ -интегрин / MAdCAM-1, тогда как для респираторного тракта более специфичны хемокиновые рецепторы CCR5, CXCR3 и их лиганды (CCL27/CCL28), экспрессируемые эндотелием сосудов слизистых дыхательных путей [198].

На сегодняшний день принятая номенклатура MALT основана на соответствии с анатомическими областями: носоглоточно-ассоциированная (nasal-associated lymphoid tissue, NALT), бронхо-ассоциированная (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT), кишечная (gut-associated lymphoid tissue, GALT) и другие органоспецифические формы [195]. Каждая из перечисленных форм MALT обладает своими особенностями как с точки зрения структуры, так и функции. В контексте интраназальных вакцин, интерес для нас представляют NALT и BALT, в то время как GALT рассматривается как наиболее изученная модель MALT, служащая референсом для сравнения.

1.5.4 Анатомия индуктивных сайтов дыхательных путей

1.5.4.1 Верхние дыхательные пути: носовая полость и глотка (NALT)

NALT имеет видоспецифические различия. Например, столь часто и широко применяемые в иммунологических исследованиях мыши имеют NALT в виде дискретных лимфоидных фолликулов, расположенных непосредственно в слизистой оболочке носовой полости, что обеспечивает раннее взаимодействие с аэрозольными патогенами.

С другой стороны, у человека подобные агрегаты в полости носа не обнаружены; функцию индуктивного сайта верхних дыхательных путей выполняет лимфоэпителиальное кольцо Пирогова-Вальдейера – кольцевидное скопление лимфоидной ткани, включающее глоточную миндалину (аденоиды),

трубные миндалины, парные нёбные миндалины, язычную миндалину и боковые лимфоидные валики глотки [199]. Роль данного межвидового различия еще предстоит изучить.

Миндалины человека содержат два иммунных компартмента: крипты и лимфоидные фолликулы.

Крипты представляют собой инвагинации многослойного плоского эпителия, значительно увеличивающие площадь контакта с внешней средой. Эпителий крипт включает микроскладчатые клетки (М-клетки), расположенные в составе фолликулярно-ассоциированного эпителия и специализирующиеся на трансэпителиальном транспорте (транскитоze) антигенов в субэпителиальное пространство, где антигены захватываются и презентуются дендритными клеткам [200, 201]. Наличие М-клеток в NALT так же было подтверждено для мышей [202], что указывает на ключевую роль М-клеток в индуктивной функции NALT у различных видов.

Под эпителиальным слоем располагаются лимфоидные фолликулы с герминативными центрами и межфолликулярные зоны, населённые Т-лимфоцитами и дендритными клетками [203], что позволяет проводить структурную и функциональную параллель с лимфатическими узлами.

1.5.4.2 Нижние дыхательные пути: трахея, бронхи и лёгкие – индуцируемые лимфоидные структуры

В отличие от верхних дыхательных путей, нижние дыхательные пути у человека и грызунов не обладают конститутивными индуктивными структурами. Бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT) у взрослого человека является индуцируемой структурой, которая формируется в ответ на хроническое воспаление, инфекцию или аллергенную стимуляцию [199, 204].

Индукцированный BALT (iBALT) характеризуется наличием фолликулов с герминативными центрами, где происходит созревание В-клеток и классовое переключение на секреторный иммуноглобулин А (sIgA). Тем не менее, эпителий

бронхов не содержит выраженных крипт с М-клетками, даже при наличии iBALT. Захват антигена в нижних дыхательных путях осуществляется преимущественно альвеолярными макрофагами и дендритными клетками (ДК), которые после взаимодействия с антигеном мигрируют в регионарные лимфоузлы для презентации антигена [205, 206, 207] . Вопрос индуктивной функции iBALT остается недостаточно изученным.

1.5.4.3 Особенности распределения индуктивных структур по дыхательному тракту

Из вышеописанного следует, что распределение лимфоидных структур по дыхательному тракту неравномерно и определяется функциональными требованиями различных отделов.

Верхние дыхательные пути (нос, глотка) подвергаются постоянному контакту с аэрозольными антигенами и поэтому обладают наиболее развитыми организованными лимфоидными структурами – кольцом Пирогова-Вальдейера.

Нижние дыхательные пути (бронхи, лёгкие) защищены от проникновения крупных частиц мукоцилиарным клиренсом, поэтому их иммунная система ориентирована преимущественно на фагоцитоз и презентацию антигена мигрирующими клетками в лимфоузлы, что определяет преимущественно системный ответ [205] с обеспечением помощи в виде индукции iBALT при длительном контакте с антигеном.

Для мукозальной вакцинации дыхательных путей это имеет принципиальное значение.

Вакцины, доставляемые в носовую полость, в первую очередь взаимодействуют с индуктивными структурами кольца Пирогова–Вальдейера, что обеспечивает эффективную индукцию секреторного IgA и тканевых резидентных Т-клеток в верхних дыхательных путях. Защита же нижних дыхательных путей обеспечивается комбинацией таких механизмов, как: системный иммунный ответ с транссудацией нейтрализующих антител IgG в лёгочную ткань; гоминг

активированных лимфоцитов из регионарных лимфоузлов в лёгкие через общие хемокиновые оси [199].

Вопрос о возможности формирования тканевых резидентных Т-клеток памяти (TRM) непосредственно в лёгочной ткани после исключительно интраназальной иммунизации остаётся неоднозначным. Некоторые исследования демонстрируют индукцию лёгочных TRM после интраназальной вакцинации векторными вакцинами [208, 209], в то время как другие указывают на необходимость локальной презентации антигена в альвеолах лёгких для устойчивой резидентности Т-клеток [210].

С одной стороны, успешность мукозального иммунитета в верхних дыхательных путях предотвращает развитие инфекции и потенциально снижает риск передачи. Однако, в случае попадания патогена в легкие большую защитную роль от тяжелой инфекции играет системный иммунный ответ, поскольку индуктивные сайты для мукозального и системного ответа в легких совпадают. Таким образом, интраназальная вакцинация против SARS-CoV-2 должна обеспечивать как мукозальный, так и системный иммунный ответ, что требует преодоления некоторых функциональных барьеров, связанных с формированием толерантности к антигенам.

1.5.5 Клеточные и молекулярные механизмы адаптивного мукозального иммунитета: толерантность и защитный ответ

Общей функциональной особенностью, обеспечивающей защиту, большинства компартментов MALT является способность к синтезу секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и реализации как Th2-зависимых, так и Th1-цитотоксических Т-клеточных реакций. Но данные механизмы так же участвуют в формировании антиген-специфической толерантности [211].

Механизм антиген-специфической толерантности наиболее изучен в кишечнике. Его необходимость определяется постоянным контактом GALT с комменсальными микроорганизмами кишечника. Поддержание иммунологической толерантности к микробиоте обеспечивается субпопуляцией

дендритных клеток (ДК), экспрессирующих CD103 (ДК CD103⁺) [212], ретинальдегиддегидрогеназу 2 (RALDH2) и продуцирующих ретиноевую кислоту. Данные факторы создают локальную среду, способствующую дифференцировке индуцированных регуляторных Т-клеток (iTreg, CD4⁺FOXP3⁺) [213]. Основная функция iTreg (CD4⁺FOXP3⁺) заключается в модуляции иммунного ответа посредством секреции иммуносупрессивных цитокинов – преимущественно интерлейкина-10 (IL-10) и трансформирующего фактора роста β (TGF- β), а также через клеточно-контактные механизмы, опосредованные, например, молекулой CTLA-4 [214].

Данный механизм, получивший название «оральная толерантность», предотвращает избыточную воспалительную реакцию на комменсальную микробиоту в GALT и был описан для некоторых антигенов, не связанных с микрофлорой [215]. Оральная толерантность давно исследуется, как стратегия восстановления толерантности к аутоантигенам или аллергенам, благодаря способности кишечника поддерживать гомеостаз при высокой концентрации антигена [216].

Ранее было подтверждено, что NALT также обладает механизмами регуляции толерантности [217]. Однако, учитывая меньшую плотность микробиоты в верхних дыхательных путях по сравнению с кишечной, иммунологический порог активации в миндалинах может быть ниже [218]. Это определяет потенциально более высокую иммуногенность интраназальной доставки антигена по сравнению с пероральной, где доминируют механизмы оральной толерантности.

1.5.6 Корреляты защиты против респираторных патогенов

На сегодняшний день эффективность мукозальной вакцинации определяется индукцией двух ключевых коррелятов защиты: секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и тканевых резидентных Т-клеток памяти (TRM).

sIgA преимущественно существует в димерной или полимерной форме, стабилизированной J-цепью. При трансэпителиальном транспорте через

полимерный иммуноглобулиновый рецептор (pIgR) к молекуле присоединяется секреторный компонент – протеолитически устойчивый фрагмент экстрацеллюлярного домена pIgR [219]. sIgA нейтрализуют вирус непосредственно в просвете слизистой до контакта с эпителием. Уровень специфических к спайк-белку sIgA в назальных смывах обратно коррелирует с вирусной нагрузкой SARS-CoV-2 в носоглотке [220].

TRM клетки – это нерециркулирующий, самоподдерживающийся класс Т клеток памяти, способный сохраняться в тканях в течение длительного времени [221]. Совместная экспрессия CD69 и CD103 является общепринятым маркером TRM. Экспрессия CD69 обеспечивает перманентную резидентность в ткани за счёт ингибирования экспрессии рецептора S1PR1 (предотвращающего выход из ткани), тогда как экспрессия CD103, связывающегося с Е-кадгерином, присутствующим на эпителиальных клетках в барьерных тканях, поддерживает удержание в тканях [222]. Совместная экспрессия CD69 и CD103 может использоваться для идентификации CD8⁺ TRM в легких и носу как у мышей, так и у людей. Вместе с тем CD4⁺ TRM в лёгких экспрессируют CD69 как в сочетании с CD103, так и без него и обнаруживаются преимущественно в iBALT [17], формирование которых требует предшествующего воспаления или инфекции, что, как упомянуто ранее, существенно ограничивает возможности стандартизированного изучения данного звена иммунитета.

При повторном контакте с вирусом CD8⁺ TRM обеспечивают цитотоксический ответ в течение нескольких часов: распознавая вирусные пептиды на МНС I инфицированных клеток, они высвобождают перфорин и гранзимы, элиминируя источник репликации задолго до активации циркулирующих Т-клеток [209]. Одновременно секреция IFN- γ и ФНО- α создаёт локальную противовирусную среду.

В контексте мукозальной вакцинации ряд исследователей продемонстрировали, что локальная экспрессия антигена и воспаление являются необходимыми условиями для привлечения антиген-специфических Т-клеток и

формирования фенотипа Т-клеток памяти. Это определяет применение живых векторных или аттенуированных вакцин, как основное направление в разработке мукозальных методов профилактики [17].

Тем не менее, методы изучения данных коррелятов не стандартизированы, и в настоящее время исследование индукции системного нейтрализующего ответа остаётся основным критерием оценки эффективности большинства разрабатываемых вакцин. Это подчеркивает необходимость разработки стандартизированных методов оценки мукозального иммунитета для объективной сравнительной оценки интраназальных вакцинных платформ, а также указывает на необходимость индукции системного гуморального ответа, как стандартизированного коррелята защитной эффективности.

1.5.7 Преимущества и ограничения интраназальной доставки антигена

Из вышеописанного следует, что мукозальный иммунитет дыхательных путей представляет собой сложную иерархически организованную систему, включающую физиологические барьеры, организованные лимфоидные структуры и специализированные клеточные популяции.

Ключевым отличием верхних дыхательных путей человека является наличие конститутивных индуктивных структур – кольца Пирогова-Вальдейера, обеспечивающего эффективный захват антигенов через крипты миндалин и их презентацию в лимфоидных фолликулах.

Эффективность мукозальной вакцинации определяется индукцией двух коррелятов потенциального стерилизующего иммунитета: секреторного иммуноглобулина А (sIgA) и тканевых резидентных Т-клеток памяти (TRM). Их синергия обеспечивает блокирование вирусной репликации на этапе первичного контакта с эпителием верхних дыхательных путей. Однако реализация этого потенциала требует преодоления ряда физиологических и анатомических барьеров носовой полости, включая мукоцилиарный клиренс, слизистый слой и дефицит микроскладчатых клеток в передних отделах носа.

Сравнение иммунологических стратегий различных компартментов слизистых оболочек демонстрирует принципиальные различия между кишечником (доминирующая толерантность) и дыхательными путями (проинфламаторная направленность). Эти различия определяют выбор вакцинных платформ: в то время как пероральная вакцинация требует преодоления мощного толерогенного барьера кишечника, интраназальная доставка может эффективнее индуцировать эффекторные иммунные механизмы в условиях относительно низкой антигенной нагрузки от комменсальной микробиоты.

Таким образом, для разработки эффективных интраназальных вакцин необходимо учитывать:

- анатомические особенности индуктивных сайтов – доставка антигена к кольцу Пирогова-Вальдейера для эффективной презентации;
- физиологические барьеры – преодоление мукоцилиарного клиренса и слизистого слоя;
- иммунологические требования – индукция как гуморального (sIgA), так и клеточного (TRM) компонентов защиты;
- безопасность – минимизация рисков, связанных с введением интраназально, которые будут рассмотрены в последующем разделе.

Эти требования определяют выбор вакцинных платформ, способных эффективно преодолевать барьеры слизистой оболочки и индуцировать стерилизующий иммунитет. Анализ современных векторных платформ и их преимуществ перед субъединичными вакцинами представлен в разделе 1.6.

1.6 Платформы для интраназальных вакцин против SARS-CoV-2

В настоящее время для разработки интраназальных вакцин активно исследуются несколько классов платформ, каждая из которых обладает уникальными преимуществами и ограничениями.

1.6.1 Живые аттенуированные вакцины

Живые аттенуированные вакцины (LAV) являются классическим примером успешного применения мукозальных вакцин для перорального введения. К числу наиболее известных представителей относятся оральная вакцина против полиомиелита (OPV), разработанная А. Сэбином в 1960-х годах [223], и пероральные вакцины против холеры [224]. Данные вакцины продемонстрировали высокую эффективность в индукции как системного, так и мукозального иммунитета, что обусловлено их способностью имитировать естественную инфекцию и активировать широкий спектр иммунных механизмов.

Для интраназального применения были разработаны и клинически применяются живые аттенуированные вакцины: FluMist [225] против гриппа типа А(Н1N1 и Н3N2) и типа В и NASOVAC[226] против гриппа Н1N1 [227].

В отношении SARS-CoV-2 нет зарегистрированных и разрешенных к применению мукозальных LAV. В 2021 году в Индии разработана кандидатная вакцина COVI-VAC, которая продемонстрировала высокую иммуногенность и эффективность против инфицирования SARS-CoV-2 на хомяках [228]. Вакцина успешно прошла I фазу клинических испытаний [229], однако данные о последующих клинических исследованиях не опубликованы.

Не исключено, что среди причин прекращения разработки могли быть как экономические препятствия, так и приход новых штаммов с высоким иммунным уклонением (Омикрон). Тем не менее, имеются данные, что некоторые вирусы, выделенные от инфицированных SARS-CoV-2 лиц в Индии, могут быть потенциальными штаммами, полученными из LAV, что указывает на риск распространения LAV против SARS-CoV-2 от вакцинированных лиц и усложняет обнаружение SARS-CoV-2 [230].

В целом, возможность циркуляции вакцинного штамма и теоретический риск реверсии вирулентности остаются основными ограничениями для вакцин данного класса. Реверсия вирулентности наблюдалась в случае с OPV, что приводило к возникновению вакцино-ассоциированного полиомиелита [231].

Помимо этого, LAV обладает более широкими противопоказаниями к применению у иммуносупрессированных лиц, беременных женщин и лиц с тяжёлыми аллергиями, что является общим ограничением для всех живых вакцин, включая широко применяемую вакцину против гриппа [232].

Таким образом, несмотря на высокую иммуногенность и способность индуцировать мукозальный иммунитет, живые аттенуированные вакцины имеют существенные ограничения, связанные с безопасностью. Возможности современной биотехнологии позволяют обойти данные препятствия через использование альтернативных платформ – субъединичных вакцин, векторных систем или иных методов доставки РНК/ДНК. Данные подходы рассматриваются в следующих разделах.

1.6.2 РНК- и ДНК-вакцины

Вакцины на основе матричной РНК (мРНК) обеспечивают временную экспрессию антигена в клетках-мишенях без риска интеграции в геном хозяина. Для интраназальной доставки мРНК требует защиты от рибонуклеаз слизистой оболочки и улучшения проникновения через эпителиальный барьер, что достигается с использованием наноносителей.

Липидные наночастицы (ЛНЧ) с ионизируемыми липидами (например, ALC-0315) обеспечивают эндосомальный выход мРНК в цитоплазму [233]. Данная платформа была реализована при разработке системных вакцин против COVID-19: mRNA-1273 и BNT162b2, показавших высокую клиническую эффективность. Тем не менее с данными вакцинами были связаны такие нежелательные явления как миокардит[234], анафилаксия [235].

Интраназальная доставка мРНК в составе ЛНЧ на доклиническом этапе продемонстрировала иммуногенность и протективную активность в ряде исследований [236, 237] , однако без явных преимуществ по сравнению с системной вакцинацией [238].

Перспективное направление в оптимизации мукозальной доставки является разработка ЛНЧ на основе хитозана или полиэтиленимина, иммуногенность

которых против SARS-CoV-2 была показана в доклинических исследованиях [239].

Интраназальное применение мРНК вакцин остается, преимущественно, развивающимся направлением в стадии доклинических исследований. Зарегистрированных и одобренных к применению интраназальных мРНК вакцин на сегодняшний день не получено.

Последние исследования демонстрируют некоторые ограничения платформы РНК для индукции мукозального иммунитета. В частности, недавно в исследовании на мышах мРНК конструкции на основе ЛНП с ALC-0315 и MC3-DOTAP, несмотря на доказанную успешную трансфекцию клеток слизистой оболочки, показали слабую иммуногенную активность [238].

Выявленные ограничения требуют дальнейшего совершенствования методов доставки мРНК вакцин, например, создания специфических лигандов для М-клеток или антиген-презентирующих клеток [240].

Похожими иммуногенными свойствами обладают конструкции ДНК-вакцин. ДНК-вакцины содержат плазмиду с кодирующей последовательностью антигена под контролем промотора эукариот (обычно CMV). После доставки в ядро клетки ДНК транскрибируется в мРНК, которая транслируется в цитоплазме. В отличие от РНК-вакцин, ДНК-вакцины более устойчивы к условиям хранения (холодовой цепи), что делает их производство менее затратным и подходящим для массовой вакцинации.

Для интраназальной доставки ДНК-вакцин против SARS-CoV-2 применяются ЛНЧ на основе хитозана, что обеспечивает защиту от нуклеаз и улучшает захват клетками. Доклинические исследования доставки ДНК, кодирующей антигена SARS-CoV-2, с помощью хитозана и золотых наночастиц показали высокую системную и мукозальную иммуногенность [241]. Однако же, разработка интраназальных ДНК-вакцин находится в стадии доклинических исследований и имеет теоретическое ограничение, связанное с безопасностью – риск интеграции в геном, а также с преодолением двух барьеров – плазматической и ядерной мембран.

1.6.3 Субъединичные вакцины

Субъединичные вакцины на основе рекомбинантного спайк-белка SARS-CoV-2 или его RBD-домена характеризуются высоким профилем безопасности, по сравнению с LAV, благодаря отсутствию репликационного потенциала [242]. Данная платформа зарекомендовала себя как высокоэффективная и безопасная для системной вакцинации. Среди разрешенных к применению можно перечислить вакцины SpikoGen [242], Nuvaxoid [243], VidPrevtyn Beta [244] и также ряд вакцин, разрешенных к региональному применению [245].

Субъединичные вакцины состоят из очищенных антигенов, которые сами по себе не способны оптимально активировать иммунную систему, ввиду недостатка РАРР-молекул. Данные вакцины требуют добавления адъювантов [246].

Разработка адъювантов для мукозальной вакцинации является отдельным направлением, поскольку используемые для системного применения адъюванты при мукозальном применении могут обладать другим профилем безопасности и рисками. В частности, применение термолабильного энтеротоксина *E. coli* (LT) в качестве мукозального адъюванта для вакцины против гриппа (Nasalflu) было связано с увеличением риска развития паралича Белла [247], что привело к отмене производства данной вакцины. Это подчёркивает необходимость тщательной оценки безопасности мукозальных адъювантов [5].

В связи с этим, современный поиск безопасных мукозальных адъювантов сосредоточен на детоксифицированных вариантах бактериальных токсинов, таких как dmLT (LT-R192G/L211A) и LThaK. Данные соединения сохраняют способность усиливать захват антигена эпителиальными клетками и индуцировать Th17-ответ и секрецию IgA, но лишены нейротоксичности исходных токсинов благодаря подавлению ADP-рибозилтрансферазной активности [18]. Перспективными также являются агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR), наночастицы на основе хитозана и бактериальные вторичные мессенджеры (например, c-di-GMP), которые активируют врождённый иммунитет

через пути STING и способствуют формированию тканевых резидентных Т-клеток (TRM) , что было показано в доклинических исследованиях кандидатной интраназальной вакцины против SARS-CoV-2 на мышах [248].

На сегодняшний день существует одна интраназальная субъединичная вакцина, одобренная для клинического применения (регионально в Иране). Субъединичная вакцина RAZI-COV PARS содержит исходный белок SARS-CoV-2 S как в мономерной (субъединицы S1 и S2), так и в открытой тримерной форме (S-тример), и вводится с использованием комбинированной схемы иммунизации: первичная (внутримышечно) - бустерная (внутримышечно) - бустерная (интраназально). Субъединицы S1 и S2 объединены с фрагментом Fc человеческого IgG для увеличения периода полураспада в сыворотке, тогда как к тримеру была добавлена последовательность T4 для обеспечения тримерной формы [249]. Данная вакцина индуцировала выраженный системный и слизистый иммунный ответ в доклинических исследованиях на мелких животных [249] с подтверждением частичной протективности на хомячках. В клинических испытаниях подтверждено индуцирование слизистого иммунного ответа, но продемонстрирована слабая защита от симптоматической инфекции SARS-CoV-2 [250, 251, 252].

Таким образом, несмотря на теоретическую привлекательность субъединичных интраназальных вакцин, перевод данных разработок в клиническую практику сопряжён со значительными трудностями с подбором адъюванта. Одним из методов решения вопроса безопасной доставки субъединичных иммуногенов в сочетании с адъювантной активностью являются вирусоподобные частицы.

1.6.4 Вирусоподобные частицы (VLP)

Вакцины на основе вирусоподобных частиц (VLP) представляют собой высокоиммуногенные платформы, имитирующие структуру вириона, но не содержащие генетического материала, что обеспечивает их высокий профиль безопасности. Несмотря на то, что ряд кандидатных VLP-вакцин против SARS-

CoV-2 прошёл клинические испытания для парентерального введения, на данный момент ни одна из них не получила одобрения для широкого применения [253].

Для интраназальной доставки перспективным подходом является инкапсуляция VLP в липидные наноносители. В частности, разработана вакцина на основе системы экспрессии «бакуловирус - клетки насекомых Sf21», инкапсулированная в анионные липосомы. Данная платформа продемонстрировала высокую иммуногенность как при интраназальном, так и при внутрибрюшинном введении в доклинических моделях [254]. Механизм действия обусловлен электростатическим отталкиванием: анионные или нейтральные наночастицы не связываются с отрицательно заряженным муциновым слоем слизистой оболочки, что облегчает их проникновение через эпителиальный барьер, эндоцитоз и транспорт М-клетками к индуктивным сайтам лимфоидной ткани NALT.

Таким образом, интраназальные вакцины на основе анионных липосом с VLP требуют дальнейшего поэтапного тестирования для клинического применения в качестве эффективной, безопасной и хорошо переносимой вакцины, обеспечивающей первую линию защиты от SARS-CoV-2.

1.6.5 Векторные вакцины

1.6.5.1 Аденовирусный вектор

Вакцины на основе аденовирусных векторов обладают уникальной способностью индуцировать мощный цитотоксический Т-клеточный ответ одновременно в системном и мукозальном компартментах [255]. Это свойство делает аденовирусные векторы привлекательной платформой для разработки мукозальных вакцин против аэрогенных патогенов.

Аденовирусы имеют естественный тропизм к респираторному эпителию посредством связывания с клеточным коксаки-аденовирусным рецептором (cox sackie-adenovirus receptor, CAR) [256], широко представленным в эпителиальных клетках. Эндогенная экспрессия антигена в цитоплазме инфицированных клеток обеспечивает презентацию пептидов как по пути МНС I

(для активации цитотоксических Т-клеток), так и по пути МНС II (для Т-хелперов), что критично для формирования полного адаптивного ответа. Дополнительно вирусная ДНК и компоненты капсида активируют врождённый иммунитет через цитозольные сенсоры (cGAS-STING) и эндосомальные рецепторы (TLR9), обеспечивая адъювантную активность без необходимости внешних адъювантов [257]

Большинство аденовирусных векторов, используемых в настоящее время в доклинических или клинических исследованиях, получены из аденовирусного вида С типа 2 (HAdV-C2) или типа 5 (HAdV-C5), для краткости часто именуемых Ad2 и Ad5. Однако высокая глобальная серопревалентность нейтрализующих антител, специфичных к Ad2 и Ad5, в человеческой популяции часто снижает эффективность вакцины при вакцинации [258]. В связи с этим для разработки против COVID-19 помимо Ad5 были разработаны вакцины на основе редких серотипов человека (Ad26, Ad35) или нечеловеческих аденовирусов шимпанзе (например, ChAdOx1, основанный на серотипе Y25) [259], которые получили одобрение к экстренному применению.

К сожалению, с применением аденовирусных вакцин против COVID-19 было отмечено повышение риска такого осложнения, как вакцин-индуцированная иммунная тромбоцитопения [260], при этом не было выявлено клинически значимой разницы между серотипами аденовируса, использованного в качестве вектора [261].

В контексте мукозальной иммунизации предсуществующая серопозитивность к аденовирусу частично нивелируется. Так высокая иммуногенность серотипа Ad5 при интраназальном введении была подтверждена на доклиническом этапе [262, 263], а ряд интраназальных вакцин был одобрен к экстренному применению в нескольких регионах.

Первой из одобренных вакцин для интраназального применения стала Convidecia Air (так же известная как Ad5-nCoV), разработанная в Китае. В клиническом применении в качестве гетерологичной бустерной дозы она значительно увеличивает средний геометрический титр нейтрализующих антител по

сравнению с гомологичной бустерной дозой инактивированной системной вакцины CoronaVac [264].

Комбинированная вакцина на основе аденовирусных векторов типов 5 и 26 Gam-COVID-Vac (Sputnik V) показала высокую индукцию системного и мукозального иммунного ответа на мышах при интраназальном введении [265]. Интраназальная форма данной вакцины была официально зарегистрирована для применения у человека в России под названием «Салнавак» в апреле 2022 года [18].

Вакцина для интраназального применения iNCOVACC (BBV154, Bharat Biotech) на основе аденовируса шимпанзе ChAd3n получила регистрацию для клинического применения в Индии в 2022 г. и продемонстрировала усиление мукозального и системного ответа при использовании в качестве бустера после внутримышечной вакцинации [266].

Среди ограничений вакцин на основе аденовирусного вектора стоит упомянуть риск нейроинвазии через обонятельный эпителий, что требует тщательной оценки безопасности. Некоторые серотипы аденовирусов в экспериментальных моделях демонстрировали транслокацию в обонятельную луковицу [11, 267]. Опасность представляет также ранее упомянутая вакцин-индуцированная тромбоцитопения, наблюдаемая при парентеральной иммунизации.

1.6.5.2 Векторы на основе вируса гриппа

Лицензированной вакциной против COVID-19 является dNS1-nCoV-RBD (Pneucolin, Китай), разрешена к применению в Китае. Платформа представляет собой живую аттенуированную вакцину против гриппа с делецией гена NS1, экспрессирующую RBD SARS-CoV-2 [5]. В доклинических исследованиях вакцина индуцировала высокие уровни специфического IgA в бронхоальвеолярном лаваже и TRM в лёгких, обеспечивая частичную защиту от SARS-CoV-2 у хомяков и перекрёстную защиту от вирусов гриппа H1N1 и H5N1 у мышей [268]. В ходе клинических испытаний вакцина показала безопасность,

однако индукция гуморального и клеточного иммунного ответа была слабой, хотя и достаточной для защиты от тяжелой формы COVID-19.

1.6.5.3 Векторы на основе вируса болезни Ньюкасла

В кандидатной вакцине NDV-HXP-S (разработка Icahn School of Medicine) используется вирус болезни Ньюкасла (NDV) в качестве вектора для экспрессии стабилизированного спайк-белка (HexaPro). Преимуществом платформы является возможность массового производства вакцинной субстанции в куриных эмбрионах по технологии гриппозных вакцин, что снижает стоимость и упрощает логистику (2-8 °C). В доклинических моделях мультивалентная формула антигена индуцировала перекрёстные нейтрализующие антитела против вариантов Омикрон и защищала как наивных животных, так и ранее вакцинированных мРНК-вакцинами [269]. Однако клинические исследования были прекращены на 3-й фазе из-за отсутствия эффективности.

1.6.6 Ограничение интраназальных вакцинных платформ

Несмотря на доказанную способность вышеописанных платформ, индуцировать мукозальный иммунитет, ни одна из зарегистрированных на сегодняшний день интраназальных вакцин не обеспечивает стерилизующего иммунитета – полного блокирования репликации вируса во входных воротах инфекции. Учитывая современные представления о мукозальном иммунитете (см. раздел 1.5) и уже полученные данные, векторные платформы являются наиболее перспективными для разработки интраназальных вакцин.

Аденовирусные векторы, несмотря на высокую иммуногенность, ограничены риском нейроинвазии и предсуществующим иммунитетом. Другие платформы требуют дальнейшего изучения и разработки. Субъединичные платформы и LVP требуют подбора безопасных адъювантов, способных индуцировать локальный ответ без развития воспаления. мРНК и ДНК вакцины требуют совершенно нового подбора адъювантов.

Все это указывает на необходимость поиска альтернативных векторных решений, сочетающих:

1. отсутствие предсуществующего иммунитета у человека;
2. цитоплазматическую репликацию без риска интеграции в геном;
3. естественный тропизм к респираторному эпителию;
4. внутреннюю адъювантную активность без внешних адъювантов;
5. доказанную способность индуцировать sIgA и TRM в доклинических моделях.

В этом контексте вакцинный вектор на основе вируса Сендай (Sendai virus, SeV) представляет собой альтернативную платформу, сочетающую преимущества живых аттенуированных вакцин с высоким профилем безопасности реплицирующихся векторов.

1.7. Вектор Сендай как платформа для интраназальной вакцины против SARS-CoV-2

1.7.1 Биологическая характеристика и безопасность платформы

Вирус Сендай (SeV) – это мышинный вирус парагриппа типа 1, относящийся к семейству *Paramyxoviridae*, роду *Respirovirus*. Геном SeV представлен одноцепочечной РНК с негативной полярностью, не имеющий стадии ДНК в своем жизненном цикле [19]. Репликация SeV происходит исключительно в цитоплазме клетки, что вместе с отсутствием стадии ДНК сводит к минимуму риск генетической интеграции вирусного генома в геном хозяина.

Естественным хозяином вируса Сендай являются грызуны. Для человека и приматов вирус не патогенен, что, вероятно, связано с особенностями белка С вируса SeV, который не оказывает антиинтерфероновой и антиапоптозной активности у человека, определяющей вирулентность человеческого вируса парагриппа типа 1 (hPIV-1) [20]. В отличие от hPIV-1, вирус SeV чувствителен к человеческому ИФН в клетках человека на поздних стадиях инфекции [270].

Эти свойства обеспечивают два ключевых преимущества SeV в качестве вакцинного вектора:

1. Отсутствие предсуществующего иммунитета. В человеческой популяции не циркулируют нейтрализующие антитела к вирусу Сендай.

2. Высокий профиль безопасности. Клинические испытания вакцин на основе SeV против инфекций hPIV-1, респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа 2-го и 3-го типов человека продемонстрировали высокий профиль безопасности у детей и взрослых [21, 22] .

Важным преимуществом использования SeV в качестве вакцинного вектора является высокая стабильность генома. Эта стабильность связана с необычным свойством генома парамиксовирусов, известным как «правило шести», которое обозначает строгую полигексамерную длину генома ($6n + 0$, где n - один нуклеотид) и обуславливает крайне низкую частоту рекомбинации геномных РНК парамиксовирусов [271].

Помимо этого, геном SeV позволяет встраивать крупные чужеродные генетические последовательности (более 3000 нуклеотидов) без существенной потери жизнеспособности вируса [272]. Для целей вакцинации против SARS-CoV-2 это даёт возможность экспрессировать полноразмерный S-белок, сохраняющий нативную тримерную структуру.

1.7.2 Иммунологические преимущества для мукозальной вакцинации

Эффективность вируса Сендай в качестве вакцинного вектора обусловлена сочетанием нескольких иммунологических факторов, критичных для защиты от респираторных патогенов. В контексте коррелятов защиты, (sIgA и TRM), платформа SeV демонстрирует следующие преимущества:

1. Активация врождённого иммунитета (внутренняя адъювантность).

Геномная РНК вируса Сендай распознаётся цитоплазматическими паттерн-распознающими рецепторами RIG-I и MDA5[273]. Это запускает каскад сигнальных путей, приводящий к продукции интерферонов I типа и провоспалительных цитокинов, создавая мощную адъювантную среду без необходимости добавления внешних адъювантов [274]. Такая активация способствует созреванию ДК и эффективной презентации антигена, что критично для преодоления толерантности слизистых оболочек.

2. Тропизм к респираторному эпителию.

