

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ»  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

*На правах рукописи*

**Юмашев Кирилл Валерьевич**

**Противовирусные свойства дендримерного пептида КК-45,  
несущего Ø-сайт F-белка, и его влияние на иммунопатогенез  
респираторно-синцитиальной вирусной инфекции**

### **3.2.7. Иммунология**

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Шиловский Игорь Петрович

Москва – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования .....	5
Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности .....	6
Степень разработанности темы исследования .....	7
Цель исследования .....	8
Задачи исследования.....	8
Научная новизна работы.....	8
Теоретическая значимость работы .....	9
Практическая значимость работы.....	9
Внедрение результатов исследования в практику .....	10
Методология и методы исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту.....	11
Степень достоверности результатов .....	12
Апробация результатов.....	12
Личный вклад автора .....	12
Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.....	13
Объем и структура диссертации .....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Респираторно-синцитиальный вирус. Структура и жизненный цикл.....	14
1.2 Иммунопатогенез РСВ-инфекции .....	19
1.2.1 Патологические изменения респираторного тракта при РСВ-инфекции у человека.....	19
1.2.2 Изучение иммунопатогенеза РСВ-инфекции с использованием моделей на животных .....	20
1.2.3 Роль Т-клеток в противовирусной защите.....	20
1.2.4 Роль Т-клеток в РСВ-индуцированной иммунопатологии лёгких.....	22
1.2.5 Роль гуморального иммунитета.....	25
1.2.6 Роль интерферонов.....	26
1.2.7 Роль цитокинов.....	28
1.2.8 Роль активных форм кислорода.....	30
1.3 Профилактика и терапия РСВ-инфекции.....	32
1.3.1 Вакцины для профилактики РСВ-инфекции .....	32
1.3.2 Препараты на основе моноклональных антител для профилактики РСВ-инфекции.....	33
1.3.3 Этиотропная терапия РСВ-инфекции. Рибавирин.....	35
1.4 Природные и синтетические пептиды как перспективные противовирусные средства .....	36

1.5 Механизмы противовирусного действия пептидов .....	37
1.5.1 Ингибирование прикрепления вириона к клетке и слияния мембран .....	37
1.5.2 Разрушение мембраны РСВ .....	37
1.5.3 Ингибирование репликации вируса .....	38
1.5.4 Другие механизмы действия .....	38
1.6 Перспективные направления развития технологии противовирусных пептидов.....	41
1.6.1 Картирование пептидов .....	41
1.6.2 Получение рекомбинантных пептидов .....	42
1.6.3 Стабилизация структуры пептида .....	43
1.6.4 Дендримеризация пептидов .....	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	46
2.1 Материалы .....	46
2.1.1 Животные.....	46
2.1.2 Клеточные культуры, вирус и реагенты .....	47
2.2 Методы исследования.....	47
2.2.1 Синтез и очистка пептидов .....	47
2.2.2 Оценка цитотоксичности пептидов <i>in vitro</i> .....	48
2.2.3 Оценка вирулицидной активности пептидов <i>in vitro</i> .....	49
2.2.4 Взаимодействие пептидов с клетками МА-104 и А549.....	49
2.2.5 Взаимодействие пептидов с РСВ.....	50
2.2.6 Оценка связывания пептидов с РСВ .....	51
2.2.7 Оценка связывания пептидов с белком нуклеолином методом ИФА.....	51
2.2.8 Противовирусная активность пептидов <i>in vivo</i> .....	52
2.2.9 Оценка токсичности, иммуногенности и аллергизирующих свойств КК-45 <i>in vivo</i> .....	53
2.2.10 Гиперреактивность бронхов (ГРБ) .....	53
2.2.11 Сбор БАЛ .....	54
2.2.12 Гистологическое исследование ткани лёгкого.....	54
2.2.13 Количественное определение вирусной нагрузки и экспрессии генов цитокинов в дыхательных путях.....	54
2.2.14 Оценка сывороточных антител специфичных к пептиду КК-45 .....	56
2.2.15 Статистическая обработка результатов .....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	58
3.1 Дизайн пептидов, имитирующих антигенный $\Theta$ -сайт F-белка.....	58
3.2 Цитотоксичность пептидов КК-44, КК-45 и D-12 <i>in vitro</i> .....	62
3.3 Вирулицидная активность пептидов <i>in vitro</i> .....	62

3.4 Предварительная обработка РСВ пептидом КК-45 ингибирует его инфекционность .....	64
3.5 Предварительная обработка клеток пептидом КК-45 ингибирует образование синцитиев ..	64
3.6 Пептид КК-44 взаимодействует с РСВ.....	65
3.7 Пептид КК-45 взаимодействует с нуклеолином.....	66
3.8 Дендримерный пептид КК-45 снижает вирусную нагрузку и воспаление дыхательных путей, но не гиперреактивность бронхов <i>in vivo</i> .....	68
3.9 Токсичность, иммуногенность и аллергизирующие свойства пептида КК-45 при интраназальном введении.....	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	84
4.1 Анализ структур пептидов с противовирусной активностью в отношении РСВ .....	84
4.1.1 Бета-дефензин-2 человека .....	84
4.1.2 Пептид Т-118 белка F.....	85
4.1.3 Пептид из белка G.....	86
4.1.4 Пептид, формирующий $\alpha$ -спираль белка F.....	87
4.1.5 Дендримерный пептид SB105-A10.....	88
4.1.6 Кателицидин – пептид LL-37 .....	89
4.1.7 Катионные пептиды из С-концевых участков хемокинов CXCL9 и CXCL12 $\gamma$ .....	91
4.1.8 Мелиттин.....	92
4.1.9 Пептиды из GTPазы RhoA.....	93
4.1.10 Дендримерный пептид LTP.....	94
4.1.11 Влияние структуры пептидов на противовирусную активность в отношении РСВ .....	95
4.2 Механизм противовирусной активности пептида КК-45 в отношении РСВ.....	99
4.3 Влияние пептида КК-45 на иммунопатогенез РСВ-инфекции.....	103
4.4 Токсикологическая, иммунологическая и аллергологическая безопасность пептида КК-45 .....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	109
Итоги .....	109
Рекомендации .....	110
Перспективы дальнейшего развития темы.....	110
ВЫВОДЫ .....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	139

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Респираторно-синцитиальный вирус человека (РСВ) является одним из наиболее значимых патогенов, вызывающих заболевания нижних дыхательных путей, особенно у детей раннего возраста, лиц старше 65 лет и пациентов с иммунодефицитными состояниями. В отдельных сезонах РСВ обуславливает до 22% случаев тяжелых инфекций нижних дыхательных путей.

Имунопатогенез РСВ-инфекции отличается сложной взаимосвязью защитных и патологических реакций. Вирус-специфические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты обеспечивают элиминацию вируса, однако одновременно, за счёт продукции провоспалительных цитокинов (IFN $\gamma$ , TNF и прочих), они вносят вклад в воспаление респираторного тракта и повреждение лёгочной ткани. Активация вирусом Th2-иммунного ответа и продукция Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13) способствуют развитию воспаления респираторного тракта, гиперпродукции слизи и гиперреактивности бронхов, что во многом определяет тяжесть клинических проявлений заболевания.

Разработка вакцин против РСВ, начатая в 60-х годах прошлого века [131], увенчалась успехом лишь в 2023–2024 годах. Средством пассивной иммунопрофилактики при инфекции РСВ служит препарат моноклональных антител – паливизумаб (направленный против белка F вируса), но его широкое применение ограничено высокой стоимостью. Для этиотропной терапии РСВ-инфекции применяется рибавирин, однако его использование сопряжено с выраженными побочными эффектами и тератогенностью, что делает его применение ограниченным. Таким образом, сохраняется потребность в разработке безопасных, доступных и эффективных терапевтических средств, что невозможно без углубленного понимания иммунопатогенеза РСВ-инфекции.

Перспективным направлением в создании противовирусных препаратов, влияющих на иммунопатогенез РСВ-инфекции, считается применение природных и синтетических пептидов. Пептиды обладают низкой токсичностью, биodeградируемостью и не вызывают развитие резистентности у вирусов. Однако выделение пептидов из природных источников обходится дорого, как и химический синтез (ввиду их значительного размера – 40-50 аминокислотных остатков). Кроме того, линейные пептиды легко разрушаются протеазами, что ограничивает их биологические эффекты.

Для преодоления описанных выше ограничений синтезируют укороченные, более дешёвые аналоги природных пептидов, либо короткие пептиды, спроектированные *de novo*. Стабильность повышают за счёт замен аминокислот, а также дендримеризации структуры; разветвлённые (дендримерные) пептиды менее подвержены деградации благодаря неприродным  $\epsilon$ -связям, а их разветвлённость обеспечивает мультивалентное взаимодействие с вирусными и клеточными мишенями, усиливая биологический эффект.

Однако иммунологические механизмы действия дендримерных пептидов остаются недостаточно изученными. Мало изучены особенности взаимодействия таких пептидов с рецепторами вирусных патогенов, не описано их влияние на иммунопатогенез РСВ-инфекции, а также же на врожденный и адаптивный иммунитет. Раскрытие данных механизмов имеет принципиальное значение для обоснованного дизайна эффективных иммуностропных и противовирусных препаратов и прогнозирования их безопасности и терапевтического потенциала.

Молекулярное картирование белка слияния F РСВ позволило определить его функциональные домены. К настоящему моменту в белке F вируса выявлено 7 антигенных сайтов. Особое значение придается недавно идентифицированному так называемому нулевому ( $\emptyset$ ) антигенному сайту, который расположен в домене HR-1. Антитела, нацеленные на этот сайт, продемонстрировали высокую нейтрализующую активность в отношении вируса, даже превосходящую активность препарата паливизумаб. Антигенный сайт  $\emptyset$  F-белка представляет собой перспективную терапевтическую мишень для разработки новых средств пептидной природы, влияющих на иммунопатогенез РСВ-инфекции и обладающих противовирусным действием.

Диссертационная работа Юмашева Кирилла Валерьевича актуальна, поскольку посвящена изучению влияния дендримерного пептида КК-45, несущего  $\emptyset$ -сайт F-белка, на иммунопатогенез респираторно-синцитиальной вирусной инфекции и исследованию его противовирусных свойств.

### **Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности**

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований: № 2, 3, 7).

## Степень разработанности темы исследования

Фундаментальный вклад в изучение иммунопатогенеза РСВ-инфекции и структурной организации его поверхностных гликопротеинов — белка прикрепления (G) и белка слияния (F) — внесли работы зарубежных исследователей, таких как В. S. Graham, J. S. McLellan, P. A. Collins, M. J. Battles. Было показано, что конформационный переход F-белка из префузионной в постфузионную форму является ключевым механизмом слияния мембран вируса и клетки, а обнаружение на префузионной форме консервативного антигенного сайта Ø открыло возможности для дизайна таргетных нейтрализующих молекул.

Изучению роли клеточных факторов и цитокинового каскада в иммунопатогенезе РСВ-инфекции, а также экспериментальному моделированию вирусных патологий и направленному проектированию противовирусных пептидов посвящены работы ведущих российских ученых, в том числе сотрудников ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России: Р.М. Хаитова, М.Р. Хаитова, И.П. Шиловского, В.В. Смирнова, С.М. Андреева [1–6, 13, 14], а так же коллективов из других научных центров, включая Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Однако до настоящего времени остаются нерешенными вопросы направленной фармакологической модуляции конформационных изменений F-белка с помощью синтетических пептидов. В литературных источниках отсутствуют систематические сведения о возможности применения дендримерных пептидных конструкций, имитирующих сайт Ø, для одновременного достижения прямого противовирусного и протективного иммуномодулирующего эффекта *in vivo*. Не определен их вклад в регуляцию воспаления и особенностей экспрессии генов врожденного иммунитета (интерферонов и интерлейкинов) при РСВ-инфекции, что обусловило необходимость проведения настоящего исследования.

## Цель исследования

Исследовать противовирусные свойства дендримерного пептида КК-45, несущего антигенный Ø-сайт F-белка, и изучить его влияние на иммунопатогенез респираторно-синцитиальной вирусной инфекции.

## Задачи исследования

1. Сконструировать линейный пептид, содержащий антигенный сайт Ø F-белка вируса, и его дендримерный вариант с разветвлённой структурой.
2. Оценить противовирусную активность линейного и дендримерного пептидов против РСВ в экспериментах *in vitro* и определить молекулярные механизмы их действия.
3. Создать экспериментальную модель РСВ-инфекции на мышах, воспроизводящую ключевые аспекты иммунопатогенеза инфекции.
4. Исследовать влияние разработанных пептидов на иммунопатогенез РСВ-инфекции в экспериментальной модели на мышах.
5. Провести комплексную оценку токсикологической, иммунологической и аллергологической безопасности катионного дендримерного пептида, содержащего антигенный сайт Ø F-белка РСВ.

## Научная новизна работы

Впервые проведено комплексное изучение влияния дендримерного пептида КК-45 на иммунопатогенез РСВ-инфекции на модели у мышей. А именно, доказано, что интраназальное введение пептида КК-45 обеспечивает дозозависимое снижение вирусной нагрузки в верхних и нижних дыхательных путях, а также ослабление воспаления респираторного тракта.

Впервые показано, что созданный пептид КК-45, содержащий последовательность антигенного сайта Ø демонстрирует высокую противовирусную активность в отношении РСВ, которая реализуется за счёт нескольких механизмов: прямого взаимодействия пептида с вирионами и ингибирования связывания РСВ с клетками-мишенями.

Впервые оценена токсикологическая, иммунологическая и аллергологическая безопасность дендримерного пептида КК-45 и установлен благоприятный профиль его безопасности. В частности, длительное интраназальное введение пептида не вызывает потери массы тела у лабораторных животных, воспалительных изменений дыхательных путей, отклонений в гематологических и биохимических показателях, а также при этом пути введения пептид не иммуногенен и не аллергенен.

### **Теоретическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы состоит в изучении новых аспектов влияния катионных дендримерных пептидов на иммунопатогенез РСВ-инфекции; в частности, установлена способность таких пептидов влиять не только на вирусную нагрузку, но и на клеточную инфильтрацию дыхательных путей, муциновую гиперсекрецию, отёк респираторного тракта и продукцию провоспалительных цитокинов в респираторном тракте.

Кроме того, теоретическую ценность представляет расширение представлений о молекулярных и иммунологических механизмах действия катионных дендримерных пептидов в отношении РСВ-инфекции, которые могут обладать двойным механизмом действия, оказывая влияние не только на вирусы, так и на клетки-мишени.

Полученные результаты дополняют современные представления о роли F-белка РСВ и его антигенного сайта Ø, как ключевой мишени для противовирусного воздействия и о возможности блокирования ранних этапов вирусной инфекции с помощью пептидных молекул. Работа вносит вклад в развитие представлений о взаимодействии вируса с клеточными рецепторами и о значении нуклеолина в механизмах проникновения РСВ в клетку.

### **Практическая значимость работы**

Разработана и внедрена в лабораторную практику новая экспериментальная модель РСВ-инфекции на мышах линии BALB/c с использованием высокой дозы очищенного вируса, адекватно воссоздающая ключевые патоморфологические, иммунологические и функциональные проявления патологии РСВ человека. Данная модель характеризуется воспроизводимостью таких клинически значимых признаков, как выраженная инфильтрация

ткани легких провоспалительными клетками, избыточная продукция муцина бокаловидными клетками респираторного эпителия и формирование обратимой бронхиальной гиперреактивности.

Разработан и физико-химически охарактеризован оригинальный продукт — синтетический дендримерный пептид КК-45, обладающий доказанным прямым противовирусным действием в отношении РСВ. На данную низкотоксичную пептидную конструкцию, блокирующую конформационные переходы поверхностных белков вируса, получен патент Российской Федерации [Патент №2810986 С2].

Таким образом, данное исследование вносит значительный вклад в развитие фундаментальной иммунологии и вирусологии, расширяя представления о механизмах формирования вирус-индуцированного воспаления и гиперреактивности дыхательных путей. Кроме того, оно способствует созданию новых экспериментальных моделей с высоким потенциалом практического применения.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Методика экспериментальной модели респираторно-синцитиальной вирусной инфекции *in vivo* на мышах линии BALB/c с использованием высокоочищенного вируса в высокой дозе для оценки противовирусных препаратов, разработанная в рамках диссертационной работы «Противовирусные свойства дендримерного пептида КК-45, несущего антигенный Ø-сайт F-белка, и его влияние на иммунопатогенез респираторно-синцитиальной вирусной инфекции», внедрена в научно-исследовательскую работу лаборатории «Противовирусного иммунитета» №75 (акт внедрения от 20 июня 2025 г., Приложение А). По результатам работ был запатентован пептид КК-45, патент на изобретение номер: RU 2810986 С2, Россия, 2024.

### **Методология и методы исследования**

В работе использован комплекс современных методов, включающий моделирование инфекции *in vitro* и *in vivo*, оценку противовирусной активности синтетических пептидов, анализ воспалительных и иммунологических показателей, а также статистическую обработку результатов. Пептиды были получены методом твердофазного синтеза. Для изучения

механизмов противовирусного действия были использованы методы титрования вируса на культурах клеток, оценка антиген-специфичных антител проведена с помощью методов ELISA, оценка экспрессии генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов методом ПЦР в реальном времени. Для моделирования иммунопатогенеза РСВ-инфекции использовали самок мышей линии BALB/c. Влияние пептидов на иммунопатогенез РСВ-инфекции оценивали методами гистологического, цитологического и гематологического анализа. Обработка первичных результатов выполнена с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Катионный дендримерный пептид КК-45, содержащий последовательность антигенного сайта  $\Theta$  F-белка РСВ, демонстрирует высокую противовирусную активность в отношении респираторно-синцитиального вируса человека, обеспечивая дозозависимое снижение вирусной нагрузки в верхних и нижних дыхательных путях.