SeV обладает естественным тропизмом к эпителиальным клеткам дыхательных путей. При интраназальном введении вектор эффективно трансдуцирует клетки верхних и нижних дыхательных путей, обеспечивая доставку антигена непосредственно к индуктивным сайтам мукозального иммунитета (NALT/миндалины) и эффекторным тканям (лёгкие) [275]. Это обеспечивает локальную экспрессию антигена в тех компартментах, где происходит первичная репликация SARS-CoV-2.

1.7.3 Индукция стерилизующего иммунитета.

Для прерывания передачи SARS-CoV-2 необходима индукция локального иммунитета во входных воротах инфекции.

В доклинических исследованиях вакцин на основе вируса Сендай против респираторных патогенов была продемонстрирована индукция высоких титров мукозального sIgA [276] и долгоживущих популяций TRM в лёгких [277].

Вектор Сендай, экспрессирующий S-белок SARS-CoV-2, на модели грызунов индуцировал IgM, IgG, IgA и нейтрализующие антитела в сыворотке или бронхоальвеолярной жидкости в течение 12 недель [23]. Т-клеточные ответы были показаны в исследованиях на макаках, с подтвержденной протективностью против заражения SARS-CoV-2 [24].

1.8 Резюме к обзору литературы

Пандемия COVID-19 продемонстрировала как невероятную скорость научного и технологического отклика на глобальную угрозу, так и фундаментальные ограничения существующих подходов к вакцинной профилактике респираторных инфекций. Разработанные в рекордно короткие сроки системные вакцины на платформах мРНК, вирусных векторов и рекомбинантных белков сыграли решающую роль в снижении тяжести заболевания и смертности, однако их способность прерывать цепь передачи быстро эволюционирующего вируса оказалась недостаточной.

Анализ эволюции SARS-CoV-2 от варианта Дельта (B.1.617.2) к доминирующему в 2025 году JN.1 (BA.2.86.1.1) выявляет чёткую дихотомию

адаптационных стратегий: от максимизации патогенности и фузогенности за счёт оптимизации TMPRSS2-зависимого проникновения – к максимальному иммунному уклонению при сохранении высокой трансмиссивности через верхние дыхательные пути. Эта смена парадигмы делает неэффективной стратегию, ориентированную исключительно на системный гуморальный и Т-клеточный ответ, и диктует необходимость перехода к мукозальной вакцинации, способной формировать стерилизующий иммунитет на уровне входных ворот инфекции.

Ключевым препятствием на этом пути является несоответствие между антигенным составом вакцин и циркулирующими штаммами. Вариант JN.1, несущий мутацию L455S в RBD, целенаправленно разрушает эпитопы, распознаваемые основной массой нейтрализующих антител, включая антитела класса 3 (типа S309). В то же время, применение изолированного RBD как антигена приводит к формированию узконаправленного иммунного ответа, чрезвычайно уязвимого к единичным мутациям и лишённого крестных эпитопов, распознаваемых антителами класса 5, обладающими широкой перекрёстной нейтрализующей активностью. Следовательно, рациональным выбором является полноразмерный S-белок в нативной тримерной конформации, который сохраняет полный репертуар В- и Т-клеточных эпитопов и способен индуцировать универсальный защитный ответ.

Реализация этой стратегии требует платформы, сочетающей безопасность, высокую иммуногенность и технологическую гибкость. Вирус Сендай представляет собой оптимальное решение: он не патогенен для человека, но способен реплицироваться в эпителии дыхательных путей при интраназальном введении, обеспечивая мощную локальную экспрессию антигена и индукцию комплексного мукозального иммунитета, включающего sIgA, тканевые резидентные Т-клетки памяти и системный ответ.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ

2.1.1 Рекомбинантные вакцинные конструкторы вируса Сендай

Для проведения доклинических исследований предоставлены рекомбинантные варианты вируса Сендай штамма Москва (GenBank KP717417.1), разработанные и сконструированные в отделе молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, в лаборатории под руководством Кочневой Г.В. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора):

Sen-RBDdelta(M) – в качестве иммуногена использована секретируемая форма рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка Дельта-варианта SARS-CoV-2 (а.о. фрагмент 308V–541F, слитый с сигнальным пептидом 1M–15C);

Sen-Sdelta(M) – в качестве иммуногена использован полноразмерный S-белок Дельта-варианта SARS-CoV-2 (а.о. 1–1273);

Sen-S-JN.1(M) – в качестве иммуногена использован полноразмерный S-белок JN.1-варианта SARS-CoV-2 (а.о. 1–1273);

Sen2-EGFP(M) – контрольный векторный штамм, экспрессирующий трансген зеленого флюоресцентного белка EGFP.

Рекомбинанты созданы с использованием ранее сконструированного набора из четырёх плазмидных ДНК [278]. Оживление рекомбинантов проведено в клетках 293-T7 (модификация НЕК 293Т), выделение и размножение осуществлено в аллантоисной полости 11-дневных куриных эмбрионов. Инфекционные титры наработанных рекомбинантов определяли на культуре клеток LLC-MK₂ методом бляшек, титр очищенных препаратов составил 1,0–1,5×10⁹ БОЕ/мл. Препараты представляют собой вирусные суспензии в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4) с добавлением 1 mM MgCl₂, стерильно профильтрованы, расфасованы и хранятся при –80 °C.

2.1.2 Рекомбинантные белки SARS-CoV-2

Для исследования провоспалительной активности использованы рекомбинантные белки, разработанные и сконструированные в отделе биофизики

и экологических исследований, в лаборатории под руководством Д.Н. Щербакова (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора): белок рецептор-связывающего домена шиповидного белка SARS-CoV-2 (Дельта вариант) – rRBD; полноразмерный шиповидный белок SARS-CoV-2 (Дельта вариант) – rSpike. Способ получения подробно описан в работе [279]. Рекомбинантные белки rRBD и rSpike нарабатывали на культуре клеток CHO-K1. Культуральную среду центрифугировали для удаления клеточного дебриса, фильтровали через фильтры – 0,22 мкм и очищали последовательной Ni-NTA и ионообменной хроматографией.

Фракции белков анализировали методом SDS-PAGE в 15% полиакриламидном геле, а целевую фракцию белка диализовали против PBS. Образцы полученных белков стерилизовали фильтрацией через фильтры 0,22 мкм. С помощью программы Gel-Pro Analyzer, версия 3.1, анализировали чистоту и гомогенность полученной фракции белка. Количественный анализ содержания белка проводили методом Лоури.

Использование эукариотической системы экспрессии (клетки CHO-K1) гарантировало отсутствие контаминации бактериальными эндотоксинами (липополисахаридами), что исключало артефактную активацию врожденного иммунитета *in vivo*.

2.1.3 Используемые штаммы SARS-CoV-2

В исследованиях иммуногенности и протективности вакцинных конструкторов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) использовали следующие изоляты SARS-CoV-2:

- hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (GISAID: EPI_ISL_406844) – Ухань-подобный вариант (линия B)
- HCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (GISAID: EPI_ISL_6565014) – вариант Гамма (линия B.1.1.28.1 или P.1)
- hCoV19/Russia/MOS2406/2021 (GISAID EPI_ISL_7338789). – вариант Дельта (линия AY.122)

В исследование эффективности Sen-S-JN.1(M) и перекрёстной нейтрализующей активности использовали штаммы SARS-CoV-2, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Штаммы SARS-CoV-2 в исследованиях эффективности и перекрёстной нейтрализующей активности Sen-S-JN.1(M)

Вариант	Название	Идентификатор GISAID	Линия
Ухань	hCoV-19/Australia/VIC01/2020	EPI_ISL_406844	B
Дельта	hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021	EPI_ISL_7338814	B.1.617.2
BA.1	hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021	EPI_ISL_8920444	B.1.1.529
BA.5.2	hCoV-19/Russia/Moscow-49415/2022	EPI_ISL_16613436	B.1.1.529.5.2
XBB.1.5	hCoV-19/Russia/SAK-SRC-8527/2023	EPI_ISL_17730074	XBB.1.5
EG.5.1	hCoV-19/Russia/Sa-yaku121SM290705/2023	EPI_ISL_18520144	XBB.1.9.2.5.1
XBB.1.16	hCoV-19/Russia/HMAO134SM300975/2023	EPI_ISL_18520146	XBB.1.16
JN.1	hCoV-19/Russia/NVS-SRC-4559/2024	EPI_ISL_19035845	BA.2.86.1.1

Все штаммы были получены из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

2.1.4 Культуры клеток

Наработку штаммов SARS-CoV-2, культивирование, определение их инфекционного титра и реакцию нейтрализации проводили на культуре клеток Vero E6 (клетки почки африканской зелёной мартышки, чувствительные к репликации коронавируса). В работе использовали клетки не выше 30-го пассажа. Для работы с вирусом Сендай использовали чувствительную к нему линию клеток почки макаки-резус LLC-MK₂. Культуры клеток Vero E6 и LLC-MK₂ были получены из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

2.1.5 Синтетические пептиды

Для стимуляции спленоцитов мышей BALB/c в ELISpot и ICS использовали пул пептидов, соответствующих последовательности S-белка SARS-CoV-2 и рестриктированных молекулами МНС класса I и II мышей линии BALB/c, в концентрации 20 мкг/мл каждого пептида (Таблица 2). Пептиды подбирали с помощью инструментов IEDB Analysis Resource и синтезировали в компании AtaGenix Laboratories (Китай), чистота пептидов составляла >80%.

Таблица 2 – Пептиды S-белка, использованные для стимуляции спленоцитов

Последовательность	Класс МНС	Аллель
SGTNGTKRF	I	H-2-Dd
YYHKNNKSW	I	H-2-Kd
KYNENGTIT	I	H-2-Kd
VYAWNRKRI	I	H-2-Kd
FERDISTEI	I	H-2-Ld
CGPKKSTNL	I	H-2-Dd
SKPSKRSFI	I	H-2-Dd
KYFKNHTSP	I	H-2-Kd
YPDKVFRSSVLHSTQ	II	H2-IEd
KNIDGYFKIYSKHTP	II	H2-IEd
RFASVYAWNRKRISN	II	H2-IEd, H2-IAAd
SNGTHWFVTQRNFYE	II	H2-IEd
YNYKLPDDFTGCVIA	II	H2-IEd
KNKCVNFNFNGLTGT	II	H2-IEd
QPTESIVRF	I	H-2-Kd
VSPTKLNDL	I	H-2-Kd
LLHAPATVCGPKKST	II	H2-IEd
ASVYAWNRKRISN	II	H2-IEd
YNYLYRLFRKSNL	II	H2-IEd

2.1.6 Антитела и конъюгаты

Первичные антитела для проведения иммуноблоттинга:

- Поликлональная сыворотка крови мыши, иммунизированной rRBD (собственного получения);
- Сыворотка крови вакцинированного реконвалесцента COVID-19 (двукратная вакцинация «Спутником V» и перенесённая инфекция);
- Кроличьи поликлональные антитела против S-белка PVV00401 (AtaGenix Laboratories, Китай).

Вторичные антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой (AP), для проведения иммуноблоттинга:

- Козьи антитела против IgG мыши (Sigma-Aldrich, США);
- Козьи антитела против IgG человека (Sigma-Aldrich, США);
- Козьи антитела против IgG кролика (Sigma-Aldrich, США).

Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена ((HRP) для проведения ИФА):

- Козьи антитела против IgG мыши (Biomedicals, США);
- Козьи антитела против IgG хомяка (Invitrogen, США).

Моноклональные антитела для проведения проточной цитометрии (BioLegend, США): CD3-FITC (клон 500A2), CD4-BV785 (клон GK1.5), CD8-AF700 (клон 53-6.7), IFN- γ -APC (клон XMG1.2), IL-2-BV421 (клон JES6-5H4).

2.1.7 Коммерческие наборы и диагностические системы

- LEGENDplex™ Mouse B cell Panel (13-plex) w/VbP (BioLegend, США) – для мультиплексного определения цитокинов и хемокинов.
- IFN- γ ELISpot Kit (Abcam, США) – для анализа IFN- γ -продуцирующих спленоцитов.
- Тест-система «Вектор ИФА SARS-CoV-2-АТ» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) – для определения сывороточных IgG.
- Mouse sIgA ELISA Kit (FineTest, Китай) – для определения секреторного IgA в назофарингеальных смывах.

- Набор для выделения РНК Riboprep (ИЛС, Россия).

2.1.8 Питательные среды и вспомогательные реактивы

- DMEM с 4,5 г/л глюкозы и GlutaMAX™ (Invitrogen/Gibco, США).
- RPMI-1640 (Gibco, США).
- Фетальная бычья сыворотка – FBS, 10%, (HyClone, США).
- Комплексный антибиотик/антимикотик пенициллин/стрептомицин/амфотерицин (Gibco, США).
- Гентамицин (50 мкг/мл).
- Трипсин-ЭДТА (0,25%, ООО «БиолоТ», Россия).
- Бычий сывороточный альбумин – БСА (Sigma-Aldrich, США).
- Коктейль ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Германия).
- Фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (AppliChem, Германия).
- Нитроцеллюлозная мембрана Trans-Blot (Bio-Rad, США).
- Субстрат для щелочной фосфатазы BCIP/NBT-Purple (Sigma-Aldrich, США).
- Хромогенный субстрат для пероксидазы хрена (ТМБ) – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в цитрат-фосфатном растворе с перекисью водорода (ООО «Имтек», Россия).
- Препарат для наркоза «Золетил» (Valdepharm, Франция).
- Седативный препарат «Ксила» (Interchemie, Нидерланды).
- Фиксатор: 4% параформальдегид / 10% нейтральный забуференный формалин.

2.1.9 Растворы и буферы

- Фосфатно-солевой буфер – ФСБ/PBS, pH 7,4 (ООО «ЭКО-СЕРВИС», Россия).
- ФСБТ – ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 (AppliChem, Германия) – для отмывки в ИФА и иммуноблоттинге.
- Физиологический раствор (NaCl 0,9%).
- Лизирующий буфер для иммуноблоттинга:
– 50 мМ Трис гидрохлорид (pH 8,0) (Sigma Aldrich, США)

– 5 мМ ЭДТА,
– 150 мМ NaCl,
– 0,1% додецилсульфата натрия – SDS (Solarbio, Китай), 1× коктейль ингибиторов протеаз и 1 мМ PMSF.

- Окрашивающий раствор генцианвиолета (0,2%): 1 г генцианвиолета (HiMedia, Индия), 20 мл 96% этилового спирта, 400 мл 10% формалина забуференного (Labiko, Россия), 80 мл буферного раствора Хенкса (Servicebio, Китай).
- Стоп-реагент для ИФА: серная кислота 1 М.
- Углекислый газ (CO₂) для гуманной эвтаназии.

2.1.10 Лабораторные животные, условия содержания и этический надзор

Мыши

Для оценки провоспалительной активности рекомбинантных белков и защитной эффективности вакцинного конструкта Sen-S-JN.1(M) использовали самцов трансгенных мышей (Mus musculus strain B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn (K18-hACE2)), возраст 8–10 недель, масса 22–25 г, свободных от патогенной микрофлоры (SPF-статус), полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (г. Пущино, Московская обл.), общее количество – 48 особей.

Мышей линии BALB/c (Mus musculus strain BALB/c), самки, возраст 8 недель, масса 18–22 г, полученных из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, использовали в следующих экспериментах:

- оценка иммуногенности и протективной эффективности конструкта Sen-RBDdelta(M) – 26 особей;
- оценка иммуногенности и протективной эффективности конструкта Sen-Sdelta(M) – 28 особей.
- оценка иммуногенности конструкта Sen-S-JN.1(M) – 30 особей.

Общее количество мышей линии BALB/c – 84 особи.

Сирийские хомяки

Сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*, самки, возраст 6 недель, масса 80–110 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», использовали для оценки иммуногенности и протективной эффективности конструкторов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) – по 16 особей на каждый конструктор, всего 32 особи.

Все работы с животными проводили в помещениях виварного блока лаборатории биологической защиты уровней BSL-2 и BSL-3. Животных содержали в стандартных условиях: на сбалансированном рационе, со свободным доступом к воде, при режиме освещения 12 ч свет / 12 ч темнота, температуре 20–22 °C и относительной влажности 50–60%.

Все манипуляции с животными, включая иммунизацию, заражение и отбор биоматериала, выполняли после премедикации.

Эксперименты с животными проводили в соответствии с принципами гуманности, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), а также с требованиями Приказа Минздрава РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Протоколы исследований одобрены Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 28.12.2022 и протокол № 7 от 27.10.2023) в соответствии с рекомендациями Международного совета по наукам о лабораторных животных (ICLAS/IAVES) и стандартами ЕАЭС (Рекомендация Коллегии ЕЭК № 33 от 14.11.2023).

2.1.11 Оборудование и программное обеспечение

- Проточный цитометр ACEA Novocyte Quanteon 4025 (Agilent, США).
- Проточный цитометр ZE5 (Bio-Rad, США).
- Сканер для компьютерной томографии Mediso MultiScan LFER 150 (Mediso, Венгрия).
- Система для визуализации иммуноблоттов GelDoc Go (Bio-Rad, США).
- Ридер для ELISpot (Carl Zeiss, Германия).
- Миницентрифуга Eppendorf Minispin (Eppendorf, Германия).

- Амплификатор для ПЦР-PB Rotor-Gene 6000 (QIAGEN, Германия).
- Автоматический процессор для обезвоживания тканей Tissue-Tek II (Sakura Finetek, Япония),
- Микротом Leica RM 2255 (Leica Biosystems, Германия).
- Программное обеспечение:
 - NovoExpress v1.5.0 (Agilent Technologies, США) – анализ проточной цитометрии,
 - Mediso Nucline LFER и InterviewFusion (Mediso, Венгрия) – реконструкция и AI-сегментация КТ,
 - GraphPad Prism 8.0.1/9.0 (GraphPad, США), Statistica 13.0 (StatSoft, США) – статистическая обработка,
 - DNA Copy Number and Dilution Calculator (Thermo Fisher, США) – расчёт копий генома.

2.2 МЕТОДЫ

2.2.1 Модель оценки провоспалительной активности антигенов *in vivo*

Оценку провоспалительной активности проводили на мышах K18-hACE2. Рекомбинантные белки rRBD (дозы: 78 и 400 мкг/кг) и rSpike (дозы: 78 и 1000 мкг/кг) в объёме ≤ 2000 мкл/кг вводили однократно интратрахеально. Контрольная группа получала эквивалентный объём физиологического раствора (0,9% NaCl). Дозы рассчитывали, исходя из эквимольного содержания функционального RBD в молекулах rRBD и rSpike с учётом тримерной конформации последнего. Наблюдение вели в течение 72 часов. До введения и каждые 24 часа регистрировали массу тела, ректальную температуру. Отбор образцов крови из ретроорбитального синуса производили до начала эксперимента, затем через 24 и 72 часа. В конечной точке через 72 часа животных выводили из эксперимента и производили забор легких. В образцах сывороток и гомогенатах легких оценивали концентрацию цитокинов методом проточной цитометрии. Дополнительно в группах животных после введения rSpike в конечной точке перед эвтаназией проводилась прижизненная компьютерная томография органов грудной клетки.

2.2.2 Интратрахеальное введение

Процедуру интубации проводили под общей анестезией раствором Золетила. Животное подвешивали за резцы в вертикальном положении. С использованием оптоволоконного кабеля диаметром 0,5 мм в качестве проводника, в голосовую щель гортани через полость рта вводили катетер (22G) на глубину 1 см. Далее через катетер дозатором в трахею капельно вводили белоксодержащую суспензию или физиологический раствор, общий объем введения не превышал 2 мл/кг массы тела, после чего катетер промывали 150 мкл воздуха. Катетер извлекали, переводили животное в вентральное положение в небольшую камеру на грелке, под дополнительный кислород (медленно снижая концентрацию O_2 со 100% до 21%) и наблюдали за животными в течение следующих 4 часов перед возвращением в обычную клетку.

2.2.3 Мультиплексный анализ цитокинов методом проточной цитометрии

Концентрацию цитокинов определяли в сыворотке крови и в 10% гомогенатах лёгких. Использовали набор LEGENDplex™ Mouse B cell Panel (13-plex) w/VbP согласно инструкции производителя. Флуоресценцию регистрировали на проточном цитометре ACEA Novocyte Quanteon 4025 (Agilent, США), анализ проводили в ПО NovoExpress v1.5.0. Панель включала: IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-10, TGF- β 1, IL-2, IL-4, IL-13, IL-12p70, BAFF, BCMA, sCD40L.

2.2.4 Прижизненная компьютерная томография органов грудной клетки с AI-сегментацией

КТ проводили на 72-й час после введения белков на сканере Mediso LFER 150 (режим zig-zag, 60 кВ, 440 мкА, экспозиция 300 мс) под общей анестезией (Золетил) в положении на животе. Реконструкцию выполняли в ПО Mediso Nucline LFER (размер вокселя 53 мкм). Анализ плотности проводили в InterviewFusion с использованием инструмента AI-сегментации лёгких (4 реперные точки, порог 85%). Рассчитывали объём лёгких (мл), среднюю

плотность в единицах Хаунсфилда (HU) и нормированную плотность (интегральную плотность пораженных тканей).

2.2.5 Анализ экспрессии целевых иммуногенов методом иммуноблоттинга

Предоставленные рекомбинантные варианты вируса Сендай штамма Москва исследовали на предмет экспрессии целевого трансгена методом иммуноблоттинга.

Экспрессию RBDdelta в составе рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) оценивали в аллантоисной жидкости и культуральной среде клеток LLC-MK₂. В качестве положительного контроля использован rRBD (200 нг, 35 кДа). В качестве первичных антител использована поликлональная сыворотка крови мыши, иммунизированной RBDdelta (разведение 1:500) или сыворотка крови вакцинированного реконвалесцента COVID-19 (разведение 1:200). В качестве вторичных антител использовали козы антигеном против IgG мыши и IgG человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой (разведение 1:3000).

Экспрессию Sdelta в составе рекомбинантного варианта Sen-Sdelta(M) оценивали в препарате очищенного вируса, культуральной среде и лизате клеток LLC-MK₂, инфицированных как рекомбинантным штаммом Sen-Sdelta(M), так и вариантом Sen2-EGFP(M), несущим гетерологичный трансген EGFP, в качестве отрицательного контроля. В качестве положительного контроля использован rSpike (200 нг, 180 кДа). Первичные антитела: сыворотка реконвалесцента (1:200). Вторичные: козы антигеном против IgG человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой (1:3000).

Экспрессию S (JN1) в составе рекомбинантного варианта Sen-S-JN.1(M) оценивали в лизатах клеток LLC-MK₂ и в препаратах очищенного концентрированного вируса, полученных из аллантоисной жидкости. В качестве отрицательного контроля использовали лизаты клеток и препараты вируса, инфицированные вариантом Sen2-EGFP(M), несущим гетерологичный трансген EGFP. В качестве положительного контроля использован rSpike (200 нг, 180 кДа). Иммунодетекцию проводили с использованием первичных анти-S кроличьих

поликлональных антител PVV00401 в разведении 1:8000. В качестве вторичных антител использовали поликлональные антитела козы против IgG кролика, конъюгированные с щелочной фосфатазой в разведении 1:3000.

Клетки LLC-MK₂, инфицированные рекомбинантными SeV, лизировали в буфере: 50 мМ Трис (pH 8,0), 5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, содержащем 0,1% SDS, коктейль ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics GmbH, Германия) и 1 мМ PMSF. Лизаты клеток, а также очищенные препараты рекомбинантных вирусов, смешивали в соотношении 1:1 с буфером нанесения (0,5М Трис, pH 6,8; 25% глицерин; 10% SDS; 10% β-меркаптоэтанол; 0,5% (w/v) бромфеноловый синий). Образцы разделяли на 12% SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Trans-Blot (Bio-Rad) с помощью процедуры влажного блоттинга (100 В, 500 мА, 90 мин, 15⁰С). Иммунодетекцию осуществляли с помощью первичных и вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой. Иммунный комплекс визуализировали добавлением жидкого субстрата BCIP/NBT-Purple (Sigma-Aldrich, США). Реакцию останавливали промывкой мембраны в дистиллированной воде. Для детекции результатов использовали сканер GelDoc Go (Bio-Rad, США).

2.2.6 Однократная интраназальная иммунизация

Общую иммуногенность и протективную активность полученных рекомбинантных вирусов оценивали в сериях экспериментов на мышах и хомяках. Иммунизацию всеми конструктами проводили однократно интраназально под легкой анестезией: мышам в объеме 10 мкл, хомякам – 100 мкл (по 50% объема в каждую ноздрю). В качестве контроля использовали рекомбинантный вирус Sen2-EGFP(M) (векторный контроль) или фосфатно-солевой буфер (PBS, отрицательный контроль).

Для оценки иммуногенности различных конструктов были сформированы следующие экспериментальные группы:

конструкт Sen-RBDdelta(M)

- Мыши BALB/c (n=27): разделены на 3 группы по 9 особей: экспериментальная (вакцинированы Sen-RBDdelta(M) в дозе 10^5 БОЕ/мышь), контроль вектора (вакцинированы Sen2-EGFP(M) в дозе 10^5 БОЕ/мышь) и отрицательный контроль (PBS).
- Сирийские хомяки (n=16): разделены на 2 группы по 8 особей: экспериментальная (вакцинированы Sen-RBDdelta(M) в дозе 10^7 БОЕ/хомяк) и отрицательный контроль (PBS).

конструкт Sen-Sdelta(M)

- Мыши BALB/c (n=28): разделены на 2 группы по 14 особей: экспериментальная (вакцинированы Sen-Sdelta(M) в дозе 10^5 БОЕ/мышь) и отрицательный контроль (PBS).
- Сирийские хомяки (n=16): разделены на 2 группы по 8 особей: экспериментальная (вакцинированы Sen-Sdelta(M) в дозе 10^6 БОЕ/хомяк) и отрицательный контроль (PBS). Дополнительно по 6 мышей из каждой группы эвтаназировали на 28-е сутки для забора селезенки и оценки клеточного иммунного ответа.

конструкт Sen-S-JN.1(M)

- Мыши BALB/c (n=20): на 2 группы по 10 особей: экспериментальная (вакцинированы Sen-S-JN.1(M) в дозе 10^5 БОЕ/мышь) и отрицательный контроль (PBS). Забор крови и назофарингеальных смывов проводили на 14-е и 28-е сутки с выводом по 5 животных из каждой группы;
- Трансгенные мыши K18-hACE2 (n=10): разделены на 2 группы по 5 особей: экспериментальная (вакцинированы Sen-S-JN.1(M) в дозе 10^5 БОЕ/мышь) и отрицательный контроль (PBS) – использованы для оценки протективности вакцины.

Забор образцов крови для серологических исследований проводили через 28 суток после иммунизации из ретроорбитального синуса у мышей или из гингивальной вены у хомяков.

2.2.7 Процедура отбора образцов крови и смывов у иммунизированных животных для изучения иммунного ответа

Всех животных перед забором биоматериала вводили в наркоз путем внутримышечного введения комбинированного препарата (Золетил® + ксилазин) в дозировке, обеспечивающей стабильный наркоз на протяжении процедуры.

У мышей в асептических условиях производили пункцию ретроорбитального синуса капиллярной стеклянной трубкой или инсулиновым шприцем с иглой 22G. Объем отбираемой крови не превышал 200 мкл ($\leq 10\%$ от объема циркулирующей крови). Образцы помещали в пластиковые пробирки типа Eppendorf без антикоагулянта.

У сирийских хомяков забор крови осуществляли методом пункции гингивальной (десневой) вены, расположенной на нижней челюсти между резцами, с использованием инсулинового шприца с иглой 22G. Процедура проводилась в асептических условиях согласно методике, описанной ранее [280]. Объем крови соответствовал физиологическим нормам для данного вида животных. Образцы помещали в пластиковые микропробирки типа Eppendorf.

Полученные образцы крови выдерживали при комнатной температуре в течение 30–60 мин для завершения ретракции сгустка, после чего центрифугировали на миницентрифуге Eppendorf Minispin при $2\,000 \times g$ (около 8 000 об/мин) в течение 10 мин при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Надосадочную жидкость (сыворотку) отбирали пипеткой, избегая контакта с клеточным осадком и гемолизированными эритроцитами, аликвотировали по 50–100 мкл в стерильные криопробирки и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения серологических анализов.

Следующую процедуру проводили только у мышей линии BALB/c, иммунизированных конструктором Sen-S-JN.1(M), для оценки уровня специфического секреторного IgA (sIgA). Непосредственно после эвтаназии носовые ходы вскрывали, после чего производили орошение и аспирацию 100 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4). Полученные смывы немедленно центрифугировали при $1\,500 \times g$ в течение 5 мин при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ для

удаления клеточного дебриса. Супернатант аликвотировали и хранили в стерильных криопробирках при -80°C .

2.2.8 Определение IFN- γ методом ELISpot и внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS)

Спленоциты выделяли путём механического продавливания селезёнки иммунизированных мышей BALB/c через клеточные фильтры с размером пор 70 и 40 мкм (Jet BioFIL, Китай). После лизиса эритроцитов спленоциты отмывали и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640, дополненной гентамицином (50 мкг/мл). Жизнеспособность и концентрацию клеток определяли методом окрашивания трипановым синим на автоматическом счётчике (Bio-Rad, США).

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по количеству спленоцитов, продуцирующих IFN- γ , методом IFN- γ ELISpot. Анализ выполняли с использованием набора Murine IFN γ ELISPOT Kit (с предварительно покрытыми планшетами) (Abcam, США) согласно инструкции производителя. Спленоциты высевали по $2,5 \times 10^5$ клеток на лунку и стимулировали пептидами, либо конканавалином А (положительный контроль), либо не стимулировали (отрицательный контроль). Клетки инкубировали в течение 18 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Количество клеток, продуцирующих IFN- γ , подсчитывали с помощью ридера для ELISpot фирмы Carl Zeiss (Германия).

Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) проводили по стандартному протоколу с использованием проточной цитометрии. Спленоциты в количестве $0,7 \times 10^6$ клеток инкубировали с пептидной смесью (Таблица 2) или без неё в течение 3 ч при 37°C и 5% CO_2 , после чего добавляли брефельдин А (1 мкг/мл) и продолжали инкубацию ещё 15 ч. Для окрашивания поверхностных маркеров использовали моноклональные антитела производства Biolegend (США) против CD3 (клон 500A2), CD4 (клон GK1.5), CD8 (клон 53-6.7), конъюгированные с AF700, BV785 и FITC соответственно. После фиксации 1% параформальдегидом в PBS и пермеабиллизации 0,5% Tween 20 в PBS клетки

окрашивали для детекции внутриклеточных цитокинов с помощью анти-IFN- γ APC (клон XMG1.2) и анти-IL-2 BV421 (клон JES6-5H4) (Biolegend, США).

Образцы анализировали на проточном цитометре ZE5 (Bio-Rad, США) с использованием программного обеспечения Everest.

2.2.9 Оценка системного и мукозального гуморального ответа методом ИФА

Сывороточные IgG определяли с помощью тест-системы «Вектор ИФА SARS-CoV-2-AT» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») с конъюгатом Goat Anti-Mouse/Hamster IgG-HRP (Biomedicals/Invitrogen). Секреторные IgA (sIgA) в назофарингеальных смывах анализировали с помощью Mouse sIgA ELISA Kit (FineTest, Китай). В качестве сорбента использовали инактивированный вирус SARS-CoV-2 (вариант JN.1 или Дельта в зависимости от задачи). Оптическую плотность измеряли при 450 нм, титры выражали как среднегеометрические значения (СГТ) с 95% ДИ.

2.2.10 Оценка системного гуморального ответа методом реакции нейтрализации на культуре клеток Vero E6

Исследование нейтрализующей активности иммунных сывороток в отношении SARS-CoV-2 проводили в реакции торможения цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток. Для сывороток животных, иммунизированных конструкцией Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) использован SARS-CoV-2, принадлежащий варианту Дельта (B.1.617.2) hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (GISAID: EPI_ISL_7338814). Сыворотки от животных, иммунизированных конструктором Sen-S-JN.1(M), исследовали в отношении штаммов SARS-CoV-2, представленных в таблице 1 (см п. 2.1.4), кроме варианта Гамма.

Клетки линии Vero E6 высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 10^5 кл/мл и культивировали 24 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ до образования сливного монослоя. Исследуемые сыворотки крови (стартовое разведение 1:10) серийно разводили поддерживающей средой с двукратным шагом. Полученные разведения смешивали в пропорции 1:1 с 0,11 мл среды, содержащей 100 ТЦИД₅₀

штамма коронавируса SARS-CoV-2. Смеси инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем аликвоты по 100 мкл вносили в дублирующие лунки планшетов с сформированным монослоем клеток.

Далее планшеты инкубировали 4 суток при 37 °С и 5 % CO₂. После инкубации проводили окрашивание клеточных монослоев. Для этого в каждую лунку добавляли по 100 мкл окрашивающего раствора генцианового фиолетового (0,2%), предварительно приготовленного следующим образом: 1 г генцианвиолета растворяли в 20 мл 96 % этилового спирта, добавляли 120 мл формалина (40%) и 350 мл буферного раствора Хенкса. Через 30 минут окрашивающий раствор удаляли, а планшеты тщательно промывали водой. Развитие ЦПД оценивали визуально под микроскопом по степени сохранности клеточного монослоя. Предельное разведение сыворотки, полностью предотвращающее ЦПД в 50% лунок (ТЦИД₅₀), рассчитывали по формуле Рида–Менча [281].

2.2.11 Определение титра вируса

Клеточную культуру выращивали в 96-луночных культуральных планшетах. После удаления ростовой среды в лунки вносили последовательные десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости в поддерживающей среде в 6 лунок 96-луночного планшета. Планшеты инкубировали в течение 4 суток при 37°С в атмосфере с 5% CO₂. По завершении инкубации клетки окрашивали 0,2% раствором генцианвиолета (приготовленным, как описано выше) на 30 мин, после чего краситель удаляли, а лунки тщательно промывали водой. Цитопатическое действие (ЦПД) оценивали визуально по наличию повреждений клеточного монослоя. Титр вируса рассчитывали по формуле Рида–Менча и выражали в lg ТЦИД₅₀/мл [281].