2. Пептид КК-45 влияет на иммунопатогенез РСВ-инфекции, уменьшая выраженность воспаления респираторного тракта, что характеризовалось снижением содержания общего количества клеток, макрофагов и лимфоцитов в бронхоальвеолярном лаваже, а также уменьшением количества клеток, инфильтрирующих ткань легких, и площади перибронхиальных инфильтратов; при этом пептид КК-45 не влиял на экспрессию генов интерферонов I типа, являющихся элементами врожденного иммунитета.

3. При длительном интраназальном введении пептид КК-45 характеризуется благоприятным профилем безопасности: не вызывает потери массы тела у лабораторных животных, воспалительных изменений дыхательных путей, отклонений в гематологических и биохимических показателях крови, а также не является иммуногенным и аллергенным.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность результатов диссертационной работы обусловлена применением современного оборудования, прошедшего своевременную поверку, использованием сертифицированных методик, достаточным объемом экспериментальных данных и корректным применением статистических методов, адекватных поставленным. Установлено, что результаты диссертационной работы являются достоверными.

### **Апробация результатов**

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на: Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов «Ильинские чтения 2023» (15-16 марта 2023 г., Москва, Российская Федерация), XII Научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку» (14 декабря 2023 г., Москва, Российская Федерация), «Витебская весна 2025: Инновации аллергологии и иммунологии» (15-16 мая 2025 г., Витебск, Республика Беларусь), Международном конгрессе по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС (5-6 декабря 2025 г., Москва, Российская Федерация), «Школа по аллергологии и иммунологии им. академика Р.М. Хаитова» (5-6 марта 2026 г., Москва, Российская Федерация). Апробация диссертации состоялась на заседании секции №1 ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России 20 мая 2026 г.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах выполнения исследований для диссертации, непосредственном участии в получении первичных результатов по экспериментальному *in vivo* моделированию РСВ-инфекции на мышах линии BALB/c с использованием высокой дозы очищенного вируса и оценке эффективности этой модели. Принимал непосредственное участие в обработке, анализе и интерпретации полученных результатов, а также в подготовке публикаций по теме исследования.

### **Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах**

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 9 печатных работ, в том числе 6 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук, 1 патент, 2 публикации в сборниках материалов конференций.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация оформлена в традиционном стиле, содержит 139 страниц машинописного текста, 21 рисунок и 6 таблиц. Диссертационная работа включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы», «Приложение А». Библиография включает 199 источников, в том числе 14 отечественных и 185 зарубежных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Респираторно-синцитиальный вирус. Структура и жизненный цикл

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) относится к порядку *Mononegavirales*, семейству *Pneumoviridae*, роду *Orthopneumovirus*. РСВ – один из самых распространённых патогенов [185], вызывающих тяжёлые заболевания верхних и нижних дыхательных путей у детей [56], пожилых людей [164] и пациентов с иммунодефицитами [50, 73]. Пациенты с бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью лёгких также в значительной степени страдают от этой инфекции [51]. Ежегодно в мире госпитализируется до 3 миллионов детей, инфицированных РСВ, при этом смертность от этой инфекции составляет 66 –199 тысяч человек [163]. Экономический ущерб от РСВ-инфекции (по данным в США) оценивается в 1,15 миллиарда долларов [74, 82].

В настоящее время для профилактики инфекции, вызываемой РСВ, одобрены три вакцины: две субъединичные – Arexvu (GSK) и Abrysvo (Pfizer), и одна мРНК-вакцина – mRESVIA (Moderna). Также для иммунопрофилактики применяют препараты на основе моноклональных антител (МАТ), широкое использование которых ограничено высокой стоимостью [192].

Эффективных, безопасных и при этом доступных методов этиотропного лечения РСВ - инфекции до сих пор не разработано. Для терапии этой инфекции в настоящее время применяется Виразол (Рибавирин), который вызывает многочисленные побочные эффекты [85].

Ведутся работы над созданием терапевтических средств, например ингибиторов вируса на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) [93], наночастиц [133], пептидных соединений [9] и других малых молекул [78].

Для создания эффективных и безопасных средств лечения и профилактики необходима информация о молекулярных и клеточных механизмах патогенеза РСВ-инфекции. За последние два десятилетия во многом удалось раскрыть особенности строения и жизненного цикла вируса.

**Геном РСВ** представлен одноцепочечной несегментированной молекулой РНК негативной полярности размером 15191–15226 нуклеотидов (штамм А2, GenBank Acc. N M74568). Геном РСВ кодирует 10 генов: *NS1*, *NS2*, *N*, *P*, *M*, *SH*, *G*, *F*, *M2* и *L*, – которые в ходе экспрессии первоначально транскрибируются в виде индивидуальных молекул мРНК, каждая из которых кодирует соответствующий белок, за исключением мРНК гена *M2*, которая имеет в своей структуре две перекрывающиеся открытые рамки считывания для белков M2-1 и M2-2

[9, 38]. РНК-геном вируса инкапсулирован в нуклеокапсид, который состоит из белка N, РНК-полимеразы (белка L) и его кофактора (белка Р), а также белка М2-1. Матриксный белок, М окружает нуклеокапсид, тем самым играя роль “мостика” между нуклеокапсидом и оболочкой вириона, сформированной липидным бислоем, в который включены гликопротеины: белок слияния F, белок G и малый гидрофобный белок SH. Белок М2-2 и два неструктурных белка, NS1 и NS2, не обнаружены в составе вирионов РСВ [20] (рисунок 1).

**Жизненный цикл РСВ** начинается с этапа прикрепления вириона к клетке-мишени с последующим слиянием мембран вируса и клетки. В этом процессе центральную роль играют поверхностные гликопротеины F и G [10]. Белок G существует в двух формах; мембранная форма осуществляет прикрепление вириона к клетке благодаря связыванию с рецепторами или факторами прикрепления на их поверхности. Стоит отметить, что в последних работах поверхностные белки клеток-мишеней, которые связываются с белком G, называют факторами прикрепления, а к рецепторам относят такие белки клеток, которые инициируют процесс слияния вириона и клетки [9, 20]. Растворимая форма (sG) функционирует как антигенная «ловушка» для связывания анти-G-антител и необходима для «ухода» вируса от иммунной системы организма [30].

Одни из наиболее изученных факторов прикрепления – это гепарансульфаты (HSGAG), относящиеся к гликозаминогликанам (GAG) и представляющие собой дисахаридные полимеры, связанные с трансмембранным белками на поверхности многих типов клеток. Взаимодействие с HSGAG реализуется за счёт электростатического связывания позитивно заряженного гепарин-связывающего домена белка G с отрицательно заряженными HSGAG [58]. Идентифицированы и другие факторы прикрепления, например хемокиновый рецептор CX3CR1, который связывается с мотивом CX3C белка G [183]. Белок F также способен участвовать в прикреплении за счёт связывания с такими факторами как HSGAG [57] ICAM1 [22] EGFR [43] и нуклеолин [180], при чем последний может функционировать не только как фактор прикрепления, но и как рецептор [180]. Таким образом, при внедрении в клетку-мишень РСВ, видимо, может использовать в качестве рецепторов несколько клеточных компонентов (рисунок 1).

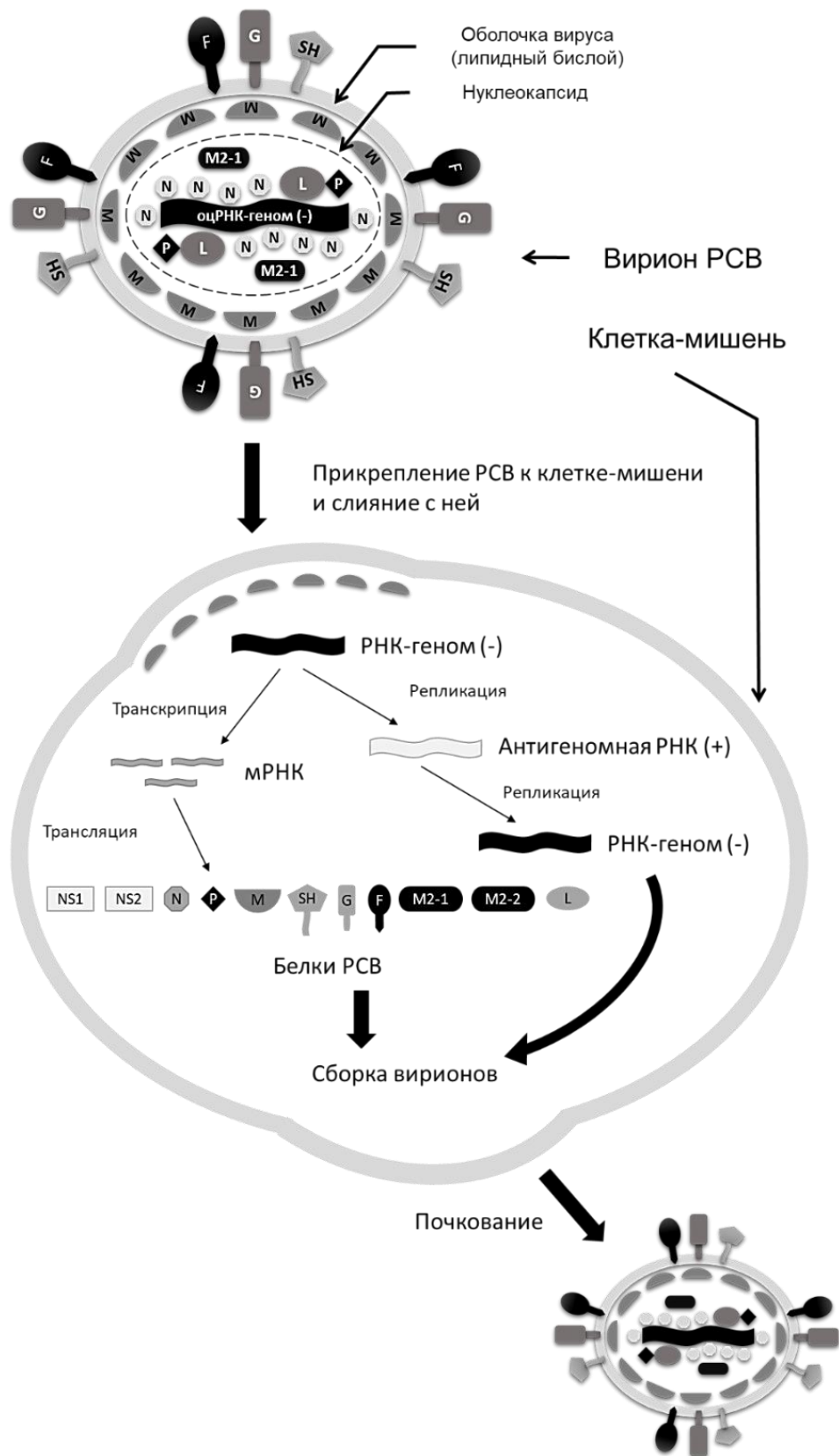
Несмотря на то, что **белок F** участвует в прикреплении, главная его функция – это слияние мембран вируса и клетки. Данный гликопротеин синтезируется инфицированной клеткой в виде белка-предшественника (F0), который протеолитически расщепляется на субъединицы F1 и F2, связанные ковалентно в гетеродимер. На поверхности вириона функциональный белок F существует в виде тримера F1/F2-гетеродимеров в префузионной конформации. На N-конце субъединицы F1 располагается пептид слияния (FP) с прилегающим к нему  $\alpha$ -спиральным участком HR-1 (HR-N). На C-конце F1 располагается трансмембранный домен (TM) с  $\alpha$ -спиральным участком HR-2 (HR-C), который обеспечивает заякоревание белка в оболочке

вируса. В процессе слияния пептид FP взаимодействует с мембраной клетки-мишени, после чего белок F меняет свою конформацию с префузионной на постфузионную. В ходе этой реорганизации участки HR-1 и HR-2 белка F сближаются, формируя шпилечную структуру, что приводит к сближению мембран клетки и вириона и в итоге к их слиянию (рисунок 2). Согласно последним данным, слияние вириона с клеткой – это двухстадийный процесс: первоначально происходит макропиноцитоз, а затем непосредственно слияние мембран внутри эндосомы [9, 20]. Гликопротеин SH не играет существенного значения в процессах прикрепления и слияния [9, 20].

В результате слияния геном вируса проникает в цитоплазму клетки, где происходит **репликация его геномной РНК, транскрипция мРНК** и трансляция его белков. На геномной минус-цепи РНК идет репликация комплементарной плюс-цепи РНК, называемой антигеномной РНК, с которой затем синтезируются новые минус-цепи РНК вируса. Вновь образовавшаяся молекула геномной РНК ассоциирует с белком N и упаковывается в нуклеокапсид, который также содержит белки L и P. В репликации генома участвуют три белка: N, P и L. Белки P и L – это субъединицы РНК-зависимой РНК-полимеразы, а белок N, связываясь с геномной РНК, защищает ее от нуклеаз клетки. Транскрипция мРНК осуществляется тем же ферментом; при этом РНК-полимераза распознает старт- и стоп-кодоны генома вируса, то есть, полимераза РСВ способна “переключаться” с репликативного на транскрипционный режим. В результате транскрипции синтезируется 10 зрелых мРНК (рисунок 1) [38].

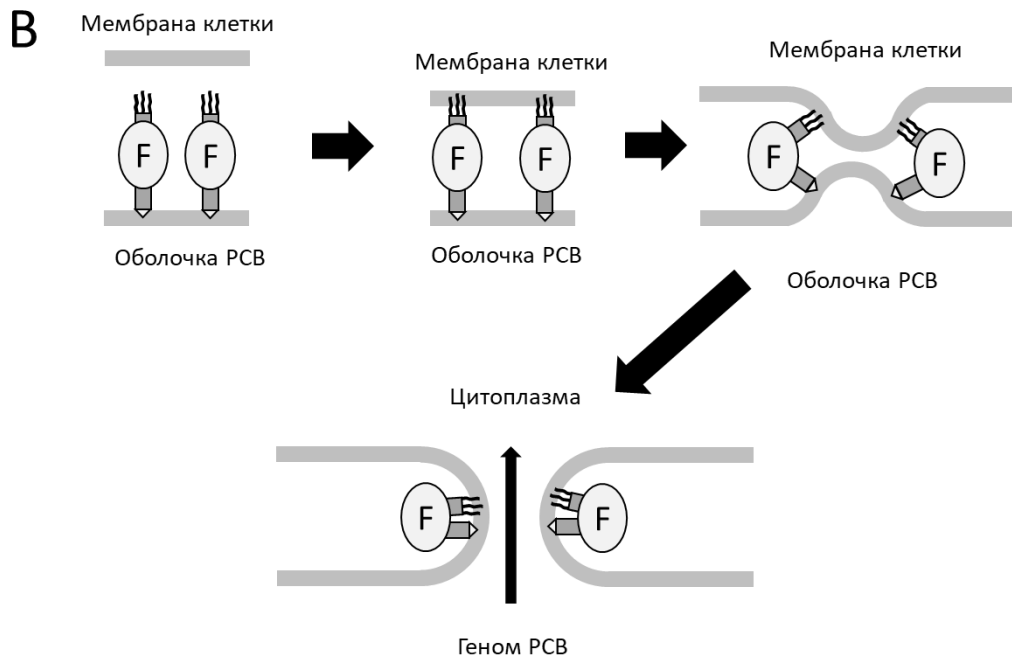
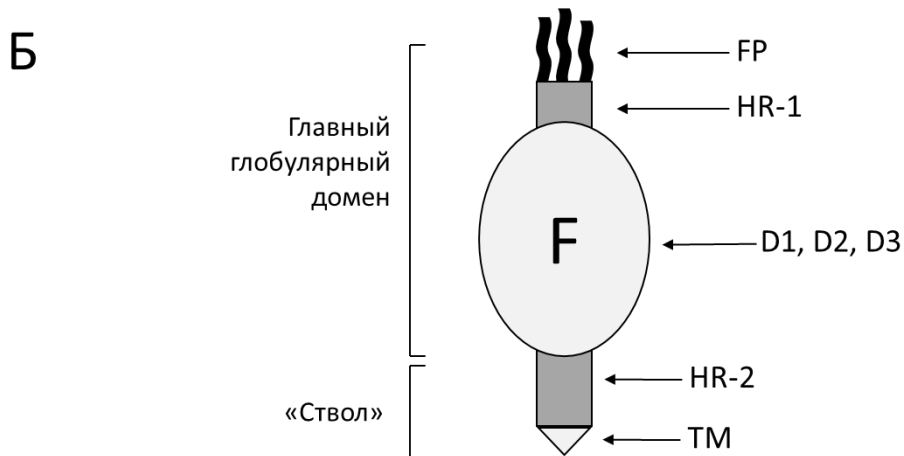
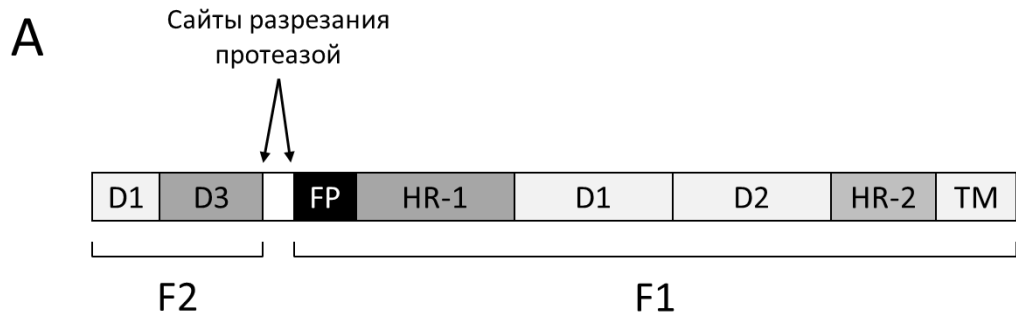
**В сборку вирионов** вовлечён актиновый цитоскелет клетки, который транспортирует белки вируса F, G и SH к апикальной поверхности мембраны клетки. Одновременно белок N связывается с заново синтезированной геномной РНК вируса и РНК-зависимой РНК-полимеразой, состоящей из большого белка L и фосфопротеина P, формируя рибонуклеопротеиновый комплекс, который дополнительно ассоциируется с белком M и затем также транспортируется к апикальной поверхности мембраны клетки – месту локализации гликопротеинов. В результате образуются вирусные частицы, которые отпочковываются от клетки-мишени в виде сформированных инфекционных вирионов [9, 20] (рисунок 1).