2.2.12 Модель интраназального вирусного заражения и забор биоматериала

Заражение SARS-CoV-2 проводилось в условиях 3-го уровня биобезопасности (BSL-3) в соответствии с российскими санитарными правилами и нормами. Через 28–35 суток после иммунизации животным интраназально вводили вирусосодержащую суспензию SARS-CoV-2 в объеме 20 мкл (мыши) или

100 мкл (хомяки), распределяя по 50% объема в каждую ноздрю. В заданные конечные точки эксперимента (5-е сутки для мышей, 6-е сутки для хомяков), соответствующие пику репликации вируса в используемых моделях, животных подвергали гуманной эвтаназии с использованием CO₂. Отбирали легкие и носовые раковины, из которых готовили 10% (масса/объем) суспензии в фосфатно-солевом буфере (PBS). Гомогенаты центрифугировали (3000 × g, 10 мин, +4 °C), аликвотировали супернатанты и хранили при –70 °C для последующего определения вирусной нагрузки.

Конструкт Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M)

Для оценки протективной эффективности у сирийских хомяков использовали штамм SARS-CoV-2, принадлежащий варианту Дельта, в дозе 3,8 log₁₀ ТЦИД₅₀ на животное (что соответствовало ~50ИД₅₀ для данной модели). При исследовании конструкта Sen-RBDdelta(M) в дополнение к стандартному протоколу ежедневно регистрировали динамику массы тела, на 2-е, 3-е, 4-е и 5-е сутки проводили забор назофарингеальных смывов для мониторинга вирусной экскреции, а по завершении эксперимента фиксировали лёгкие в 4% нейтральном забуференном формалине для последующего гистологического анализа. Иммунизированных мышей линии BALB/c заражали штаммом варианта Гамма (P.1) в дозе 3,3 Log₁₀ ТЦИД₅₀ на животное (что соответствовало ~50ИД₅₀ для данной модели).

Конструкт Sen-S-JN.1(M)

Трансгенных мышей линии K18-hACE2, иммунизированных данным конструктом, заражали интраназально штаммом SARS-CoV-2, принадлежащим варианту JN.1 в дозе 10³ ТЦИД₅₀ /мышь. Отбор образцов проводили в те же точки, что и в экспериментах с мышами линии BALB/c (на 5-е сутки после заражения).

2.2.13. ПЦР в реальном времени в биологических образцах

Вирусную нагрузку оценивали методом ОТ-ПЦР-РВ в образцах лёгких и носовых раковин, как описано в работе [282]. Кратко, тотальную РНК выделяли с использованием набора Riboprep (ИЛС, Россия), а количество копий вирусных

геномов определяли с помощью диагностического набора «SARS» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия), основанного на реакции ПЦР в реальном времени с детекцией по методу TaqMan и следующими праймерами: 5'-GTTGCAACTGAGGGAGCCTTG-3'(прямой), 5'-GAGAAGAGGCTTGACTGCCG-3'(обратный) и 5'-FAM-TACACCAAAAGATCACATTGGCACCCG-BHQ1-3'(зонд).

В качестве референсного стандарта для нормировки количественной ПЦР использовали плазмиду pJet1.2_SARS, содержащую фрагмент генома штамма SARS-CoV-2 MN997409.1 (позиции 28670–28826). Пересчёт концентрации вирусной нуклеиновой кислоты в число копий вирусного генома выполняли с помощью калькулятора DNA Copy Number and Dilution Calculator (Thermo Fisher, США). Каждый эксперимент включал три повтора.

2.2.14 Гистологическая обработка и патоморфологический анализ тканей

Фрагменты лёгких фиксировали в 4% параформальдегиде или 10% нейтральном формалине. Обезвоживание проводили в автоматическом процессоре Sakura Tissue-Tek II (этанол, изопропанол, ксилол), заливали в парафин (Гистомикс). Срезы толщиной 3–4 мкм готовили на микротоме Leica RM 2255, окрашивали гематоксилином и эозином. Световую микроскопию проводили с оценкой степени плазморрагии, воспалительной инфильтрации, сохранности воздушности альвеол и признаков отёка. Морфометрию выполняли в ПО с расчётом процента площади поражённой ткани.

2.2.15. Статистическая обработка экспериментальных данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2/9.0 и Statistica 13.0. Расчёт копий вирусного генома выполняли в калькуляторе DNA Copy Number and Dilution Calculator. Предельное разведение сыворотки, полностью предотвращающее цитопатическое действие в 50% лунок (ТЦИД₅₀), а также инфекционный титр вируса рассчитывали по формуле Рида–Менча и выражали в log₁₀ ТЦИД₅₀/мл.

Оценка типа распределения

Для всех количественных переменных предварительно оценивали характер распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Поскольку большинство изучаемых параметров (концентрации цитокинов, вирусная нагрузка, титры антител) характеризовались асимметричным распределением и/или малым объёмом выборок, в работе преимущественно применяли методы непараметрической статистики.

Сравнение независимых групп

- При сравнении двух независимых групп использовали U-критерий Манна–Уитни. При одновременном сравнении нейтрализующих титров сывороток против нескольких штаммов SARS-CoV-2 (см. раздел 3.2.3.1, 3.2.3.2) применяли поправку Бонферрони. Скорректированный порог статистической значимости рассчитывали как α/k , где $\alpha = 0,05$, k – число попарных сравнений

- При сравнении трёх и более независимых групп применяли H-критерий Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным попарным сравнением по тесту Данна с поправкой на множественные сравнения.

Анализ динамики в связанных выборках

Для оценки внутригрупповой динамики показателей, измеренных в нескольких временных точках у одних и тех же животных (масса тела, температура, уровень цитокинов), применяли критерий Фридмана с последующим попарным апостериорным сравнением по тесту Данна.

Корреляционный анализ

Для оценки взаимосвязи между количественными показателями (объём лёгких, средняя плотность лёгочной ткани в единицах Хаунсфилда, нормированная плотность поражённых тканей, уровень IL-6 в сыворотке и гомогенатах лёгких) использовали ранговую корреляцию Спирмена (ρ). Коэффициент корреляции интерпретировали в соответствии с общепринятой шкалой Чеддока: 0,1 - 0,3 – слабая; 0,3 - 0,5 – умеренная; 0,5 - 0,7 – заметная; 0,7 - 0,9 – высокая; 0,9 - 0,99 – весьма высокая.

Представление данных

Данные на графиках представлены в как средние арифметические значения с 95% ДИ, для титров в тексте используются средние геометрические титры (СГТ) с 95% ДИ (рассчитанный после предварительного логарифмирования титров). Значения ниже порога определения при расчёте СГТ принимали равными половине порога определения.

Порог статистической значимости

Различия считали статистически значимыми при двустороннем $p < 0,05$, если не указано иное (при применении поправки Бонферрони).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Раздел «Результаты и их обсуждение» представлен в виде трех частей. Первая часть посвящена оценке провоспалительной активности потенциальных иммуногенов для вакцин против SARS-CoV-2: рекомбинантного RBD (rRBD) и полноразмерного рекомбинантного белка Spike (rSpike) вируса SARS-CoV-2 варианта Дельта. Вторая часть посвящена оценке иммуногенности и протективности двух рекомбинантных кандидатных вакцин на основе вируса Сендай штамм Москва, экспрессирующих трансгены RBD или полноразмерного белка Spike против VOC вариантов SARS-CoV-2. Третья часть посвящена оценке иммуногенности, протективности и перекрестной эффективности вакцины против актуального варианта JN.1 вируса SARS-CoV-2 линии Омикрон и его предшественников.

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

В рамках разработки интраназальной векторной вакцины на основе вируса Сендай против инфекции SARS-CoV-2, нами была проведена предварительная оценка собственного провоспалительного потенциала рекомбинантных белков (RBD и S), полученных в системе эукариотических клеток. Белки сконструированы и получены в лаборатории под руководством Щербакова Д.Н. Эти белки аналогичны тем, что использовались впоследствии в качестве иммуногенов для получения вакцинных конструкторов. Такой подход позволяет разделить эффекты, обусловленные самим иммуногенным белком, от реакций на вирусный вектор или процесс его репликации в клетках дыхательных путей.

RBD представляет собой рецептор-связывающий домен S белка SARS-CoV-2 варианта Дельта (участок S белка 308V-541F), слитый с сигнальным пептидом (участок S белка 1M-15C). Это секретируемая форма RBD, содержащая на N-конце сигнальный пептид S-белка MFVFLVLLPLVSSQC, который обеспечивает выход белка во внеклеточное пространство [283]. Ранее было показано, что данная ссекретируемая форма рекомбинантного RBD SARS-CoV-2, полученного в

клетках яичников китайского хомячка CHO-K1, специфически взаимодействует с человеческим рецептором ACE2 и сывороточными IgG реконвалесцентов COVID-19, а также обеспечивает индукцию специфического гуморального иммунного ответа у мышей при двукратной внутрибрюшинной иммунизации с использованием в качестве адьюванта гидроокиси алюминия [279].

Анализ провоспалительной активности белков-иммуногенов особенно важен в свете имеющихся данных о способности S-белка SARS-CoV-2 активировать TLR2/TLR4-зависимые пути воспаления даже в отсутствие вирусной репликации [122, 124].

Исходя из ранее опубликованных данных, согласно которым субъединица S1 белка S, в состав которой входит RBD, введённая интратрахеально мышам линии K18-hACE2 в дозе 400 мкг/кг, вызывает признаки острого повреждения лёгких [122] в нашем исследовании были выбраны следующие дозы.

Для rRBD:

- 400 мкг/кг - доза, равная по массе той, что использовалась для S1 в упомянутой работе;

- 78 мкг/кг - доза, эквивалентная количеству RBD, содержащемуся в 400 мкг S1-субъединицы, рассчитанная на основе молекулярных масс (RBD ~30 кДа, S1 ~150 кДа) и стехиометрии (1 домен RBD на 1 молекулу S1).

Для полноразмерного rSpike:

- 1000 мкг/кг - доза, при которой содержание RBD в тримерной конформации (с учётом доли молекул в «up»-положении) эквивалентно ~120 мкг мономерного RBD, что позволяет оценить провоспалительный потенциал полноразмерного белка при максимально достижимом содержании функционального домена;

- 78 мкг/кг - доза, идентичная минимальной дозе RBD, что обеспечивает прямое сравнение провоспалительной активности мономерного RBD и полноразмерного S-белка при равной массовой концентрации.

Все белки вводили интратрахеально, поскольку именно нижние дыхательные пути представляют собой зону риска при экспрессии структурных

белков SARS-CoV-2 после интраназальной вакцинации. Оценку воспалительного ответа проводили в течение 72 часов, что соответствует временному окну, использованному в ранее опубликованных работах по данной проблематике [122].

3.1.1 Клинический эффект RBD и S-белка при интратрахеальном введении

Перед введением белков у мышей K18-hACE2 регистрировали исходные значения массы и температуры тела. Повторные измерения проводили каждые 24 часа в течение 72 часов после интратрахеального введения.

В первые 24 часа у одного животного (в группе, получавшей полноразмерный S-белок в дозе 1000 мкг/кг) произошла гибель вследствие технических осложнений при манипуляции (повреждение гортани с последующим кровотечением). В соответствии с правилами этического надзора, данные этого животного были исключены из последующего статистического анализа. Результаты клинического наблюдения представлены на рисунке 1.

В ходе клинического наблюдения выявлено значимое повышение температуры тела (на 1,2 °C относительно контрольной группы, $p=0,008$, тест Данна) в группе, получавшей rSpike белок в дозе 1000 мкг/кг на 48-м часе после введения. Ни в одной из групп, получавших rRBD (в дозах 78 и 400 мкг/кг), достоверных отклонений температуры от контроля не выявлено (рисунок 1а).

Динамика изменения массы тела (рисунок 1б) не превышала 10% от исходного значения во всех экспериментальных группах. Минимальная масса тела наблюдалась на 24-м часе, после чего животные стали набирать вес. Примечательно, что медианные значения массы тела на 72-м часе были выше в группах, получавших rRBD, по сравнению с группами, получавшими rSpike белок. Этот факт может свидетельствовать о меньшей системной нагрузке и лучшей переносимости rRBD при локальном введении в дыхательные пути.

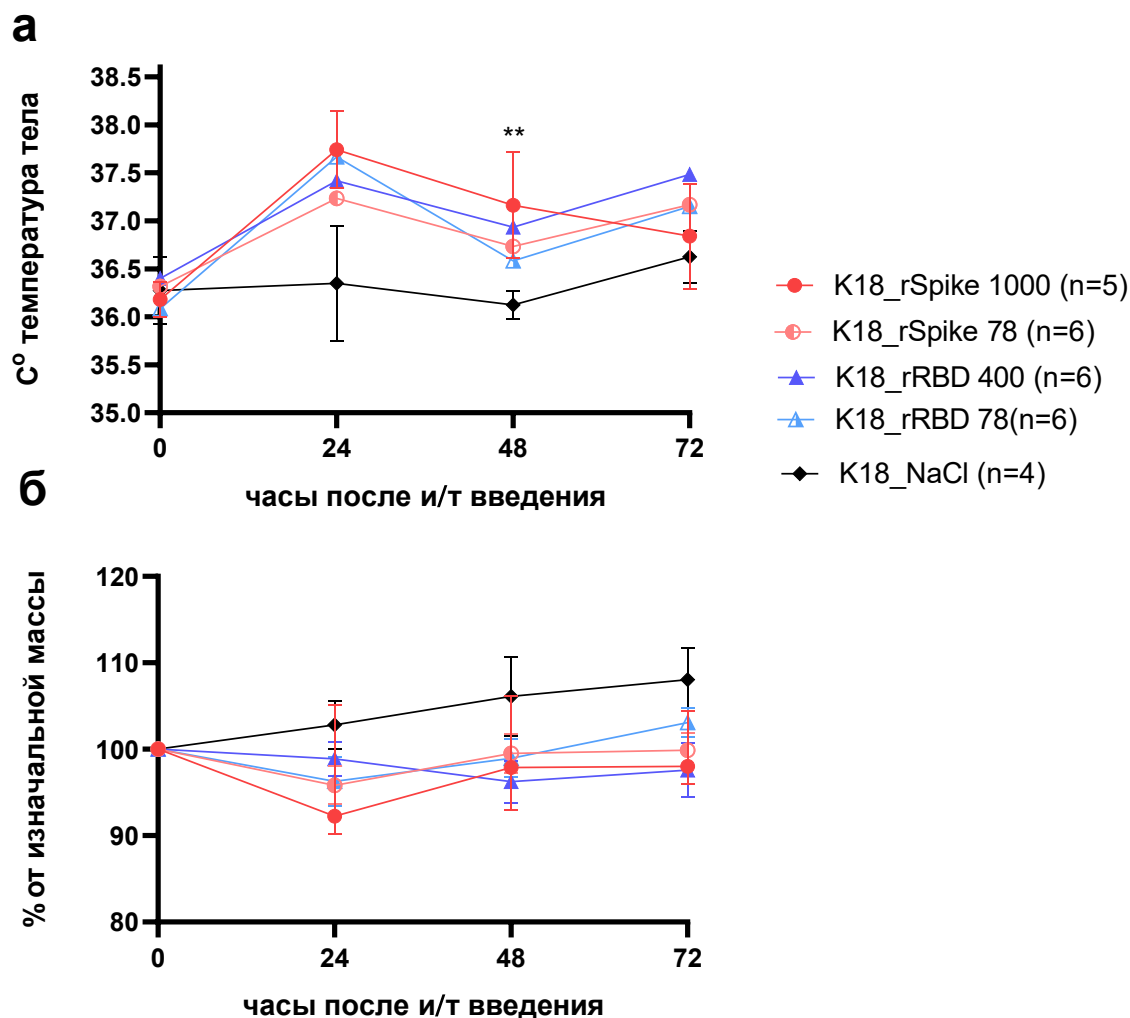


Рисунок 1 – Клинические реакции у мышей K18-hACE2 после интратрахеального введения rSpike белка и rRBD: **а** – температура тела; **б** – динамика изменения массы тела (%). Точки – средние значения; вертикальные линии – 95% ДИ. Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем в тесте Данна после подтверждения межгрупповых различий тестом Краскела-Уоллиса. Уровни значимости: ** $p < 0,01$

3.1.2 Системный и локальный провоспалительный цитокиновый ответ при интратрахеальном введении rRBD и rSpike белка

Для оценки провоспалительного потенциала рекомбинантных белков rRBD и rSpike исследовали уровни ключевых провоспалительных цитокинов в системном кровотоке (0ч, 24ч и 72 часа после введения) и локально – в тканях лёгких (72 часа после введения).

Концентрацию цитокинов в сыворотке крови и лёгочных гомогенатах определяли методом множественной проточной цитометрии. Анализ концентраций ключевого медиатора острого воспаления и «цитокинового шторма» – IL-6 представлен на рисунке 2.

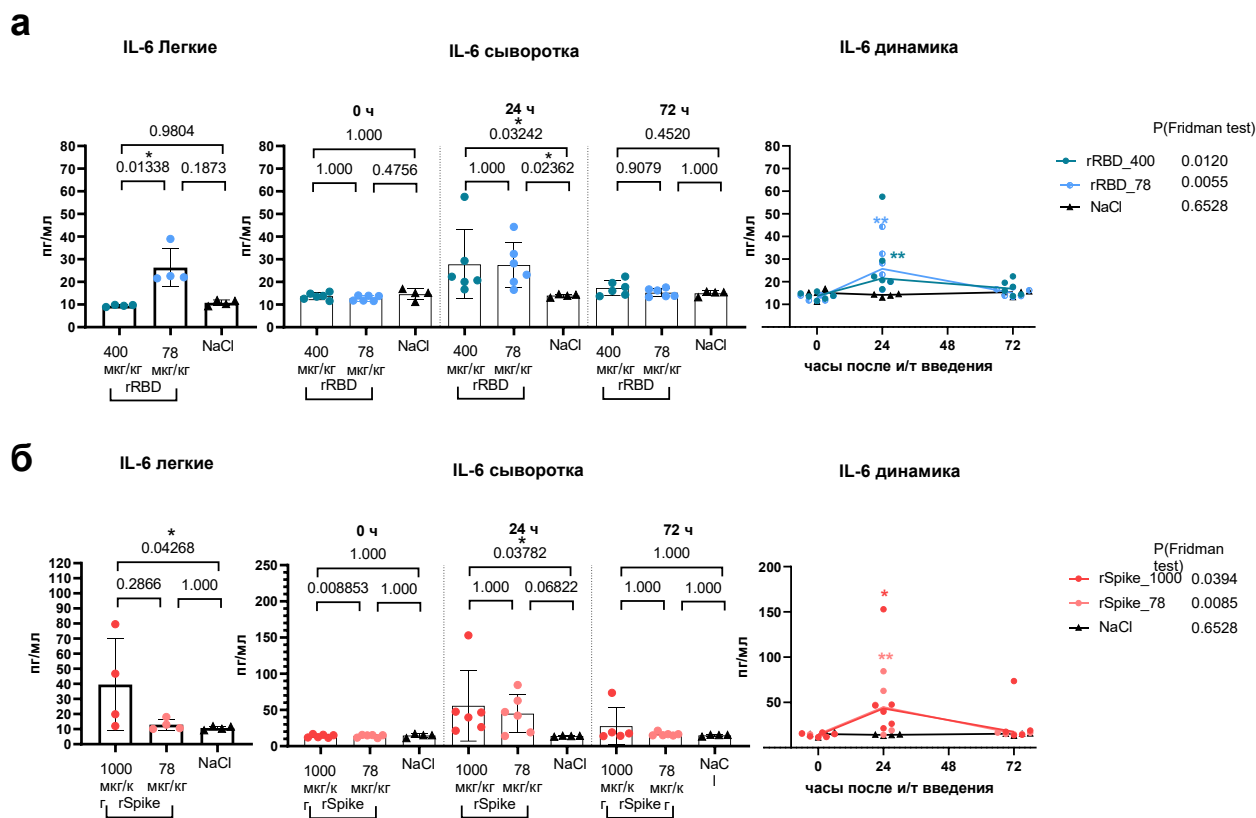


Рисунок 2 – Уровни провоспалительного цитокина IL-6 (пг/мл) в легких (слева) и в сыворотке крови (по центру) мышей K-18hACE2 после введения: **а** – rRBD; **б** – rSpike. Точки – индивидуальные значения; вершины гистограмм – средние значения; вертикальные линии – 95% ДИ. Статистическая значимость различий с контролем оценивалась с помощью теста Данна после подтверждения межгрупповых различий в тесте Краскела–Уоллиса, значимость различий концентрации относительно исходной представлена в графическом виде (справа), использован тест Данна после подтверждения внутригрупповых различий в тесте Фридмана. Уровни значимости: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Как следует из данных, представленных на рисунку 2а, rRBD через 24 часа после интратрахеального (и/т) введения вызвал повышение медианной концентрации IL-6 в сыворотках крови животных обеих групп: в ~1,4 раза

относительно исходных значений ($p < 0,005$, тест Фридмана с тестом Данна); в ~1,5 раза относительно контрольной группы ($p < 0,05$, тест Данна после Краскела-Уоллиса). Через 72 часа концентрация IL-6 в обеих группах вернулась к уровню изначальных значений (0 ч). В тканях легких в группе малой дозы rRBD (78 мкг/кг) концентрация IL-6 (рисунок 2а) 3-кратно превышала по уровню контроль ($p < 0,05$, тест Данна после Краскела-Уоллиса), чего не наблюдалось в группе большей дозы rRBD 400 мкг/кг ($p > 0,05$, тест Данна после Краскела-Уоллиса).

Анализ IL-6 после и/т введения rSpike (рисунок 2б) показал значимое повышение концентрации в обеих группах через 24 часа: в 3,14 раз ($p < 0,05$, тест Фридмана с тестом Данна) в дозе 1000 мкг/кг, в 2,99 раз ($p < 0,01$, тест Фридмана с тестом Данна) в дозе 78 мкг/кг. Повышение IL-6 через 24 часа было статистически значимым относительно контроля только после введения 1000 мкг/кг ($p < 0,05$, тест Данна после Краскела-Уоллиса). Как и после введения rRBD к 72-м часам концентрация IL-6 вернулась к исходному уровню.

В тканях легких (рисунок 2б) повышение концентрации IL-6 относительно контроля (в 3,14 раз) зафиксировано только в группе животных, получивших S белок в дозе 1000 мкг/кг ($p < 0,05$, тест Данна после Краскела-Уоллиса).

Анализ концентраций других воспалительных цитокинов: TNF- α , IFN- γ и IL-17A; а также регуляторных (IL-10, TGF- β), Th-ассоциированных (IL-2, IL-4, IL-13), не выявил значимых различий с контролем. (см. Приложения А – Г). Среди факторов, регулирующих В-клеточную активность (BAFF, BCMA, sCD40L), в группе rRBD 78 мкг/кг выявлены минимальные различия с контролем: повышение концентрации BCMA в лёгких (см. Приложение А) и снижение в сыворотке через 72 часа (см. Приложение Г), а также снижение IL-12p70 (цитокина регулирующего Th-1) в сыворотке через 24 часа (см. Приложение В).

Таким образом, повышение IL-6, вызванное rRBD и rSpike белком, имеет местный характер и не приводит к запуску системного цитокинового каскада, характерного для цитокинового шторма.

Уровни IL-6 на пике не достигали ранее описанных значений, характерных для ОРДС и цитокинового шторма у мышей K18-hACE2 [122]. Расхождение с

ранее опубликованными данными, вероятно обусловлено использованием эукариотических продуцентов (клетки CHO-K1), исключающих артефактную активацию TLR2/4 бактериальными эндотоксинами, которая так же была уже описана в контексте изучения провоспалительных свойств белка Spike [126]. Тем не менее, в данном эксперименте не исследовалась реактогенность изолированной S1-субъединицы. Не исключено, что реактогенность полноразмерного S-белка отличается от таковой для S1. Отсутствие данных по реактогенности изолированной S1 не снижает значимости результатов, поскольку вакцинные платформы на основе вируса Сендай экспрессируют именно полноразмерный S-белок, а не его фрагменты.

3.1.3 Компьютерная томография органов грудной клетки после интратрахеального введения S белка

Прижизненное рентгеновское компьютерно-томографическое (КТ) сканирование грудной клетки проводили мышам групп K18_ rSpike 1000 (n=3), K18_ rSpike 78 (n=3) и контрольной группы K18_NaCl (n=3), поскольку только после введения S белка были зафиксированы временные, но значимые клинические изменения.

Для анализа томографических данных использовался инструмент AI-сегментации, с помощью которого определяли объем легких и среднее значение плотности легочной ткани в единицах Хаунсфилда (HU - Hounsfield Units). Проведен корреляционный анализ всех указанных показателей между собой и с уровнем IL-6, измеренным через 24 часа, где было обнаружено достоверное повышение концентрации данного цитокина. Результаты анализа представлены на рисунке 3.

В ходе томографического исследования органов грудной клетки (рисунок 3а) в исследуемых группах не выявлено рентгенологических признаков пневмонии, таких как инфильтрация легочной ткани. Анализ объемов легких (рисунок 3в) продемонстрировал достоверное увеличение данного показателя в группе животных, получавших S-белок в дозе 1000 мкг/кг. При этом средняя

плотность легочной ткани по НУ в этой группе характеризовалась значительным разбросом значений.

Корреляционный анализ (рисунок 3д) не выявил достоверной связи между концентрацией IL-6 и средней плотностью по НУ или объемом легких. Для исключения влияния индивидуальных анатомических особенностей была рассчитана нормированная плотность легочной ткани на общий объем (НУ/мл), представляющая собой отношение среднего значения НУ к объему легких (рисунок 3г). Установлено, что в группе, получавшей S белок в дозе 1000 мкг/кг, наблюдается достоверное увеличение нормированной плотности легочной ткани ($HU=0$ - плотность воды; $HU=-1000$ - плотность воздуха) относительно контрольной группы.

Таким образом, в группе животных, получавших S-белок в дозе 1000 мкг/кг, выявлены косвенные рентгенологические признаки диффузного увеличения плотности легочной ткани, проявляющиеся в повышении нормированной по объему плотности легочной ткани. Несмотря на отсутствие значимой попарной корреляции, групповые тенденции показывают, что дозозависимое повышение нормированной плотности лёгких совпадает во времени с пиком IL-6, что указывает на общую воспалительную природу изменений. Тем не менее, однозначность интерпретации ограничена ввиду отсутствия динамического томографического наблюдения.

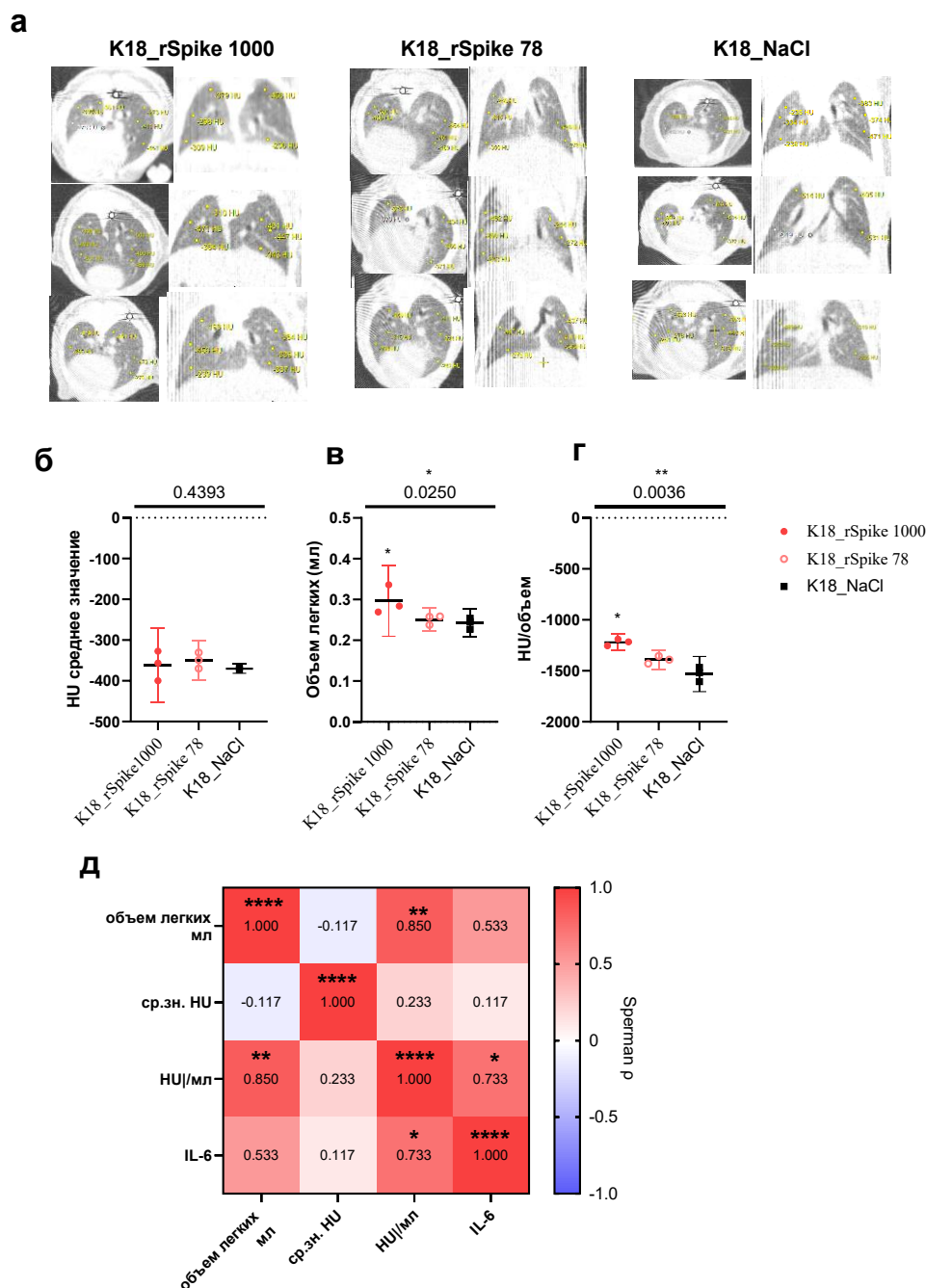


Рисунок 3 – Компьютерная томография органов грудной клетки мышей линии K-18hACE2 через 72 ч после интратрахеального введения рекомбинантного белка S (вариант Дельта). **а** – аксиальные и фронтальные срезы; **б** – средняя рентгеновская плотность легких (НУ); **в** – объем легких (мл); **г** – нормированная плотность легочной ткани; **д** – корреляционная матрица. Точки на графиках – индивидуальные значения, горизонтальные линии – медианы, вертикальные линии – ДИ 95%. Уровни значимости: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

3.1.4 Заключение

Результаты подтверждают, что полноразмерный S-белок SARS-CoV-2, полученный в эукариотической системе экспрессии, не обладает выраженным провоспалительным потенциалом при интратрахеальном введении в физиологически релевантных дозах. Полученные данные согласуются с литературными сведениями о том, что артефактная активация врождённого иммунитета и развитие острой лёгочной патологии при локальном введении S-белка часто обусловлены контаминацией бактериальными эндотоксинами в препаратах, полученных в прокариотических системах [126, 129, 130]. Использование эукариотических продуцентов, напротив, обеспечивает отсутствие LPS и предотвращает неспецифическую активацию TLR2/TLR4-зависимых путей воспаления, минимизируя риск ложноположительных реакций [126, 127].

В отличие от моделей искусственной персистенции высоких доз изолированной S1-субъединицы [122] локальная и транзиторная экспрессия полноразмерного S-белка не сопровождается развитием системного цитокинового шторма или острым повреждением лёгочной ткани, что подтверждает высокий профиль безопасности платформ для мукозальной вакцинации, с S-белком в качестве антигена [5, 18, 23, 24].

Это обосновывает использование полноразмерного S-белка в качестве основного иммуногена для интраназальных векторных вакцин, поскольку он сохраняет полный репертуар В- и Т-клеточных эпитопов, включая криптоические участки и консервативные домены S2, критически важные для индукции широкого и устойчивого мукозального иммунитета [29, 30, 31, 109].

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

Для разработки интраназальной вакцины на основе вируса Сендай штамма Москва против высокопатогенного варианта SARS-CoV-2 (VOC) были выбраны два иммуногена варианта Дельта (линия B.1.617.2): рецептор-связывающий домен

(RBD) и полноразмерный S-белок. Выбор обусловлен необходимостью сравнительной оценки двух стратегий антигенного дизайна в рамках единой векторной платформы, характеристики которой подробно рассмотрены в разделе 1.7.

RBD представляет собой компактный домен, минимизирующий риск неспецифической иммунной активации, однако спектр индуцируемых им эпитопов ограничен преимущественно классами 1–3 [26, 27].

Полноразмерный S-белок в нативной тримерной конформации сохраняет полный репертуар В- и Т-клеточных эпитопов, включая криптоэпитопы классов 4–5 и консервативные участки субъединицы S2, что критически важно для индукции широкого перекрёстного иммунного ответа. Вместе с тем теоретически полноразмерный антиген может обладать более высоким провоспалительным потенциалом, что требовало экспериментальной проверки в условиях локальной экспрессии в дыхательных путях.

На начальном этапе разработки конструкторов приоритет определялся соображениями безопасности. В условиях ограниченных данных о патогенезе SARS-CoV-2 существовали обоснованные опасения относительно риска антителозависимого усиления инфекции (ADE), потенциально опосредованного низкоаффинными антителами к конформационно-лабильным эпитопам полноразмерного S-белка. В этом контексте изолированный RBD рассматривался как консервативная стратегия: минимальный функциональный домен, лишённый потенциально проблемных регионов (фуриновый сайт расщепления, трансмембранный домен), теоретически снижал риск индукции нежелательных иммунных реакций.