Понимание молекулярных механизмов РСВ-инфекции позволяет выявить наиболее значимые молекулярные мишени для таргетной терапии. Помимо очевидных мишеней: белков G и F, необходимых для прикрепления вириона к клетке и слияния с ней, и клеточных рецепторов РСВ, – заслуживают внимания белки L и P – как субъединицы фермента, необходимого для реализации инфекционного цикла вируса, а также белок N, обеспечивающий стабильность и защиту от ферментативной дегградации геномной РНК в инфицированной клетке [9].



Схематическое изображение строения вириона и структуры генома РСВ, а также основные этапы его жизненного цикла: прикрепление к клетке-мишени и слияние с ней, репликация генома, транскрипция мРНК вирусных генов с последующей трансляцией, сборка и почкование вирионов.

Рисунок 1 – Строение вириона РСВ и его жизненный цикл



А. Доменная структура белка F. Белок F в ходе процессинга разрезается на две субъединицы, F1 и F2. FP – пептид слияния, необходим для взаимодействия с мембраной клетки-мишени. TM – трансмембранный домен, необходим для заякорения белка F в оболочке РСВ. HR-1 и HR-2 – регионы, формирующие  $\alpha$ -спиральную структуру белка F. Домены D1, D2 и D3 формируют главный глобулярный домен белка F. Б. Схематическое изображение структуры F-белка. Функциональный белок F представляет собой тример F1/F2 гетеродимеров. В нем выделяют главный глобулярный домен, формируемый доменами D1, D2, D3, FP и спиральным участком HR-1, а также “ствол” белка, формируемый спиральной областью HR-2 и TM. В. Механизм слияния РСВ и клетки-мишени. Белок F заякорен в

оболочке РСВ за счет ТМ. FР взаимодействует с мембраной клетки-мишени, что инициирует пространственную перестройку белка F, заключающуюся в сближении  $\alpha$ -спиральных областей HR-1 и HR-2, что в итоге приводит к формированию шпильчатой структуры и сближению мембран вируса и клетки. В результате мембраны вируса и клетки сливаются и геном РСВ проникает в цитоплазму клетки.

Рисунок 2 – Структура белка F и молекулярный механизм его участия в процессе слияния вириона и клетки-мишени

## 1.2 Иммунопатогенез РСВ-инфекции

Для изучения иммунопатогенеза РСВ-инфекции помимо клинического материала пациентов применяют модели на животных.

### 1.2.1 Патологические изменения респираторного тракта при РСВ-инфекции у человека

При исследовании биообразцов от пациентов, показано, что РСВ поражает верхние и нижние дыхательные пути человека. Инфицирование происходит за счёт прямого контакта вирусосодержащих частиц с эпителием респираторного тракта. Первоначально репликация вируса протекает в эпителии носоглотки после инкубационного периода, составляющего 4–5 дней с последующим распространением патогена в нижние дыхательные пути. При этом тяжесть патологии значительно варьирует от слабых симптомов ОРВИ (острая респираторная вирусная инфекция) вплоть до обструкции дыхательных путей, гипоксии и пневмонии [145].

Вирус преимущественно реплицируется в реснитчатом эпителии дыхательных путей и альвеолярных пневматоцитах типа I и II [86]. Сведения о гистологических изменениях респираторного тракта были получены при анализе образцов лёгких от пациентов, погибших в результате тяжёлой РСВ-инфекции. Данные изменения характеризовались периваскулярной и перибронхиальной инфильтрацией мононуклеарами и Т-клетками, признаками пневмонии, некроза эпителия бронхиол, закупоркой просвета бронхиол конгломератами клеток (слушивающимися эпителиальными клетками, макрофагами и нейтрофилами), гиперсекрецией слизи [86]. При этом CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоциты обнаруживались в дыхательных путях редко [194]. Анализ образцов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), полученных от детей с РСВ-индуцированным бронхиолитом, выявил значительное количество нейтрофилов [168]. Также в образцах БАЛ выявлено значительное количество провоспалительных факторов: TNF $\alpha$ ,

IL-6, IL-1a, IL-8, MIP-1a, MCP-1, RANTES, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-9 и IL-17 [149, 172]. Активация вышеуказанных провоспалительных факторов вносит вклад в патогенез РСВ-инфекции.

### **1.2.2 Изучение иммунопатогенеза РСВ-инфекции с использованием моделей на животных**

Моделирование РСВ-инфекции проводят на мышах, крысах, хорьках, телятах, овцах и других животных [15], однако эти виды лишь частично чувствительны к вирусу, что ограничивает их применение для изучения патогенеза инфекции. Единственные природно-восприимчивые к РСВ человека животные — шимпанзе [15, 179], но их использование ограничено высокой стоимостью исследований. Чаще всего для моделирования РСВ-инфекции используют лабораторных мышей (особенно линии BALB/c), т.к. вирус ограниченно реплицируется в их респираторном тракте [125]. Обычно мышей заражают интраназально дозами  $10^4$ – $10^7$  БОЕ (бляшкообразующих единиц), что достаточно для индукции проявлений патологии таких как, гиперсекреция слизи, инфильтрация легких провоспалительными клетками и иные патологические изменения [171]. В исследованиях применяют штаммы A2, *line 19, long*, а также клинические изоляты от пациентов [171]. Первые работы по моделированию РСВ-инфекции у мышей появились в конце 70-х [141] — начале 80-х годов прошлого века. [68, 178]. К настоящему времени благодаря моделированию с использованием мышей удалось в значительной степени понять иммунопатогенез РСВ-инфекции на молекулярном и клеточном уровнях.

### **1.2.3 Роль Т-клеток в антивирусной защите**

Антивирусная защита от РСВ реализуется за счет нескольких механизмов, один из них опосредован Т-клетками. Мыши, у которых отсутствовали Т-клетки вследствие врожденной аплазии тимуса (*nu/nu* BALB/c) или экспозиции к гамма-излучению, были более восприимчивы к РСВ-инфекции и развивали более тяжёлую патологию в сравнении с мышами, у которых присутствовали функциональные Т-клетки [31]. Адоптивный перенос таким мышам Т-клеток, праймированных вирусом, способствовал ускоренному клиренсу респираторного тракта от РСВ. При этом праймированные Т-клетки проявляли антивирусный эффект благодаря

цитотоксическим свойствам и независимо от гуморальной иммунной системы, так как элиминация вируса из легких происходит в отсутствие вирус-специфических антител [31]. Однако присутствие вирус-специфических антител ускорило клиренс лёгких от РСВ, что свидетельствует о важной роли не только клеточного, но и гуморального звена иммунитета в антивирусной защите [31]. Аналогичные наблюдения сделаны в клинической практике. На модели РСВ-инфекции у человека продемонстрировано, что увеличение количества CD8 Т-клеток в образцах БАЛ коррелировало со снижением вирусной нагрузки [89].

В последствии роль Т-клеток в патогенезе РСВ-инфекции была многократно подтверждена, чему посвящён ряд обзоров [152, 157, 158]. Согласно современным данным, при первичной инфекции дендритные клетки (ДК) поглощают и презентуют антигены вируса и активируют вирус-специфические цитотоксические Т-лимфоциты в региональных лимфоузлах, которые мигрируют в респираторный тракт и осуществляют протективный эффект. Содержание активированных Т-клеток в бронхиальных аспиратах пациентов с РСВ-инфекцией достигает максимума через 10 суток после развития симптомов заболевания, при этом вирус-специфические CD8 Т-клетки локализуются преимущественно в паренхиме лёгких, а не циркулируют в кровеносной системе. В ходе инфекции активированные Т-клетки продуцируют провоспалительные цитокины  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$ , а после разрешения инфекции цитотоксические Т-лимфоциты остаются в организме в виде клеток памяти в течение нескольких месяцев и обеспечивают защиту от последующих инфекций. При вторичной инфекции Т-клетки значительно быстрее аккумулируются в лёгких, преимущественно за счёт миграции, а не пролиферации (рисунок 3), и осуществляют цитотоксический эффект в отношении инфицированных клеток за счёт способности индуцировать апоптоз инфицированной клетки или осуществлять прямой её лизис путём продукции гранзимов и перфоринов (рисунок 3 А). Также продукция провоспалительных цитокинов  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  инициирует смерть инфицированных клеток [157, 158].

Углублённые исследования позволили установить несколько субтипов Т-клеток, памяти:  $T_{CM}$  – центральные Т-клетки памяти, локализующиеся во вторичных лимфоидных органах;  $T_{EM}$  – эффекторные Т-клетки памяти, которые мигрируют в респираторный тракт и осуществляют эффекторные функции. Эти два субтипа клеток ( $T_{CM}$  и  $T_{EM}$ ) присутствуют одновременно в системном кровотоке и в респираторном тракте. Ещё один субтип Т-клеток, которые локализуются только в лёгких –  $T_{RM}$  (тканерезидентные CD8 Т-клетки памяти). Именно они представляют собой «первую линию» защиты от повторных инфекций [89, 124, 157, 158] (рисунок 3 Б).

### 1.2.4 Роль Т-клеток в РСВ-индуцированной иммунопатологии лёгких

Несмотря на антивирусный эффект, Т-клетки вовлечены в развитие иммунопатологии лёгких [32]. Экспериментально показано, что деплеция цитотоксических Т-лимфоцитов приводит к увеличению репродукции вируса в лёгких, но при этом патологические изменения респираторного тракта уменьшаются [69]. Наоборот, увеличение количества цитотоксических Т-лимфоцитов утяжеляет патологические процессы в лёгких, но при этом вирусная нагрузка снижается [156]. Согласно последним данным в индукцию такой иммунопатологии вовлечены цитокины TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , продуцируемые вирус-специфическими Т-клетками. Нейтрализация TNF $\alpha$  с помощью МАТ перед инфекцией приводила к ослаблению патологических изменений в лёгких [156]. Аналогично нейтрализация IFN $\gamma$  или нокаут соответствующего гена снижает выраженность иммунопатологии лёгких после заражения РСВ [134, 156] (рисунок 3 А).

Примечательно, что такая иммунопатология, опосредованная Т-клетками характерна для РСВ-инфекции, но не для всех респираторных вирусов. Например, цитотоксические Т-лимфоциты памяти обладают протективным эффектом по отношению к вирусу гриппа и коронавирусу (штамм *MA15*), при этом не вызывают иммунопатологии лёгких [33, 167].

Данные об участии Т-клеток в иммунопатологии, полученные на моделях у мышей, коррелируют с клиническими наблюдениями. Отмечалось, что увеличение числа цитотоксических Т-лимфоцитов в образцах БАЛ приводило к более выраженной патологии респираторного тракта пациентов с РСВ-инфекцией [39]. Также после трансплантации костного мозга у пациента возрастало количество цитотоксических Т-лимфоцитов и коррелировало со снижением титра РСВ в назальных смывах, однако появление цитотоксических Т-лимфоцитов негативно сказывалось на функции дыхания пациентов, что являлось маркёром патологических изменений в лёгких [153].

В нивелировании патологии опосредованной цитотоксическими Т-лимфоцитами играют роль Т-регуляторные клетки (Treg). Они уменьшают выраженность патологических изменений в лёгких. Деплеция Treg на фоне РСВ-инфекции приводила к увеличению количества цитотоксических Т-лимфоцитов, повышению продукции TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  и, как следствие, к усилению патологии лёгких [61]. Наоборот, увеличение количества Treg перед инфекцией приводило к обратному эффекту [106]. Treg оказывают такой эффект за счёт продукции значительного количества противовоспалительного IL-10. Его нейтрализация с помощью МАТ или нокаут соответствующего гена усиливали патологию лёгких [108, 173] (рисунок 3 А).

Кроме того, согласно последним данным, клетки T<sub>RM</sub> способны осуществлять антивирусную защиту, не вызывая иммунопатологии лёгких. В исследовании Kinnear et al. [94]

мышам перед РСВ-инфекцией интраназально вводили  $T_{RM}$ -клетки, полученные из лёгких инфицированных мышей. В итоге эти клетки существенно снижали вирусную нагрузку в лёгких и уменьшали тяжесть патологии; при этом  $CD8^+$   $T_{RM}$ -клетки обеспечивали антивирусные свойства, в то время как  $CD4^+$   $T_{RM}$ -клетки не влияли на репродукцию РСВ, но оказывали противовоспалительный эффект, подавляя экспрессию  $TNF\alpha$  [94]. Стоит отметить, что формирование  $T_{RM}$ -клеток в лёгких происходит после локальной (а не системной) иммунизации антигенами вируса [124]. По всей видимости, локальный (например, аэрозольный) способ вакцинации может являться перспективным для профилактики РСВ.

Стоит отметить, что провоспалительный цитокин  $TNF\alpha$  продуцируется не только цитотоксическими Т-лимфоцитами под действием вируса, но и макрофагами. Макрофаги, выделенные от мышей, нокаутных по гену, кодирующему  $TLR2$ , продуцировали значительно меньше  $TNF\alpha$  после стимуляции вирусом по сравнению с макрофагами мышей дикого типа [129]. Клетки респираторного эпителия также продуцируют  $TNF\alpha$  после их стимуляции вирусом, что показано в исследованиях *in vitro* с применением МАТ, блокирующих  $TNF\alpha$ . Таким образом, помимо цитотоксических Т-лимфоцитов в РСВ-индуцированной иммунопатологии лёгких задействованы и другие типы клеток (макрофаги и эпителиальные клетки).



Выделяют несколько фенотипов Т-клеток памяти: 1. ТСМ – центральные Т-клетки памяти (CD62Lhi/CCR7hi/IL-7R $\alpha$ hi/KLRG1lo) циркулируют в кровеносном русле и аккумулируются во вторичных лимфоидных органах. 2. ТЕМ – эффекторные Т-клетки памяти (CD62Llo/CCR7lo/IL-7R $\alpha$ lo/KLRG1hi) преимущественно локализуются в лёгких, но способны к циркуляции в кровотоке. 3. ТРМ – тканерезидентные Т-клетки памяти (CD62Llo/CD69hi/CD103hi) локализуются исключительно в лёгких и не способны к циркуляции в кровотоке. Б. Механизм гибели зараженной клетки. ТЕМ и ТРМ осуществляют протективный антивирусный эффект, запуская апоптоз или прямой лизис инфицированной клетки.

Рисунок 3 – Роль Т-клеток в антивирусной защите и иммунопатологии лёгких

### 1.2.5 Роль гуморального иммунитета

Ввиду того, что модели на мышах не воспроизводят в полной мере клиническую картину РСВ-инфекции у человека, их применение для изучения роли адаптивной иммунной системы в патогенезе данного заболевания остаётся ограниченным. Значительная часть данных была получена на моделях РСВ-инфекции у человека, когда группу добровольцев инфицировали очищенным вирусом. На таких моделях было установлено, что антитела класса А (IgA), выделенные из назальных смывов, а также сывороточные антитела класса G (IgG) оказывали протективный эффект в отношении вируса [72]. При этом IgA проявляли более выраженный и длительный по времени анти-РСВ-эффект в сравнении с IgG-антителами [72].

Нейтрализующие антитела вырабатываются в основном на белок F вируса. Иммунологическое картирование этого белка выявило семь главных антигенных сайтов: Ø, I, II, III, IV, V и VIII. При этом сайты Ø, V и VIII существуют только на префузионной конформации белка F [71, 126]. Было показано, что большинство вируснейтрализующих антител (более 60%), выделенных из В-клеток пациентов, перенёсших РСВ-инфекцию, направлены против сайтов Ø, V [64] и VIII [126]. В то же время антитела, направленные к сайтам II, III и IV, обладают значительно (в 100–1000 раз) меньшими вируснейтрализующими свойствами.

Это связано с тем, что антигенные сайты Ø, V и VIII представлены на префузионной, а не на постфузионной форме белка F. Связывание антител с этими сайтами стабилизируют белок F, препятствуя его перестройке в постфузионную конформацию и, как следствие, процессу слияния вириона и клетки [71, 126].

В составе препарата паливизумаб содержатся антитела против антигенного сайта II, который располагается на постфузионной форме белка F. Проведённые исследования показали, что МАТ против сайтов Ø, V и VIII обладали значительно более высоким (в 100–1000 раз) вируснейтрализующим эффектом в сравнении с препаратом паливизумаб [126, 199]. Полученные

новые данные об антигенной структуре белка F позволят создать не только более эффективные аналоги паливизумаба, но и разработать эффективную вакцину.

На другой поверхностный гликопротеин вируса – белок G – также формируются нейтрализующие антитела, особенно к его центральному консервативному домену [87], однако существование растворимой формы этого белка может нивелировать их антивирусный эффект [103].

В ответ на РСВ-инфекцию образуются также антитела класса E (IgE). Однако они не обладают антивирусным эффектом, а наоборот, играют неблагоприятную роль в патогенезе инфекции. В частности, РСВ-специфические IgE-антитела инициируют высвобождение тучными клетками гистамина и лейкотриенов, индуцируя воспалительные реакции [103].

### 1.2.6 Роль интерферонов

У человека идентифицировано три типа интерферонов: IFN-I, IFN-II и IFN-III, каждый из которых проявляет биологическую активность посредством своего рецептора. IFN-I и IFN-III напрямую участвуют в антивирусной защите организма [119]. Индукция интерферонов происходит после взаимодействия гликопротеинов РСВ с TLR-рецепторами (TLR2, TLR6, TLR3, TLR4, и TLR7) на поверхности лейкоцитов, плазмоцитоидных ДК и альвеолярных макрофагов [98]. Белок F распознается TLR4, что приводит к продукции IFN-I [198]. Нокаут соответствующего гена приводит к снижению эффективности элиминации вируса у мышей [98]. Рецепторы TLR2 и TLR6 также вовлечены в распознавание лигандов РСВ. Нокаут соответствующих генов приводит к увеличению вирусной нагрузки [129] (рисунок 4). Эндосомальные рецепторы TLR3 и TLR7, а также цитозольный рецептор NOD2 распознают вирусную РНК и инициируют продукцию IFN-I [23, 113, 151].

Роль интерферонов в патогенезе РСВ-инфекции показана в экспериментах на моделях у мышей. Инактивация гена, кодирующего фактор STAT1, являющегося транскрипционным фактором и участвующим в IFN-I/II-опосредованной сигнальной трансдукции, приводит к увеличению вирусной нагрузки в лёгких, усилению ГРБ (гиперреактивности бронхов), гиперпродукции слизи бронхиальным эпителием, увеличенной инфильтрации лёгких провоспалительными клетками [75] (рисунок 4). С использованием биоматериала от пациентов установлено, что IFN-I и IFN-III активируются в первые два дня после инфекции [160]. Стоит отметить, что третий тип интерферонов (IFN-III) включает в себя 4 представителя: IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 (известные как IL-29, IL-28A и IL-28B), а также IFN- $\lambda$ 4. В исследовании

Selvaggi et al. [160] показано, что у детей, госпитализированных с диагностированной РСВ-инфекцией, значительно повышена экспрессия генов *IFN- $\lambda$ 1– $\lambda$ 3* в назальных смывах; при этом выявлена прямая корреляция между уровнем экспрессии *IFN- $\lambda$ 1*, тяжестью патологии и ухудшением функции лёгких. В то же время эффект РСВ-инфекции на экспрессию *IFN- $\lambda$ 4* бронхиальным эпителием ещё не изучался.

По сравнению с другими респираторными вирусами РСВ индуцирует слабый интерфероновый ответ, особенно у детей [174]. Данные, полученные на модели РСВ-инфекции новорожденных мышей, подтверждают этот факт; заражение вирусом мышей в возрасте 5 дней не индуцирует экспрессию  $IFN\alpha$  и  $IFN\beta$  в лёгких по сравнению с половозрелыми мышами возрастом 6–8 недель. При этом введение экзогенного  $IFN\alpha$  нивелировало проявления патологии. В отдельном исследовании показано, что интраназальное введение  $IFN\alpha$  новорожденным мышам перед заражением РСВ приводит к значительному снижению вирусной нагрузки в лёгких путём повышения продукции протективных антител класса IgA в слизистой оболочке дыхательных путей [79].

Одно из объяснений aberrантного  $IFN$ -ответа в раннем возрасте – это низкое количество плазмоцитоподобных ДК и макрофагов, главных продуцентов  $IFN-I$  в респираторном тракте [40, 79]. Эти данные, полученные на модели у мышей, совпадают с результатами широкомасштабного клинического исследования INFANT, которое показало, что РСВ-инфекция у детей не индуцирует сколько-нибудь значительного  $IFN$ -ответа в слизистой оболочке дыхательных путей [152]. Вышеупомянутые исследования показывают сходство иммунного ответа на РСВ у мышей и человека, что позволяет изучать роль компонентов врождённого иммунитета на этом модельном виде животных.

Несмотря на значительное количество накопленных сведений об антивирусной активности  $IFN-I$  и  $IFN-III$ , их эффективность для анти-РСВ терапии противоречива. Это связано со способностью РСВ «уходить» от интерферонового ответа [152]. В частности, два неструктурных белка вируса ( $NS1$  и  $NS2$ ) связываются с фактором RIG-I в цитоплазме инфицированной клетки и супрессируют соответствующие пути сигнальной трансдукции. Также существуют сведения об участии белка G в ослаблении интерферонового антивирусного эффекта за счёт активации белков-супрессоров интерферонов –  $SOCS1$  и  $SOCS3$ . Белки  $SOCS1$  и  $SOCS3$  активируются по TLR-зависимому пути в ответ на РСВ-инфекцию, после чего они ингибируют продукцию интерферонов в клетке [197]. Таким образом, РСВ обладает механизмами, позволяющими не только блокировать сигнальный антивирусный ответ интерфероновых рецепторов, но и супрессировать продукцию эндогенных интерферонов, что ограничивает их медицинское применение для терапии РСВ. Кроме того, в отдельных случаях интерфероны способствуют более тяжёлому течению РСВ-инфекции [160].

### 1.2.7 Роль цитокинов

PCB приводит к повышенной продукции ряда провоспалительных цитокинов:  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A и прочих, как при естественной инфекции у человека [34], так и на моделях у мышей [84]. Большинство провоспалительных цитокинов продуцируется вирус-специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, а также макрофагами, эпителиальными клетками и ILC2 (врождённые лимфоидные клетки типа II) [84, 89, 156].

У пациентов с PCB-инфекцией фиксируется увеличение продукции  $IFN\gamma$  как в назальных смывах, так и в сыворотке крови [34]. Кроме того, тяжёлое течение инфекции ассоциировано с пониженным уровнем  $IFN\gamma$  [182]. Аналогичные данные получены на моделях у мышей. Введение  $IFN\gamma$  в дыхательные пути усиливает клиренс вируса в лёгких [52], в то время как нокаут соответствующего гена, наоборот, приводит к усилению репликации PCB [104] (рисунок 4). Все эти данные свидетельствуют о протективном антивирусном эффекте данного цитокина. Стоит отметить, что  $IFN\gamma$  может играть неблагоприятную патогенетическую роль, так как его введение на фоне PCB-инфекции усиливало воспаление в лёгких у животных и вызывало обструкцию бронхов [52] (рисунок 4), в то время как его нейтрализация с помощью МАТ приводила к уменьшению иммунопатологии лёгких [156]. Таким образом,  $IFN\gamma$  играет протективную роль в отношении PCB-инфекции, однако его роль в развитии иммунопатологии лёгких остаётся противоречивой.

Другой цитокин –  $TNF\alpha$  – также вносит вклад в иммунопатологию лёгких при PCB-инфекции. Его нейтрализация с помощью МАТ не влияет на репликацию PCB, но приводит к ослаблению воспаления в лёгких [156] (рисунок 4).

В ходе PCB-инфекции активируется продукция не только провоспалительных, но и регуляторных цитокинов, например IL-10. Повышение экспрессии IL-10 наблюдается как на моделях у мышей [108], так и в клинической практике у человека [34]. IL-10 продуцируется в основном Т-регуляторными клетками (Treg) [108] и обладает противовоспалительным эффектом, что частично компенсирует вирус-индуцированное воспаление респираторного тракта. У мышей с делецией данного гена развивается более выраженное воспаление лёгких на фоне PCB-инфекции. Такой эффект IL-10 связан с тем, что он подавляет способность цитотоксических Т-лимфоцитов продуцировать провоспалительные цитокины  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  (рисунок 4) [108]. Аналогичные наблюдения были сделаны и в клинической практике, когда снижение экспрессии IL-10 и генов IL-10-сигнального пути коррелировало с тяжестью патологии [122].

На моделях у мышей показано, что продукция IL-4 ассоциирована с тяжестью течения РСВ-инфекции [177]. Аналогичные наблюдения были сделаны и при исследовании назальных смывов пациентов с РСВ-инфекцией [190]. Наоборот, нейтрализация IL-4 с помощью МАТ приводила к нивелированию воспаления при инфекции [177] (рисунок 4). Это связано с тем, что данный цитокин ослабляет антивирусную цитолитическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов [29]. Другой Th2-цитокин – IL-13 – задействован в развитии гиперпродукции слизи и ГРБ при РСВ-инфекции, так как нокаут соответствующего гена нивелирует вышеуказанные проявления патологии [112] (рисунок 4). По всей видимости продукция IL-13, осуществляемая ILC2, регулируется цитокином TSLP, так как его нейтрализация снижает уровень экспрессии IL-13 и гиперсекрецию слизи [170] (рисунок 4).

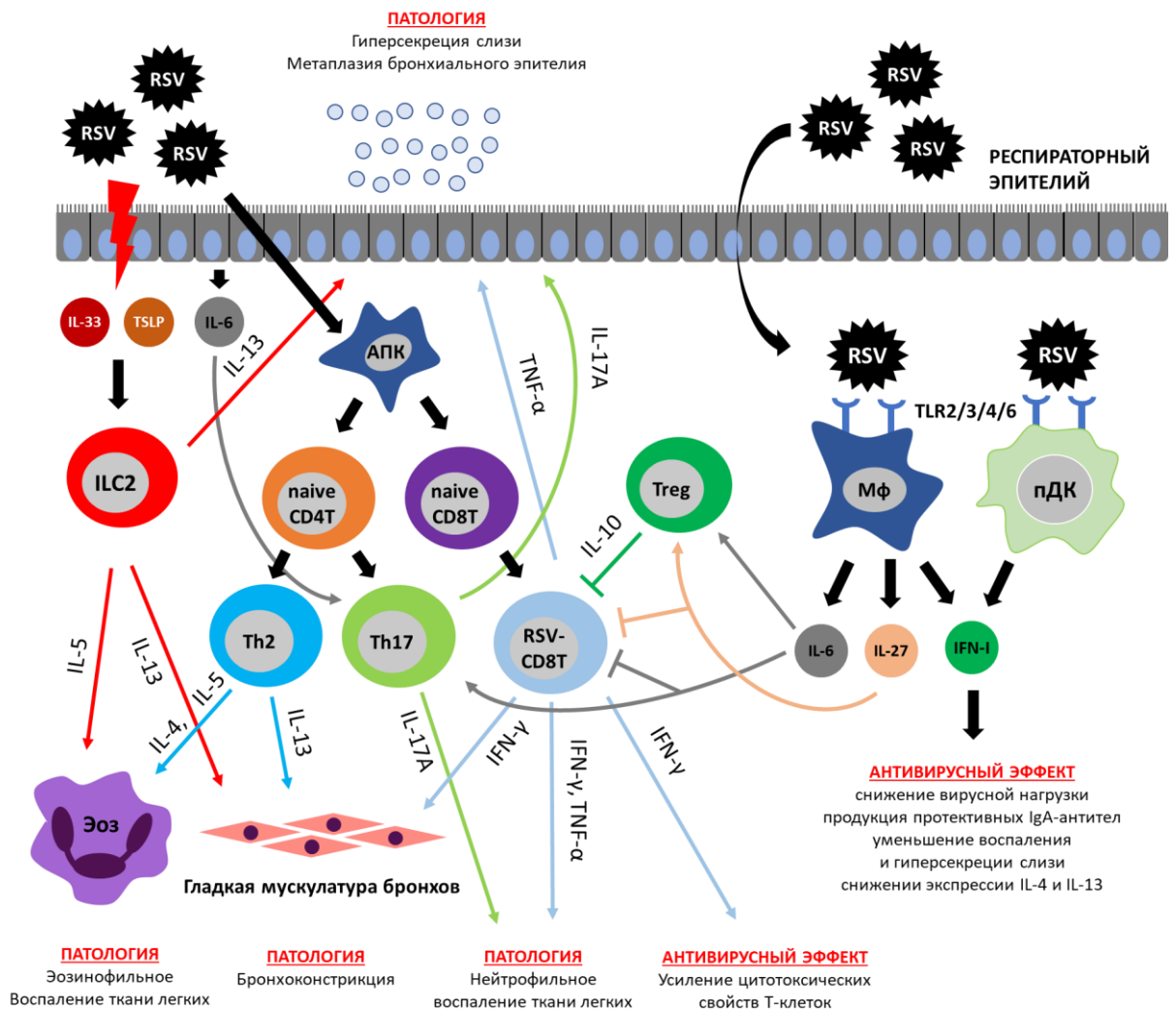
Цитокин IL-17A, который продуцируется в основном Th17-клетками, индуцирует нейтрофильное воспаление лёгких и гиперпродукцию слизи при РСВ-инфекции на модели у мышей [127] (рисунок 4). Продукция эпителиальными клетками и макрофагами другого провоспалительного цитокина – IL-6 – также увеличивается при РСВ-инфекции. Данный цитокин необходим для поляризации Th17-клеток. Несмотря на провоспалительные свойства IL-6, его нейтрализация с помощью МАТ перед заражением лабораторных животных приводила к утяжелению патологического процесса. Вероятно, это связано с тем, что нейтрализация IL-6 приводит к увеличению числа вирус-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов в лёгких и, как следствие, к усилению продукции провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  и снижению концентрации регуляторных цитокинов IL-10 и IL-27. При этом концентрация IL-17A значительно снижалась [143] (рисунок 4). По этой причине не проводились клинические исследования эффективности анти-IL-6 и анти-IL-17 терапии у пациентов с РСВ-инфекцией. Сходным образом IL-27 активируется при РСВ-инфекции. Однако его инактивация с помощью МАТ приводит к усилению патологических процессов в лёгких мышей, за счёт увеличения числа цитотоксических Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ . Таким образом, в иммунопатогенезе РСВ-инфекции IL-6 и IL-27 играют сходную роль: снижают цитотоксические Т-лимфоциты и активируют Treg-клетки [143] (рисунок 4).

Несмотря на отсутствие исследований клинической эффективности анти-IL-6 терапии у пациентов с РСВ-инфекцией, недавно был опубликован ряд работ, в которых описаны попытки применения в клинической практике моноклональных антител против IL-6 (препараты Tocilizumab, Sarilumab и Siltuximab) для лечения пациентов с диагнозом COVID-19. Систематизация результатов 10 клинических исследований не выявила существенных благоприятных эффектов от данной терапии [19, 101]. Обсуждается также возможность применения анти-IL-17 МАТ для лечения пациентов с COVID-19 [135], однако опубликованные результаты таких исследований отсутствуют.

Недавно была показана роль цитокинов IL-33 и TSLP, продуцируемых эпителием в патогенезе РСВ-инфекции. Было выявлено, что у новорожденных мышей повышена экспрессия провоспалительного цитокина IL-33 в ткани лёгких [130, 155]. Данный цитокин активирует ILC2, которые продуцируют значительные количества IL-13, что в итоге способствует формированию Th2-иммунного ответа на РСВ-инфекцию. Нейтрализация IL-33 или нокаут гена его рецептора приводили к уменьшению патологии лёгких, но не влияли на репликацию вируса [155] (рисунок 4). Сходные результаты были получены в исследовании, в котором осуществлялась супрессия IL-33 миРНК; она приводила к уменьшению воспаления в лёгких, но не вирусной нагрузки [97]. Другой цитокин, продуцируемый бронхиальным эпителием – TSLP – также участвует в РСВ-индуцированном воспалении лёгких. Его инактивация уменьшает количество ILC2 в респираторном тракте [170].

### 1.2.8 Роль активных форм кислорода

Накоплены убедительные доказательства, что активные формы кислорода (АФК) являются важным фактором воспаления лёгких и повреждения тканей бронхиального эпителия при РСВ-инфекции. В 2004 г. было показано, что РСВ индуцирует образование АФК, которые, в свою очередь, запускают воспалительный каскад за счёт активации факторов STAT в эпителиальных клетках [107]. Известно, что ген, кодирующий фактор IRG1, вовлечён в регуляцию АФК. РСВ-инфекция эпителиальных клеток *in vitro* приводит к активации IRG1 и продукции АФК. Эти данные подтверждаются и в экспериментах *in vivo* при заражении мышей РСВ. Нокаут этого гена молекулами миРНК уменьшает продукцию АФК и, как следствие, воспаление в лёгких [148].



РСВ-инфекция активирует пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$ , которые вовлечены в формирование основных проявлений патологии. Дополнительно  $IFN\gamma$  вовлечён не только в развитие патологии, но и в противовирусную защиту организма. РСВ вызывает некроз респираторного эпителия, приводя к высвобождению цитокинов IL-33 и TSLP, которые активируют ILC2, продуцирующие цитокины IL-5 и IL-13. Данные цитокины участвуют в формировании проявлений патологии, вызывают эозинофильное воспаление лёгких, а также гиперпродукцию слизи и гиперреактивность бронхов. Кроме того, при РСВ-инфекции под действием определенного цитокинового микроокружения происходит поляризация Th2- и Th17-иммунного ответа. Th2- клетки продуцируют цитокины IL-4, IL-5 и IL-13, которые приводят к развитию гиперреактивности бронхов, гиперсекреции слизи и эозинофильному воспалению лёгких. Th17- клетки продуцируют IL-17A, который формирует нейтрофильное воспаление лёгких и гиперсекрецию слизи. Иммунорегуляторные функции выполняет цитокин IL-10, продуцируемый Treg. Он подавляет провоспалительную активность цитотоксических Т- лимфоцитов. Сходными свойствами обладают IL-6 и IL-27. Они способны как напрямую супрессировать цитотоксические Т-лимфоциты, так и активировать Treg. РСВ распознается TLR-рецепторами на поверхности макрофагов (Mφ) и плазмацитоидных ДК (пДК), которые продуцируют ограниченное количество интерферонов типа I ( $IFN-I$ ), обладающих противовирусным эффектом.