По мере накопления экспериментальных данных, не подтвердивших реализацию ADE при вакцинации против SARS-CoV-2 [115, 118] акцент сместился в сторону оценки иммуногенного потенциала ввиду повеления уклоняющихся вариантов. Хотя криптоэпитопы классов 4–5 и их роль в перекрёстной нейтрализации были детально охарактеризованы в период доминирования вариантов линии Омикрон [28, 31], структурные предпосылки для

их существования в нативном тримере S-белка были известны ранее [26, 27]. Это позволило гипотетически обосновать включение полноразмерного антигена в дизайн исследования ещё на этапе работы с вариантом Дельта.

Дизайн исследования предусматривал поэтапную оценку конструкторов: результаты, полученные для Sen-RBDdelta(M), послужили основанием для оптимизации протокола исследования Sen-Sdelta(M). В частности, с учётом данных по RBD, в эксперименте с S-белком акцент был смещён на оценку клеточного иммунного ответа, а мониторинг вирусной динамики в назофарингеальных смывах был исключён как избыточный на данном этапе. Такая итеративная стратегия позволила рационально распределить ресурсы и сфокусироваться на ключевых коррелятах защиты для каждого из антигенов.

Рекомбинантные варианты Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) были получены в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с использованием векторной системы на основе вируса Сендай штамма Москва, разработанной в лаборатории под руководством Кочневой Г.В. [284]. Ниже представлены результаты иммунохимической характеристики и сравнительной оценки вакцинных свойств конструкторов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M).

3.2.1 Характеристика рекомбинантных вариантов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M)

Рекомбинантные варианты Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) вируса Сендай штамма Москва были сконструированы в лаборатории Г.В. Кочневой ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с использованием ранее разработанного набора из четырёх плазмидных ДНК, три из которых экспрессируют гены N, P и L вируса Сендай штамма Москва (вспомогательные плазмиды), четвёртая содержит полноразмерную копию ДНК геномной РНК вируса Сендай штамма Москва (GenBank Acc. KP717417.1), в состав которой введён структурный элемент для встройки и экспрессии трансгенов между генами P и M. Схематичное изображение структуры рекомбинантов представлено на рисунке 4.

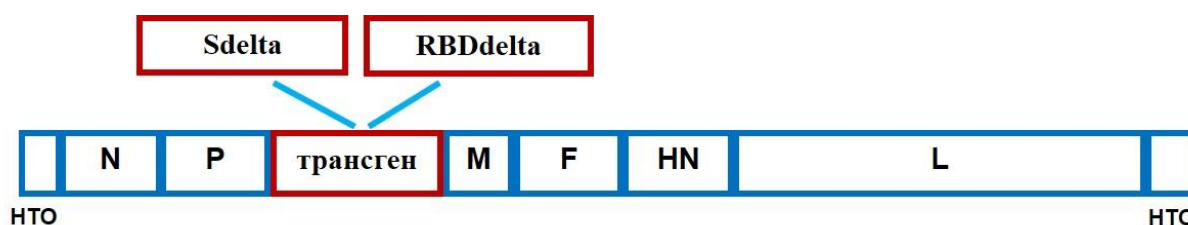


Рисунок 4 – Схема генома рекомбинантных вариантов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) вируса Сендай штамма Москва с инсерцией трансгенов RBDdelta или Sdelta между генами P и M

Для рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) в качестве трансгена использовали синтетическую последовательность рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2 штамма Дельта, слитую вместе с сигнальным пептидом, как описано ранее (см. раздел 3.1).

Для рекомбинантного варианта Sen-Sdelta(M) трансген, кодирующий полноразмерный S-белок варианта дельта SARS-CoV-2, был выделен методом ОТ-ПЦР из геномной РНК штамма SARS-CoV-2 HCoV-19/Russia/MOS-2406/2021 (GISAID: EPI_ISL_7338789), относящегося к линии B.1.617.2 (вариант Дельта).

Оценку экспрессии трансгенов в составе рекомбинантных вариантов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) проводили методом иммуноблоттинга. Поскольку в рекомбинантном варианте Sen-RBDdelta(M) иммуноген RBDdelta сконструирован в виде секретируемого белка, для иммуноблоттинга была использована аллантоисная жидкость 11-дневных куриных эмбрионов (рисунок 5 а, в) или культуральная среда клеток LLC-MK₂ (рисунок 5 б) после их инфицирования штаммом Sen-RBDdelta(M).

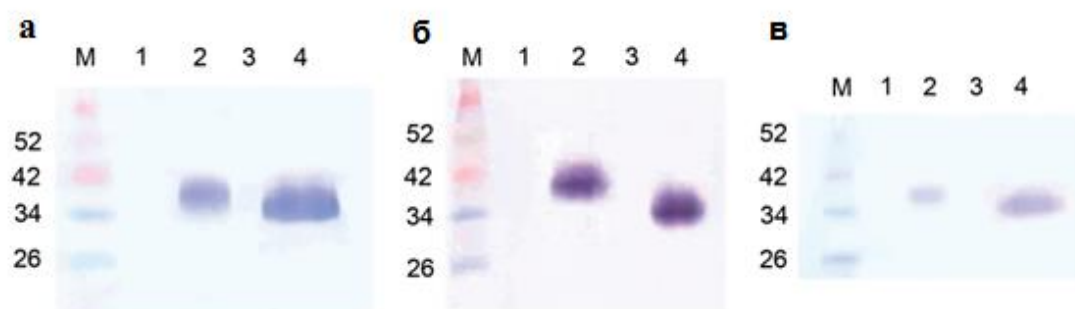


Рисунок 5 – Экспрессия трансгена RBDdelta в составе рекомбинантного вируса Sen-RBDdelta(M): (**а, в**) – в аллантоисной жидкости 11-дневных куриных эмбрионов; (**б**) – в культуральной среде клеток LLC-MK₂. В качестве первичных антител использована поликлональная сыворотка крови мыши, иммунизированной RBDdelta, разведение 1:500 (**а, б**), или сыворотка крови вакцинированного реконвалесцента COVID-19, разведение 1:200 (**в**). М – контроль молекулярной массы; 1 – отрицательный контроль аллантоисной жидкости неинфицированных куриных эмбрионов (**а, в**) или культуральной среды неинфицированных клеток (**б**); 2 – положительный контроль RBD (200 нг, 39 кДа), экспрессированного в клетках CHO-K1; 3 – пустая дорожка; 4 – аллантоисная жидкость куриных эмбрионов, инфицированных Sen-RBDdelta(M), 15 мкл (**а, в**), или культуральная среда клеток, инфицированных Sen-RBDdelta(M) (**б**)

Как следует из результатов иммуноблоттинга (рисунок 5), RBDdelta выявляется в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов в виде белка с молекулярной массой ~35 кДа и взаимодействует как с антителами иммунной мыши (рисунок 5 а), так и с сывороткой крови человека (рисунок 5в), прошедшего двукратную вакцинацию «Спутником-V», а через полгода переболевшего в лёгкой форме COVID-19. В культуральной среде LLC-MK₂ клеток, инфицированных рекомбинантом Sen-RBDdelta(M) (рисунок 5б), также выявляется RBDdelta с использованием в качестве первичных антител иммунной сыворотки мыши. Некоторое варьирование молекулярной массы RBDdelta связано с разным типом гликозилирования белка в разных системах экспрессии (куриные эмбрионы, клетки LLC-MK₂).

Экспрессию трансгена Sdelta оценивали в лизатах клеток LLC-MK₂, инфицированных рекомбинантом Sen-Sdelta(M), а также в препаратах

очищенного и концентрированного вируса, выделенного из аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. В качестве отрицательного контроля использовали рекомбинантный вариант Sen2-EGFP(M), экспрессирующий трансген зеленого флюоресцентного белка. Результаты иммуноблоттинга представлены на рисунке 6.

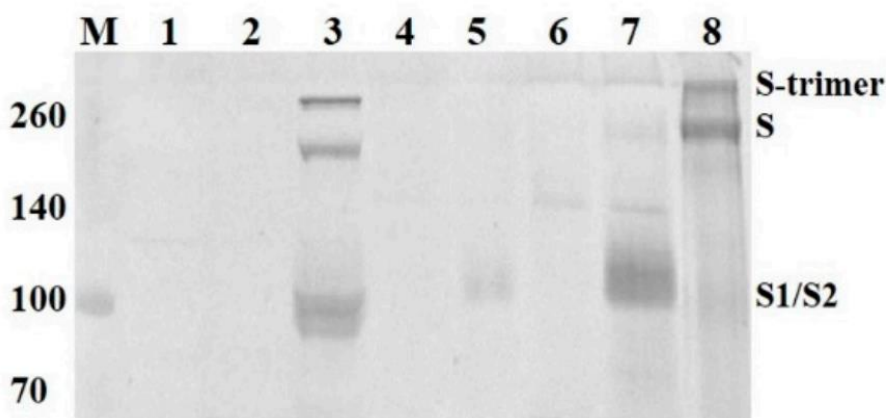


Рисунок 6 – Экспрессия трансгена Sdelta в составе рекомбинантного вируса Sen-Sdelta(M): **М** - маркер молекулярной массы (кДа); **1** - лизат неинфицированных клеток LLC-MK₂ (отрицательный контроль); **2** - лизат клеток LLC-MK₂, инфицированных Sen2-EGFP(M) (отрицательный контроль); **3** - лизат клеток LLC-MK₂, инфицированных Sen-Sdelta(M); **4** - культуральная среда клеток LLC-MK₂, инфицированных Sen2-EGFP(M); **5** - культуральная среда клеток LLC-MK₂, инфицированных Sen-Sdelta(M); **6** – очищенный препарат рекомбинанта Sen2-EGFP(M) (отрицательный контроль); **7** – очищенный препарат рекомбинанта Sen-Sdelta(M); **8** - S-тример, наработанный в трансформированных клетках CHO-K1, 200 нг (положительный контроль)

В лизатах клеток, инфицированных Sen-Sdelta(M) (рисунок 6, дорожка 3) детектируется несколько форм S-белка. Формы с молекулярной массой около 190 кДа и дублет в диапазоне 90-115 кДа, вероятно, соответствуют полноразмерному S-белку SARS-CoV-2 и продуктам его расщепления на субъединицы S1/S2 соответственно [285, 286]. Форма с молекулярной массой свыше 260 кДа соответствует тримерной конформации S-белка, которая также обнаруживается в образце положительного контроля (рисунок 6, дорожка 8) и представляет собой тримерный S-белок варианта Дельта SARS-CoV-2, экспрессированный в трансформированных клетках CHO-K1[279]

Белок S также обнаруживается в препаратах очищенного вируса Sen-Sdelta(M), полученных из аллантоисной жидкости куриных эмбрионов (рисунок 6, полоса 7). Подобный эффект был ранее показан для другого рекомбинантного парамиксовируса - вируса болезни Ньюкасла, экспрессирующего трансген S белка SARS-CoV-2, и объясняется встраиванием S белка в вирионы рекомбинантного вируса [287]. В очищенных и концентрированных препаратах вируса Sen-Sdelta(M) белок S практически полностью представлен процессированной до S1/S2 расщепленной формой, как это было показано ранее для очищенных препаратов SARS-CoV-2 [288]. Эффективный процессинг S белка SARS-CoV-2, по-видимому, связан с тем, что аллантоисная жидкость куриных эмбрионов содержит большое количество активных протеолитических ферментов, участвующих в процессах пищеварения, морфогенеза и гемостаза эмбрионов [289]. Хотя SARS-CoV-2 преимущественно использует клеточную протеазу фурина для процессинга S1/S2 [290], было показано, что и другие протеазы способны к такому процессингу [291]. По-видимому, одна или несколько протеаз, содержащихся в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, также способны эффективно расщеплять S-белок SARS-CoV-2. В среде клеток LLC-MK₂, инфицированных Sen-Sdelta(M), обнаруживается процессированная S1/S2 форма S-белка SARS-CoV-2 (рисунок 6, полоса 5), которая, по-видимому, попадает туда в составе отпочковавшихся с поверхности клеток вирионов рекомбинантного вируса.

Таким образом, методом иммуноблоттинга показано, что рекомбинантные варианты Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) эффективно экспрессируют соответствующие трансгены, продукты которых связываются с сывороткой реконвалесцента COVID-19, что свидетельствует об их иммуноидентичности природным аналогам SARS-CoV-2. При этом RBD регистрируется как в клетках, инфицированных Sen-RBDdelta(M), так и в культуральной среде и в аллантоисной жидкости инфицированных куриных эмбрионов, что свидетельствует о секреции белка. S белок регистрируется как в клетках, инфицированных Sen-RBDdelta(M), так и в составе очищенных вирионов Sen-RBDdelta(M), причем в зрелой

процессированной S1/S2 форме, как это показано и для очищенных препаратов SARS-CoV-2.

3.2.2 Исследование вакцинных свойств рекомбинантов Sen-RBDdelta(M) и Sen-Sdelta(M) на животных моделях

Поскольку оба антигена, RBD и полноразмерный S-белок, продемонстрировали приемлемый профиль безопасности (см. раздел 3.1) и были успешно интегрированы в вектор вируса Сендай штамма Москва (см. раздел 3.2.1), следующим логическим этапом является оценка их вакцинных свойств.

Ключевым вопросом остаётся – какой из антигенов обеспечивает более сильный и, что особенно важно для мукозальной вакцинации, стерилизующий иммунитет, способный прерывать цепь передачи вируса SARS-CoV-2 в процессе инфекции.

Для этого были проведены исследования иммуногенности и протективности двух лабораторных моделей: сирийских хомяков (высокочувствительной модели, воспроизводящей пневмонию при инфекции вариантом Дельта SARS-CoV-2) и BALB/с-мышей (восприимчивых к заражению вариантом Гамма SARS-CoV-2).

3.2.2.1 Иммуногенность и протективность рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) на модели сирийского хомяка

Экспериментальной группе золотистых хомяков ($n = 8$) однократно проводили интраназальную иммунизацию вирусом Sen-RBDdelta(M) в дозе 10^7 БОЕ/животное. Контрольной группе ($n = 8$) интраназально вводили фосфатный буферный раствор, на котором проводили разведение вируса.

Вирус Сендай является природным патогеном мышей, но он также патогенен и для других грызунов, включая хомяков [292]. В связи с этим всех животных ежедневно наблюдали на предмет побочных клинических реакций после введения рекомбинантного вируса. Иммунизированные животные в 1-ю неделю демонстрировали клинические ухудшения в виде потускнения и локальной потери шерстяного покрова. К 7-м суткам зафиксирована смерть одного вакцинированного животного. В последующие дни клиника системного

ответа регрессировала. Через 28 дней после иммунизации у всех животных измеряли уровень общих и вируснейтрализующих антител класса IgG против вируса SARS-CoV-2 штамма hCoV19/Russia/MOS2406/2021 (вариант Дельта). У 100% вакцинированных индукции иммунного ответа не выявлено. Показатель титра общих антикоронавирусных антител составил менее 1:50 (ниже порога определения), показатель титра вируснейтрализующих антител – менее 1:7 (ниже порога определения).

Полученные данные согласуются с данными литературы о слабой восприимчивости хомяков к иммунизации RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 как в виде субъединичных вакцин [279], так и в составе векторной конструкции [285].

На 30-й день после иммунизации группам вакцинированных хомяков и контроля проводили интраназальную инокуляцию вирусом SARS-CoV-2 штаммом hCoV19/Russia/MOS2406/2021 (вариант Дельта). Контроль клинического состояния после заражения проводили ежедневно, у всех животных фиксировали массу тела (рисунок 7а). Репликацию коронавируса оценивали методом ОТ-ПЦР-РВ в смывах из полости носа ежедневно со 2-х по 5-е сутки после заражения (рисунок 7б) и на 6-е сутки после окончания эксперимента в тканях лёгких и носовой полости (рисунок 7в).

После заражения SARS-CoV-2 у всех животных наблюдалась прогрессирующая потеря массы тела. К 6-м суткам снижение массы составило 6 % в контрольной группе и 4,2 % у вакцинированных хомяков, при этом межгрупповые различия не достигли статистической значимости (рисунок 7а).

РНК SARS-CoV-2 детектировалась в назофарингеальных смывах у всех животных со 2-х по 5-е сутки без достоверных различий между группами (рисунок 7б). При анализе тканей лёгких на 6-е сутки в вакцинированной группе выявлено достоверное снижение вирусной нагрузки: разница средних значений концентрации вирусной РНК составила $1,2 \log_{10}$ относительно контроля ($p = 0,0093$, U-критерий Манна–Уитни; рисунок 7в)

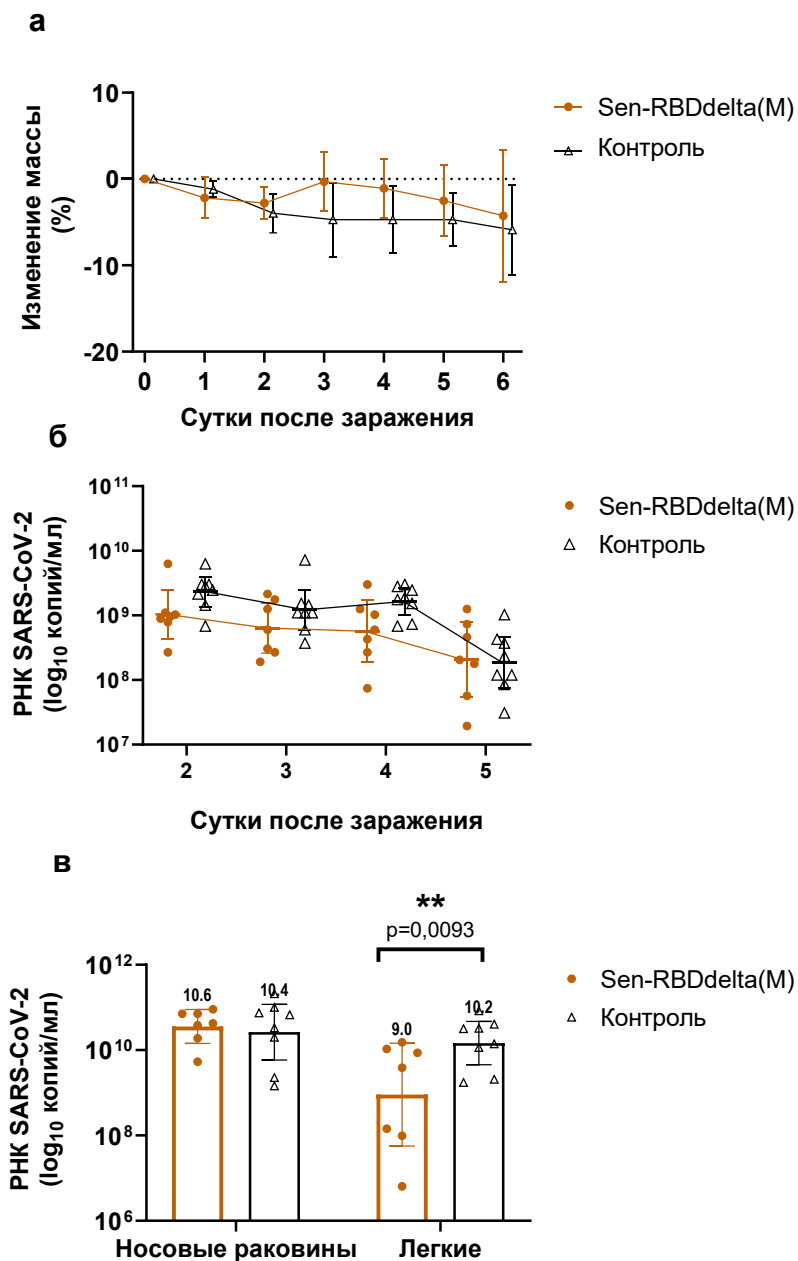


Рисунок 7 – Клиническое заболевание у иммунизированных Sen-RBDdelta(M) хомяков после интраназального заражения вариантом Дельта SARS-CoV-2: **а** – динамика изменения массы тела (%); **б** – вирусная нагрузка ($\log_{10}$ копий/мл) в смывах носовой полости; **в** – вирусная нагрузка ($\log_{10}$ копий/мл) в гомогенатах тканей носовых раковин и лёгких. Точки – индивидуальные значения, горизонтальные линии (или вершины гистограмм) – средние значений, вертикальные линии – 95% ДИ. Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) по U-критерию Манна-Уитни. Уровни значимости: ** $p < 0,01$

Патоморфологический анализ показал, что основное различие в состоянии лёгких животных вакцинированной и контрольной группы состояло в

преобладании в контрольной группе выраженного нарушения сосудистой проницаемости в форме плазморрагии, достигающей 43-67% от общей площади срезов (рисунок 8а). В лёгких вакцинированных хомяков обширных локусов плазморрагии и геморрагии не обнаруживалось (рисунок 8б).

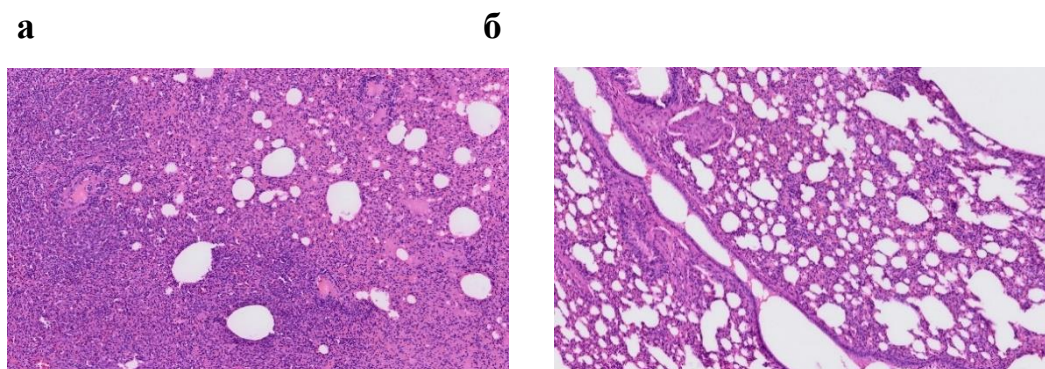


Рисунок 8 – Гистологический срез лёгкого сирийского хомяка из контрольной (а) и вакцинированной группы (б)

В группе вакцинированных животных отмечалась наименьшая степень выраженности воспалительно-клеточной инфильтрации. С более слабой воспалительно-клеточной реакцией у вакцинированных хомяков связано и заметное сохранение воздушности лёгочной ткани (рисунок 8 б). В контрольной группе наблюдалась потеря воздушности лёгких, которая сопровождалась максимальными проявлениями плазморрагии (рисунок 8 а).

3.2.2.2 Иммуногенность и протективность рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) на модели мышей линии BALB/c

Основываясь на ранее полученных данных о патогенности высокой дозы вируса Сендай для хомяков (см. раздел 3.2.2.1), доза иммунизации мышей была снижена до 10^5 БОЕ/мышь. Также не было исключено, что протективный эффект, в отсутствии подтверждения гуморального ответа у хомяков, мог быть вызван иммуностимулирующими свойствами вектора Сендай, наблюдаемыми в ранее опубликованных работах [293]. С учётом этого в исследование была добавлена контрольная группа, вакцинированная рекомбинантным вариантом вируса Сендай штамма Москва, несущего в геноме инсерцию зеленого флюоресцентного белка Sen2-EGFP(M) [284].

В эксперименте использовали 26 мышей линии BALB/c, разделенных на 3 группы: первую группу (n=9) интраназально иммунизировали рекомбинантом Sen-RBDdelta(M) в дозе 10^5 БОЕ/мышь; мышам второй группы (n=8) аналогично вводили рекомбинант Sen2-EGFP(M) (контроль вакцинного вектора); третьей группе (n=9, отрицательный контроль) интраназально вводили фосфатно-солевой буфер, использованный для получения вирусных суспензий.

Через 28 дней после иммунизации у всех животных измеряли уровень общих (рисунок 9а) и вируснейтрализующих (рисунок 9б) антител класса IgG против вируса SARS-CoV-2 штамм hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021 (вариант Дельта).

Результаты ИФА (рисунок 9а) свидетельствуют о формировании специфических IgG у всех вакцинированных животных, в то время как в контрольных группах (вектор и PBS) уровень антител не превышал пороговых значений. Анализ нейтрализующей активности (рисунок 9б) подтвердил наличие вируснейтрализующих антител у всех иммунизированных особей: средний геометрический титр (СГТ) составил 127 (95% ДИ: 97–166).

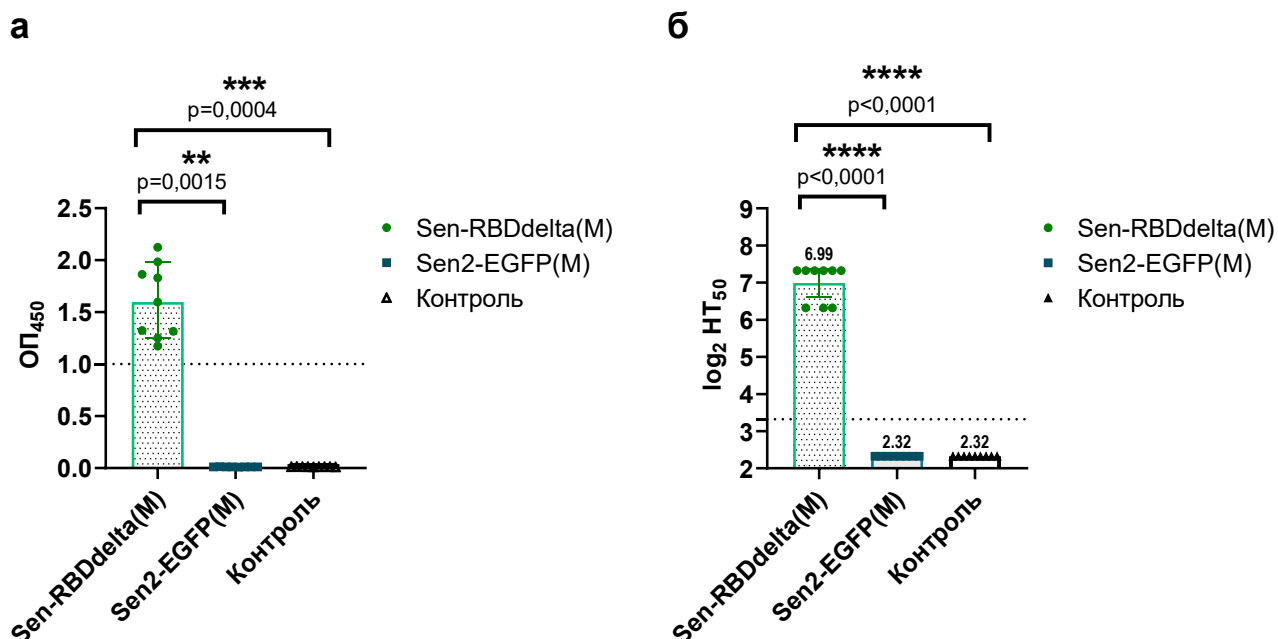


Рисунок 9 – Общие и нейтрализующие антитела класса IgG против варианта Дельта SARS-CoV-2 в сыворотках иммунизированных Sen-RBDdelta(M) мышей линии BALB/c: **а** – значение оптической плотности (ОП₄₅₀), определённое методом ИФА; **б** – титры нейтрализации (НТ₅₀) варианта Дельта SARS-CoV-2/ Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние значения ОП₄₅₀ и log₂ НТ₅₀, вертикальные линии – 95% ДИ, горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение в ИФА (1,0 ОП₄₅₀), реакции нейтрализации (3,32 log₂ НТ₅₀). Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем в тесте множественного сравнения Данна после подтверждения межгрупповых различий тестом Краскела-Уоллиса. Уровни значимости: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Протективность рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) оценивали в отношении штамма SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021(вариант Гамма). Выбор варианта Гамма обусловлен восприимчивостью к нему мышей линии BALB/c. Предшествующие эксперименты по заражению вариантом Дельта SARS-CoV-2 показали отсутствие развития инфекционного процесса у мышей линии BALB/c [294].

Как показано на рисунке 10, однократная интраназальная иммунизация конструктором Sen-RBDdelta(M) приводила к достоверному снижению концентрации вирусной РНК в обоих органах-мишенях по сравнению с

интактным контролем. Различие средних значений составило 3 $\log_{10}$ в тканях носовых раковин ($p = 0,0012$, тест Данна) и 1,4 $\log_{10}$ в лёгких ($p = 0,0377$, тест Данна). В группе векторного контроля (Sen2-EGFP(M)) показатели вирусной нагрузки занимали промежуточное положение: они были выше, чем в группе Sen-RBDdelta(M), и ниже, чем в интактном контроле, однако статистически значимых различий между этими группами не выявлено ($p > 0,05$, тест Данна).

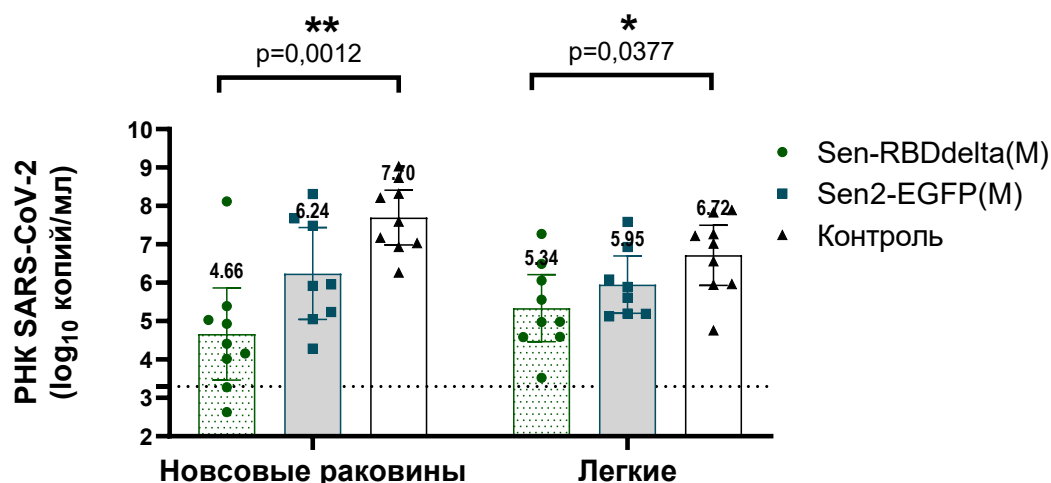


Рисунок 10 – Вирусная нагрузка (копий/мл) в гомогенатах тканей носовой полости и легких иммунизированных Sen-RBDdelta(M) мышей BALB/c на 5 сутки после заражения вариантом Гамма SARS-CoV-2. Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – медианы, вертикальные линии – 95% ДИ, горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение ОТ-ПЦР-РВ (3,3 $\log_{10}$ копий/мл) Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем в тесте множественного сравнения Данна после подтверждения межгрупповых различий тестом Краскела-Уоллиса. Уровни значимости: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Таким образом, в ходе исследования вакцинных свойств Sen-RBDdelta(M) было показано:

– При однократном интраназальном введении сирийским хомякам не выявлено достоверных признаков индукции гуморального ответа. Однако в легких животных при инфицировании вирусом SARS-CoV-2 варианта Дельта выявлено протективное действие вакцины в виде снижения вирусной нагрузки (РНК вируса) на 1,2 $\log_{10}$. Наблюдаемая частичная защита в отсутствие

детектируемых сывороточных IgG указывает на возможную роль не-антитело-опосредованных механизмов, включая адъювантный эффект вектора Сендай или Т-клеточный иммунитет. Однако прямые данные по клеточному ответу в данной модели не исследовали;

– На модели мышей BALB/c однократная интраназальная иммунизация индуцировала формирование антител класса G с нейтрализующей активностью на уровне $NT_{50} = 127$ против SARS-CoV-2 варианта Дельта. При заражении SARS-CoV-2 вариантом Гамма достоверный протективный эффект выявлен как в полости носа, так и в легких: вирусная нагрузка была снижена относительно контроля на $3 \log_{10}$ и $1,4 \log_{10}$ соответственно;

– В группе иммунизированных вектором Sen2-EGFP(M) выявлена тенденция к снижению вирусной нагрузки относительно контроля, что вероятно связано с иммуностимулирующими свойствами вируса Сендай.

Поскольку вакцинный вариант на основе RBD продемонстрировал ограниченную эффективность у хомяков, следующим этапом стало исследование варианта вакцины, экспрессирующей полноразмерный S-белок, обладающий более широким спектром антигенных эпитопов.

3.2.3 Изучение вакцинных свойств рекомбинантного варианта Sen-Sdelta(M)

3.2.3.1 Иммуногенность и протективность рекомбинантного варианта Sen-Sdelta(M) на модели сирийского хомяка

Экспериментальной группе золотистых хомяков ($n = 8$) однократно проводили интраназальную иммунизацию вирусом Sen-Sdelta(M) в дозе 10^6 БОЕ/животное. Доза была снижена в 10 раз по сравнению с предыдущими экспериментами (см. раздел 3.2.2.1), чтобы предотвратить гибель животных. Контрольной группе ($n = 8$) интраназально вводили фосфатный буферный раствор. Через 28 дней после иммунизации у всех животных определяли уровни специфических IgG и вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2 (Рисунок 11).