Рисунок 4 – Иммунопатогенез РСВ-инфекции

### 1.3 Профилактика и терапия РСВ-инфекции

#### 1.3.1 Вакцины для профилактики РСВ-инфекции

В настоящее время для профилактики РСВ-инфекции одобрены три вакцины: две субъединичные – Arexvy (GSK) и Abrysvo (Pfizer), и одна мРНК-вакцина – mRESVIA (Moderna). Arexvy представляет собой рекомбинантную вакцину, содержащую пре-слитый (preF) белок РСВ подтипа А с адьювантом AS01E, и показана лицам в возрасте 60 лет и старше, а также пациентам 50–59 лет с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой или дыхательной системы, диабетом [17]. В ключевом исследовании III фазы **эффективность Arexvy** в первый сезон составила более 80% [136]. Наблюдение за вакцинированными в течение следующих трёх сезонов продемонстрировало сохранение защиты: кумулятивная эффективность достигла 62,9 [17, 83]. По данным пострегистрационного надзора, у вакцинированных Arexvy отмечено повышение частоты синдрома Гийена–Барре (СГБ) – 1,8 случая на миллион введённых доз [77]. Исследование вакцины у беременных было досрочно прекращено из-за более высокой частоты преждевременных родов (6,8% против 4,9% в группе плацебо) и неонатальной смертности, поэтому Arexvy не показан для вакцинации беременных [46].

**Вакцина Abrysvo**, в отличие от Arexvy, содержит равные количества preF-белков обоих подтипов РСВ (А и В) и не содержит адьюванта; она одобрена для взрослых старше 60 лет, а также для беременных на сроке 24–36 недель с целью пассивной защиты новорожденных [17]. У пожилых людей эффективность Abrysvo составила 65,1% в первый сезон и снизилась до 55,7% во второй [191]. При вакцинации беременных эффективность в предотвращении заболеваний нижних дыхательных путей у младенцев достигла 81,8% в первые 90 дней и 69,4% в течение 180 дней после рождения, причём более высокая защита наблюдалась при иммунизации на 32–36-й неделях гестации [17, 90]. По безопасности Abrysvo также выявлен сигнал о возможном повышении риска СГБ – 4,4 случая на миллион доз [77]. В исследованиях у беременных отмечена тенденция к увеличению частоты преждевременных родов (5,7% против 4,7% в плацебо), однако причинно-следственная связь окончательно не установлена [17].

Третья **вакцина, mRESVIA** компании Moderna, основана на мРНК, кодирующей мембраносвязанный preF-белок РСВ-А, и показана лицам старше 60 лет [17]. По результатам исследования ConquerPCV, эффективность в первый сезон составила 78,7%, но уже через 18 месяцев наблюдения снизилась до 50,3%; тем не менее защита от тяжёлого течения инфекции сохранялась на более высоком уровне [17, 196]. Важно, что при применении мРНК-вакцины не

зарегистрировано случаев СГБ или миокардита, характерных для некоторых мРНК-вакцин против COVID-19 [16, 196].

Несмотря на успехи вакцинации, остаётся ряд нерешённых проблем. Во-первых, отсутствуют надёжные данные об эффективности и безопасности всех трёх вакцин у иммунокомпрометированных пациентов (например, получающих химиотерапию или ритуксимаб) и у лиц старше 80 лет, поскольку эти группы были исключены или недостаточно представлены в клинических исследованиях [17]. Во-вторых, прямое сравнение вакцин затруднено из-за различий в определениях конечных точек [17]. Кроме того, все ключевые испытания проводились в период пандемии COVID-19, когда циркуляция РСВ была аномально низкой, что могло повлиять на оценку эффективности [193].

В педиатрии остаётся неопределённость в выборе оптимальной стратегии: вакцинация беременных (Abrysvo) или пассивная иммунизация младенцев моноклональным антителом нирсевимаб; оба подхода считаются сопоставимыми по эффективности [17, 80, 147, 166].

Таким образом, несмотря на появление эффективных вакцин против РСВ, сохраняется необходимость в разработке безопасных и универсальных терапевтических средств для лечения РСВ-инфекции.

### **1.3.2 Препараты на основе моноклональных антител для профилактики РСВ-инфекции**

Разработка МАТ против РСВ является одним из ключевых направлений профилактики тяжелой инфекции у детей раннего возраста. Исторически первым и на протяжении длительного времени единственным препаратом оставался паливизумаб (Synagis, AstraZeneca), одобренный FDA в 1998 году и ЕМА в 1999 году. Паливизумаб представляет собой МАТ, нацеленное на антигенный сайт II F-белка вируса, что предотвращает слияние вируса с клеткой [35, 140]. Однако его период полувыведения составляет всего 20 дней, что требует внутримышечного введения пяти доз (по 15 мг/кг) с интервалом в месяц на протяжении всего сезона РСВ [140].

Эффективность паливизумаба была подтверждена в ряде исследований. Систематический обзор пяти рандомизированных контролируемых исследований с участием 3343 детей из группы высокого риска показал, что через два года наблюдения относительный риск госпитализации в группе паливизумаба был ниже по сравнению с плацебо [139]. Кроме того, применение паливизумаба привело к скромному, но статистически значимому снижению числа госпитализаций и более существенному снижению частоты РСВ-инфекции, и количеству дней с нарушением дыхания [139]. Несмотря на эффективность, высокая стоимость и необходимость

ежемесячных инъекций ограничивают применение паливизумаба только группами самого высокого риска (дети с врожденными пороками сердца, бронхолегочной дисплазией) и делают его непригодным для массового использования [139].

Попытки улучшить фармакокинетические свойства привели к созданию мотавизумаба — МАТ с более высокой авидностью к тому же сайту II, позволяющего вводить меньшие дозы [131]. Однако FDA отказало в его регистрации в 2010 году из-за отсутствия доказательств превосходства над паливизумабом и опасений по поводу гиперчувствительности [45]. Другой кандидат, суптавумаб (нацелен на сайт V), успешно прошел II фазу, но провалился в III фазе из-за появления в сезоне 2016–2017 гг. нового штамма РСВ-В с мутациями в сайте связывания, что подчеркивает важность мониторинга циркулирующих штаммов [188].

Принципиально новым этапом стало появление **нирсевиумаба (Beyfortus, AstraZeneca/Sanofi)** – рекомбинантного человеческого МАТ с удлинённым периодом полувыведения (около 69 дней), нацеленного на высококонсервативный антигенный сайт Ø пре-фузионной конформации F-белка. Блокируя этот сайт, нирсевиумаб стабилизирует F-белок в пре-фузионной форме, предотвращая проникновение вируса в клетку [64, 76]. Благодаря длительному периоду полувыведения, однократной дозы достаточно для защиты на весь сезон [116, 150].

Эффективность и безопасность нирсевиумаба подтверждены в серии клинических исследований. Исследование III фазы у здоровых недоношенных детей, родившихся на 29–35-й неделе гестации, показало снижение частоты РСВ-ассоциированных инфекций на 71% и госпитализаций на 78% [70]. В крупном многонациональном исследовании 2023 года эффективность нирсевиумаба достигла 83,2%, [120].

Данные реальной клинической практики из стран, внедривших массовую иммунизацию нирсевиумабом в сезон 2023/2024, подтверждают результаты клинических исследований [91, 118, 120, 169]. Профиль безопасности нирсевиумаба благоприятный: нежелательные явления ограничивались типичными поствакцинальными реакциями: болезненность в месте инъекции, раздражительность, лихорадка [37, 70, 120, 121, 169]. Данные подтверждают безопасность применения даже у глубоко недоношенных детей и детей с кардиореспираторной патологией [17].

В настоящее время в разработке находится несколько новых МАТ. Наиболее разработанным является **клесровумаб (МК-1654, Merck)** – МАТ с удлинённым периодом полувыведения (73–91 день), нацеленное на высококонсервативный сайт IV F-белка, общий для пре- и пост-фузионной конформации [17, 196]. Промежуточный анализ результатов исследования IIb/III фазы показал, что однократная доза клесровумаба (100 мг независимо от веса) снижает частоту РСВ-ассоциированных инфекций дыхательных путей на 60,4%, а

госпитализаций на 84,2% [16]. Другие разрабатываемые МАТ включают **TNM001** (Trinomab Biotechnology) и **RSM01** (Bill & Melinda Gates Medical Research Institute), последний ориентирован на доступность для стран с низким и средним уровнем дохода [67, 161].

### 1.3.3 Этиотропная терапия РСВ-инфекции. Рибавирин

Рибавирин — это нуклеозидный аналог с широким спектром противовирусной активности против различных вирусов [21, 137]. Аэрозольный рибавирин — единственная разрешенная FDA (в 1985 году) противовирусная терапия для лечения РСВ-инфекций [189]. Однако его клиническое применение ограничено противоречивой эффективностью и побочными эффектами. В настоящее время рибавирин применяется только при угрожающих жизни инфекциях, вызванных РСВ, у пациентов с ослабленным иммунитетом.

Рибавирин не оказывает существенного клинического эффекта у иммунокомпрометированных детей с РСВ-инфекцией. Метаанализ, в котором были рассмотрены несколько рандомизированных контролируемых исследований, свидетельствует об отсутствии достаточных доказательств, подтверждающих существенную пользу рибавирина в снижении смертности или необходимости механической вентиляции у детей с РСВ-бронхиолитом [189]. Другой систематический обзор показал, что, хотя рибавирин может оказывать некоторое положительное влияние на снижение вирусной нагрузки РСВ, его общее влияние на клинические исходы, такие как продолжительность механической вентиляции и длительность пребывания в больнице, остается спорным [146].

Однако рибавирин демонстрирует приемлемую эффективность против РСВ у пациентов с иммунодепрессивными состояниями (например, у реципиентов трансплантации гемопоэтических клеток). Метаанализ и систематический обзор демонстрируют, что рибавирин может значительно снизить смертность от РСВ-инфекций нижних дыхательных путей у гематологических пациентов [27].

Учитывая вышесказанное существует потребность в разработке новых средств этиотропной терапии РСВ-инфекции.

#### 1.4 Природные и синтетические пептиды как перспективные противовирусные средства

Природные пептиды — важная составляющая врождённой иммунной системы организма от насекомых до млекопитающих, выполняющая антимикробные, иммуномодулирующие и противовирусные функции [54] [81] [159]. У млекопитающих ключевыми семействами таких пептидов выступают дефензины (альфа, бета и тета) и кателицидины. Например, альфа-дефензины (HNP1–4 и HD5–6) и бета-дефензины проявляют активность против микробов и вирусов [54] [81]. Тета-дефензины у человека отсутствуют, но созданные на их основе ретроциклины (RC1, RC2) тоже демонстрируют противовирусные свойства [159]. Единственный человеческий кателицидин hCAP-18 расщепляется до активной формы LL-37, обладающей антимикробным и противовирусным действием [59] [55] [41]. Несмотря на перспективность природных пептидов, их медицинское применение осложняется быстрой инактивацией протеазами сыворотки, высокой стоимостью производства и сложностью определения точного механизма действия из-за плейотропного эффекта. Тем не менее интерес к ним растёт, о чем свидетельствует тот факт, что не менее 15 пептидсодержащих противомикробных препаратов находятся на стадии клинических испытаний [60].

Активно разрабатываются синтетические пептиды. Исследования белка F РСВ позволили создать ряд синтетических пептидов с противовирусной активностью. Например, пептид T-118, который специфически ингибирует РСВ, связываясь с белком F и блокируя слияние вируса с клеткой [100]. Аналогично, пептид из центрального субдомена белка G (G149–197) ингибирует РСВ-инфекцию, взаимодействуя с рецептором вируса на клетке [66].

Особый интерес представляют стабилизированные  $\alpha$ -спиральные пептиды, например, модифицированный пептид HR-C483–495 с лактамными мостиками: он демонстрирует противовирусную активность в отношении РСВ [162]. Также активен пептид SB105-A10, который блокирует взаимодействие РСВ с гепарансульфатными протеогликанами (HSPG) на поверхности клеток [48].

Описаны и другие соединения с анти-PCV активностью, например пептиды из хемокинов CXCL9 и CXCL12 $\gamma$  с гликозаминогликан-связывающими доменами, которые ингибируют РСВ-инфекцию на стадии прикрепления вируса к клетке [187], пептид RhoA77-95, блокирующий процесс слияния вируса с клеткой [138], и дендримерный пептид LTP, богатый аргинином [6, 175]

Таким образом, природные и синтетические пептиды представляют значительный интерес как основа для разработки новых препаратов, влияющий на иммунопатогенез РСВ-инфекции.

## 1.5 Механизмы противовирусного действия пептидов

В современной научной литературе описано несколько различных механизмов антивирусного действия: ингибирование прикрепления вириона к клетке-мишени и слияния с ней, разрушение оболочки вириона и влияние на внутриклеточные процессы репликации вируса [9].

### 1.5.1 Ингибирование прикрепления вириона к клетке и слияния мембран

Процесс ингибирования прикрепления вириона к клетке и слияния вирусной и клеточной мембран может быть реализован двумя путями: во-первых, связыванием пептида с белками G и F вируса, которые необходимы РСВ на этих начальных стадиях инфекции; во-вторых, взаимодействием пептида с рецепторами РСВ на поверхности клеток-мишеней (рисунок 5) [9]. Большинство описанных на сегодняшний день пептидов с анти-РСВ-активностью действуют по первому пути – эффективно ингибируют прикрепление и слияние вириона с клеткой EC<sub>50</sub> (концентрация, при которой агент подавляет активность на 50%) составляет от нескольких десятков нМ [100, 162] до 100 мкМ [48, 49, 68]. Однако стоит отметить, что пептиды с таким механизмом действия могут быть эффективны только в профилактическом режиме применения, то есть непосредственно перед началом инфекционного процесса, и не активны в терапевтическом режиме – когда вирион уже слился с клеткой-мишенью и началась внутриклеточная стадия репликации вируса [9].

### 1.5.2 Разрушение мембраны РСВ

Оболочка РСВ включает мембрану, которая в свою очередь содержит в своей структуре так называемые липидные рафты – участки, богатые сфинголипидами и холестерином, несущие отрицательный заряд. Взаимодействие пептида с мембраной вируса опосредуется электростатическими взаимодействиями, поскольку притивовирусные пептиды в подавляющем большинстве катионного типа, то есть несут положительный заряд (рисунок 5) [9]. Проводя аналогию с механизмом действия природных катионных антимикробных пептидов, можно

предположить следующий молекулярный механизм разрушения оболочки вируса [9, 114]. На начальной стадии катионный пептид взаимодействует с отрицательно заряженным участком мембраны вириона; далее после достижения определенной критической концентрации пептида на поверхности мембраны формируется разрыв и пора, через которую низкомолекулярные соединения проникают внутрь капсида и разрушают его [9, 65].

### 1.5.3 Ингибирование репликации вируса

Геном РСВ представлен одноцепочечной молекулой РНК отрицательной полярности, а за репликацию геномной РНК отвечает фермент РНК-полимераза, которая состоит из белка L и его кофактора – белка Р. Белки L и Р удерживаются в едином комплексе за счет нековалентных связей, поэтому нарушение этих связей позволит предотвратить сборку активного фермента в клетке и тем самым заблокировать процесс репликации вируса. Пептиды, которые способны нарушать процесс репликации РСВ, в настоящий момент не описаны, однако существуют пептиды с подобным механизмом действия в отношении другого респираторного вируса – вируса гриппа. РНК-полимераза вируса гриппа состоит из субъединиц PB1, PB2 и PA, которые удерживаются в едином комплексе за счет нековалентных связей. Ghanem и соавт. [63] создали пептиды PB11\_25 и PB715\_740, которые связываются с субъединицей PA, блокируя сборку функциональной РНК-полимеразы и тем самым ингибируют репликацию вируса. Аналогичный подход возможен и для подавления репликации РСВ, однако он еще не реализован [9].

### 1.5.4 Другие механизмы действия

Условно, механизмы противовирусного действия пептидов можно подразделить на два вида: опосредованные вирусом (прямой лизис вирионов или блокирование вирусных лигандов, ответственных за инфекцию, и др.) или опосредованные клеткой (инактивация клеточных рецепторов, ингибирование процесса слияния и т.д.). Для природных пептидов описан целый ряд опосредованных клеткой механизмов противовирусного действия [9]. Так, для дефензинов показано, что они ингибируют киназу PKC, которая необходима для перемещения вириона внутри инфицированной клетки [154]. Дефензины усиливают способность нейтрофилов поглощать вирионы и тем самым их нейтрализуют [181], однако этот механизм действия не

относится к вирусспецифичным – он же задействован и в ответе клетки на бактериальные инфекции. В экспериментах *in vivo* выявлена иммунорегуляторная функция кателицидина LL-37. Не исключено, что противовирусная активность LL-37 обусловлена именно этой особенностью. По всей видимости, в организме млекопитающих LL-37, благодаря своему высокому положительному заряду, связывается с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами, присутствующими в клетках и внеклеточном пространстве, после чего образовавшийся комплекс LL-37/нуклеиновая кислота связывается с Toll-подобными рецепторами и активирует их [9, 99].

По результатам проведенного анализа механизмов противовирусного действия пептидов показано их разнообразие. Некоторые пептиды реализуют противовирусную активность по нескольким различным механизмам, что обуславливает широкий спектр их действия, не ограниченный только РСВ. Важно, что такой плеiotропный противовирусный эффект, характерный для пептидов, не способствует развитию резистентности у патогена.

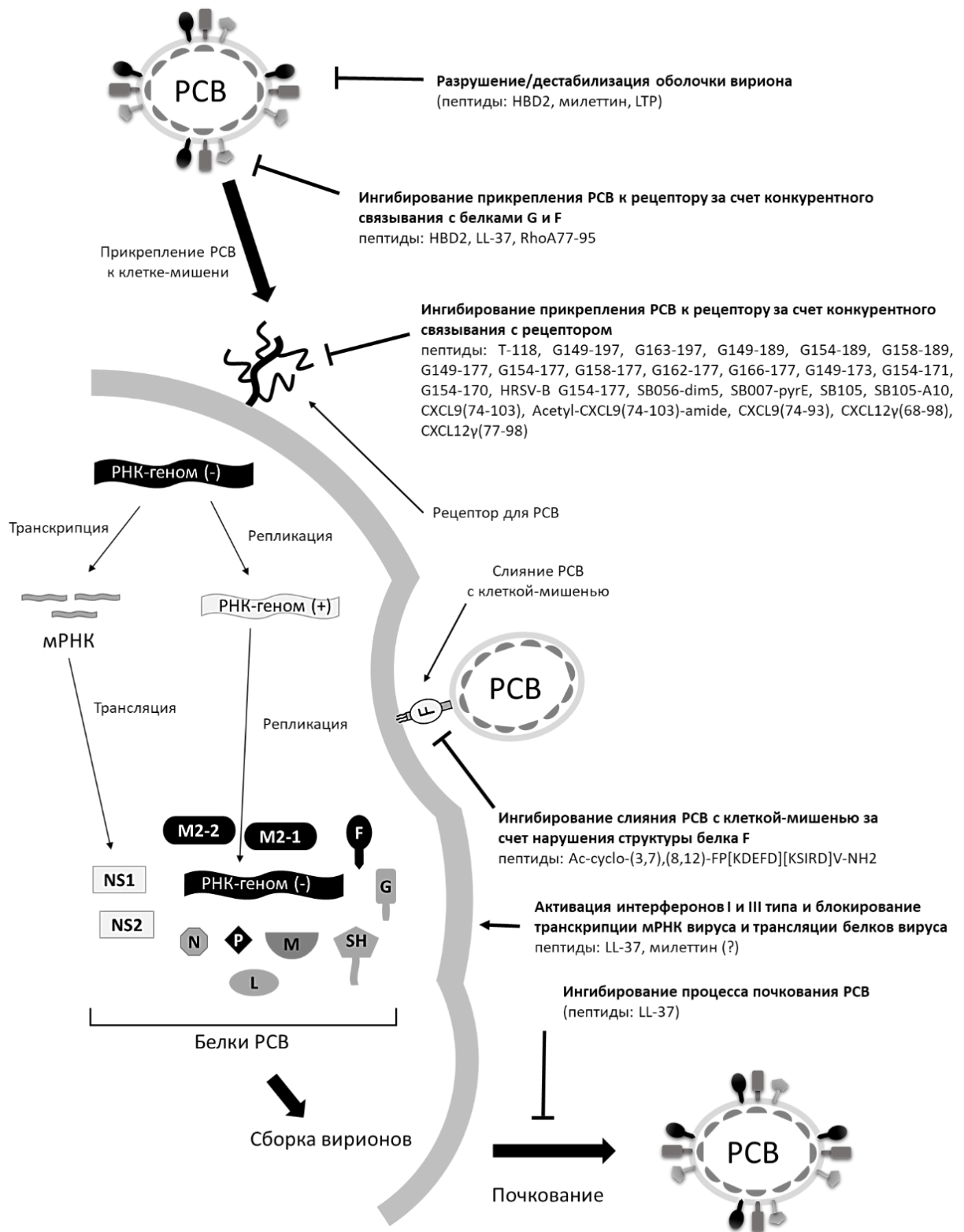


Схема жизненного цикла респираторно-синцитиального вируса (РСВ) и основных механизмов действия противовирусных пептидов. Показаны ключевые этапы взаимодействия вируса с клеткой-мишенью: прикрепление, слияние вирусной и клеточной мембран, транскрипция, репликация, синтез вирусных белков, сборка вирионов и почкование. Также обозначены потенциальные точки ингибирования, включая разрушение или дестабилизацию оболочки вириона, блокирование прикрепления и слияния, подавление репликации и транскрипции, а также нарушение процесса почкования.

Рисунок 5 – Механизмы противовирусного действия пептидов

## 1.6 Перспективные направления развития технологии противовирусных пептидов

### 1.6.1 Картирование пептидов

Технологии получения природных пептидов или их рекомбинантных аналогов относятся к дорогостоящим процессам, что ограничивает широкое применение этих биологически активных соединений в медицинской практике. Для снижения себестоимости ряд исследовательских коллективов предлагает картировать пептиды и тем самым создавать более короткие синтетические аналоги. Ранее экспериментально показано, что укороченные до 13–14 а.о. (аминокислотных остатков) аналоги природных пептидов также проявляют выраженную антибактериальную активность [8, 105, 144]. Аналогичный подход был реализован и по отношению к противовирусным пептидам. Так, пептид из центрального негликозилированного субдомена белка G, G149–197, размером 48 а.о. проявлял анти-PCV-активность с  $EC_{50}$  около 80 мкМ. Gorman и др. [66] провели его картирование с целью выявления минимальной аминокислотной последовательности, необходимой для проявления антивирусного эффекта. Укорочение пептида G149–197 с N-конца на 14 а.о. (пептид G163–197 размером 34 а.о.) не привело к изменению противовирусной активности, в то время как дополнительное укорочение еще на 8 а.о. (пептид G171–197 размером 26 а.о.) значительно ее снизило. Укорочение пептида G149–197 с C-конца на 8 а.о. (G149–189 размер 40 а.о.) приводило к значительному увеличению как цитотоксичности, так и противовирусной активности; значение  $EC_{50}$  составило 12 мкМ. При дополнительном укорочении пептида G149–189 на 5 а.о. с N-конца (пептид G154–189 размером 35 а.о.) не приводило к снижению антивирусной активности. В итоге, укорочение пептида G149–197 на 13 а.о. (с 48 до 35 а.о.), до G154–189, не только не снизило его биологическую активность, но, наоборот, привело к почти семикратному ее увеличению – с 80 до 12 мкМ, данные приведены в таблице 6 [66].

LL-37 – относительно крупный пептид, его длина составляет 37 а.о. Для выявления биологически значимого участка Currie и др. [41, 42] синтезировали укороченные аналоги LL-37 с размером 22 а.о.: N-концевой фрагмент (1–22), центральный коровый пептид (12–33) и C-концевой фрагмент (16–37). Только пептид из центральной части LL-37 сохранял выраженную противовирусную активность, сопоставимую с полноразмерным LL-37, в то время как N- и C-концевые фрагменты были инертны [41, 42].

Таким образом, на примере пептидов G149–197 и LL-37 продемонстрирована перспективность картирования, как подхода к созданию укороченных аналогов природных

пептидов, что позволит упростить технологию их производства. Такой подход вполне может быть применен и к другим крупным природным пептидам, например к бета-дефензину HBD2, размер которого 41 а.о., но пока о таких исследованиях не сообщалось.

### 1.6.2 Получение рекомбинантных пептидов

В качестве альтернативы картированию крупных пептидов может выступать технология создания рекомбинантных ДНК-конструктов и получения с их помощью полноразмерных пептидов в клетках-продуцентах. Однако сложность использования продуцентов-прокариот, таких как традиционные штаммы *Escherichia coli*, состоит в том, что продуцируемые противовирусные пептиды токсичны по отношению к бактериям, что приводит к гибели продуцентов либо существенно снижает выход конечного продукта за счет подавления их роста при ферментации. Для преодоления этой сложности целевой продукт получают в виде неактивного предшественника, после чего проводят дополнительные стадии его гидролиза и очистки, что, безусловно, сказывается на себестоимости конечного продукта.

Недавно предпринята попытка удешевить способ получения пептида RhoA77-95, обладающего анти-PCV-активностью, за счет использования эукариотического продуцента [132]. Авторы разработали экспрессионные конструкции, способные экспрессировать этот пептид в клетках растений, и получили рекомбинантный белок пептид RhoA77-95, соединенный с белком-носителем: лихеназой (LicKM) или вирусным белком оболочки (CP). В результате анализа противовирусных свойств полученных химер RhoA-LicKM и RhoA-CP показано, что их анти-PCV-активность в 10 раз превышает таковую для синтетически полученного RhoA77-95. Возможно, этот эффект связан с тем, что в исходной генетической конструкции закодировано несколько копий пептида [132]. Описанный подход, с использованием альтернативных *E. coli* продуцентов, вполне соответствует современным технологиям производства биологически активных препаратов – как по дизайну целевых продуктов, так и по способам их наработки, так как системы ферментации эукариотических клеток неуклонно развиваются.

### 1.6.3 Стабилизация структуры пептида

Как описано выше картирование представляется перспективным инструментом в проектировании противовирусных пептидов, хотя значительное укорочение аминокислотной цепи может приводить к утрате противовирусных свойств из-за потери той пространственной структуры, которую этот участок аминокислотной цепи имел в составе белка и исходного пептида. Это связано с тем, что короткие пептиды не способны поддерживать функционально активную трехмерную структуру. В связи с этим применяют различные способы стабилизации необходимой третичной структуры коротких пептидов.

Так, Gorman и др. [66] в исследовании по картированию пептида G149–197 размером 49 а.о. получили укороченный на 14 а.о. пептид G154–189, (размер 35 а.о.) который сохранял противовирусную активность. Дальнейшее уменьшение размера исходного пептида до пептидов G149–177 и G154–177 длиной соответственно 28 и 25 а.о. привело к полной утрате активности. Однако авторы установили, что замена аминокислот His159 и Tyr170 соответственно на Pro и Phe приводит к восстановлению и даже усилению противовирусной активности: значение  $EC_{50}$  снизилось до 5 мкМ, данные приведены в таблице 6. Боковые группы аминокислот Pro и Phe повышают гидрофобность пептида, что, по всей видимости, приводит к увеличению стабильности его пространственной структуры за счет гидрофобных взаимодействий с другими аминокислотными остатками [66].

С аналогичной трудностью столкнулись Shepherd и др. [162]. Они синтезировали относительно короткий пептид длиной 13 а.о. ( $^{483}FPSDEFDASISQV^{495}$ ), который в составе белка F формирует  $\alpha$ -спираль в области HR-C, но этот пептид не проявлял противовирусной активности, по-видимому, из-за невозможности образовать спиральную структуру. Однако после стабилизации этого пептида лактамными связями (пептид Ac-cyclo-(3,7),(8,12)-FP[KDEFD][KSIRD]V-NH<sub>2</sub>) он проявлял выраженные противовирусные свойства по отношению к РСВ (см. раздел 4.1.4 “Пептид, формирующий  $\alpha$ -спираль белка F”) [162].

Таким образом, стабилизация структуры пептидов путем рационального дизайна позволяет получать биологически активные соединения с небольшим числом аминокислотных остатков, что повышает экономическую целесообразность их наработки методом химического синтеза.

### 1.6.4 Дендримеризация пептидов

Другая проблема широкого использования пептидов – их низкая устойчивость к протеазам. Повысить устойчивость синтетических пептидов можно путем их модификации, например, получая разветвленные (дендримерные) пептиды. Таких пептидов в природе нет, так как в их структуре содержатся  $\epsilon$ -амидные связи. Предполагают, что благодаря этим структурным отличиям дендримерные пептиды менее подвержены гидролизу протеазами, что повысит их стабильность и позволит использовать в схемах не только местной, но и системной терапии.

Дендримерными пептидами называют сверхразветвленные полимеры, состоящие из аминокислотных остатков. Пептиды такого рода не встречаются в природе, их синтезируют искусственно. Методология их синтеза описана еще в 40-х годах прошлого века, но лишь в 70–80-х годах разработаны методы синтеза таких полимеров разной химической природы и начаты исследования их биологических эффектов [26, 36, 176]. Пока мало сведений по применению пептидных дендримеров в качестве противовирусных средств. В нескольких работах исследована противовирусная активность таких пептидов. Так, два дендримера, несущие на поверхности короткие положительно заряженные пептиды (заряд 4+), были активны против цитомегаловируса. Выяснен и механизм их действия – они ингибировали присоединение вируса к клетке-мишени [110]. Описаны дендримерные пептиды, активные против вируса папилломы человека [38] и вируса простого герпеса [111].

Известно только две публикации, в которых исследовано противовирусное действие дендримерных пептидов, SB105-A10 [48] и LTP [6, 175], в отношении РСВ. Показано, что эти дендримерные пептиды проявляют более выраженную противовирусную активность в сравнении с линейными. Таким образом, перспективность исследований таких структур как дендримерные пептиды не вызывает сомнений.

Помимо устойчивости к действию протеолитических ферментов и высокой биологической активности, дендримерные пептиды относительно недороги в получении. Так, дендример LTP состоит из 17 а.о., но для его синтеза необходимо всего 6 циклов присоединения аминокислот – благодаря разветвленной структуре. Для сравнения, при синтезе линейного пептида такого же размера придется сделать 17 циклов. С учетом того, что в ходе химического синтеза потери конечного продукта происходят на каждом цикле, синтез дендримера, безусловно, потребует меньше затрат, чем линейного пептида аналогичного размера.

Таким образом, синтетические дендримерные пептиды, характеризующиеся высокой устойчивостью к протеолизу, выраженной биологической активностью и сравнительно низкой

стоимостью получения, представляют собой многообещающие соединения для создания новых противовирусных препаратов.

Как описано выше молекулярное картирование белка F позволило идентифицировать антигенный сайт Ø, который расположен на границе доменов HR-1 и D1. Этот сайт имеет критическое значение для развития инфекционного процесса, что делает его перспективной мишенью для разработки противовирусных средств, в том числе пептидных. Учитывая вышесказанного цель исследования состояла в разработке пептида, имитирующего антигенный сайт Ø белка F, а также его дендримерного (разветвлённого) варианта, и в изучении их влияния на иммунопатогенез РСВ-инфекции в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Животные

Исследование проводили на самках мышей BALB/c (20–22 г, возраст 10–12 недель), которые были приобретены в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. После получения из питомника животных 14 дней содержали в карантине. Группы формировали с рандомизацией по массе тела и вариабельностью по массе в группе не более  $\pm 10\%$ . Вес животных на начало исследования составлял от 23 до 25 г.

Все манипуляции с экспериментальными мышами проводили в строгом соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ETS N123), Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств и Правилами исследовательской работы с лабораторными животными в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (приказ от 12 ноября 2015 г.).

На клетках устанавливали идентификационные таблички с указанием названия эксперимента, номера группы, номеров содержащихся в клетке животных. Животным ставили индивидуальные метки. Все кодировки, метки и исходный вес животных заносили в протоколы экспериментов.

Содержание и уход за лабораторными животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216–2014 (Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами).

Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках 1145T Sealsafe NEXT (Tecniplast S.p.A., Италия). Мышей содержали до 10 особей в клетке в контролируемых условиях (система подачи и отведения воздуха, монтируемая на стеллаж с клетками): температура окружающего воздуха 24–25 °С, относительная влажность 50–70 %. Проводили постоянный мониторинг общего состояния животных, оценку выживаемости мышей. Все наблюдения заносили в рабочие протоколы. Доступ к воде и корму был свободным, световой режим естественным. Пищевой рацион включал полнорационный комбикорм для содержания мелких лабораторных грызунов (Delta Feeds, Россия). Все необходимые манипуляции с животными

(тесты, взвешивание, забор крови, вскрытие животных) выполнялись с 10 до 15 часов дня. Воду для питья фильтровали через антибактериальный фильтр (Aquaphor B300, Россия). Смену воды осуществляли 2 раза в неделю. Гигиенический подстил Рехофикс МК 2000 для лабораторных животных, клетки и аксессуары (крышки, лотки для корма), бутылочки для питья меняли 2 раза в неделю, мыли и дезинфицировали.

### **2.1.2 Клеточные культуры, вирус и реагенты**

Клеточные линии МА-104 (эмбриональная почка макаки-резус), НЕР-2 (эпидермоидная карцинома гортани человека) и А549 (карцинома лёгкого человека) были приобретены в коллекции клеточных культур Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Штамм РСВ А2 был приобретён в коллекции вирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». Полная среда ЕМЕМ (Eagle's Minimum Essential Medium) (PanEco, Россия), содержащая 25 мМ НЕРЕС (-(-2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (PanEco, Россия), 300 мг/л L-глутамин (PanEco, Россия), 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera, Филиппины), использовалась для роста клеток. Неполная среда ЕМЕМ, содержащая 25 мМ НЕРЕС, 600 мг/л L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США), использовалась для наращивания РСВ. РСВ наращивали с использованием клеток НЕР-2 в неполной ЕМЕМ, как описано в [96].

## **2.2 Методы исследования**

### **2.2.1 Синтез и очистка пептидов**

Синтез пептидов КК-44, КК-45 и D-12 выполняли на синтезаторе PS3 (Protein Technologies Inc., США) как описано в патенте [7] с использованием Fmoc-защищённых аминокислот (Iris Biotech, Германия) и смолы H-Rink-Amide-ChemMatrix (Iris Biotech, Германия).

N,N- диметилформамид (Scharlau, Германия) использовали в качестве растворителя на всех этапах. Активацию аминокислот проводили с помощью HBTU (2- (1H- бензотриазол- 1- ил)- 1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфата) (Acros Organics, США) и N-метилморфолина (Fisher Scientific, Германия). Снятие Fmoc-защиты осуществляли с использованием 4-метилпиперидина (Sigma Aldrich, Германия).

Пептиды отщепляли от смолы с использованием смеси трифторуксусной кислоты (TFA; PanReac AppliChem, США), 1,2-этандитиола, тиоанизола (PanReac AppliChem, США) и воды. Пептиды осаждали из реакционной смеси седиментацией. Очистку проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращённой фазой с использованием системы LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с неподвижной фазой Kromasil Eternity C18 (Nouryon, Швеция). Элюцию проводили в линейном градиенте от 5% до 70% ацетонитрила (Fisher Scientific, США) в 0,1% водном растворе TFA (трифторуксусная кислота). Детекцию выполняли фотометрически при 226 и 280 нм.

Подлинность и чистота каждого синтезированного пептида подтверждали с помощью ВЭЖХ, капиллярного электрофореза и масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS) с использованием спектрометра Bruker Microflex LT (Bruker, Германия) и  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Sigma Aldrich, Германия) в качестве матрицы. Пептиды были синтезированы и охарактеризованы физико-химическими методами в лаборатории № 52 «Пептидных иммуногенов» ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

### **2.2.2 Оценка цитотоксичности пептидов *in vitro***

Цитотоксичность пептидов изучали с помощью МТТ-теста на культуре клеток МА-104 в широком диапазоне концентраций от 0,04 до 2,5 мг/мл, как описано в [13, 96].