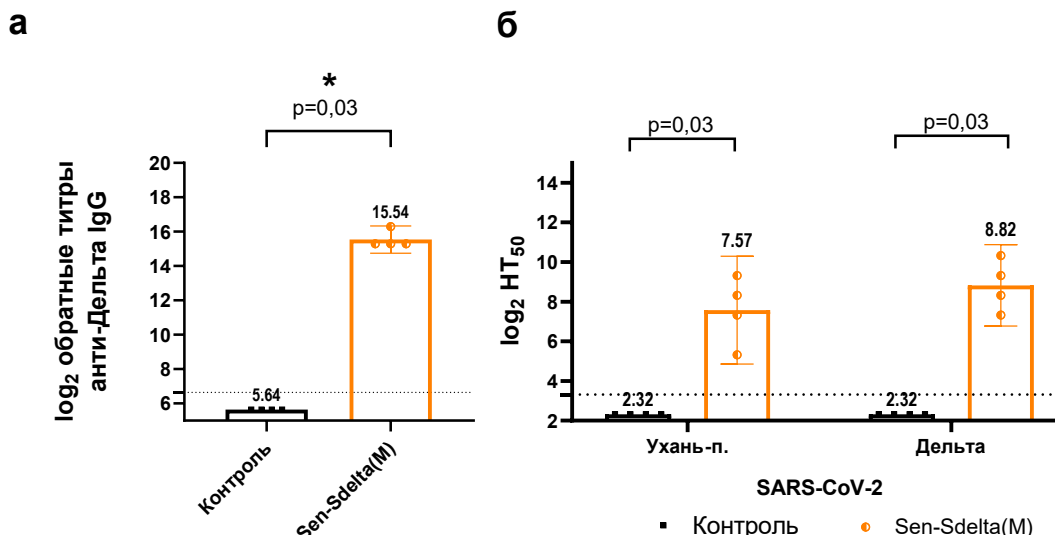


Рисунок 11 – Специфические антитела IgG и нейтрализующие антитела в сыворотках, иммунизированных Sen-Sdelta(M) сирийских хомяков: **а** – обратные титры в ИФА к антигену варианта Дельта SARS-CoV-2; **б** – титры нейтрализации (NT₅₀) Ухань-подобного и Дельта варианта SARS-CoV-2. Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние значения, вертикальные линии – 95% ДИ, горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение в ИФА (6,64 log₂) и реакции нейтрализации (3,32 log₂ NT₅₀). Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем по U-критерию Манна-Уитни. Для нейтрализующих титров применяли поправку Бонферрони на множественность сравнений; статистически значимыми считали различия при $p < 0,025$. Уровни значимости: * $p < 0,05$

У всех вакцинированных хомяков, получавших Sen-Sdelta(M), наблюдалась выраженная индукция гуморального иммунного ответа на антиген варианта Дельта SARS-CoV-2 (рисунок 11а): СГТ антител класса IgG составил 47 568 (95% ДИ: 27 404–82 570). Так же была выявлена высокая нейтрализующая активность сывороток крови вакцинированных хомяков против варианта Дельта SARS-CoV-2 (рисунок 11б): СГТ составил 453 (95% ДИ: 160–1280). Нейтрализующая активность против варианта Ухань была ниже: СГТ в вакцинированной группе составил 190 (95% ДИ: 40–640). Различия с контролем не достигали порога уровня значимости ввиду малого размера выборки ($n=4$) и консервативности теста Бонферрони.

На 35-е сутки после иммунизации хомяков из групп Sen-Sdelta(M) и контроля (по 8 животных в каждой) интраназально заражали вариантом Дельта

SARS-CoV-2. На 6-е сутки после заражения в тканях носовых раковин и легких оценивали репликативную и инфекционную активность вируса (рисунок 12).

На 6-е сутки после заражения в группе иммунизированных животных лишь у 1 из 8 хомяков был обнаружен детектируемый уровень вирусной РНК в легких (рисунок 12а), тогда как в остальных образцов значения находились ниже порога детекции (>36 Ct или $3,3 \log_{10}$ копий/мл). Различие в средних концентрациях вирусной РНК в легких между иммунизированной и контрольной группами составило $6 \log_{10}$ и было высоко статистически значимым ($p = 0,0002$, U-критерий Манна-Уитни).

Во всех образцах носовых раковин вакцинированных животных была обнаружена РНК SARS-CoV-2 (Рисунок 12б), тем не менее её концентрация была достоверно ниже по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$, U-критерий Манна-Уитни) на $4,5 \log_{10}$.

Инфекционный вирус не был обнаружен ни в одном образце лёгких и носовых раковин вакцинированных хомяков, тогда как в контрольной группе средний инфекционный титр составил $4,06 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл в легких и $3,75$ ТЦИД₅₀/мл в носовых раковинах (рисунки 12а и 12б). Таким образом, в группе вакцинированных хомяков была достигнута 100% эффективность в предотвращении инфекции, вызванной вариантом Дельта SARS-CoV-2, что является высоко статистически значимым по сравнению с контролем ($p = 0,0002$, U-критерий Манна-Уитни).

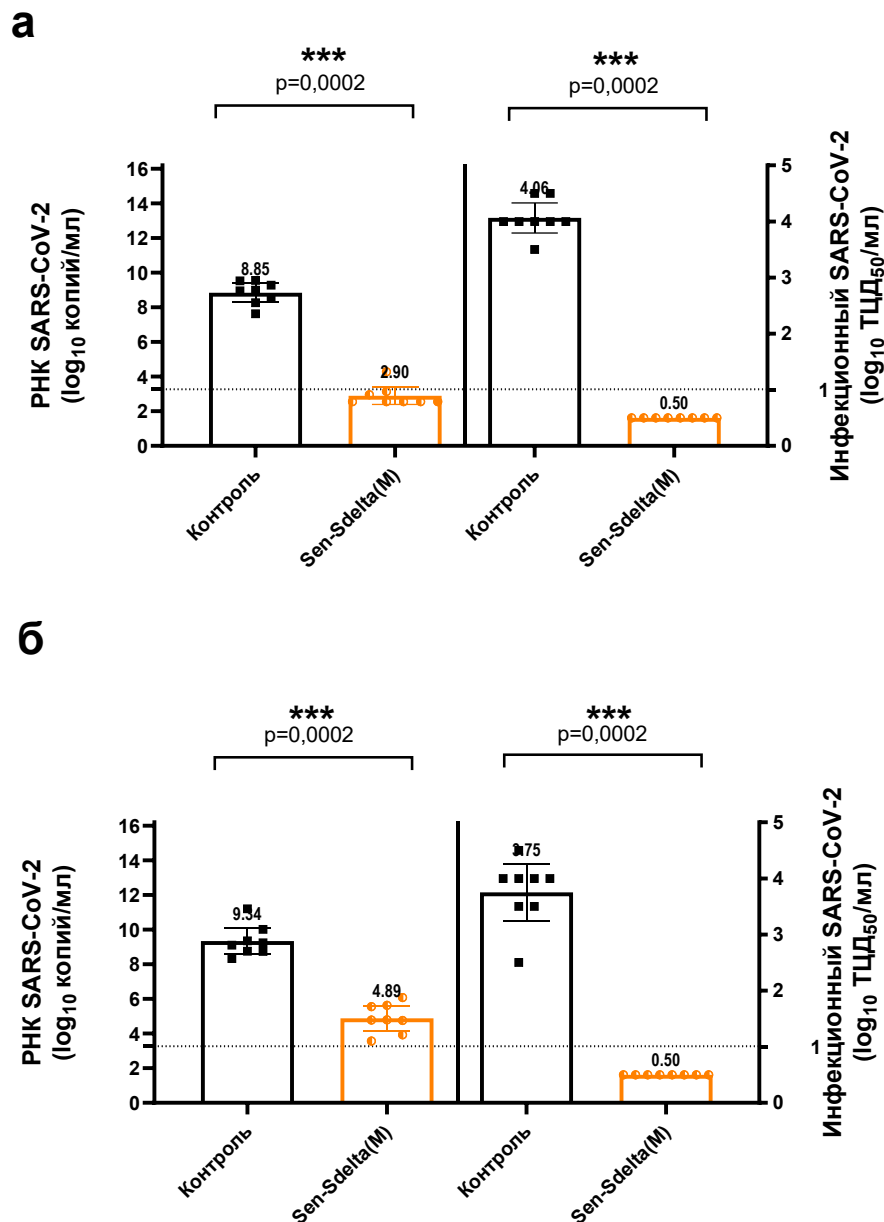


Рисунок 12 – Вирусная нагрузка на 6-е сутки после заражения вариантом Дельта SARS-CoV-2 иммунизированных Sen-Sdelta(M) сирийских хомяков в гомогенатах органов мишеней: **а** – легких; **б** – носовых раковинах. Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние значения, вертикальные линии – 95% ДИ. Слева – концентрация вирусной РНК ($\log_{10}$ копий/мл); справа – инфекционный титр вируса ($\log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл). Горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение ОТ-ПЦР-РВ (3,3 $\log_{10}$ копий/мл) и инфекционного титра (1 $\log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл). Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем по U-критерию Манна-Уитни. Уровни значимости: *** $p < 0,001$

3.2.3.2 Иммуногенность и протективность рекомбинантного варианта Sen-Sdelta(M) на модели мышей линии BALB/c

Мышей BALB /с разделили на две группы. Экспериментальную группу однократно интраназально иммунизировали рекомбинантным вариантом Sen-Sdelta(M). На основании данных раздела 3.2.2.2, где показано, что векторный контроль не даёт значимой защиты против варианта Гамма SARS-CoV-2, в данном эксперименте использовали только PBS как отрицательный контроль. Оценку иммунного ответа и протективной эффективности проводили на отдельных когортах мышей линии BALB/c.

На 28 сутки после иммунизации, по 5 животных выводили из эксперимента для оценки вакцин-индуцированного гуморального (рисунок 13) и клеточного иммунного ответа (рисунок 14).

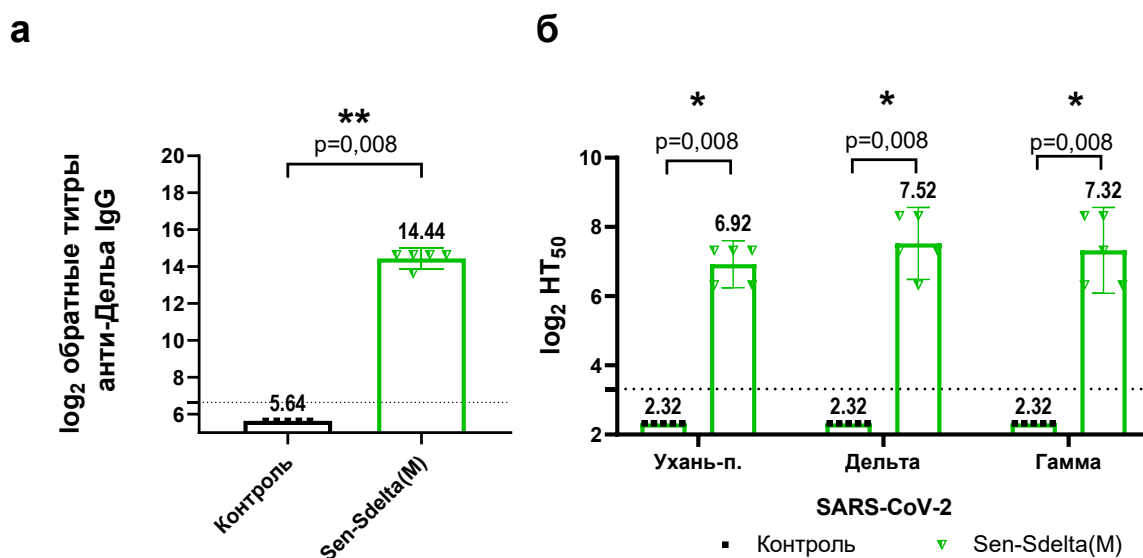


Рисунок 13 – Специфические антитела IgG и нейтрализующие антитела в сыворотках иммунизированных Sen-Sdelta(M) мышей линии BALB/c: **а** – обратные титры в ИФА к антигену варианта Дельта SARS-CoV-2; **б** – титры нейтрализации (NT₅₀) Ухань-подобного, Дельта и Гамма варианта SARS-CoV-2. Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние значения, вертикальные линии – 95% ДИ, горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение в ИФА (6,64 $\log_2$) и реакции нейтрализации (3,32 $\log_2$ NT₅₀). Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем по U-критерию Манна-Уитни. Для нейтрализующих титров применяли поправку Бонферрони на множественность сравнений; статистически значимыми считали различия при $p < 0,0167$. Уровни значимости: * $p < 0,01$

Результаты ИФА иммунных сывороток показали, что рекомбинантный вариант Sen-Sdelta(M) способен вызывать специфический гуморальный иммунный ответ с СГТ IgG = 22286 (95%ДИ: 15166– 3274) (рисунок 13а).

В сыворотке всех иммунизированных мышей выявлены вируснейтрализующие антитела, эффективные против гомологичного варианта Дельта, а также вариантов Гамма и Ухань (рисунок 13б). СГТ антител, нейтрализующих вариант Дельта SARS-CoV-2, составил 184 (95% ДИ:89–378). Сопоставимая нейтрализующая активность была продемонстрирована в отношении варианта Гамма: СГТ составил 160 (95% ДИ:68–286). Нейтрализующая способность против исходного штамма Ухань оказалась в 1,52 раза ниже по сравнению с гомологичным вариантом Дельта, что согласуется с антигенным дрейфом и накоплением мутаций в RBD-домене у вариантов Дельта и Гамма [94].

Дополнительно у тех же мышей был исследован Т-клеточный иммунный ответ, гипотеза о протективном эффекте которого была предложена по результатам исследования протективности Sen-RBDdelta(M) на хомяках (см. раздел 3.2.2.1).

Т-клеточный ответ в группе, иммунизированных Sen-Sdelta(M) мышей оценивали с помощью методов ELISpot-IFN- γ и внутриклеточного цитокинового окрашивания (ICS) (рисунок 14). Как показано на рисунке 14а, однократная интраназальная вакцинация мышей рекомбинантным вариантом Sen-Sdelta(M) индуцирует Т-клеточный иммунный ответ со средним количеством 126 спотов на 106 спленоцитов. Это значимо отличается от величины иммунного ответа в контрольных группах ($p < 0,01$, U-критерий Манна-Уитни).

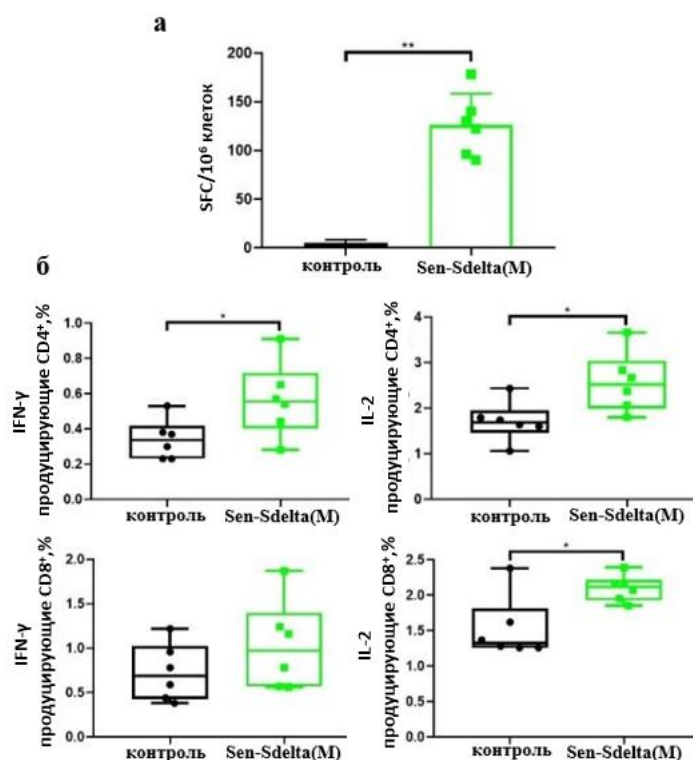


Рисунок 14 – Клеточный иммунный ответ у мышей BALB/c, оцененный с помощью: **а** – ELISpot количество спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на специфическую стимуляцию, на 10⁶ клеток; **б** – ICS. процент SARS-CoV-2-специфических цитокин-продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Точки – индивидуальные значения, линии – средние значения, верхний и нижний края прямоугольников – 95% ДИ. Значения *p* указаны для статистически значимых различий (*p* < 0,05) с контролем по U-критерию Манна-Уитни. Уровни значимости: **p* < 0,05, ** *p* < 0,01

Анализ Т-клеточного ответа с помощью ICS (рисунок 14б) показал, что в группе вакцинированных мышей Sen-Sdelta(M) наблюдалось значительное антиген-специфическое увеличение количества IFN-γ-продуцирующих Т-хелперных клеток по сравнению с контрольной группой. Цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD8+IFN-γ+ в группе вакцинированных, хотя и имели тенденцию к увеличению, не отличались значимо от интактных мышей. В группе, получившей вакцину, также наблюдался высокий уровень IL-2-продуцирующих клеток для обеих популяций Т-лимфоцитов, что свидетельствует об эффективной индукции Т-клеточного иммунитета в результате иммунизации препаратом Sen-Sdelta(M).

Протективную эффективность рекомбинантного Sen-Sdelta(M) оценивали против HCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (вариант Гамма). На 35-й день после вакцинации проводили интраназальное заражение опытной (Sen-Sdelta(M), n=8) и контрольной (контроль, n=8) групп мышей вирусом SARS-CoV-2. Животных подвергали эвтаназии на 5-й день после заражения. На рисунке 15 представлены результаты определения инфекционного титра и концентрации (НК вируса SARS-CoV-2 в легких и носовых раковинах).

В гомогенатах лёгких вакцинированных животных наблюдалось значимое ($p < 0,001$, U-критерий Манна-Уитни) снижение концентрации вирусной РНК SARS-CoV-2 по сравнению с контрольной группой на $1,4 \log_{10}$ (рисунок 15а). Инфекционный титр SARS-CoV-2 в вакцинированной группе был на $1,5 \log_{10}$ ниже, чем в контроле ($p = 0,002$, U-критерий Манна-Уитни). Кроме того, значения титра на уровне порога детекции ($\leq 1 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл) наблюдались у 62,5% образцов лёгочной ткани вакцинированных животных.

Ещё более выраженные различия были выявлены при анализе гомогенатов носовых раковин (рисунок 15б). В вакцинированной группе концентрация вирусной РНК была на $1,5 \log_{10}$ ниже ($p = 0,007$, U-критерий Манна-Уитни), чем в контрольной группе. Кроме того, в 87,5% образцов носовой ткани мышей, вакцинированных Sen-Sdelta(M), инфекционные титры находились на уровне порога детекции (титр $\leq 1 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл), снижение среднего инфекционного титра относительно контроля составило $2,9 \log_{10}$ ($p = 0,003$, U-критерий Манна-Уитни).

Выраженное подавление репликации вируса в верхних дыхательных путях, наряду с системным иммунным ответом, может указывать на участие механизмов местной защиты, включая мукозальный иммунитет.

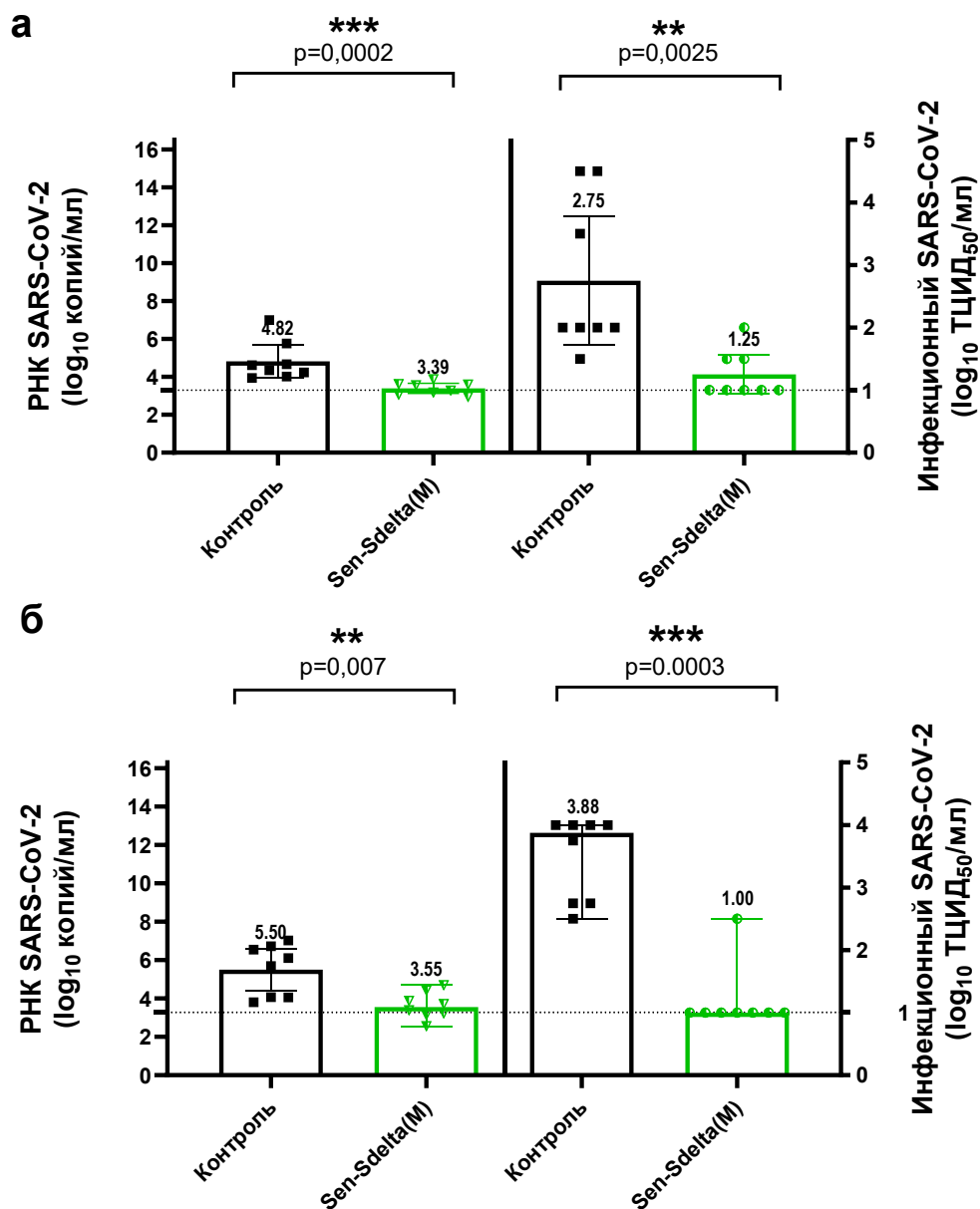


Рисунок 15 – Вирусная нагрузка на 5-е сутки после заражения вариантом Гамма SARS-CoV-2 иммунизированных Sen-Sdelta(M) мышей BABL/c в гомогенатах органов мишеней: а – легких; б – носовых раковинах. Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние значения, вертикальные линии – 95% ДИ. Слева – концентрация вирусной РНК (log₁₀ копий/мл); справа – инфекционный титр вируса (log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). Горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение ОТ-ПЦР-РВ (3,3 log₁₀ копий/мл) и инфекционного титра (1 log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). Значения р указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем по U-критерию Манна-Уитни. Уровни значимости: *** $p < 0,001$

Таким образом, однократная интраназальная иммунизация рекомбинантным вирусом Sen-Sdelta(M) индуцирует мощный системный гуморальный ответ (СГТ

IgG = 22 286 у мышей, 47 568 у хомяков) и высокие титры нейтрализующих антител против гомологичного (Дельта) и гетерологичных (Гамма, Ухань) вариантов SARS-CoV-2.

Вакцинация обеспечивает стерилизующий иммунитет у хомяков при заражении вариантом Дельта SARS-CoV-2 вирусная РНК не обнаруживается в лёгких у 7 из 8 животных, а инфекционный вирус отсутствует во всех образцах лёгких и носовых раковин. У мышей BALB/c при заражении вариантом Гамма достигается снижение инфекционного титра на $1,5 \log_{10}$ (лёгкие) и на $2,9 \log_{10}$ (носовые раковины) относительно контроля, с частотой недетектируемых титров инфекционного вируса – 62,5% и 87,5%, соответственно.

Кроме того, показано, что рекомбинант Sen-Sdelta(M) эффективно стимулирует Т-клеточный иммунитет у мышей BALB/c, включая IFN- γ - и IL-2-продуцирующие CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты, что указывает на формирование полноценного адаптивного ответа.

Таким образом, вакцина на основе полноразмерного S-белка варианта Дельта SARS-CoV-2 демонстрирует эффективность на обеих исследуемых моделях: сирийские хомяки и мыши BALB/c.

3.3 Обоснование выбора антигена для разработки обновлённой вакцины против актуального варианта SARS-CoV-2

Результаты исследования показали, что конструкция на основе полноразмерного S-белка индуцировала иммунный ответ у мышей BALB/c и сирийских хомяков. У последних иммунитет был стерилизующим. В свою очередь Sen-RBDdelta(M) не индуцировала детектируемых антител у сирийских хомяков. Полученные данные указывают на то, что данные антигены формируют иммунный ответ с разной степенью эффективности при интраназальном введении.

Дополнительно, было показано, полноразмерный S-белок сохраняет приемлемый профиль безопасности при локальной доставке, не вызывая системного цитокинового шторма (см. раздел 3.1).

В связи с быстрой эволюцией SARS-CoV-2 и доминированием к началу 2024 года варианта JN.1, обладающего повышенной контагиозностью и способностью к иммунному уклонению, нами было принято решение использовать оптимально зарекомендовавший себя антигенный дизайн - экспрессию трансгена полноразмерного S-белка циркулирующего варианта JN.1 в обновлённой вакцинной конструкции Sen-S-JN.1(M).

Этот подход позволяет сохранить все преимущества платформы вируса Сендай штамма Москва: индукцию мукозального и системного иммунитета, однократное применение и высокую протективную эффективность при актуализации антигена под циркулирующий вариант линии Омикрон.

JN.1 (BA.2.86.1.1) являлся доминирующим субвариантом линии Омикрон в 2024 году и продолжает циркулировать в настоящее время. Он характеризуется повышенной контагиозностью, тропностью к верхним дыхательным путям и способностью к иммунному уклонению за счёт мутации L455S в RBD-домене.

3.4 Оценка эффективности рекомбинантного вакцинного конструктора на основе вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего трансген S белка штамма JN.1 коронавируса SARS-CoV-2

3.4.1 Характеристика рекомбинантного варианта Sen-S JN.1(M)

При получения вакцинного конструктора в качестве иммуногена был использован полноразмерный S-белок штамма hCoV-19/Russia/NVS-SRC-4559/2024 (JN.1, GISAID: EPI_ISL_19035845). Рекомбинантный штамм вируса Сендай, несущий инсерцию трансгена белка S(JN.1) между генами Р и М Sen-S-JN.1(M), был получен в лаборатории под руководством Кочневой Г.В. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Схематичное изображение структуры рекомбинанта представлено на рисунке 16.

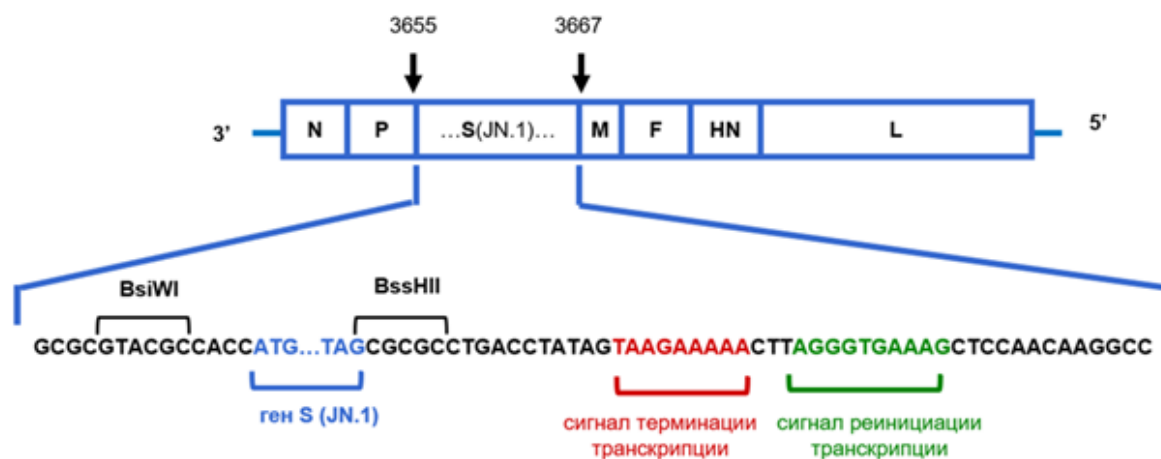


Рисунок 16 – Схема структуры генома рекомбинантного варианта Sen-S JN.1(M) вируса Сендай штамма Москва с инсерцией трансгена S (JN.1) между генами P и M. Вертикальными стрелками указаны позиции нуклеотидов генома вируса, между которыми проведена инсерция трансгена, ниже указана нуклеотидная последовательность инсерции в формате комплементарной ДНК (данные предоставлены Зайнутдиновым С.С.)

Исследование экспрессии трансгена S(JN.1) в составе рекомбинантного вируса Sen-S-JN.1(M) методом иммуноблоттинга, показало, что S белок детектируется как в лизатах клеток линии LLC-MK₂, инфицированных вирусом Sen-S-JN.1(M), так и в препаратах очищенного и концентрированного вируса, выделенного из аллантоисной жидкости 11-дневных куриных эмбрионов (рисунок 17).

Аналогично белку S варианта дельта (см. раздел 3.2.1, рисунок 6), при экспрессии трансгена S(JN.1) регистрируются как полноразмерная мономерная и тримерная формы белка, так и процессированная S1/S2 форма (рисунок 17). Эффективное экспонирование антигена на поверхности вирионов (дорожка 6, рисунок 17) является ключевым условием для индукции нейтрализующих антител. Подобная инкорпорация S-белка в вирионы ранее выявлялась и в конструкции Sen-Sdelta(M), причем в той же процессированной S1/S2-форме, что соответствует характеру посттрансляционной модификации, наблюдаемой у природного SARS-CoV-2 [288].

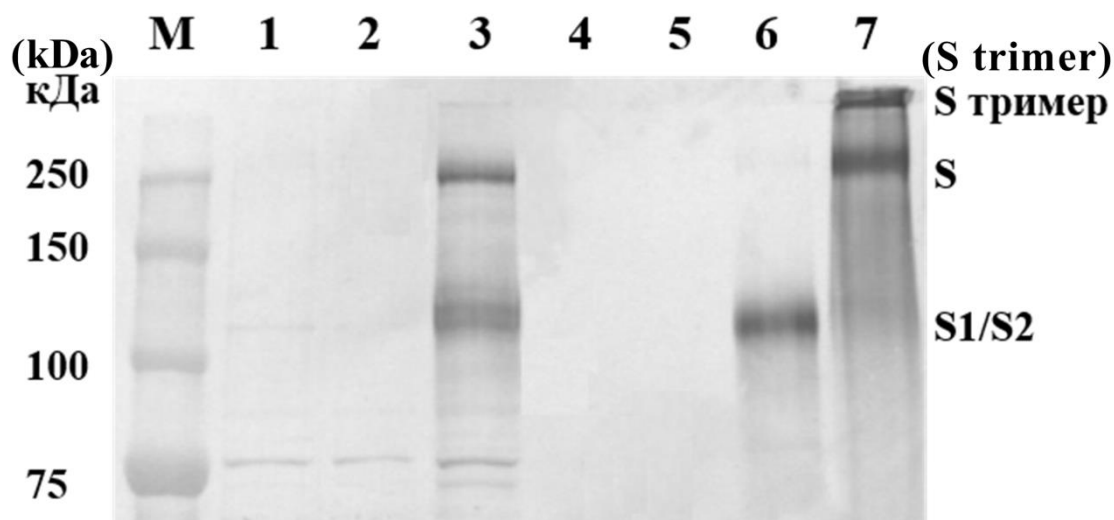


Рисунок 17 – Анализ экспрессии трансгена S(JN.1) в составе рекомбинантного вируса Sen-S-JN.1(M) методом иммуноблотинга. М - маркер молекулярной массы (кДа); 1 - лизат неинфицированных клеток LLC-MK₂ (отрицательный контроль клеток); 2 - лизат клеток LLC-MK₂, инфицированных Sen2-EGFP (отрицательный контроль вируса); 3 - лизат клеток LLC-MK₂, инфицированных Sen-S JN.1(M); 4 – аллантоисная жидкость неинфицированных куриных эмбрионов (отрицательный контроль); 5 – очищенный из аллантоисной жидкости препарат рекомбинантного варианта Sen2-EGFP (отрицательный контроль вируса); 6 – очищенный из аллантоисной жидкости препарат рекомбинантного штамма Sen-S-JN.1(M); 7 - S-тример, продуцированный в трансформированных клетках CHO-K1, 500 нг (положительный контроль)

3.4.2 Иммуногенность Sen-S-JN.1(M)

С учетом, ранее полученных результатов исследования Sen-Sdelta(M) (см. раздел 3.2.3) были выявлены признаки дополнительной протективности в верхних дыхательных путях, что может быть связано с индукцией мукозального иммунитета. Для заполнения этого пробела в изучении вакцинных свойств ранее исследованных рекомбинантов разработанную кандидатную вакцину Sen-S-JN.1(M) исследовали на предмет индукции секретируемых антител класса sIgA, чья роль заключается в формировании защитного барьера непосредственно у входных ворот респираторных инфекций. Повышенная тропность к клеткам верхних дыхательных путей у современных вариантов Омикрон делает данный критерий особенно актуальным. Наравне с этим системный гуморальный ответ

остаётся не менее важным для профилактики тяжелой пневмонии и летального исхода.

3.4.2.1 Индукция специфических антител классов sIgA и IgG вакцинным конструктором Sen-S-JN.1(M) на модели мышей линии BALB/c

На данном этапе исследования была оценена динамика формирования мукозального и системного гуморального ответа у мышей линии BALB/c после однократной интраназальной иммунизации вакциной Sen-S-JN.1(M) (доза 10^5 БОЕ/мышь). Уровни секреторных IgA (sIgA) в назофарингеальных смывах и сывороточных IgG против штамма JN.1 определяли на 14-е и 28-е сутки после вакцинации (рисунок 18).