### 2.2.3 Оценка вирулицидной активности пептидов *in vitro*

Вирулицидную активность пептидов изучали согласно методу, описанному в [96], с некоторыми модификациями. Кратко, пептиды в нетоксичных концентрациях 250 мкг/мл инкубировали с вирусом (титр = 200 тысяч бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл) в течение 2 часов при 37°C, после чего проводили титрование на монослое клеток МА-104 и инкубировали в течение 5 дней. Количество синцитиев подсчитывали с помощью световой микроскопии. В качестве отрицательного контроля вирус обрабатывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). В качестве положительного контроля использовали нейтрализующие моноклональные антитела (МАТ) (Invitrogen, США) в концентрации 10 мкг/мл.

### 2.2.4 Взаимодействие пептидов с клетками МА-104 и А549

Для оценки способности пептидов ингибировать проникновение РСВ 15 тысяч клеток МА-104/лунку высевали в 96-луночный планшет в полной среде ЕМЕМ и культивировали при 5% CO<sub>2</sub> (диоксид углерода) и 37°C. Клетки отмывали ФСБ и добавляли 50 мкл (охлажденной до 4°C) неполной ЕМЕМ. Все дальнейшие манипуляции проводили при 4°C (на льду), поскольку эта температура позволяет РСВ прикрепляться к клеткам-мишеням, но ингибирует энергозависимый процесс слияния [48]. Пептиды в объеме 50 мкл неполной ЕМЕМ добавляли к клеткам в различных нетоксичных концентрациях с последующей инкубацией в течение 30 минут при 4°C. Гепарин (PanEco, Россия) использовали в качестве положительного контроля. Известно, что гепарин связывается с РСВ и конкурентно предотвращает его связывание с клеточными рецепторами (гепарансульфатами) [48]. Затем РСВ А2 (50 БОЕ на лунку в объеме 50 мкл неполной ЕМЕМ) добавляли к обработанным пептидами клеткам и инкубировали в течение 2 часов при 4°C для адсорбции. Несвязавшийся РСВ удаляли промывкой клеток 200 мкл неполной ЕМЕМ. Добавляли свежие 100 мкл неполной ЕМЕМ и инкубировали клетки при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. Количество синцитиев подсчитывали с помощью световой микроскопии и рассчитывали значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC<sub>50</sub>), как указано в [96].

Аналогичные эксперименты проводили на клетках А549, которые высевали в 24-луночные планшеты (80 000 клеток/лунку) в полной ЕМЕМ. После промывки клетки обрабатывали пептидом КК-45 (250 мкл холодной неполной ЕМЕМ, использовали различные

концентрации) и инкубировали в течение 30 минут при 4°C (гепарин и МАТ служили положительными контролями). Затем добавляли РСВ А2 (МОИ = 1, 250 мкл в неполной ЕМЕМ) для адсорбции (2 часа при 4°C). Несвязавшийся вирус удаляли промывкой 500 мкл неполной ЕМЕМ. Клетки инкубировали в свежей неполной среде (500 мкл, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в течение 7 дней, после чего монослой лизировали с помощью буфера RLT (Qiagen, Германия) для очистки тотальной РНК и количественного определения вирусной нагрузки, как описано ниже. Супернатанты клеток титровали на клетках МА-104.

### 2.2.5 Взаимодействие пептидов с РСВ

Пептиды изучали в тесте ингибирования поверхностных лигандов РСВ. Кратко, 15 тысяч клеток МА-104/лунку высевали в 96-луночный планшет в полной ЕМЕМ, инкубировали в течение ночи до образования монослоя и отмывали от сывороточной среды ФСБ. После этого добавляли 100 мкл неполной ЕМЕМ и охлаждали до 4°C. В отдельных пробирках смешивали различные концентрации пептидов в 50 мкл неполной ЕМЕМ с 50 мкл РСВ (50 БОЕ/образец). Смесь пептид/РСВ инкубировали при 4°C в течение 1 часа и добавляли к предварительно отмытым и охлаждённым клеткам. Смесь пептид/РСВ с клетками инкубировали в течение 2 часов при 4°C, затем несвязавшийся РСВ отмывали неполной ЕМЕМ. Жизнеспособность клеток контролировали методом световой микроскопии. Далее клетки, обработанные смесью пептида и РСВ, инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. Далее подсчитывали количество синцитиев с помощью световой микроскопии и рассчитывали ЕС<sub>50</sub>. В качестве положительного контроля использовали МАТ в концентрациях: 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 и 0,00125 мкг/мл. Данный анализ позволяет выяснить, взаимодействуют ли пептиды с лигандами РСВ (скорее всего, белками F и G) и препятствуют ли процессу прикрепления/слияния.

### 2.2.6 Оценка связывания пептидов с РСВ

Способность пептидов взаимодействовать с РСВ оценивали методом ИФА. Пептиды в концентрациях 0,25; 2,5; 25 и 250 мкг/мл сорбировали в 96-луночном планшете в течение 2 часов при 37°C, дважды промывали 0,25% полисорбата Твин-20 (Tween-20)/ФСБ и блокировали 2% молоком (Sigma Aldrich, США) при 4°C в течение ночи. В качестве отрицательного контроля проводили сорбцию 1% БСА (бычий сывороточный альбумин) (PanEco, Россия) и гепарина (Velpharm, Россия) в тех же концентрациях. Затем после трёхкратной промывки добавляли РСВ в неполной ЕМЕМ (10 тысяч БОЕ/мл) и инкубировали 2 часа при 37°C. После двукратной промывки вносили антитела против F-белка [Monoclonal Antibody (C106D) к белку слияния РСВ (ThermoFisher, США)] и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После двукратной промывки добавляли вторичные биотинилированные антитела [крысиные anti-mouse IgG1- биотин (BD, США)] и снова промывали. Затем добавляли конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (SaV-HRP) (BD, США), инкубировали 1 час при комнатной температуре и промывали 3 раза. После этого добавляли субстрат пероксидазы хрена – ТМБ (ТМВ) (BD, США) и инкубировали 10–20 минут. Реакцию останавливали 2Н раствором серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Оптическую плотность (ОП) измеряли на планшетном фотометре Multiskan GO (ThermoFisher, США) при двух длинах волн: 450 и 620 нм. Разницу между ОП450 и ОП620 (ΔОП) рассчитывали с помощью программного обеспечения Multiskan GO (ThermoFisher, США).

### 2.2.7 Оценка связывания пептидов с белком нуклеолином методом ИФА

Пептиды в концентрациях 2,5; 25 и 250 мкг/мл адсорбировали на дно планшета в течение 2 часов при 37°C, дважды промывали (0,25% Tween-20/ФСБ) и блокировали 2% молоком (Sigma Aldrich, США) при 4°C в течение ночи. В качестве отрицательного контроля проводили сорбцию 1% БСА (PanEco, Россия) и гепарина в тех же концентрациях. Затем после трёхкратной промывки добавляли 100 мкл раствора нуклеолина 1 мкг/мл (Human NCL/Nucleolin Protein, рекомбинантный с 6His, N-конец а.о. 2-482) (LSBio, США) и инкубировали 2 часа при 4°C. После трёхкратной промывки добавляли поликлональные кроличьи антитела против нуклеолина [Nucleolin Polyclonal Antibody (ThermoFisher, США)], инкубировали 1 час при комнатной температуре и снова дважды промывали. Добавляли детектирующие антитела против кроличьих IgG, меченные HRP [Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP (ThermoFisher, США)],

инкубировали 30 минут и промывали 3 раза. Затем добавляли ТМВ (BD, США), инкубировали 15-30 минут и останавливали реакцию 2N раствором серной кислоты ( $H_2SO_4$ ). Оптическую плотность (ОП) измеряли, как описано выше.

### 2.2.8 Противовирусная активность пептидов *in vivo*

Для изучения противовирусной активности пептидов использовали модель РСВ-инфекции на мышах [11][12]. Эксперименты на животных были одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Мыши были разделены на 5 групп (10 мышей/группа). Животным групп 1–4 интраназально вводили РСВ А2 в объёме 50 мкл в дозе  $5 \times 10^6$  БОЕ/мышь. Сухие пептиды (КК-45, КК-44 и D12) растворяли в ФСБ до необходимой концентрации и вводили интраназально в объёме 50 мкл/мышь в дозе 0,0045 мкМ/мышь, что соответствует 10 мкг/мышь, 6 мкг/мышь и 4,7 мкг/мышь для КК-45, КК-44 и D12 соответственно. Проводили одно интраназальное введение в течение 5 дней. В качестве отрицательного контроля вводили аналогичный объем ФСБ. Интактные животные группы 5 не были инфицированы и не получали экспериментально терапии, что указано в таблице 1. На 6-й день после инфекции мышей умерщвляли и собирали бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ). Правые доли лёгких собирали и замораживали для ПЦР-анализа в реальном времени. Левые доли лёгких собирали для гистологического анализа и помещали в 4% параформальдегид (Carl Roth, Германия).

Таблица 1 – Режим и дозы введения пептидов

No	Группа	Количество	РСВ	Доза на мышь	Режим введения
1	ФСБ	10	$5 \times 10^6$ БОЕ	-	Однократное интраназальное введение в объёме 50 мкл в течение 5 дней
2	КК-44	10		0,0045 мкМ = 6 мкг	
3	D-12	10		0,0045 мкМ = 4,7 мкг	
4	КК-45	10		0,0045 мкМ = 10 мкг	
5	Норма	10	-	-	-

### 2.2.9 Оценка токсичности, иммуногенности и аллергизирующих свойств КК-45 *in vivo*

Для оценки токсических свойств пептида КК-45 самки мышей BALB/c были разделены на 5 групп (по 10 мышей). Трём группам интраназально вводили пептид ежедневно в течение 14 дней в объёме 50 мкл/мышь в дозах 10, 25 и 100 мкг/мышь. Группа 4 служила отрицательным контролем и получала ФСБ интраназально в том же объёме.

Измерения массы тела регистрировали на 1-й день (до начала лечения) и затем на 7, 14, 21 и 28-й день. На 1-й день после введения последней дозы пептида собирали цельную кровь и разделяли на две части. Первую часть помещали в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) для гематологического исследования, которое проводили с использованием анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия). Вторая часть служила для получения сыворотки для биохимического анализа. Следующие параметры оценивали с помощью автоматического биохимического анализатора Rayto Super Z (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Китай): аланинаминотрансфераза (АЛТ); аспартатаминотрансфераза (АСТ); азот мочевины; креатинин. Кроме того, образцы сыворотки использовали для определения уровней антипептидных антител IgG1, IgG2a и IgE, как описано ниже. Определение уровней IgG1- и IgG2a-антител позволяет оценить иммуногенность пептида, а оценка уровня IgE-антител – его аллергизирующий потенциал.

Дополнительно на 1-й и 14-й дни после интраназального введения пептида КК-45 собирали образцы БАЛ от 5 мышей из каждой группы. Эти образцы обрабатывали, как описано ниже, для анализа клеточного состава.

Для получения антипептидных сывороток мышам группы 5 внутрибрюшинно (в/б) вводили 100 мкг КК-45 в смеси с 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich, США) (общий объём 0,5 мл ФСБ), с последующими двумя бустерными в/б иммунизациями той же дозой пептида с неполным адьювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich, США) на 14-й и 28-й дни после первичной дозы.

### 2.2.10 Гиперреактивность бронхов (ГРБ)

ГРБ измеряли на 5-й день после инфекции неинвазивным методом с использованием плетизмографа FinePointe NAM (Вухсо, США). ГРБ оценивали как удельное сопротивление

дыхательных путей (sRaw) после ингаляции возрастающих концентраций метахолина (Sigma- Aldrich, США): 10, 20 и 40 мг/мл. Метод подробно описан в [92].

### **2.2.11 Сбор БАЛ**

Трахею канюлировали, и лёгкие промывали шприцем 2 раза по 0,5 мл неполной ЕМЕМ. Каждый образец БАЛ центрифугировали 10 минут при 400 g. Клеточные осадки ресуспендировали в 0,05 мл ФСБ. Общее количество клеток в БАЛ измеряли на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия). Клеточный состав БАЛ оценивали после окрашивания азуром и эозином, как описано в [92].

### **2.2.12 Гистологическое исследование ткани лёгкого**

Левое лёгкое удаляли, фиксировали в 4% параформальдегиде и затем заливали в парафин. Срезы лёгких окрашивали гематоксилином и эозином для оценки перибронхиальной клеточной инфильтрации и альциановым синим (Bio-Optica, Италия) для визуализации муцин- положительных бокаловидных клеток, как описано в [165].

### **2.2.13 Количественное определение вирусной нагрузки и экспрессии генов цитокинов в дыхательных путях**

Вирусную нагрузку в лёгких оценивали двумя методами: количественной ПЦР в реальном времени и титрованием супернатантов БАЛ в клеточной культуре. Тотальную РНК выделяли из гомогенатов ткани лёгких с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию очищенной РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, США). кДНК синтезировали с использованием специфических праймеров и набора RT-1 (Синтол, Россия). кДНК амплифицировали с использованием системы iCycler iQ5 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, США) и специфической пары праймеров, описанные в таблице 2. Вирусную нагрузку выражали как количество копий вирусной РНК в 1 мкг тотальной РНК.

Таблица 2 – Праймеры и зонды

Ген	Праймер/зонд	Последовательность
vRNA	Forward	CACAACAATGCCAGTACTACAA
	Reverse	ATTAAGATCAAATCCAAGTAATTCAG
	Probe	ROX-GGAATTAACACATTGCTCTCAACCTAATGG-RTQ2
Il6	Forward	CTGATGCTGGTGACAACC
	Reverse	CTTCACAAGTCGGAGGCT
	Probe	ROX-CAGAGGATACCACTCCCAACAGACCTG-RTQ2
Bact	Forward	CTTTGCAGCTCCTTCGTTG
	Reverse	CACATAGGAGTCCTTCTGAC
	Probe	ROX-GCCCTAGGCACCAGGGTGTGATG-RTQ2
Tnfa	Forward	CGTCGTAGCAAACCACCAAG
	Reverse	TGTCTACTCCCAGGTTCTCTTCA
	Probe	ROX-ACGGCATGGATCTCAAAGACAACCAACTAGTG-RTQ2
Ifng	Forward	AAATCCTGCAGAGCCAGATTAT
	Reverse	TACTACCTTCTTCAGCAACAGC
	Probe	ROX-ACGCTTATGTTGTTGCTGATGGCC-RTQ2
Il1b	Forward	CAAGCAATACCCAAAGAAGA
	Reverse	AGGACATAATTGACTTCACCAT
	Probe	ROX-ACTGGTACATCAGCACCTCACAAGCAGA-BHQ2
Inga1	Forward	TGCCCAGCAGATCAAGAAGG
	Reverse	TCAGGGGAAATTCCTGCACC
	Probe	ROX-AATGACCTCCACCAGCAGCTCAAT-BHQ2
Ifna2	Forward	ATCTGCCTCACACTTATAACCTCAG
	Reverse	ATCTTACTCAGCAGACCTTGAAC
	Probe	ROX-AGAAGGCTCAAGCCATCCCTGTG-BHQ2
Ifnb	Forward	AGGGCGGACTTCAAGATC
	Reverse	CTCATTCCACCCAGTGCT
	Probe	ROX-TGCAGAAGAGTTACACTGCCTTTGCC-BHQ2

Дополнительно вирусную нагрузку определяли титрованием образцов БАЛ в клеточной культуре. Клетки МА-104 высевали в 96-луночный планшет (SPL Lifesciences, Корея) в количестве  $2 \times 10^4$  клеток/лунку в объёме 100 мкл/лунку полной ЕМЕМ. После инкубации в течение ночи клетки промывали ФСБ, полную среду заменяли на 100 мкл неполной ЕМЕМ, после чего вносили образцы БАЛ. Образцы инкубировали 4 часа для прикрепления жизнеспособного вируса к клеткам. Несвязавшийся вирус удаляли, добавляли свежую полную среду на 1 день, затем заменяли на среду OverLay (0,6% агарозы в неполной ЕМЕМ). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней и фиксировали 100 мкл 10% формалина в ФСБ в течение ночи. После этого слой агарозы OverLay аккуратно удаляли и промывали ФСБ. После фиксации монослоя лунки промывали 3 раза буфером ФСБ-Т (1 л ФСБ / 0,5 мл Tween 20) и блокировали 200 мкл буфера (2% молоко в ФСБ-Т) в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации планшеты промывали 3 раза ФСБ-Т и добавляли 100 мкл антител к F-белку (Invitrogen) в разведении 1/50 в ФСБ-Т на 1 час. После промывки ФСБ-Т 3 раза добавляли вторичные биотинилированные антитела anti-mouse-IgG1 (BD, США) в общем объёме 100 мкл в разведении 1/1000 и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Затем лунки промывали 3 раза ФСБ-Т, добавляли пероксидазу хрена со стрептавидином SaV-HRP (BD, США) в разведении 1/1000 и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После инкубации планшеты промывали 4 раза и добавляли 50 мкл на лунку субстрата ТМБ для мембран (Sigma, США). Затем планшеты инкубировали 25–30 минут и останавливали реакцию добавлением 50 мкл дистиллированной воды. Синцитии подсчитывали с помощью световой микроскопии. Вирусную нагрузку выражали как количество БОЕ на 1 мл БАЛ.