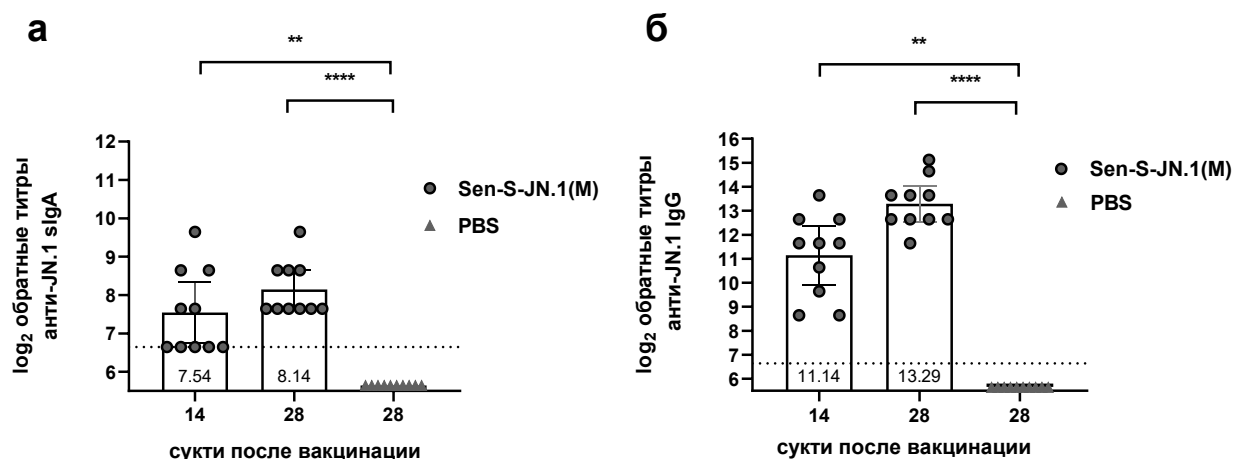


Рисунок 18 – Динамика мукозального и гуморального ответов у мышей BALB/c после интраназальной иммунизации Sen-S-JN.1(M), измеренная в ИФА против антигена варианта JN.1 SARS-CoV-2: **а** – sIgA в назофарингеальных смывах; **б** – IgG в сыворотках крови. Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние значения, вертикальные линии – 95% ДИ, горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение в ИФА (6,64 $\log_2$). Уровни значимости указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем в тесте множественного сравнения Данна после подтверждения межгрупповых различий тестом Краскела-Уоллиса. Уровни значимости: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$

Уже на 14-е сутки у всех иммунизированных животных регистрировался специфический мукозальный ответ: СГТ sIgA составил 187 (95% ДИ: 108–322), а к 28-м суткам увеличился до 283 (95% ДИ: 199–402) (рисунок 18а). Системный

ответ развивался параллельно: СГТ IgG составил 2263 на 14-е сутки (95% ДИ: 966–5298) и достиг 10 026 к 28-м суткам (95% ДИ: 5955–16 880) (рисунок 18б).

Таким образом, однократное введение Sen-S-JN.1(M) эффективно индуцирует как местный (sIgA), так и системный (IgG) гуморальный иммунный ответ, что подтверждает адекватность выбранной стратегии интраназальной иммунизации.

3.4.2.2 Перекрестная нейтрализующая активность Sen-S-JN.1(M)

С учетом динамичной эволюции SARS-CoV-2 и циркуляции множества антигенов близких субвариантов линии Омикрон, ключевым параметром эффективности разработанного рекомбинанта Sen-S-JN.1(M) является способность индуцировать перекрёстно нейтрализующие антитела.

С этой целью была проведена оценка нейтрализующей активности сывороток вакцинированных мышей линии BALB/c против восьми вариантов SARS-CoV-2 (таблица 1), включая исходный Ухань-подобный штамм, варианты Дельта, Гамма и шесть субвариантов Омикрон (рисунок 19).

В сыворотках крови мышей линии BALB/c на 28-е сутки после однократной интраназальной иммунизации Sen-S-JN.1(M) (рисунок 19) выявлен высокий титр нейтрализующих антител против гомологичного штамма JN.1 с СГТ=279 (95%ДИ: 177-439).

Анализ перекрестной нейтрализующей активности показал выраженное снижение нейтрализующих титров против вариантов Дельта, BA.1, XBB.1.5 и EG.5.1 (рисунок 19). Кратность снижения титра по отношению к JN.1 составила 45,3-52,0, что, по-видимому, связано с наличием у данных вариантов ключевой замены Т478К в белке S, впервые выявленной в варианте Дельта и известной своей способностью к усилению связывания с рецепторами ACE2 и снижению эффективности нейтрализации [295].

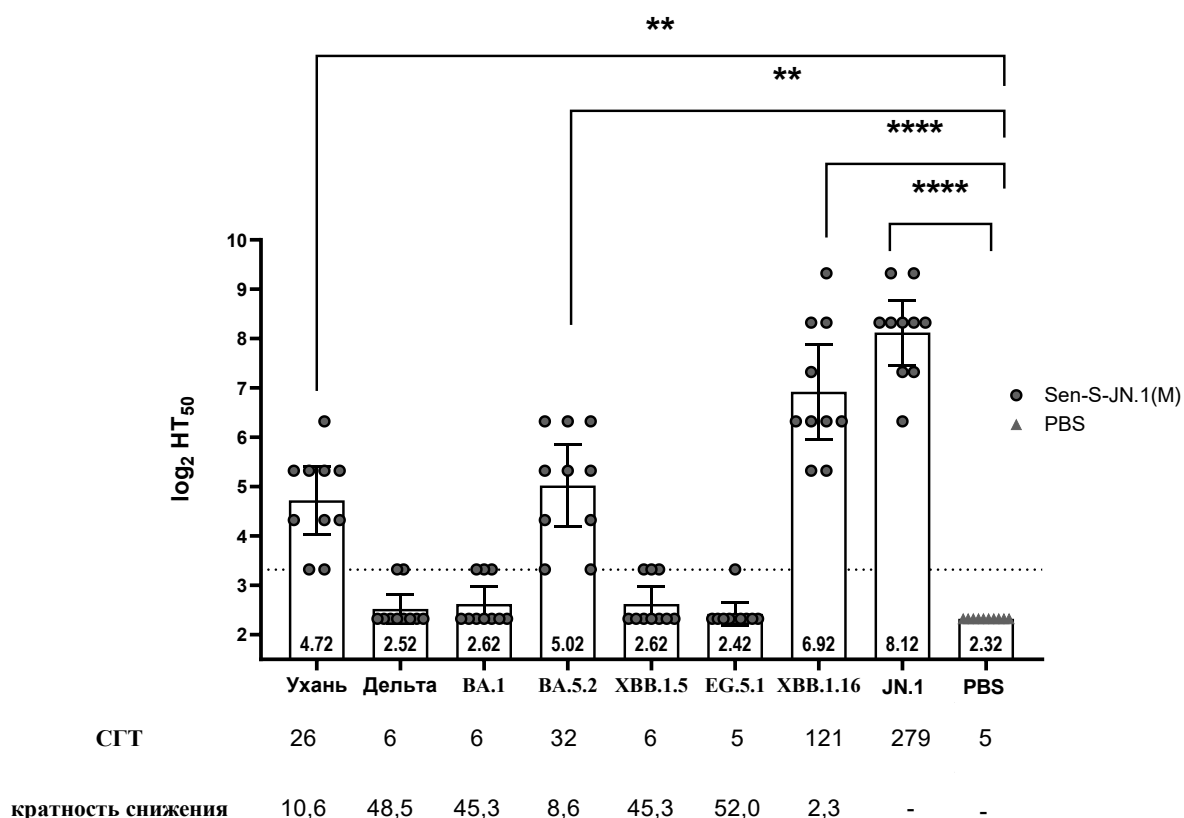


Рисунок 19 – Перекрестная нейтрализующая активность против вариантов SARS-CoV-2, выраженная в обратных титрах нейтрализации ($\log_2$ NT₅₀), в сыворотках мышей BALB/c на 28-й день (n=10) после интраназальной иммунизации Sen-S-JN.1(M) или PBS. Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние значения, вертикальные линии – 95% ДИ, горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение реакции нейтрализации (3,32 $\log_2$ NT₅₀). Уровни значимости указаны для статистически значимых различий (p<0,05) с контролем в тесте множественного сравнения Данна после подтверждения межгрупповых различий тестом Краскела-Уоллиса. **p<0,01; **** p<0,0001

Умеренное снижение СГТ (в 8,6 и 10,6 раз) наблюдалось против Ухань-подобного штамма и BA.5.2. Последний содержит замену E484A, которая, подобно классической «эскейп»-мутации E484K, может снижать эффективность нейтрализации, хотя и в меньшей степени [296]. Наиболее высокий уровень перекрестной нейтрализации был зарегистрирован в отношении варианта XBB.1.16 (рисунок 19), где замена треонина на аргинин (T478R) вместо лизина (T478K) является менее эффективной в маскировке эпитопов и уклонении от нейтрализации по сравнению с EG.5.1 [297].

Ранее было показано, что иммунизация JN.1-содержащими вакцинами индуцирует нейтрализующие антитела против потомков JN.1 [171]. Настоящее исследование расширяет эти данные, демонстрируя значимую перекрёстную нейтрализацию с предшествующими вариантами линии Омикрон XBB.1.16 и BA.5.2, а также с родоначальником пандемии вариантом Ухань. В связи с последним можно предположить наличие защиты от ряда вариантов SARS-CoV-2 линии Омикрон у ранее вакцинированных против варианта Ухань людей.

3.4.3 Протективность рекомбинантного варианта Sen-S-JN.1(M)

Современные Омикрон-варианты SARS-CoV-2, включая JN.1, слабо патогенны для стандартных лабораторных моделей, таких как мыши линии BALB/c и сирийские хомяки [297, 298]

Трансгенные модели, экспрессирующие ген человеческого ACE2 рецептора, например, мыши линии K18-hACE2, восприимчивы к заражению субвариантами Омикрона, включая JN.1, хотя тяжесть заболевания у них, как правило, ниже по сравнению с предшествующими вариантами SARS-CoV-2 [299, 300].

В настоящей работе мы оценили протективный эффект Sen-S-JN.1(M) на мышцах линии K18-hACE2. Через 28 суток после иммунизации Sen-S-JN.1(M) мышей заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 (JN.1 вариант) в дозе 10^3 ТЦИД₅₀. Вирусную нагрузку исследовали в тканях легких и носовых раковин на 5-е сутки после заражения.

Уровень вирусной РНК у иммунизированных мышей K18-hACE2 был значимо снижен относительно контроля ($p < 0,001$, U-критерий Манна-Уитни) на $5,5 \log_{10}$ в тканях легких (рисунок 20а), на $3,5 \log_{10}$ в тканях носовых раковин (рисунок 20б). Во всех образцах тканей вакцинированных Sen-S-JN.1(M) мышей не было обнаружено инфекционного SARS-CoV-2, тогда как в контрольной группе инфекционный титр составил 2,2 и $1,5 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл в тканях легких и носовых раковин соответственно ($p < 0,001$ и $p < 0,0001$, U-критерий Манна-Уитни). Полученные данные показывают, что вакцина Sen-S-JN.1(M) эффективно

подавляет репликацию SARS-CoV-2 вариант JN.1 в верхних и нижних дыхательных путях при интраназальной инфекции.

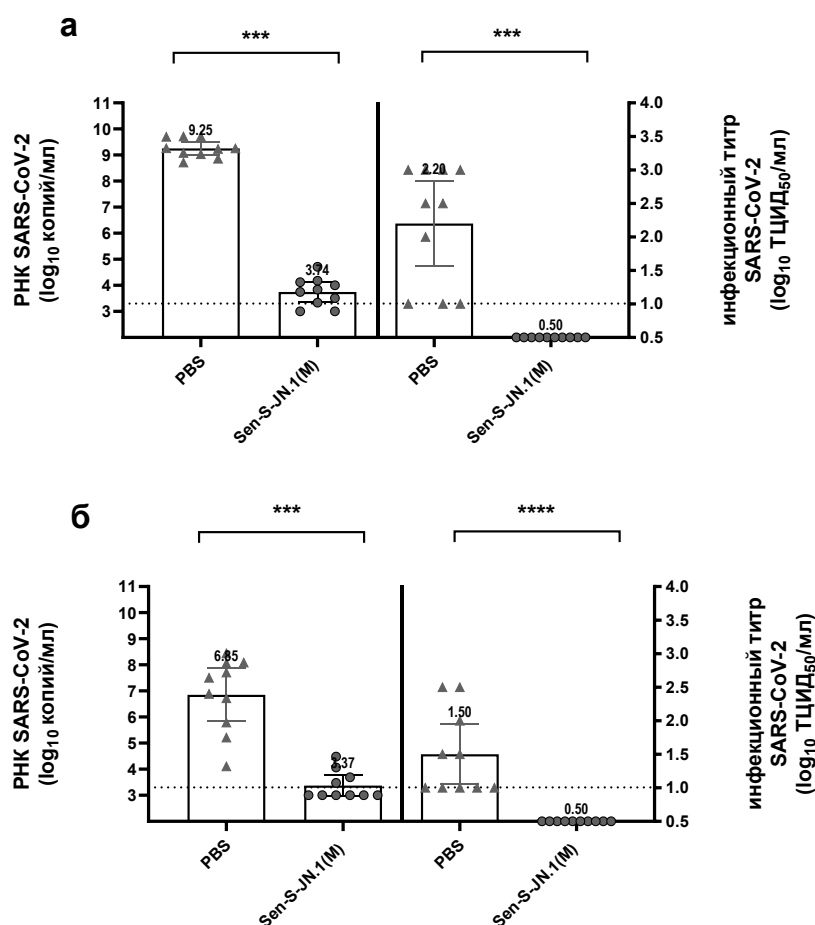


Рисунок 20 – Вирусная нагрузка на 5-е сутки у мышей K18-hACE2 после заражения вариантом JN.1 SARS-CoV-2 иммунизированных Sen-S-JN.1(M): **а** – легких; **б** – носовых раковинах. Точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние значения, вертикальные линии – 95% ДИ. Слева – концентрация вирусной РНК (log₁₀ копий/мл); справа – инфекционный титр вируса (log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). Горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение ОТ-ПЦР-РВ (3,3 log₁₀ копий/мл) и инфекционного титра (1 log₁₀ ТЦИД₅₀/мл). Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) с контролем по U-критерию Манна-Уитни. Уровни значимости: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе решена актуальная научно-практическая задача по экспериментальной оценке прототипов интраназальных векторных вакцин на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва против SARS-CoV-2-инфекции, вызванной актуальными вариантами коронавируса.

В ходе исследования обоснована стратегия использования полноразмерного S-белка в качестве вакцинного иммуногена по сравнению с изолированным RBD. Доказано, что интратрахеальное введение рекомбинантного S-белка не вызывает системного цитокинового шторма или острого повреждения легких. Показано, что вакцинный конструктор Sen-Sdelta(M), экспрессирующий S-белок варианта Дельта SARS-CoV-2, индуцирует высокие титры нейтрализующих антител и обеспечивает стерилизующий иммунитет на модели сирийского хомяка, чего не наблюдалось на той же модели для вакцинного конструктора Sen-RBDdelta(M),

Исследован обновленный вакцинный прототип Sen-S-JN.1(M), экспрессирующий S-белок доминирующего на 2025 год варианта JN.1 (линия BA.2.86.1.1). Впервые на модели трансгенных мышей K18-hACE2 продемонстрировано, что однократная интраназальная иммунизация данным прототипом обеспечивает стерилизующий иммунитет: подавление репликации РНУ вируса в легких на $5,5 \log_{10}$, в полости носа на $3,5 \log_{10}$ при полном отсутствии инфекционного вируса в дыхательных путях. Вакцина также индуцировала высокий уровень секреторных IgA в нозофарингеальных смывах мышей BALB/c, что критически важно для прерывания передачи инфекции. Выявлена перекрестная нейтрализующая активность прототипа 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 интраназальных вакцин, способных индуцировать стерилизующий иммунитет против современных иммуноуклоняющихся вариантов SARS-CoV-2.

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 литературы

1. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X.-L. Yang, X.-G. Wang [et al.] // *nature*. – 2020. – Т. 579. – № 7798. – С. 270-273.
2. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu [и др.] // *Nature*. – 2020. – Т. 579. – № 7798. – С. 265-269.
3. Challenges to the Effectiveness and Immunogenicity of COVID-19 Vaccines: A Narrative Review with a Systematic Approach / A. A. Soldatov, N. A. Kryuchkov, D. V. Gorenkov [et al.] // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13. – Challenges to the Effectiveness and Immunogenicity of COVID-19 Vaccines. – № 8. – P. 789.
4. Beyond the Pandemic Era: Recent Advances and Efficacy of SARS-CoV-2 Vaccines Against Emerging Variants of Concern / A. Saha, S. Ghosh Roy, R. Dwivedi [et al.] // *Vaccines*. – 2025. – Т. 13. – № 4. – С. 424.
5. Tscherne, A. A review of currently licensed mucosal COVID-19 vaccines / A. Tscherne, F. Krammer // *Vaccine*. – 2025. – Т. 61. – С. 127356.
6. Zhan, Y. B.1.617.2 (Delta) Variant of SARS-CoV-2: features, transmission and potential strategies / Y. Zhan, H. Yin, J.-Y. Yin // *International Journal of Biological Sciences*. – 2022. – Vol. 18. – B.1.617.2 (Delta) Variant of SARS-CoV-2. – № 5. – P. 1844-1851.
7. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity / B. Meng, A. Abdullahi, I. A. T. M. Ferreira [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 603. – № 7902. – P. 706-714.
8. Lung tropism in hospitalized patients following infection with SARS-CoV-2 variants from D614G to Omicron BA.2 / Y. Hirotsu, Y. Kakizaki, A. Saito [и др.] // *Communications Medicine*. – 2023. – Т. 3. – № 1. – С. 32.
9. Fast evolution of SARS-CoV-2 BA.2.86 to JN.1 under heavy immune pressure / S. Yang, Y. Yu, Y. Xu [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2024. – Т. 24. – № 2. – С. e70-e72.

10. Russell, M. W. Mucosal immunity: The missing link in comprehending SARS-CoV-2 infection and transmission / M. W. Russell, J. Mestecky. – Текст : электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Т. 13. – Mucosal immunity. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.957107/full> (дата обращения: 12.01.2026).
11. Nasal vaccines: solutions for respiratory infectious diseases / R. Nakahashi-Ouchida, K. Fujihashi, Y. Kurashima [et al.] // *Trends in Molecular Medicine*. – 2023. – Т. 29. – Nasal vaccines. – № 2. – С. 124-140.
12. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution / Y. Cao, F. Jian, J. Wang [et al.] // *Nature*. – 2023. – Т. 614. – № 7948. – С. 521-529.
13. Antigenicity and receptor affinity of SARS-CoV-2 BA.2.86 spike / Q. Wang, Y. Guo, L. Liu [et al.] // *Nature*. – 2023. – Vol. 624. – № 7992. – P. 639-644.
14. SARS-CoV-2 variants: biology, pathogenicity, immunity and control / R. Uraki, B. Korber, M. S. Diamond, Y. Kawaoka // *Nature Reviews Microbiology*. – 2026. – Vol. 24. – SARS-CoV-2 variants. – № 1. – P. 8-28.
15. SARS-CoV-2 neutralizing antibody specificities differ dramatically between recently infected infants and immune-imprinted individuals / B. Dadonaite, A. R. Burrell, J. Logue [et al.] // *Journal of Virology*. – 2025. – Т. 99. – № 4. – С. e00109-25.
16. Immunological imprinting shapes the specificity of human antibody responses against SARS-CoV-2 variants / T. S. Johnston, S. H. Li, M. M. Painter [et al.] // *Immunity*. – 2024. – Т. 57. – № 4. – С. 912-925.
17. Inflammatory conditions shape phenotypic and functional characteristics of lung-resident memory T cells in mice / A. Schmidt, J. Fuchs, M. Dedden [et al.] // *Nature Communications*. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 3612.
18. Advances and prospects of respiratory mucosal vaccines: mechanisms, technologies, and clinical applications / J. Li, G. Wu, Z. Huang [et al.] // *npj Vaccines*. – 2025. – Vol. 10. – Advances and prospects of respiratory mucosal vaccines. – № 1. – P. 230.

19. Nakanishi, M. Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine / M. Nakanishi, M. Otsu // *Current Gene Therapy*. – 2012. – Т. 12. – № 5. – С. 410-416.
20. Human Parainfluenza Virus Type 1 C Proteins Are Nonessential Proteins That Inhibit the Host Interferon and Apoptotic Responses and Are Required for Efficient Replication in Nonhuman Primates / E. J. Bartlett, A.-M. Cruz, J. Esker [et al.] // *Journal of Virology*. – 2008. – Т. 82. – № 18. – С. 8965-8977.
21. Russell, C. J. Sendai Virus-Vectored Vaccines That Express Envelope Glycoproteins of Respiratory Viruses / C. J. Russell, J. L. Hurwitz. – Text : electronic // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 6. – URL: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/6/1023> (date accessed: 23.03.2026).
22. Intranasal Sendai Virus Vaccination of Seropositive Children 1 to 2 Years of Age in a Phase I Clinical Trial Boosts Immune Responses Toward Human Parainfluenza Virus Type 1 / E. Adderson, K. J. Allison, K. Branum [et al.]. – Text : electronic // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13. – № 4. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-393X/13/4/430> (date accessed: 23.03.2026).
23. Intranasal Sendai virus-based SARS-CoV-2 vaccine using a mouse model / S. Morimoto, K. Saeki, M. Takeshita [et al.] // *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*. – 2023. – Т. 28. – № 1. – С. 29-41.
24. Neutralizing-antibody-independent SARS-CoV-2 control correlated with intranasal-vaccine-induced CD8⁺ T cell responses / H. Ishii, T. Nomura, H. Yamamoto [et al.] // *Cell Reports Medicine*. – 2022. – Т. 3. – № 2. – С. 100520.
25. Three SARS-CoV-2 antibodies provide broad and synergistic neutralization against variants of concern, including Omicron / S. Wang, H. Sun, Y. Zhang [et al.]. – Текст : электронный // *Cell Reports*. – 2022. – Т. 39. – № 8. – URL: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(22\)00635-0](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(22)00635-0) (дата обращения: 20.10.2025).
26. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies / C. O. Barnes, C. A. Jette, M. E. Abernathy [et al.] // *Nature*. – 2020. – Т. 588. – № 7839. – С. 682-687.

27. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape / T. N. Starr, N. Czudnochowski, Z. Liu [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 597. – № 7874. – P. 97-102.
28. A cryptic site in class 5 epitope of SARS-CoV-2 RBD maintains highly conservation across natural isolates / L. Cui, T. Li, M. Lan [et al.]. – Текст : электронный // *iScience*. – 2024. – Т. 27. – № 7. – URL: [https://www.cell.com/iscience/abstract/S2589-0042\(24\)01433-0](https://www.cell.com/iscience/abstract/S2589-0042(24)01433-0) (дата обращения: 20.10.2025).
29. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19 / A. Grifoni, J. Sidney, R. Vita [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2021. – Т. 29. – SARS-CoV-2 human T cell epitopes. – № 7. – C. 1076-1092.
30. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron / A. Tarke, C. H. Coelho, Z. Zhang [et al.] // *Cell*. – 2022. – Т. 185. – № 5. – C. 847-859.e11.
31. Yamamoto, Y. Structural Insights into the SARS-CoV-2 Spike Protein and Its Implications for Antibody Resistance / Y. Yamamoto, K. Noguchi // *Biomolecules*. – 2025. – Т. 15. – № 11. – C. 1489.
32. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor / J. Lan, J. Ge, J. Yu [et al.] // *Nature*. – 2020. – Т. 581. – № 7807. – C. 215-220.
33. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein / A. C. Walls, Y.-J. Park, M. A. Tortorici [et al.] // *Cell*. – 2020. – Т. 181. – № 2. – C. 281-292.
34. Statement on the antigen composition of COVID-19 vaccines. – URL: <https://www.who.int/news/item/26-04-2024-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines> (date accessed: 09.01.2026). – Text : electronic.
35. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine / F. P. Polack, S. J. Thomas, N. Kitchin [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Т. 383. – № 27. – C. 2603-2615.

36. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness / K. S. Corbett, D. K. Edwards, S. R. Leist [et al.] // *Nature*. – 2020. – T. 586. – № 7830. – C. 567-571.
37. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis / C. Wang, Z. Liu, Z. Chen [et al.] // *Journal of medical virology*. – 2020. – Vol. 92. – № 6. – P. 667-674.
38. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome / T. G. Ksiazek, D. Erdman, C. S. Goldsmith [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2003. – T. 348. – № 20. – C. 1953-1966.
39. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 / A. E. Gorbalenya, S. C. Baker, R. S. Baric [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2020. – T. 5. – № 4. – C. 536-544.
40. Wang, F.-S. What to do next to control the 2019-nCoV epidemic? / F.-S. Wang, C. Zhang // *The Lancet*. – 2020. – T. 395. – № 10222. – C. 391-393.
41. Ceraolo, C. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus / C. Ceraolo, F. M. Giorgi // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92. – № 5. – P. 522-528.
42. A distinct name is needed for the new coronavirus / S. Jiang, Z. Shi, Y. Shu [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2020. – T. 395. – № 10228. – C. 949.
43. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission / X. Xu, P. Chen, J. Wang [et al.] // *Science China Life Sciences*. – 2020. – Vol. 63. – № 3. – P. 457-460.
44. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu, X. Zhao, J. Li [et al.] // *The lancet*. – 2020. – T. 395. – Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus. – № 10224. – C. 565-574.
45. Exploring the Natural Origins of SARS-CoV-2 in the Light of Recombination / S. Lytras, J. Hughes, D. Martin [et al.] // *Genome Biology and Evolution*. – 2022. – T. 14. – № 2. – C. evac018.

46. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes / P. Forster, L. Forster, C. Renfrew, M. Forster // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – Т. 117. – № 17. – С. 9241-9243.
47. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2 / X. Tang, C. Wu, X. Li [et al.] // *National Science Review*. – 2020. – Т. 7. – № 6. – С. 1012-1023.
48. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology / A. Rambaut, E. C. Holmes, Á. O'Toole [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2020. – Vol. 5. – № 11. – P. 1403-1407.
49. Вступительное слово Генерального директора на пресс брифинге по COVID-19 11 марта 2020 г. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/speeches/item/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (дата обращения: 12.09.2025). – Текст : электронный.
50. Evolutionary and structural analyses of SARS-CoV-2 D614G spike protein mutation now documented worldwide / S. Isabel, L. Graña-Miraglia, J. M. Gutierrez [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Т. 10. – № 1. – С. 14031.
51. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus / B. Korber, W. M. Fischer, S. Gnanakaran [et al.] // *Cell*. – 2020. – Т. 182. – Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike. – № 4. – С. 812-827.e19.
52. Onder, G. Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy / G. Onder, G. Rezza, S. Brusaferro // *Jama*. – 2020. – Т. 323. – № 18. – С. 1775-1776.
53. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia / A. B. Komissarov, K. R. Safina, S. K. Garushyants [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Т. 12. – № 1. – С. 649.
54. Cross-neutralising antibodies to SARS-CoV-2 in sera from straw-coloured fruit bats (*Eidolon helvum*) in Nigeria / H. Goharriz, G. Wu, V. O. Ameh [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2025. – Т. 21. – № 1. – С. 530.
55. Immunogenicity and safety of BNT162b2 mRNA vaccine in Chinese adults: A phase 2 randomised clinical trial / A.-M. Hui, J. Li, L. Zhu [et al.]. – Текст :

- электронный // The Lancet Regional Health–Western Pacific. – 2022. – Т. 29. – Immunogenicity and safety of BNT162b2 mRNA vaccine in Chinese adults. – URL: [https://www.thelancet.com/journals/lanwpc/article/PIIS2666-6065\(22\)00201-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanwpc/article/PIIS2666-6065(22)00201-2/fulltext) (дата обращения: 11.09.2025).
56. Choi, J. Y. SARS-CoV-2 Variants of Concern / J. Y. Choi, D. M. Smith // Yonsei Medical Journal. – 2021. – Т. 62. – № 11. – С. 961-968.
57. WHO announces simple, easy-to-say labels for SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern. – URL: <https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern> (дата обращения: 12.09.2025). – Текст : электронный.
58. New variants of SARS-CoV-2 / R. Cantón, P. D. L. Ramos, A. García-Botella [et al.] // Revista Española de Quimioterapia. – 2021. – Т. 34. – № 5. – С. 419-428.
59. The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine effectiveness: New opportunities to new challenges / J. A. Malik, S. Ahmed, A. Mir [et al.] // Journal of Infection and Public Health. – 2022. – Т. 15. – The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine effectiveness. – № 2. – С. 228-240.
60. Assessing the Transmissibility of the New SARS-CoV-2 Variants: From Delta to Omicron / R. Dong, T. Hu, Y. Zhang [et al.] // Vaccines. – 2022. – Vol. 10. – Assessing the Transmissibility of the New SARS-CoV-2 Variants. – № 4. – P. 496.
61. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England / N. G. Davies, S. Abbott, R. C. Barnard [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2021. – Т. 372. – № 6538. – С. eabg3055.
62. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa / H. Tegally, E. Wilkinson, M. Giovanetti [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 592. – № 7854. – P. 438-443.
63. Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant / S. A. Madhi, V. Baillie, C. L. Cutland [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2021. – Vol. 384. – № 20. – P. 1885-1898.

64. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity / W. F. Garcia-Beltran, E. C. Lam, K. S. Denis [et al.] // *Cell*. – 2021. – T. 184. – № 9. – C. 2372-2383.e9.
65. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil / N. R. Faria, T. A. Mellan, C. Whittaker [et al.] // *Science*. – 2021. – T. 372. – № 6544. – C. 815-821.
66. Domingo, E. Interaction of virus populations with their hosts / E. Domingo // *Virus as Populations*. – 2020. – C. 123-166.
67. Liu, Y. The reproductive number of the Delta variant of SARS-CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus / Y. Liu, J. Rocklöv // *Journal of Travel Medicine*. – 2021. – T. 28. – № 7. – C. taab124.
68. Molecular basis of immune evasion by the Delta and Kappa SARS-CoV-2 variants / M. McCallum, A. C. Walls, K. R. Sprouse [et al.] // *Science*. – 2021. – T. 374. – № 6575. – C. 1621-1626.
69. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity / C. Motozono, M. Toyoda, J. Zahradnik [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2021. – T. 29. – № 7. – C. 1124-1136.e11.
70. SARS-CoV-2 spike mutations alter structure and energetics to modulate ACE2 binding immune evasion and viral adaptation / F. Ataya, A. Alamro, A. Alghamdi, D. Fouad // *Scientific Reports*. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 37546.
71. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation / A. Saito, T. Irie, R. Suzuki [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 602. – № 7896. – P. 300-306.
72. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets / T. P. Peacock, D. H. Goldhill, J. Zhou [et al.] // *Nature Microbiology*. – 2021. – T. 6. – № 7. – C. 899-909.
73. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [et al.] // *Cell*. – 2020. – T. 181. – № 2. – C. 271-280.e8.

74. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness / A. Sheikh, J. McMenamin, B. Taylor, C. Robertson // *The Lancet*. – 2021. – T. 397. – SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland. – № 10293. – C. 2461-2462.
75. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 and B. 1.351 variants to neutralizing antibodies / D. Planas, T. Bruel, L. Grzelak [et al.] // *Nature medicine*. – 2021. – T. 27. – № 5. – C. 917-924.
76. Thakur, V. OMICRON (B. 1.1. 529): a new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear / V. Thakur, R. K. Ratho // *Journal of medical virology*. – 2022. – T. 94. – № 5. – C. 1821-1824.
77. Third BNT162b2 Vaccination Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron Infection / I. Nemet, L. Kliker, Y. Lustig [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386. – № 5. – P. 492-494.
78. Effectiveness of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants / H. F. Tseng, B. K. Ackerson, Y. Luo [et al.] // *Nature medicine*. – 2022. – T. 28. – № 5. – C. 1063-1071.
79. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike / D. Yamasoba, I. Kimura, H. Nasser [et al.] // *Cell*. – 2022. – T. 185. – № 12. – C. 2103-2115.e19.
80. Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants / Q. Wang, S. Iketani, Z. Li [et al.] // *Cell*. – 2023. – T. 186. – № 2. – C. 279-286.e8.
81. Chakraborty, C. FLip mutations (L455F + F456L) in newly emerging VOI, JN.1: Its antibody and immune escape / C. Chakraborty, M. Bhattacharya // *International Immunopharmacology*. – 2024. – T. 133. – FLip mutations (L455F + F456L) in newly emerging VOI, JN.1. – C. 112146.
82. Evolving antibody response to SARS-CoV-2 antigenic shift from XBB to JN.1 / F. Jian, J. Wang, A. Yisimayi [et al.] // *Nature*. – 2025. – Vol. 637. – № 8047. – P. 921-929.

83. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity / B. Meng, A. Abdullahi, I. A. T. M. Ferreira [et al.] // *Nature*. – 2022. – T. 603. – № 7902. – C. 706-714.
84. Immune evasion, infectivity, and membrane fusion of the SARS-CoV-2 JN.1 variant / H. Tang, Y. Zhuo, J. Chen [et al.] // *Virology Journal*. – 2025. – Vol. 22. – № 1. – P. 162.
85. Effects of a Shift of the Signal Peptide Cleavage Site in Signal Peptide Variant on the Synthesis and Secretion of SARS-CoV-2 Spike Protein / Z. Zhang, X. Wan, X. Li, C. Wan // *Molecules*. – 2022. – T. 27. – № 19. – C. 6688.
86. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions / Z. Ke, J. Oton, K. Qu [et al.] // *Nature*. – 2020. – T. 588. – № 7838. – C. 498-502.
87. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges / B. Turoňová, M. Sikora, C. Schürmann [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 370. – № 6513. – P. 203-208.
88. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission / Y. Liu, J. Liu, K. S. Plante [et al.] // *Nature*. – 2022. – T. 602. – № 7896. – C. 294-299.
89. Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies / C. Yi, X. Sun, J. Ye [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2020. – Vol. 17. – № 6. – P. 621-630.
90. Ghimire, D. Structural plasticity and immune evasion of SARS-CoV-2 spike variants / D. Ghimire, Y. Han, M. Lu // *Viruses*. – 2022. – T. 14. – № 6. – C. 1255.
91. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells / C. B. Jackson, M. Farzan, B. Chen, H. Choe // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2022. – Vol. 23. – № 1. – P. 3-20.
92. Identification of a conserved S2 epitope present on spike proteins from all highly pathogenic coronaviruses / R. P. Silva, Y. Huang, A. W. Nguyen [et al.] // *eLife*. – 2023. – T. 12. – C. e83710.
93. SARS-CoV-2 spike conformation determines plasma neutralizing activity elicited by a wide panel of human vaccines / J. E. Bowen, Y.-J. Park, C. Stewart [et al.] // *Science Immunology*. – 2022. – T. 7. – № 78. – C. eadf1421.

94. Tan, T. J. Evidence of antigenic drift in the fusion machinery core of SARS-CoV-2 spike / T. J. Tan, A. K. Verma, A. Odle // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2024. – T. 121. – № 15. – C. e2317222121.
95. Prediction of linear B-cell epitopes based on protein sequence features and BERT embeddings / F. Liu, C. Yuan, H. Chen, F. Yang // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 2464.
96. Deng, X. Enhancing antibody patent protection using epitope mapping information / X. Deng, U. Storz, B. J. Doranz // *mAbs*. – 2017. – T. 10. – № 2. – C. 204-209.
97. Daëron, M. The function of antibodies / M. Daëron // *Immunological Reviews*. – 2024. – T. 328. – № 1. – C. 113-125.
98. Neutralizing antibody immune correlates in COVAIL trial recipients of an mRNA second COVID-19 vaccine boost / B. Zhang, Y. Fong, L. Dang [et al.] // *Nature communications*. – 2025. – T. 16. – № 1. – C. 759.
99. Fc-effector functional antibody assays for SARS-CoV-2 variants of concern / X. Chen, G. Li, C. Ciric [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – T. 16. – C. 1571835.
100. Fc-engineered antibody therapeutics with improved anti-SARS-CoV-2 efficacy / R. Yamin, A. T. Jones, H.-H. Hoffmann [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 599. – № 7885. – P. 465-470.
101. Izadi, A. Protective non-neutralizing SARS-CoV-2 monoclonal antibodies / A. Izadi, P. Nordenfelt // *Trends in immunology*. – 2024. – T. 45. – № 8. – C. 609-624.
102. BNT162b2-induced neutralizing and non-neutralizing antibody functions against SARS-CoV-2 diminish with age / T. A. Bates, P. Lu, Y. J. Kang [et al.] // *Cell reports*. – 2022. – T. 41. – № 4.
103. Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses / Y. Chen, X. Zhao, H. Zhou [et al.] // *Nature Reviews. Immunology*. – 2023. – T. 23. – № 3. – C. 189-199.
104. *Immunobiology* / K. Murphy, P. Travers, M. Walport, C. Janeway. – Garland Science New York, NY, 2012.

105. Selective CD4 T cell help for antibody responses to a large viral pathogen: deterministic linkage of specificities / A. Sette, M. Moutaftsi, J. Moyron-Quiroz [et al.] // *Immunity*. – 2008. – T. 28. – Selective CD4 T cell help for antibody responses to a large viral pathogen. – № 6. – С. 847-858.
106. Molecular basis of potent antiviral HLA-C-restricted CD8⁺ T cell response to an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope / Y. Goto, Y. M. Ahn, M. Toyoda [et al.] // *Nature Communications*. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 8062.
107. SARS-CoV-2 Spike-Specific CD4⁺ T Cell Response Is Conserved Against Variants of Concern, Including Omicron / A. Mazzoni, A. Vanni, M. Spinicci [et al.]. – Текст: электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – T. 13. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.801431/full> (дата обращения: 23.01.2026).
108. Sankaranarayanan, S. Mutations in spike protein T cell epitopes of SARS-COV-2 variants: Plausible influence on vaccine efficacy / S. Sankaranarayanan, M. Mohkhedkar, V. Janakiraman // *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. – 2022. – T. 1868. – Mutations in spike protein T cell epitopes of SARS-COV-2 variants. – № 9. – С. 166432.
109. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases / A. Tarke, J. Sidney, C. K. Kidd [et al.] // *Cell Reports Medicine*. – 2021. – T. 2. – № 2. – С. 100204.
110. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies / W. S. Lee, A. K. Wheatley, S. J. Kent, B. J. DeKosky // *Nature Microbiology*. – 2020. – Vol. 5. – № 10. – P. 1185-1191.
111. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy / S. Sridhar, A. Luedtke, E. Langevin [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2018. – T. 379. – № 4. – С. 327-340.
112. Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus / T. Hohdatsu, M. Yamada,

- R. Tominaga [et al.] // The Journal of Veterinary Medical Science. – 1998. – T. 60. – № 1. – C. 49-55.
113. Graham, B. S. Vaccines Against Respiratory Syncytial Virus: The Time Has Finally Come / B. S. Graham // Vaccine. – 2016. – T. 34. – Vaccines Against Respiratory Syncytial Virus. – № 30. – C. 3535-3541.
114. Polack, F. P. Atypical Measles and Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease (ERD) Made Simple / F. P. Polack // Pediatric Research. – 2007. – Vol. 62. – № 1. – P. 111-115.
115. Coish, J. M. The SARS-CoV-2 antibody-dependent enhancement façade / J. M. Coish, L. A. MacNeil, A. J. MacNeil // Microbes and Infection. – 2025. – T. 27. – № 3. – C. 105464.
116. Channappanavar, R. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology / R. Channappanavar, S. Perlman // Seminars in Immunopathology. – 2017. – Vol. 39. – Pathogenic human coronavirus infections. – № 5. – P. 529-539.
117. Circulating multimeric immune complexes contribute to immunopathology in COVID-19 / J. Ankerhold, S. Giese, P. Kolb [et al.] // Nature Communications. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 5654.
118. Covid-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B. 1.1. 529) variant / N. Andrews, J. Stowe, F. Kirsebom [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2022. – T. 386. – № 16. – C. 1532-1546.
119. Theoharides, T. C. Could SARS-CoV-2 Spike Protein Be Responsible for Long-COVID Syndrome? / T. C. Theoharides // Molecular Neurobiology. – 2022. – Vol. 59. – № 3. – P. 1850-1861.
120. Perico, L. SARS-CoV-2 and the spike protein in endotheliopathy / L. Perico, A. Benigni, G. Remuzzi // Trends in microbiology. – 2024. – T. 32. – № 1. – C. 53-67.
121. Unraveling the SARS-CoV-2 spike protein long-term effect on neuro-PASC / F. Menezes, J. da F. Palmeira, J. dos S. Oliveira [et al.] // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2024. – T. 18. – C. 1481963.

122. The SARS-CoV-2 spike protein subunit S1 induces COVID-19-like acute lung injury in K18-hACE2 transgenic mice and barrier dysfunction in human endothelial cells / R. M. L. Colunga Biancatelli, P. A. Solopov, E. R. Sharlow [et al.] // American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2021. – T. 321. – № 2. – C. L477-L484.
123. TLR2/4 are novel activating receptors for SARS-CoV-2 spike protein on NK cells / N. Landolina, B. Ricci, I. Veneziani [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2024. – T. 15. – C. 1368946.
124. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway / S. Khan, M. S. Shafiei, C. Longoria [et al.] // elife. – 2021. – T. 10. – C. e68563.
125. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin $\alpha 5\beta 1$ and NF- κ B signaling / J. P. Robles, M. Zamora, E. Adan-Castro [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2022. – T. 298. – № 3. – C. 101695.
126. Variable Induction of Pro-Inflammatory Cytokines by Commercial SARS CoV-2 Spike Protein Reagents: Potential Impacts of LPS on In Vitro Modeling and Pathogenic Mechanisms In Vivo / W. Ouyang, T. Xie, H. Fang [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – Variable Induction of Pro-Inflammatory Cytokines by Commercial SARS CoV-2 Spike Protein Reagents. – № 14. – C. 7540.
127. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines / M. Zheng, R. Karki, E. P. Williams [et al.] // Nature immunology. – 2021. – T. 22. – № 7. – C. 829-838.
128. Differential proinflammatory activities of Spike proteins of SARS-CoV-2 variants of concern / S. D. Tyrkalska, A. Martínez-López, A. B. Arroyo [et al.] // Science advances. – 2022. – T. 8. – № 37. – C. eabo0732.
129. SARS-CoV-2 spike protein as a bacterial lipopolysaccharide delivery system in an overzealous inflammatory cascade / F. Samsudin, P. Raghuvamsi, G. Petruk [et al.] // Journal of Molecular Cell Biology. – 2022. – T. 14. – № 9. – C. mjac058.

130. SARS-CoV-2 spike protein binds to bacterial lipopolysaccharide and boosts proinflammatory activity / G. Petruk, M. Puthia, J. Petrlova [et al.] // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2020. – T. 12. – № 12. – C. 916-932.
131. Long-lived macrophage reprogramming drives spike protein-mediated inflammasome activation in COVID-19 / S. J. Theobald, A. Simonis, T. Georgomanolis [и др.] // *EMBO Molecular Medicine*. – 2021. – T. 13. – № 8. – C. e14150.
132. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine / L. R. Baden, H. M. El Sahly, B. Essink [et al.] // *New England journal of medicine*. – 2021. – T. 384. – № 5. – C. 403-416.
133. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK / M. Voysey, S. A. C. Clemens, S. A. Madhi [et al.] // *The Lancet*. – 2021. – T. 397. – № 10269. – C. 99-111.
134. Final analysis of efficacy and safety of single-dose Ad26. COV2. S / J. Sadoff, G. Gray, A. Vandebosch [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – T. 386. – № 9. – C. 847-860.
135. Effectiveness of the first component of Gam-COVID-Vac (Sputnik V) on reduction of SARS-CoV-2 confirmed infections, hospitalisations and mortality in patients aged 60-79: a retrospective cohort study in Argentina / S. González, S. Olszevicki, M. Salazar [et al.] // *EClinicalMedicine*. – 2021. – T. 40.
136. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine / P. T. Heath, E. P. Galiza, D. N. Baxter [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – T. 385. – № 13. – C. 1172-1183.
137. Assessment of Safety and Prophylactic Efficacy of the EpiVacCorona Peptide Vaccine for COVID-19 Prevention (Phase III) / A. B. Ryzhikov, E. A. Ryzhikov, M. P. Bogryantseva [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 5. – P. 998.
138. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial / Y. Zhang, G. Zeng, H. Pan [et al.] // *The Lancet infectious diseases*. – 2021. – T. 21. – № 2. – C. 181-192.

139. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2 / H. Wang, Y. Zhang, B. Huang [et al.] // *Cell*. – 2020. – T. 182. – № 3. – C. 713-721.
140. Safety and Immunogenicity of Inactivated Whole Virion COVID-19 Vaccine CoviVac in Clinical Trials in 18–60 and 60+ Age Cohorts / I. V. Gordeychuk, L. I. Kozlovskaya, A. A. Siniugina [et al.] // *Viruses*. – 2023. – T. 15. – № 9. – C. 1828.
141. Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B. 1.617. 2 (Delta) variant. / J. L. Bernal, N. Andrews, C. Gower [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – T. 385. – № 7. – C. 585-594.
142. Effectiveness of COVID-19 Vaccines over 13 Months Covering the Period of the Emergence of the Omicron Variant in the Swedish Population / Y. Xu, H. Li, B. Kirui [et al.] // *Vaccines*. – 2022. – T. 10. – № 12. – C. 2074.
143. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA / Z. Wang, J. C. C. Lorenzi, F. Muecksch [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2021. – T. 13. – № 577. – C. eabf1555.
144. Increased in vitro neutralizing activity of SARS-CoV-2 IgA1 dimers compared to monomers and IgG / L. Sun, S. Kallolimath, R. Palt [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2021. – T. 118. – № 44. – C. e2107148118.
145. 7-month duration of SARS-CoV-2 mucosal immunoglobulin-A responses and protection / U. Marking, O. Bladh, S. Havervall [et al.] // *The Lancet. Infectious Diseases*. – 2023. – T. 23. – № 2. – C. 150-152.
146. Protective effectiveness of previous SARS-CoV-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: a systematic review and meta-regression / N. Bobrovitz, H. Ware, X. Ma [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2023. – T. 23. – № 5. – C. 556-567.
147. Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination / J. Tang, C. Zeng, T. M. Cox [et al.] // *Science Immunology*. – 2022. – T. 7. – № 76. – C. eadd4853.

148. Mucosal immune responses following a fourth SARS-CoV-2 vaccine dose / O. Bladh, U. Marking, S. Havervall [et al.]. – Текст : электронный // The Lancet. Microbe. – 2023. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10115585/> (дата обращения: 12.01.2026).
149. Mucosal immune response after the booster dose of the BNT162b2 COVID-19 vaccine / L. Azzi, D. Dalla Gasperina, G. Veronesi [et al.] // eBioMedicine. – 2023. – Т. 88. – С. 104435.
150. Correlates of protection and viral load trajectories in omicron breakthrough infections in triple vaccinated healthcare workers / U. Marking, S. Havervall, N. G. Norin [et al.] // Nature Communications. – 2023. – Т. 14. – № 1. – С. 1577.
151. SARS-CoV-2 breakthrough infection induces rapid memory and de novo T cell responses / M. Koutsakos, A. Reynaldi, W. S. Lee [et al.] // Immunity. – 2023. – Т. 56. – № 4. – С. 879-892.e4.
152. Antibody longevity and waning following COVID-19 vaccination in a 1-year longitudinal cohort in Bangladesh / M. A. Haq, A. K. Roy, R. Ahmed [et al.] // Scientific Reports. – 2024. – Т. 14. – № 1. – С. 11467.
153. IgG4 antibodies induced by repeated vaccination may generate immune tolerance to the SARS-CoV-2 spike protein / V. N. Uversky, E. M. Redwan, W. Makis, A. Rubio-Casillas // Vaccines. – 2023. – Т. 11. – № 5. – С. 991.
154. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization / S. Cele, L. Jackson, D. S. Khoury [et al.] // Nature. – 2022. – Vol. 602. – № 7898. – P. 654-656.
155. Rates of SARS-CoV-2 transmission and vaccination impact the fate of vaccine-resistant strains / S. A. Rella, Y. A. Kulikova, E. T. Dermitzakis, F. A. Kondrashov // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 15729.
156. Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens / A. F. Read, S. J. Baigent, C. Powers [et al.] // PLoS Biology. – 2015. – Т. 13. – № 7. – С. e1002198.
157. Boni, M. F. Vaccination and antigenic drift in influenza / M. F. Boni // Vaccine. – 2008. – Т. 26. – № Suppl 3. – С. C8-14.

158. Population immunity predicts evolutionary trajectories of SARSCoV-2 / M. Meijers, D. Ruchnewitz, J. Eberhardt [et al.] // *Cell*. – 2023. – T. 186. – № 23. – C. 5151-5164.e13.
159. Impact of systemic SARS-CoV-2 vaccination on mucosal IgA responses to subsequent breakthrough infection / U. Marking, O. Bladh, K. Aguilera [et al.] // *eBioMedicine*. – 2025. – Vol. 120. – P. 105912.
160. Silva-Sanchez, A. Spiking SARS-CoV-2 antiviral immunity in the respiratory tract / A. Silva-Sanchez, T. D. Randall // *Trends in Immunology*. – 2023. – T. 44. – № 2. – C. 87-89.
161. Upper respiratory tract mucosal immunity for SARS-CoV-2 vaccines / R. Fraser, A. Orta-Resendiz, A. Mazein, D. H. Dockrell // *Trends in Molecular Medicine*. – 2023. – T. 29. – № 4. – C. 255-267.
162. A Single Dose of BNT162b2 mRNA Vaccine Induces Airway Immunity in SARS-CoV-2 Naive and recovered COVID-19 subjects / E. MARTINUZZI, J. BENZAQUEN, O. GUERIN [et al.] // *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2022. – C. ciac378.
163. Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B. 1.617. 2 (Delta) variant / J. Lopez Bernal, N. Andrews, C. Gower [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – T. 385. – № 7. – C. 585-594.
164. Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2 / L. Liu, S. Iketani, Y. Guo [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 602. – № 7898. – P. 676-681.
165. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies / Y. Cao, J. Wang, F. Jian [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 602. – № 7898. – P. 657-663.
166. Kherabi, Y. COVID-19 vaccines against Omicron variant: real-world data on effectiveness / Y. Kherabi, O. Launay, L. B. Luong Nguyen // *Viruses*. – 2022. – T. 14. – № 10. – C. 2086.
167. Bivalent SARS-CoV-2 mRNA vaccines increase breadth of neutralization and protect against the BA.5 Omicron variant in mice / S. M. Scheaffer, D. Lee, B. Whitener [et al.] // *Nature Medicine*. – 2023. – Vol. 29. – № 1. – P. 247-257.

168. XBB. 1.5 monovalent mRNA vaccine booster elicits robust neutralizing antibodies against XBB subvariants and JN. 1 / Q. Wang, Y. Guo, A. Bowen [et al.] // *Cell host & microbe*. – 2024. – T. 32. – № 3. – C. 315-321.
169. Antigenicity and infectivity characterisation of SARS-CoV-2 BA. 2.86 / S. Yang, Y. Yu, F. Jian [et al.] // *The Lancet infectious diseases*. – 2023. – T. 23. – № 11. – C. e457-e459.
170. Panagiotakopoulos, L. Use of COVID-19 vaccines for persons aged ≥ 6 months: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices–United States, 2024–2025 / L. Panagiotakopoulos // *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2024. – T. 73.
171. Statement on the antigen composition of COVID-19 vaccines. – URL: <https://www.who.int/news/item/15-05-2025-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines> (date accessed: 09.01.2026). – Text : electronic.
172. Lymphocytes and the Cellular Basis of Adaptive Immunity / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis [et al.]. – Text : electronic // *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. – Garland Science, 2002. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26921/> (date accessed: 10.01.2026).
173. Akkaya, M. B cell memory: building two walls of protection against pathogens / M. Akkaya, K. Kwak, S. K. Pierce // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – B cell memory. – № 4. – P. 229-238.
174. Exposure to two antigenically distinct SARS-CoV-2 variants broadens neutralization patterns / M. M. Schmitt, A. Rössler, A. Netzl [et al.] // *Vaccine*. – 2025. – T. 62. – C. 127459.
175. Francis, T. On the doctrine of original antigenic sin / T. Francis // *Proceedings of the American Philosophical Society*. – 1960. – T. 104. – № 6. – C. 572-578.
176. Age-specific differences in the dynamics of protective immunity to influenza / S. Ranjeva, R. Subramanian, V. J. Fang [et al.] // *Nature communications*. – 2019. – T. 10. – № 1. – C. 1660.

177. Persistent immune imprinting occurs after vaccination with the COVID-19 XBB.1.5 mRNA booster in humans / M. A. Tortorici, A. Addetia, A. J. Seo [et al.] // *Immunity*. – 2024. – T. 57. – № 4. – C. 904-911.e4.
178. Imprinted antibody responses against SARS-CoV-2 Omicron sublineages / Y.-J. Park, D. Pinto, A. C. Walls [et al.] // *Science*. – 2022. – T. 378. – № 6620. – C. 619-627.
179. Recall of preexisting cross-reactive B cell memory after Omicron BA. 1 breakthrough infection / C. I. Kaku, A. J. Bergeron, C. Ahlm [et al.] // *Science immunology*. – 2022. – T. 7. – № 73. – C. eabq3511.
180. Repeated Omicron exposures override ancestral SARS-CoV-2 immune imprinting / A. Yisimayi, W. Song, J. Wang [et al.] // *Nature*. – 2024. – Vol. 625. – № 7993. – P. 148-156.
181. Strategies to alleviate original antigenic sin responses to influenza viruses / J. H. Kim, W. G. Davis, S. Sambhara, J. Jacob // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – T. 109. – № 34. – C. 13751-13756.
182. Profiling B cell immunodominance after SARS-CoV-2 infection reveals antibody evolution to non-neutralizing viral targets / H. L. Dugan, C. T. Stamper, L. Li [et al.] // *Immunity*. – 2021. – T. 54. – № 6. – C. 1290-1303.
183. Brandtzaeg, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions / P. Brandtzaeg // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2009. – T. 70. – Mucosal immunity. – № 6. – C. 505-515.
184. Mestecky, J. Mucosal immunoglobulins and their contribution to defence mechanisms: an overview / J. Mestecky, M. W. Russell // *Biochemical Society Transactions*. – 1997. – T. 25. – Mucosal immunoglobulins and their contribution to defence mechanisms. – № 2. – C. 457-462.
185. Morrison, L. A. Influence of mucosal and parenteral immunization with a replication-defective mutant of HSV-2 on immune responses and protection from genital challenge / L. A. Morrison, X. J. Da Costa, D. M. Knipe // *Virology*. – 1998. – T. 243. – № 1. – C. 178-187.

186. Levinson, S. S. Is Measurement of Systemic IgG Antibodies the Wrong Way to Assess COVID-19 Vaccine Effectiveness for Breakthrough Infections? / S. S. Levinson // The Journal of Applied Laboratory Medicine. – 2022. – C. jfac049.
187. Enhanced FcRn-dependent transepithelial delivery of IgG by Fc-engineering and polymerization / S. Foss, A. Grevys, K. M. K. Sand [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2016. – T. 223. – C. 42-52.
188. A Neonatal Fc Receptor-Targeted Mucosal Vaccine Strategy Effectively Induces HIV-1 Antigen-Specific Immunity to Genital Infection / L. Lu, S. Palaniyandi, R. Zeng [et al.] // Journal of Virology. – 2011. – Vol. 85. – № 20. – P. 10542.
189. Tosta, E. The seven constitutive respiratory defense barriers against SARS-CoV-2 infection / E. Tosta // Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. – T. 54. – C. e0461-2021.
190. Mucus / A. McShane, J. Bath, A. M. Jaramillo [et al.] // Current biology : CB. – 2021. – T. 31. – № 15. – C. R938-R945.
191. Chilvers, M. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods / M. Chilvers, C. O'Callaghan // Thorax. – 2000. – T. 55. – Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging. – № 4. – C. 314-317.
192. Inflammatory and Microbiota-Related Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier / G. Barbara, M. R. Barbaro, D. Fuschi [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2021. – T. 8. – C. 718356.
193. Randall, T. D. The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with micro-organisms / T. D. Randall, R. E. Mebius // Mucosal Immunology. – 2014. – Vol. 7. – The development and function of mucosal lymphoid tissues. – № 3. – P. 455-466.
194. Trivedi, A. The lymphatic vasculature in lung function and respiratory disease / A. Trivedi, H. O. Reed // Frontiers in Medicine. – 2023. – T. 10. – C. 1118583.
195. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue / P. Brandtzaeg, H. Kiyono, R. Pabst, M. W. Russell // Mucosal Immunology. – 2008. – T. 1. – Terminology. – № 1. – C. 31-37.

196. Kiyono, H. Mucosal immune system: Features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development / H. Kiyono // *Reg Immunol.* – 1992. – T. 4. – C. 52-62.
197. Rumbo, M. Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity / M. Rumbo, E. J. Schiffrin // *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS.* – 2005. – T. 62. – № 12. – C. 1288-1296.
198. Czerkinsky, C. Vaccines against enteric infections for the developing world / C. Czerkinsky, J. Holmgren // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* – 2015. – T. 370. – № 1671. – C. 20150142.
199. Pabst, R. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)–Structure, function and species differences / R. Pabst // *Vaccine.* – 2015. – T. 33. – № 36. – C. 4406-4413.
200. Dillon, A. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance / A. Dillon, D. D. Lo // *Frontiers in Immunology.* – 2019. – T. 10. – M Cells. – C. 1499.
201. Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human adenoids / N. Ogasawara, T. Kojima, M. Go [et al.] // *Acta oto-laryngologica.* – 2011. – T. 131. – № 2. – C. 116-123.
202. Imaging murine NALT following intranasal immunization with flagellin-modified circumsporozoite protein malaria vaccines / A. Nacer, D. Carapau, R. Mitchell [et al.] // *Mucosal Immunology.* – 2014. – Vol. 7. – № 2. – P. 304-314.
203. Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids / L. E. Wagar, A. Salahudeen, C. M. Constantz [et al.] // *Nature medicine.* – 2021. – T. 27. – № 1. – C. 125-135.
204. Randall, T. D. Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT) / T. D. Randall // *Advances in Immunology.* – 2010. – T. 107. – C. 187-241.
205. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract / P. G. Holt, D. H. Strickland, M. E. Wikström, F. L. Jahnsen // *Nature Reviews Immunology.* – 2008. – Vol. 8. – № 2. – P. 142-152.
206. Inhalation of diesel exhaust for three months affects major cytokine expression and induces bronchus-associated lymphoid tissue formation in murine lungs /

- K. Hiramatsu, A. Azuma, S. Kudoh [et al.] // *Experimental Lung Research*. – 2003. – T. 29. – № 8. – C. 607-622.
207. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF / M. Guillemins, I. De Kleer, S. Henri [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2013. – T. 210. – № 10. – C. 1977-1992.
208. Mucosal vaccination in mice provides protection from diverse respiratory threats / H. Zhang, K. Floyd, Z. Fang [et al.] // *Science*. – 2026. – C. eaea1260.
209. A single intranasal dose of chimpanzee adenovirus-vectored vaccine protects against SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques / A. O. Hassan, F. Feldmann, H. Zhao [et al.] // *Cell Reports Medicine*. – 2021. – T. 2. – № 4. – C. 100230.
210. Mucosal adenovirus vaccine boosting elicits IgA and durably prevents XBB.1.16 infection in nonhuman primates / M. Gagne, B. J. Flynn, S. F. Andrew [et al.] // *Nature Immunology*. – 2024. – Vol. 25. – № 10. – P. 1913-1927.
211. Harnessing the potential of the NALT and BALT as targets for immunomodulation using engineering strategies to enhance mucosal uptake / M. L. Seefeld, E. L. Templeton, J. M. Lehtinen [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – T. 15. – C. 1419527.
212. A ROR γ t⁺ cell instructs gut microbiota-specific Treg cell differentiation / R. Kedmi, T. A. Najar, K. R. Mesa [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 610. – № 7933. – P. 737-743.
213. Mowat, A. M. Regional specialization within the intestinal immune system / A. M. Mowat, W. W. Agace // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – Vol. 14. – № 10. – P. 667-685.
214. FOXP3⁺ regulatory T cells and their functional regulation / Z. Li, D. Li, A. Tsun, B. Li // *Cellular and Molecular Immunology*. – 2015. – T. 12. – № 5. – C. 558-565.
215. Tordesillas, L. Mechanisms of oral tolerance / L. Tordesillas, M. C. Berin // *Clinical reviews in allergy & immunology*. – 2018. – T. 55. – № 2. – C. 107-117.
216. Faria, A. M. C. Oral Tolerance: Therapeutic Implications for Autoimmune Diseases / A. M. C. Faria, H. L. Weiner // *Clinical and Developmental Immunology*. – 2006. – T. 13. – Oral Tolerance. – № 2-4. – C. 143-157.

217. Induction of tolerance via the respiratory mucosa / J. L. Lowrey, N. D. Savage, D. Palliser [et al.] // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 1998. – T. 116. – № 2. – C. 93-102.
218. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3⁺ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance / O. Palomares, B. Rückert, T. Jartti [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2012. – T. 129. – № 2. – C. 510-520.e9.
219. Kaetzel, C. S. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces / C. S. Kaetzel // *Immunological Reviews*. – 2005. – T. 206. – The polymeric immunoglobulin receptor. – C. 83-99.
220. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 / D. Sterlin, A. Mathian, M. Miyara [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2021. – T. 13. – № 577. – C. eabd2223.
221. Zheng, M. Z. M. Tissue resident memory T cells in the respiratory tract / M. Z. M. Zheng, L. M. Wakim // *Mucosal Immunology*. – 2022. – T. 15. – № 3. – C. 379-388.
222. Schenkel, J. M. Tissue-Resident Memory T Cells / J. M. Schenkel, D. Masopust // *Immunity*. – 2014. – T. 41. – № 6. – C. 886-897.
223. Sabin, A. B. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world / A. B. Sabin. – 1985.
224. Holmgren, J. Mucosal immunity and vaccines / J. Holmgren, C. Czerkinsky // *Nature medicine*. – 2005. – T. 11. – № Suppl 4. – C. S45-S53.
225. Carter, N. J. Live Attenuated Influenza Vaccine (FluMist®; Fluenz™) / N. J. Carter, M. P. Curran // *Drugs*. – 2011. – Vol. 71. – № 12. – P. 1591-1622.
226. A pandemic influenza vaccine in India: from strain to sale within 12 months / R. Dhere, L. Yeolekar, P. Kulkarni [et al.] // *Vaccine*. – 2011. – T. 29. – C. A16-A21.
227. Seasonal FluMist vaccination induces cross-reactive T cell immunity against H1N1 (2009) influenza and secondary bacterial infections / K. Sun, J. Ye, D. R. Perez, D. W. Metzger // *Journal of Immunology*. – 2011. – T. 186. – № 2. – C. 987-993.

228. 577. COVI-VACTM, a Live Attenuated COVID-19 Vaccine, Provides Single Dose Protection Against Heterologous Challenge with SARS-CoV-2 Beta (B.1.351) in the Syrian Golden Hamster Model / A. Kushnir, S. Mueller, S. Tasker, J. Robert Coleman // Open Forum Infectious Diseases. – 2021. – T. 8. – № Suppl 1. – C. S390.
229. 584. Phase 1 Placebo-Controlled Trial of COVI-VACTM, an Intranasal, Live Attenuated COVID-19 Vaccine / S. Tasker, D. Bendel, M. Bevan [et al.] // Open Forum Infectious Diseases. – 2021. – T. 8. – C. S394.
230. He, D. C. Discovery of vaccine-like recombinant SARS-CoV-2 circulating in human / D. C. He, C.-Q. He // Virology Journal. – 2022. – Vol. 19. – № 1. – P. 209.
231. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus / O. Kew, V. Morris-Glasgow, M. Landaverde [et al.] // Science. – 2002. – T. 296. – № 5566. – C. 356-359.
232. Grohskopf, L. A. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2023–24 influenza season / L. A. Grohskopf // MMWR. Recommendations and Reports. – 2023. – T. 72.
233. mRNA vaccines – a new era in vaccinology / N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman // Nature reviews. Drug discovery. – 2018. – T. 17. – № 4. – C. 261-279.
234. COVID-19 vaccine-associated myocarditis: Analysis of the suspected cases reported to the EudraVigilance and a systematic review of the published literature / V. Jaiswal, D. Mukherjee, S. Peng Ang [et al.] // IJC Heart & Vasculature. – 2023. – T. 49. – COVID-19 vaccine-associated myocarditis. – C. 101280.
235. Evaluating the safety of XBB.1.5-containing COVID-19 mRNA vaccines using a self-controlled case series study / Y. Pan, Y. Han, C. Zhou [et al.] // Nature Communications. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 6514.
236. Intranasal mRNA-LNP vaccination protects hamsters from SARS-CoV-2 infection / G. Baldeon Vaca, M. Meyer, A. Cadete [et al.] // Science Advances. – 2023. – T. 9. – № 38. – C. eadh1655.
237. Enhanced mucosal immune responses and reduced viral load in the respiratory tract of ferrets to intranasal lipid nanoparticle-based SARS-CoV-2 proteins and mRNA

- vaccines / P. A. Boley, C. M. Lee, J. Schrock [et al.] // Journal of Nanobiotechnology. – 2023. – T. 21. – № 1. – C. 60.
238. Deconvolution of cargo delivery and immunogenicity following intranasal delivery of mRNA lipid nanoparticle vaccines / M. N. Vu, D. Pilapitiya, A. Kelly [et al.] // Molecular Therapy. Nucleic Acids. – 2025. – T. 36. – № 2. – C. 102547.
239. A chitosan-mediated inhalable nanovaccine against SARS-CoV-2 / S.-H. Zhuo, J.-J. Wu, L. Zhao [et al.] // Nano Research. – 2022. – T. 15. – № 5. – C. 4191-4200.
240. Towards the future exploration of mucosal mRNA vaccines against emerging viral diseases; lessons from existing next-generation mucosal vaccine strategies / S. A. Hameed, S. Paul, G. K. Y. Dellosa [et al.] // npj Vaccines. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 71.
241. Gold-nanostar-chitosan-mediated delivery of SARS-CoV-2 DNA vaccine for respiratory mucosal immunization: development and proof-of-principle / U. S. Kumar, R. Afjei, K. Ferrara [et al.] // ACS nano. – 2021. – T. 15. – № 11. – C. 17582-17601.
242. Petrovsky, N. Clinical development of SpikoGen®, an Advax-CpG55.2 adjuvanted recombinant spike protein vaccine / N. Petrovsky // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – T. 20. – № 1. – C. 2363016.
243. Estimated effectiveness of a primary cycle of protein recombinant vaccine NVX-CoV2373 against COVID-19 / A. Mateo-Urdiales, C. Sacco, D. Petrone [et al.] // JAMA network open. – 2023. – T. 6. – № 10. – C. e2336854.
244. Efficacy of a bivalent (D614+ B. 1.351) SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine with AS03 adjuvant in adults: a phase 3, parallel, randomised, modified double-blind, placebo-controlled trial / G. H. Dayan, N. Roupheal, S. R. Walsh [et al.] // The Lancet Respiratory Medicine. – 2023. – T. 11. – № 11. – C. 975-990.
245. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity / J. Yang, W. Wang, Z. Chen [et al.] // Nature. – 2020. – T. 586. – № 7830. – C. 572-577.
246. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? / A. S. McKee, M. K. MacLeod, J. W. Kappler, P. Marrack // BMC Biology. – 2010. – T. 8. – Immune mechanisms of protection. – C. 37.

247. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland / M. Mutsch, W. Zhou, P. Rhodes [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2004. – T. 350. – № 9. – C. 896-903.
248. Single-dose intranasal vaccination elicits systemic and mucosal immunity against SARS-CoV-2 / X. An, M. Martinez-Paniagua, A. Rezvan [et al.] // iScience. – 2021. – T. 24. – № 9. – C. 103037.
249. Safety and Efficacy of Combined Intramuscular/Intranasal RAZI-COV PARS Vaccine Candidate Against SARS-CoV-2: A Preclinical Study in Several Animal Models / S. R. Banihashemi, A. Es-haghi, M. H. Fallah Mehrabadi [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2022. – T. 13. – Safety and Efficacy of Combined Intramuscular/Intranasal RAZI-COV PARS Vaccine Candidate Against SARS-CoV-2. – C. 836745.
250. Immunogenicity and Safety of a Combined Intramuscular/Intranasal Recombinant Spike Protein COVID-19 Vaccine (RCP) in Healthy Adults Aged 18 to 55 Years Old: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase I Trial / M. S. Dodaran, S. R. Banihashemi, A. Es-haghi [et al.]. – Text : electronic // Vaccines. – 2023. – Vol. 11. – Immunogenicity and Safety of a Combined Intramuscular/Intranasal Recombinant Spike Protein COVID-19 Vaccine (RCP) in Healthy Adults Aged 18 to 55 Years Old. – № 2. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-393X/11/2/455> (date accessed: 05.03.2026).
251. Phase II, Safety and Immunogenicity of RAZI Cov Pars (RCP) SARS Cov-2 Vaccine in Adults Aged 18-70 Years; A Randomized, Double-Blind Clinical Trial / A. Mohazzab, M. H. Fallah Mehrabadi, A. Es-Haghi [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2023. – T. 112. – № 12. – C. 3012-3021.
252. Safety and efficacy of RCP recombinant spike protein covid-19 vaccine compared to Sinopharm BBIBP: A phase III, non-inferiority trial / M. Solaymani-Dodaran, S. Kalantari, S. R. Banihashemi [et al.] // Heliyon. – 2024. – T. 10. – Safety and efficacy of RCP recombinant spike protein covid-19 vaccine compared to Sinopharm BBIBP. – № 5. – C. e27370.

253. Sharifzadeh, M. A Review of Virus-Like Particle-Based SARS-CoV-2 Vaccines in Clinical Trial Phases / M. Sharifzadeh, N. Mottaghi-Dastjerdi, M. Soltany Rezae Raad // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*. – 2022. – T. 21. – № 1. – C. e127042.
254. Immunogenicity of intraperitoneal and intranasal liposome adjuvanted VLP vaccines against SARS-CoV-2 infection / M. Chulanetra, P. Punnakitkashem, K. Mahasongkram [et al.] // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 27311.
255. Sakurai, F. Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases / F. Sakurai, M. Tachibana, H. Mizuguchi // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2022. – T. 42. – C. 100432.
256. Enhanced Tropism of Species B1 Adenoviral-Based Vectors for Primary Human Airway Epithelial Cells / N. Li, A. L. Cooney, W. Zhang [et al.] // *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*. – 2019. – T. 14. – C. 228-236.
257. Genetic and Chemical Capsid Modifications of Adenovirus Vectors to Modulate Vector–Host Interactions / D. Weklak, D. Pembaur, G. Koukou [et al.] // *Viruses*. – 2021. – T. 13. – № 7. – C. 1300.
258. Tang, J. Past, Present, and Future of Viral Vector Vaccine Platforms: A Comprehensive Review / J. Tang, M. A. Amin, J. L. Campian // *Vaccines*. – 2025. – T. 13. – Past, Present, and Future of Viral Vector Vaccine Platforms. – № 5. – C. 524.
259. The seroprevalence of adenoviruses since 2000 / L. Hong, J. Li, W. Zeng [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – T. 14. – № 1. – C. 2475831.
260. Thrombosis and bleeding in patients with vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia: a systematic review of published cases / B. Clerici, E. Pontisso, C. Aloise [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2024. – T. 124. – № 05. – C. 423-431.
261. Comparison of vaccine-induced immune thrombocytopenia and thrombosis cases following two adenovirus-vectored COVID-19 vaccines / R. Van Rampelbergh, S. Pavord, L. Anaya-Velarde [et al.] // *Communications Medicine*. – 2025. – Vol. 5. – № 1. – P. 168.

262. Intranasal delivery of an adenovirus-vector vaccine co-expressing a modified spike protein and a genetic adjuvant confers lasting mucosal immunity against SARS-CoV-2 / H. E. Jung, K. B. Ku, B. H. Kang [et al.] // *Antiviral Research.* – 2023. – T. 216. – C. 105656.
263. Single-Dose Intranasal Administration of AdCOVID Elicits Systemic and Mucosal Immunity against SARS-CoV-2 and Fully Protects Mice from Lethal Challenge / R. G. King, A. Silva-Sanchez, J. N. Peel [et al.]. – Text: electronic // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9. – № 8. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/8/881> (date accessed: 26.02.2026).
264. The 6-Month Antibody Durability of Heterologous Convidecia Plus CoronaVac and Homologous CoronaVac Immunizations in People Aged 18–59 Years and over 60 Years Based on Two Randomized Controlled Trials in China / H. Jiang, P. Jin, X. Guo [et al.]. – Text: electronic // *Vaccines.* – 2023. – Vol. 11. – № 12. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-393X/11/12/1815> (date accessed: 26.02.2026).
265. Immunogenicity and protectivity of intranasally delivered vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine Sputnik V in mice and non-human primates / A. I. Tikhvatulin, I. V. Gordeychuk, I. V. Dolzhikova [et al.] // *Emerging Microbes & Infections.* – 2022. – T. 11. – № 1. – C. 2229-2247.
266. Phase III Pivotal comparative clinical trial of intranasal (iNCOVACC) and intramuscular COVID 19 vaccine (Covaxin®) / C. Singh, S. Verma, P. Reddy [et al.] // *NPJ Vaccines.* – 2023. – T. 8. – C. 125.
267. Kiyono, H. Nasal vaccines for respiratory infections / H. Kiyono, P. B. Ernst // *Nature.* – 2025. – Vol. 641. – № 8062. – P. 321-330.
268. A live attenuated virus-based intranasal COVID-19 vaccine provides rapid, prolonged, and broad protection against SARS-CoV-2 / J. Chen, P. Wang, L. Yuan [et al.] // *Science Bulletin.* – 2022. – T. 67. – № 13. – C. 1372-1387.
269. An inactivated NDV-HXP-S COVID-19 vaccine elicits a higher proportion of neutralizing antibodies in humans than mRNA vaccination / J. M. Carreño, A. Raskin, G. Singh [et al.] // *Science Translational Medicine.* – 2023. – T. 15. – № 683. – C. eabo2847.

270. Robust IgA and IgG-producing antibody forming cells in the diffuse NALT and lungs of Sendai virus-vaccinated cotton rats associate with rapid protection against human parainfluenza virus-type 1 / R. Sealy, B. Jones, S. L. Surman, J. L. Hurwitz // Vaccine. – 2010. – T. 28. – № 41. – C. 6749-6756.
271. The control of paramyxovirus genome hexamer length and mRNA editing / Y. Matsumoto, K. Ohta, D. Kolakofsky, M. Nishio // Rna. – 2018. – T. 24. – № 4. – C. 461-467.
272. Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication / Y. Sakai, K. Kiyotani, M. Fukumura [et al.] // FEBS letters. – 1999. – T. 456. – Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome. – № 2. – C. 221-226.
273. A Sendai Virus-Derived RNA Agonist of RIG-I as a Virus Vaccine Adjuvant / L. Martínez-Gil, P. H. Goff, R. Hai [et al.] // Journal of Virology. – 2013. – T. 87. – № 3. – C. 1290-1300.
274. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response / H. Kato, S. Sato, M. Yoneyama [et al.] // Immunity. – 2005. – T. 23. – № 1. – C. 19-28.
275. Organ tropism of Sendai virus in mice: proteolytic activation of the fusion glycoprotein in mouse organs and budding site at the bronchial epithelium. / M. Tashiro, M. Yamakawa, K. Tobita [et al.] // Journal of Virology. – 1990. – T. 64. – Organ tropism of Sendai virus in mice. – № 8. – C. 3627-3634.
276. Induction of influenza-specific mucosal immunity by an attenuated recombinant Sendai virus / T. L. Le, E. Mironova, D. Garcin, R. W. Compans // PLoS One. – 2011. – T. 6. – № 4. – C. e18780.
277. Sendai Virus Mucosal Vaccination Establishes Lung-Resident Memory CD8 T Cell Immunity and Boosts BCG-Primed Protection against TB in Mice / Z. Hu, K.-W. Wong, H.-M. Zhao [et al.] // Molecular Therapy. – 2017. – T. 25. – № 5. – C. 1222-1233.
278. Пат. 2787724 С1 Российская Федерация, МПК С12N 15/09. Набор рекомбинантных плазмидных ДНК для получения рекомбинантных вирусов Сендай штамм Москва (варианты) / С. С. Зайнутдинов, Г. В. Кочнева,

Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева; заявитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» ; опубл. 20.01.2023, Бюл. № 3.

279. Comparative immunogenicity of the recombinant receptor-binding domain of protein S SARS-CoV-2 obtained in prokaryotic and mammalian expression systems / I. A. Merkuleva, D. N. Shcherbakov, M. B. Borgoyakova [et al.] // *Vaccines*. – 2022. – Т. 10. – № 1. – С. 96.

280. The gingival vein as a minimally traumatic site for multiple blood sampling in guinea pigs and hamsters / M. V. Rodrigues, S. O. de Castro, C. Z. de Albuquerque [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Т. 12. – № 5. – С. e0177967.

281. Reed, L. J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. / L. J. Reed, H. Muench. – 1938.

282. Deletion of BST2 cytoplasmic and transmembrane N-terminal domains results in SARS-CoV, SARS-CoV-2, and influenza virus production suppression in a Vero cell line / A. A. Dolskiy, S. A. Bodnev, A. A. Nazarenko [et al.] // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2020. – Т. 7. – С. 616798.

283. Пат. No 2752858 Российская Федерация, МПК C12N15/74 C07K14/00A61K39/215 A61P31/14 C07K16/10. Интегративный плазмидный вектор pVEAL2 –S –RBD, обеспечивающий экспрессию и секрецию рекомбинантногорепторсвязывающего домена (RBD) коронавируса SARS-CoV-2 в клеткахмлекопитающих, рекомбинантный штамм клеточной линии CHO –K1 –RBD ирекомбинантный белок RBD SARS-CoV-2, продуцируемый указанным штаммомклеточной линии CHO –K1 –RBD / Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., БеленькаяС.В., Исаева А.А., Несмеянова В.С., Шаньшин Д.В., Волкова Н.В., Ильичев А.А.,Карпенко Л.Н.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»Роспотребнадзора. – опубл. 11.08.2021, Бюл. No 23

284. Векторная Система На Основе Вируса Сендай Для Разработки Интраназальных Вакцин Против Респираторных Инфекций На Примере Covid-19 / С. С. Зайнутдинов, Г. А. Кудров, А. В. Шиповалов [и др.]. – Текст : электронный. – Новосибирский национальный исследовательский государственный

университет, 2023. – С. 475-476. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=67362205> (дата обращения: 21.06.2026).

285. A single intranasal dose of human parainfluenza virus type 3-vectored vaccine induces effective antibody and memory T cell response in the lungs and protects hamsters against SARS-CoV-2 / P. A. Ilinykh, S. Periasamy, K. Huang [et al.] // *npj Vaccines*. – 2022. – Т. 7. – № 1. – С. 47.

286. Immunogenicity and efficacy of the COVID-19 candidate vector vaccine MVA-SARS-2-S in preclinical vaccination / A. Tscherne, J. H. Schwarz, C. Rohde [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Т. 118. – № 28. – С. e2026207118.

287. Newcastle disease virus (NDV) expressing the spike protein of SARS-CoV-2 as a live virus vaccine candidate / W. Sun, S. R. Leist, S. McCroskery [et al.] // *EBioMedicine*. – 2020. – Т. 62.

288. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness / J. A. Plante, Y. Liu, J. Liu [et al.] // *Nature*. – 2021. – Т. 592. – № 7852. – С. 116-121.

289. Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic fluids during chicken embryonic development / M. Da Silva, V. Labas, Y. Nys, S. Réhault-Godbert // *Poultry science*. – 2017. – Т. 96. – № 8. – С. 2931-2941.

290. Hoffmann, M. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Pöhlmann // *Molecular cell*. – 2020. – Т. 78. – № 4. – С. 779-784.

291. Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike at the S1/S2 boundary: potential role of proteases beyond furin / T. Tang, J. A. Jaimes, M. K. Bidon [et al.] // *ACS Infectious Diseases*. – 2021. – Т. 7. – № 2. – С. 264-272.

292. Mechanisms of oncolysis by paramyxovirus Sendai / O. Matveeva, G. Kochneva, S. Netesov [et al.] // *Acta Naturae* (англоязычная версия). – 2015. – Т. 7. – № 2 (25). – С. 6-16.

293. The challenges of vaccine development against betacoronaviruses: antibody dependent enhancement and sendai virus as a possible vaccine vector / T. Zaichuk,

- Y. D. Nechipurenko, A. Adzhubey [et al.] // *Molecular Biology*. – 2020. – T. 54. – № 6. – C. 812-826.
294. Susceptibility to SARS-CoV-2 virus variants of concern in mouse models / A. Shipovalov, G. Kudrov, A. Tomilov [et al.] // *Problems of Particularly Dangerous Infections*. – 2022. – № 1. – C. 148-155.
295. Structural basis for SARS-CoV-2 Delta variant recognition of ACE2 receptor and broadly neutralizing antibodies / Y. Wang, C. Liu, C. Zhang [et al.] // *Nature communications*. – 2022. – T. 13. – № 1. – C. 871.
296. Emergence of the E484K mutation in SARS-COV-2-infected immunocompromised patients treated with bamlanivimab in Germany / B. Jensen, N. Luebke, T. Feldt [et al.] // *The Lancet Regional Health–Europe*. – 2021. – T. 8.
297. Neutralisation sensitivity of SARS-CoV-2 lineages EG. 5.1 and XBB. 2.3 / L. Zhang, A. Kempf, I. Nehlmeier [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2023. – T. 23. – № 10. – C. e391-e392.
298. Characterization of SARS-CoV-2 Omicron BA. 4 and BA. 5 isolates in rodents / R. Uraki, P. J. Halfmann, S. Iida [et al.] // *Nature*. – 2022. – T. 612. – № 7940. – C. 540-545.
299. Pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron subvariants JN. 1, KP. 2, and EG. 5.1 in K18-hACE2 transgenic mice / L. D. Patterson, A. Elsharkawy, H. R. Jahantigh [et al.] // *Viruses*. – 2025. – T. 17. – № 9. – C. 1177.
300. Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant / R. Suzuki, D. Yamasoba, I. Kimura [et al.] // *Nature*. – 2022. – T. 603. – № 7902. – C. 700-705.

Приложение А:

Таблица 1 – Концентрации цитокинов и хемокинов (пг/мл) в 10% гомогенатах лёгких мышей линии K18-hACE2 через 72 часа после интратрахеального введения рекомбинантных белков rRBD и rSpike, определённые с помощью набора LEGENDplex™ Mouse B cell Panel (13-plex) w/VbP

Цитокин/ хемокин	rRBD		rSpike		NaCl	Цитокин/ хемокин	rRBD		rSpike		NaCl
	400	78	1000	78			400,00	78,00	1000	78,00	
IL-4	2,85	4,45	3,16	2,71	2,93	IL-13	3,10	9,31	4,27	3,01	3,02
	3,14	3,02	2,93	2,84	3,00		3,42	3,21	4,74	3,46	3,70
	2,70	2,81	2,91	3,02	3,01		2,51	3,54	3,14	4,04	3,48
	2,97	2,89	2,84	4,84	2,96		3,72	3,94	4,51	3,43	3,27
ср.знач.	2,92	3,29	2,96	3,35	2,97	ср.знач.	3,19	5,00	4,16	3,48	3,37
IL-21p70	3,99	4,42	5,23	2,78	3,77	IFN-γ	3,32	7,39	3,78	3,06	3,26
	4,45	3,86	3,63	3,83	4,35		3,48	3,26	3,18	2,88	3,28
	2,97	4,02	3,88	4,01	4,34		3,02	3,10	3,40	3,16	3,26
	4,53	4,39	3,36	5,10	4,62		3,29	3,25	3,18	7,78	4,35
ср.знач.	3,99	4,17	4,03	3,93	4,27	ср.знач.	3,28	4,25	3,39	4,22	3,54
IL-17A	6,40	6,97	6,63	6,24	6,30	BAFF	327,61	292,11	362,14	151,71	178,41
	6,62	6,48	6,66	6,58	6,63		143,73	380,66	51,46	194,36	276,56
	6,26	6,61	6,65	6,50	6,61		312,36	393,18	93,15	125,74	140,89
	6,72	6,44	6,51	7,15	6,74		149,87	273,67	267,14	142,53	220,48
ср.знач.	6,50	6,62	6,61	6,62	6,57	ср.знач.	233,39	334,91	193,47	153,59	204,09
IL-2	8,83	13,17	15,42	11,18	9,13	BCMA	9,71	12,00	37,67	11,17	14,86
	8,35	16,46	15,46	11,19	9,32		8,77	20,65	13,02	13,32	19,04
	9,18	12,66	19,45	11,34	11,26		11,43	13,36	16,55	10,08	18,90
	9,46	13,39	27,48	29,64	11,70		10,86	11,78	17,95	50,24	24,90
ср.знач.	8,95	13,92	19,45	15,84	10,35	ср.знач.	10,19*	14,45	21,30	21,20	19,42
TNF-α	6,15	6,39	6,21	5,58	5,76	sCD40L	6,25	9,81	6,55	5,96	6,07
	6,35	5,62	6,86	6,21	6,26		6,18	6,20	5,98	6,19	6,27
	4,58	5,52	6,70	7,21	6,37		6,01	6,09	6,30	6,02	6,12
	6,78	6,13	6,34	6,39	6,04		6,09	6,18	6,96	9,59	6,51
ср.знач.	5,97	5,91	6,53	6,35	6,11	ср.знач.	6,13	7,07	6,44	6,94	6,24
св.актив. TGF-B1	4,43	14,65	11,09	6,24	8,50	IL-10	16,91	17,38	17,41	17,02	16,80
	6,35	7,79	4,08	8,17	5,39		17,44	17,32	17,15	16,81	17,01
	4,38	5,85	6,73	4,29	5,40		16,52	17,18	17,40	16,42	17,15
	5,12	4,92	5,52	5,54	8,64		17,36	17,17	16,34	17,32	16,62
ср.знач.	5,07	8,30	6,86	6,06	6,98	ср.знач.	17,06	17,26	17,08	16,89	16,89

Примечание – * статистически значимое различие по сравнению с контролем ($p < 0,05$, тест Данна с поправкой на множественные сравнения после теста Краскела–Уоллиса; проведено 2 сравнения с контролем для каждого белка).

Приложение Б:

Таблица 2 – Концентрации цитокинов и хемокинов (пг/мл) в 10% гомогенатах лёгких мышей линии K18-hACE2 до интратрахеального введения (0 часов)рекомбинантных белков rRBD и rSpike, определённые с помощью набора LEGENDplex™ Mouse B cell Panel (13-plex) w/VbP

0 часов	IL-4	IL-12p70	IL-17A	IL-2	TNF-α	св.акт ив. TGF-β1	IL-13	IFN-γ	BAFF	BCMA	sCD40L	IL-10
rSpike_1000	9,02	6,62	13,74	15,76	19,31	351,15	4,14	7,97	4787,49	182,09	9,95	23,62
	9,31	6,21	12,48	16,41	12,79	326,71	4,44	6,97	4811,67	164,69	10,35	24,44
	8,80	6,13	12,66	15,89	13,79	334,78	4,25	7,09	4798,83	102,97	10,34	22,99
	8,82	6,17	13,43	15,89	13,85	424,15	3,81	6,84	3852,39	89,98	10,41	22,85
	9,28	6,24	12,66	16,44	15,17	421,61	4,18	8,24	4159,75	262,83	10,00	23,05
	9,36	6,66	13,79	16,46	15,68	468,99	4,43	7,23	3792,41	195,44	10,05	22,90
ср.знач.	9,10	6,34	13,13	16,14	15,10	387,90	4,21	7,39	4367,09	166,33	10,18	23,31
rSpike_78	8,81	6,06	13,68	15,77	15,64	470,21	3,49	8,43	4171,15	88,70	9,89	23,78
	9,31	6,26	13,57	15,70	17,70	368,56	4,36	8,20	3971,42	158,35	10,09	23,63
	9,40	6,13	13,60	16,40	10,80	394,51	4,36	6,54	3904,70	86,29	10,35	22,96
	8,86	6,19	13,67	16,41	13,80	415,10	4,56	8,00	4721,81	119,00	10,40	23,94
	8,84	6,13	13,75	16,43	13,33	160,58	4,57	8,17	3875,62	228,65	10,10	23,70
	8,87	6,31	13,35	16,52	16,50	395,90	3,83	7,15	4331,94	161,49	9,98	24,51
ср.знач.	9,01	6,18	13,61	16,20	14,63	367,48	4,19	7,75	4162,78	140,41	10,14	23,75
rRBD_400	8,85	6,69	12,60	16,34	9,83	439,13	4,38	8,20	4227,92	265,37	10,30	23,86
	8,73	6,20	13,62	15,61	18,40	402,67	4,53	8,17	4359,37	72,01	9,94	24,51
	9,29	6,16	12,47	16,47	14,14	454,43	3,32	7,91	4695,75	249,24	9,96	24,51
	9,41	6,30	13,55	15,81	14,35	387,31	4,45	6,63	4342,51	165,84	10,38	24,49
	8,88	6,68	12,65	16,28	14,67	428,95	4,35	6,55	4808,97	90,93	9,92	23,21
	9,02	6,18	13,55	16,40	13,75	353,33	3,57	8,02	3792,65	247,38	10,01	23,64
ср.знач.	9,03	6,37	13,07	16,15	14,19	410,97	4,10	7,58	4371,19	181,80	10,08	24,04
rRBD_78	9,31	6,23	13,72	16,37	16,70	340,91	3,62	6,18	4866,69	238,47	9,99	24,63
	8,79	6,07	13,40	16,33	16,85	368,47	3,67	6,14	4811,46	259,66	10,11	22,96
	9,42	6,55	13,56	15,86	13,40	338,88	4,13	6,59	3758,60	181,82	9,92	24,38
	8,89	6,25	13,62	15,77	13,47	371,03	3,83	6,49	3731,61	166,35	10,32	23,89
	9,31	6,23	13,84	16,44	14,18	377,47	3,58	6,20	3740,15	167,64	9,93	23,10
	9,11	6,20	12,47	15,63	10,06	392,63	4,15	8,14	3733,01	242,35	9,90	22,92
ср.знач.	9,14	6,26	13,43	16,07	14,11	364,90	3,83	6,62	4106,92	209,38	10,03	23,65
NaCl	9,38	6,15	13,53	15,75	13,46	400,74	4,40	6,23	3971,72	95,13	10,03	23,08
	8,78	6,25	12,43	16,34	12,46	340,96	4,52	7,13	3726,29	227,87	10,16	23,12
	8,75	6,16	12,68	16,38	16,21	363,12	4,57	8,13	3947,26	78,56	10,03	22,91
	9,04	6,20	12,63	16,46	11,00	378,17	3,38	6,58	3797,60	90,03	10,30	24,63
ср.знач.	8,99	6,19	12,82	16,24	13,28	370,75	4,22	7,02	3860,72	122,90	10,13	23,43

Приложение В

Таблица 3 – Концентрации цитокинов и хемокинов (пг/мл) в 10% гомогенатах лёгких мышей линии K18-hACE2 через 24 часа после интратрахеального введения рекомбинантных белков rRBD и rSpike, определённые с помощью набора LEGENDplex™ Mouse B cell Panel (13-plex) w/VbP

24 часа	IL-4	IL-12p70	IL-17A	IL-2	TNF-α	св. акт ив. TGF-β1	IL-13	IFN-γ	BAFF	BCMA	sCD40L	IL-10
rSpike_1000		4,52	12,80	15,68	16,56	170,29	2,75	5,89	5762,00	53,01	10,03	21,94
	9,36	5,40	14,43	16,09	12,02	464,67	3,26	6,10	2501,11	74,74	10,26	23,30
	9,32	5,70	13,78	16,08	15,50	297,80	5,07	6,30	5136,79	70,66	9,92	22,73
	9,62	5,56	13,38	16,71	12,18	441,15	3,75	7,78	6258,45	61,03	10,57	24,44
	9,43	5,09	13,34	16,17	14,28	312,11	3,56	6,54	6393,34	57,80	10,06	23,60
	9,10	5,00	13,17	16,25	15,98	337,08	3,33	6,37	4593,55	108,00	10,24	22,15
ср.знач.	9,37	5,21	13,48	16,16	14,42	337,18	3,62	6,50	5107,54	70,87	10,18	23,03
rSpike_78	9,23	5,22	13,31	15,71	14,28	289,86	3,15	6,50	6998,20	36,18	10,16	23,00
	9,04	5,22	13,17	16,01	12,17	292,94	3,27	6,28	5499,81	75,72	10,36	23,34
	9,48	5,49	16,92	16,38	16,61	459,81	3,48	6,64	4483,85	45,94	10,25	23,06
	9,44	4,76	13,51	16,21	13,55	312,43	3,40	6,84	4539,56	97,07	10,20	23,37
	9,44	7,20	13,34	25,54	11,60	260,62	3,52	6,95	5900,95	64,76	18,44	23,56
	9,00	5,02	12,90	15,96	11,34	282,95	3,22	6,65	4755,67	63,06	10,23	23,27
ср.знач.	9,27	5,49	13,86	17,64	13,26	316,43	3,34	6,64	5363,01	63,79	11,61	23,27
rRBD_400	9,32	4,69	14,45	15,84	11,39	354,56	3,15	6,61	3864,55	51,52	10,19	23,27
	8,80	4,71	12,70	15,61	12,63	154,91	3,04	6,01	2913,59	46,60	9,81	21,85
	9,14	5,34	12,94	15,48	17,12	275,14	3,19	6,69	5123,81	43,45	10,02	22,90
	9,57	5,08	13,57	15,99	14,97	380,77	3,57	6,80	5313,11	100,76	10,01	23,36
	9,21	5,79	13,04	15,93	15,50	253,49	3,42	6,29	4388,26	30,70	9,97	22,34
	9,20	5,31	13,80	16,47	14,71	135,95	3,44	6,92	4171,26	70,12	10,04	23,68
ср.знач.	9,21	5,15	13,42	15,89	14,39	259,14	3,30	6,55	4295,76	57,19	10,01	22,90
rRBD_78	9,27	4,86	14,79	16,11	15,00	294,30	3,12	6,50	4183,95	123,12	10,19	22,59
	9,46	5,04	13,50	15,96	12,59	229,43	3,07	6,90	5247,73	66,75	10,38	22,63
	9,18	4,99	13,17	16,32	13,91	247,21	3,43	6,41	4410,60	96,51	10,05	23,03
	9,07	4,54	13,02	15,82	12,09	191,74	2,81	6,24	4093,37	41,91	10,11	22,27
	9,01	5,06	13,10	15,69	15,92	268,14	3,34	6,74	4692,17	55,59	9,94	23,06
	9,13	5,93	13,79	15,85	14,67	290,35	3,06	6,97	4093,77	61,52	9,98	22,75
ср.знач.	9,19	5,07 *	13,56	15,96	14,03	253,53	3,14	6,62	4453,60	74,23	10,11	22,72
NaCl	9,32	6,20	13,69	16,42	17,04	429,51	4,46	7,97	3857,11	178,48	10,36	24,58
	9,35	6,63	13,47	16,37	14,28	448,30	4,27	8,29	4809,64	244,88	10,10	23,85
	8,81	6,09	12,58	15,69	11,97	180,02	3,47	6,42	194,43	17,48	10,04	23,02
	9,06	6,26	13,58	15,83	15,39	352,09	3,68	7,07	4239,79	93,45	9,94	23,02
ср.знач.	9,13	6,29	13,33	16,08	14,67	352,48	3,97	7,44	3275,24	133,58	10,11	23,62

Примечание – * статистически значимое различие по сравнению с контролем ($p < 0,05$, тест Данна с поправкой на множественные сравнения после теста Краскела–Уоллиса; проведено 2 сравнения с контролем для каждого белка).

Приложение Г

Таблица 4 – Концентрации цитокинов и хемокинов (пг/мл) в 10% гомогенатах лёгких мышей линии K18-hACE2 через 72 часа после интратрахеального введения рекомбинантных белков rRBD и rSpike, определённые с помощью набора LEGENDplex™ Mouse B cell Panel (13-plex) w/VbP

72 часа	IL-4	IL-12p70	IL-17A	IL-2	TNF-α	св.акти в. TGF- B1	IL-13	IFN-γ	BAFF	BCMA	sCD40L	IL-10
rSpike_1000	9,39	4,92	13,24	16,30	12,55	407,99	3,32	6,90	5596,40	72,60	10,60	23,31
	9,51	5,15	14,11	15,92	11,96	282,99	3,70	6,87	3505,65	89,29	10,32	24,26
	8,99	4,62	13,36	15,59	11,12	322,01	4,23	6,43	3387,58	43,81	10,18	22,86
	9,29	5,02	13,11	15,72	11,48	698,94	2,89	7,27	2960,62	39,81	10,36	22,82
	10,91	4,74	13,19	16,19	25,12	96,98	2,91	6,89	3095,74	36,92	10,34	22,40
ср.знач.	9,62	4,89	13,40	15,94	14,44	361,78	3,41	6,87	3709,20	56,49	10,36	23,13
rSpike_78	9,02	4,68	13,23	15,84	12,02	355,15	3,15	6,54	3509,23	27,77	9,95	22,23
	8,96	5,13	13,29	15,66	13,56	329,10	3,03	6,12	2781,32	82,99	10,04	22,78
	9,52	4,91	15,43	16,13	11,99	573,55	2,82	6,58	3337,66	60,88	10,27	22,55
	9,06	4,35	13,20	15,96	10,92	477,97	2,84	6,51	3398,11	64,32	10,33	22,35
	9,38	6,49	13,20	21,82	13,75	643,65	2,99	9,51	3899,19	77,65	15,43	22,83
	9,08	4,55	13,09	15,97	11,13	448,59	2,72	6,60	3591,11	75,40	10,48	22,35
ср.знач.	9,17	5,02	13,58	16,90	12,23	471,33	2,92	6,98	3419,44	64,83	11,08	22,52
rRBD_400	9,22	3,99	13,60	15,88	11,30	610,89	2,86	6,56	3948,43	56,43	10,15	22,39
	9,62	5,41	13,75	16,83	16,18	1335,87	4,00	7,85	7219,22	104,17	10,77	24,42
	9,01	4,56	13,22	15,81	10,01	645,21	2,70	6,79	3631,04	38,46	10,21	22,76
	9,04	4,73	13,21	15,72	13,12	611,63	2,82	7,15	3012,36	70,89	10,01	22,52
	9,20	4,35	13,00	15,50	13,17	660,31	3,17	6,50	5270,22	41,36	10,06	22,25
	9,13	5,00	14,07	15,96	12,37	346,33	2,98	6,49	4415,06	43,86	10,02	22,98
ср.знач.	9,20	4,67	13,47	15,95	12,69	701,71	3,09	6,89	4582,72	59,20	10,20	22,89
rRBD_78	9,40	4,28	14,56	16,28	9,89	415,77	2,80	6,58	2766,12	161,16	10,35	22,83
	9,10	5,12	12,81	16,06	10,56	519,90	2,82	6,66	2803,35	41,51	10,28	21,94
	9,25	4,94	13,04	15,60	12,19	344,96	2,89	6,03	2774,04	81,44	10,07	21,93
	9,21	4,90	12,90	16,00	12,18	619,86	3,06	6,62	4094,74	58,73	10,13	22,77
	9,05	5,09	13,06	15,90	11,00	343,81	3,13	7,21	3206,73	52,03	10,38	22,28
	9,45	4,40	13,04	16,15	12,21	569,34	2,87	7,14	3383,28	62,11	10,11	22,66
ср.знач.	9,24	4,79	13,23	16,00	11,34	468,94	2,93	6,71	3171,38	76,16	10,22	22,40
NaCl	8,89	4,83	13,00	16,03	12,39	518,49	3,41	7,01	6886,39	39,22	10,12	22,44
	8,87	4,87	13,47	15,79	12,36	1127,28	3,07	6,31	6657,62	24,34	10,12	22,41
	9,34	4,60	13,21	16,19	11,89	420,63	3,15	7,74	4047,08	50,75	10,22	23,08
	9,12	4,32	13,05	16,22	10,31	34,92	2,86	6,66	2460,74	29,17	10,23	22,80
ср.знач.	9,06	4,66	13,18	16,06	11,74	525,33	3,13	6,93	5012,96	35,87	10,17	22,68

Примечание – * статистически значимое различие по сравнению с контролем ($p < 0,05$, тест Данна с поправкой на множественные сравнения после теста Краскела–Уоллиса; проведено 2 сравнения с контролем для каждого белка).