Для количественного определения экспрессии генов цитокинов использовали специфические праймеры и зонды, описанные в таблице 2. Экспрессию этих генов нормализовали по экспрессии гена *Vact* и представляли как относительное количество (RQ);  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 2.2.14 Оценка сывороточных антител специфичных к пептиду КК-45

Пептид КК-45 растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,4–7,6; PanEco, Россия) до 30 мкг/мл и адсорбировали на 96-луночных планшетах (SPL Lifesciences, Корея) добавлением 100 мкл/лунку и инкубацией при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали трижды ФСБ-Т (ФСБ + 0,05% Tween-20), блокировали 150 мкл/лунку ФСБ-Т /1% БСА в течение 1 часа при 37°C и промывали трижды ФСБ-Т. Образцы сыворотки мыши разводили в буфере для разведения

(ФСБ-Т /0,05% БСА), добавляли (100 мкл/лунку) и инкубировали 1,5 часа при 37°C. После трёх промывок добавляли биотинилированные вторичные антитела (Biotin Rat Anti-Mouse IgG2a, Biotin Rat Anti-Mouse IgG1, Biotin Rat Anti-Mouse IgE; BD OptEIA™, США) в разведении 1:1000 в буфере для разведения (100 мкл/лунку) и инкубировали 1 час при 37°C. Планшеты промывали четыре раза ФСБ-Т, затем добавляли стрептавидин-HRP в разведении 1:1000 (100 мкл/лунку) и инкубировали 30-40 минут при 37°C. После пяти промывок ФСБ-Т планшеты проявляли с 100 мкл/лунку субстрата ТМВ (BD, США) в течение 10 минут, останавливали 50 мкл/лунку 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и считывали при 450/620 нм с использованием спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Scientific, Финляндия).

### 2.2.15 Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism (версия 9.2.0, GraphPad Software, США). Критерий Краскела-Уоллиса с коррекцией Данна использовался для сравнения трех и более независимых групп между собой. Значение  $p \leq 0,05$  (величина уровня значимости в статистике) считалось статистически значимым. Данные представлены в виде медиан с интерквартильным размахом (Me  $\pm$  IQR).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Дизайн пептидов, имитирующих антигенный Ø-сайт F-белка

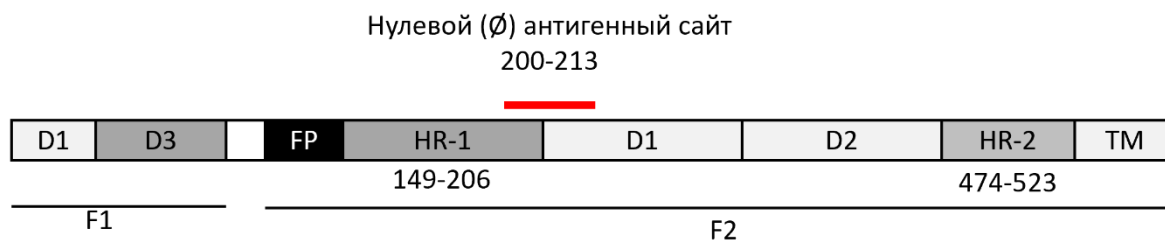
Предыдущие исследования [118] показали, что нейтрализующее РСВ антитело D25 специфически распознаёт эпитоп Ø (а.о. 200–213), расположенный в домене HR-1 F-белка (рисунок 6 А). В исследовании 2019 года [88] было обнаружено, что D25, наряду с двумя другими вируснейтрализующими антителами, нацелен на ключевые остатки аминокислот в сайте Ø, особенно Q202, P205, K209 и Q210. На основе этих данных о значимости указанных аминокислотных остатков антигенного сайта Ø был разработан линейный пептид КК-44 (а.о. 201–212), который включает описанные важные аминокислотные остатки. Еще один разработанный пептид КК-45 включает эту же линейную часть, полученную из сайта Ø, но на С-конце соединен с дендримерным фрагментом с разветвленным лизиновым ядром (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K). Малый дендримерный пептид D-12 (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K) без линейной последовательности Ø-сайта (а.о. 201–212) был синтезирован и использован в качестве пептида сравнения, характеристика пептидов указана в таблице 3 (рисунок 6 Б).

Пептиды КК-44, КК-45, D-12 были синтезированы твердофазным методом, как описано в разделе «Материалы и методы» в главе 2.2.1. Методом масс-спектрометрии была подтверждена идентичность пептидов D-12, КК-44 и КК-45: масс-спектры показали доминирующие ионы при  $m/z$  1027,7; 1368,9 и 2246,9 (рисунок 7), что соответствует рассчитанным молекулярным массам, указанным в таблице 3. Пиков, соответствующих усечённым последовательностям или побочным продуктам, обнаружено не было.

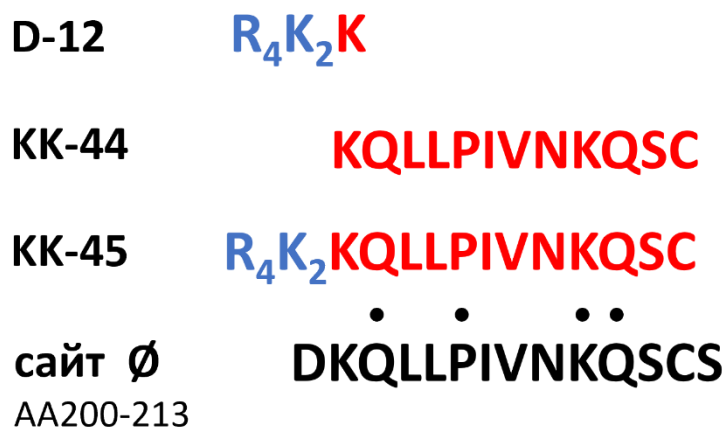
Чистоту синтезированных пептидов оценивали методами капиллярного электрофореза (для D-12) и ВЭЖХ (для КК-44, КК-45). Электрофореграмма D-12 показала единственный симметричный пик (>95% от общей площади пиков) (рисунок 8), что подтверждает высокую электрофоретическую чистоту. Хроматограммы КК-44 и КК-45 показали основные симметричные пики при ~15,2 минутах и 12,8 минутах, соответственно, с незначительными сторонними сигналами. Минорные пики слабой интенсивности существенно не влияли на общую хроматографическую площадь (рисунок 8).

Таким образом, масс-спектрометрия, ВЭЖХ и капиллярный электрофорез в совокупности подтвердили правильную молекулярную идентичность и высокую чистоту (>95%) всех синтезированных пептидов КК-44, КК-45 и D-12.

А



Б

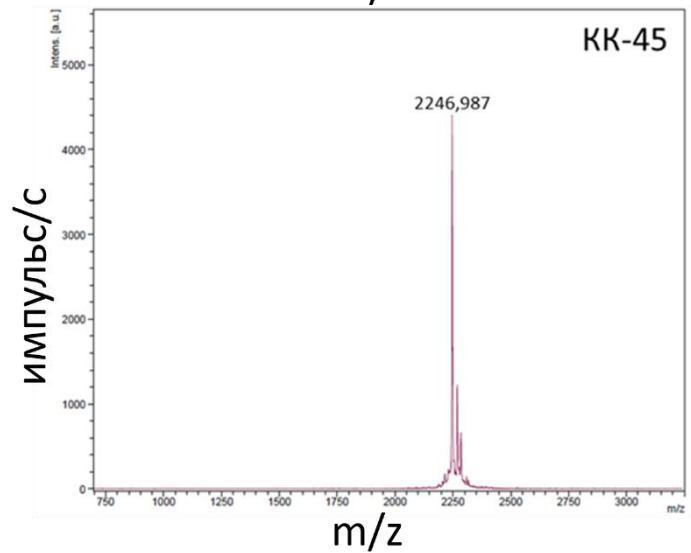
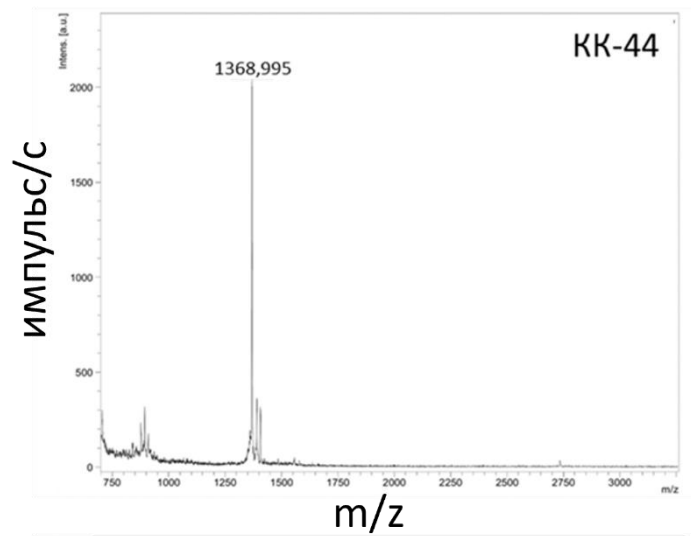
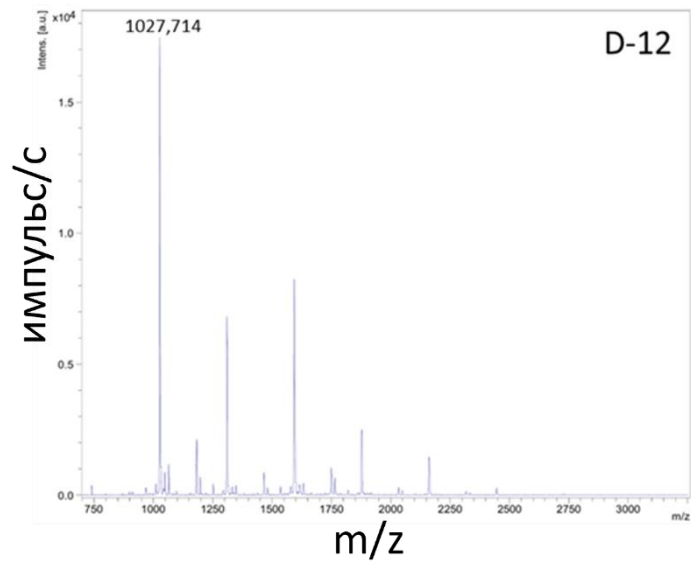


Структура F-белка РСВ. Белок F разделён на две субъединицы, F1 и F2. Они включают области: FP — фузионный пептид для взаимодействия клетка-клетка; TM — трансмембранный домен для прикрепления F-белка к оболочке РСВ; HR-1 и HR-2 — области, формирующие  $\alpha$ -спиральную структуру. Домены D1, D2 и D3 образуют основной глобулярный домен. Антигенный  $\emptyset$ -сайт важен для процесса слияния вируса с клеткой, его локализация отмечена на схеме. Б. Структуры спроектированных пептидов. Разветвлённая (дендримерная) часть пептида выделена синим цветом, линейная часть (а.о. 201–212) пептида, полученная из антигенного  $\emptyset$ -сайта (а.о. 200–213), выделена красным. Чёрные точки указывают на аминокислоты, критически важные для вируснейтрализующих антител.

Рисунок 6 – Структура F-белка РСВ и пептидов

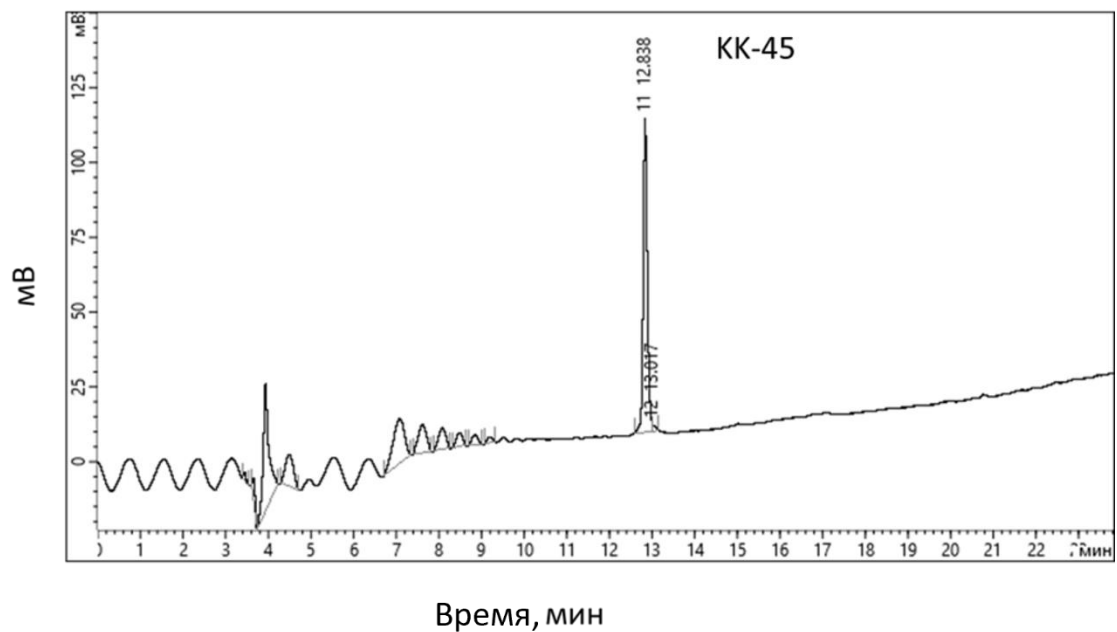
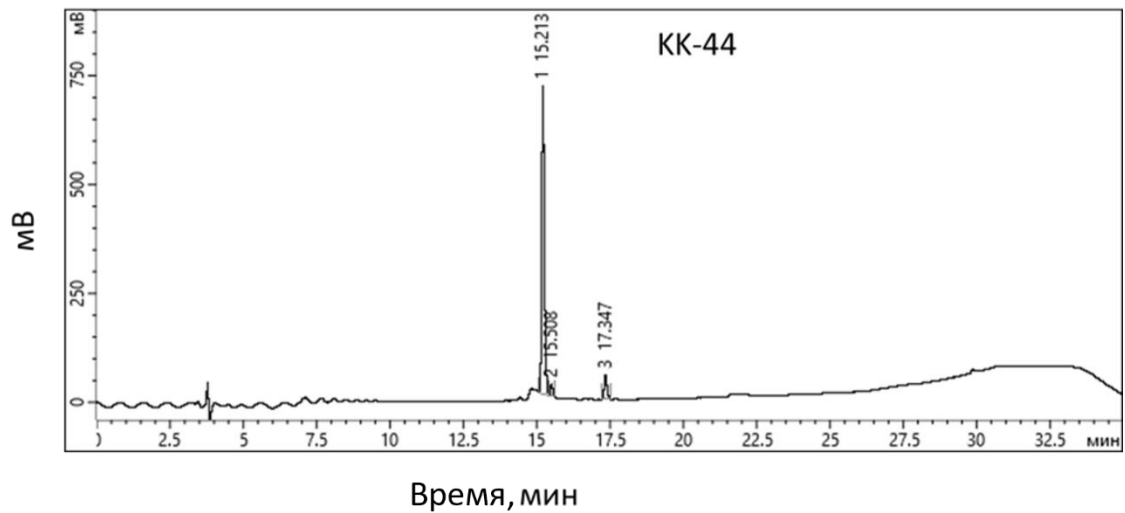
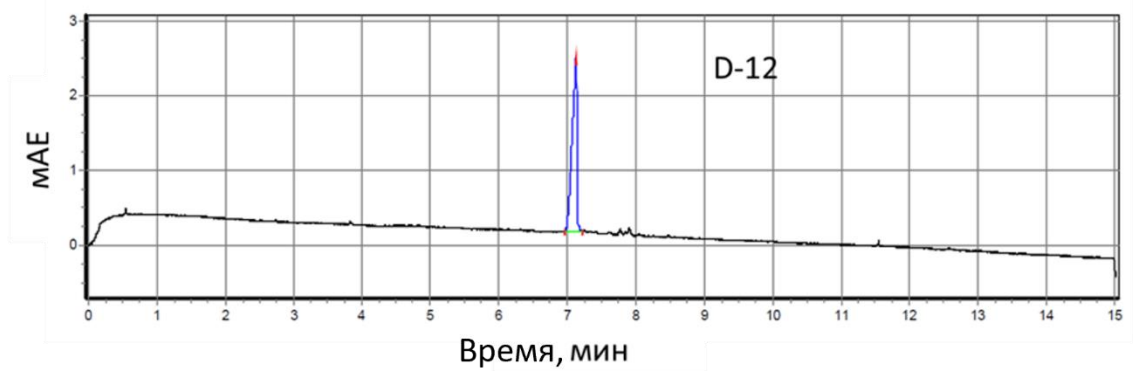
Таблица 3 – Характеристика пептидов

Пептид	Структура	Молярная масса, г/моль	Заряд
D-12	$R_4K_2K$	1028	+8
KK-44	$KQLLPV\dot{N}KQSC$	1369	+3
KK-45	$R_4K_2KKQLLPV\dot{N}K\dot{Q}SCS$	2247	+9



Подтверждение структур пептидов D-12, KK-44 и KK-45 выполнено методом MALDI-масс-спектрометрии. По оси X отображено отношение массы к заряду ( $m/z$ ), по оси Y — интенсивность сигнала (импульсы/с).

Рисунок 7 – Масс-спектры пептидов D-12, KK-44, KK-45



Чистоту D-12 оценивали с помощью капиллярного электрофореза, где по оси X указано время миграции (мин), а по оси Y — миллиединицы оптической плотности (МАЕ). Чистоту КК- 44 и КК-45 определяли методом ВЭЖХ, где по оси X указано время удерживания (мин), а по оси Y — милливольты (мВ).

Рисунок 8 – Определение чистоты пептидов D-12, КК-44 и КК-45 методом хроматографии и капиллярного электрофореза

### 3.2 Цитотоксичность пептидов КК-44, КК-45 и D-12 *in vitro*

Оценку цитотоксичности пептидов проводили на клетках МА-104 с использованием МТТ- теста. Для этого пептиды инкубировали с монослоем клеток в течение 24 часов, после чего определяли жизнеспособность клеток относительно контрольных клеток, обработанных фосфатно-солевым буфером.

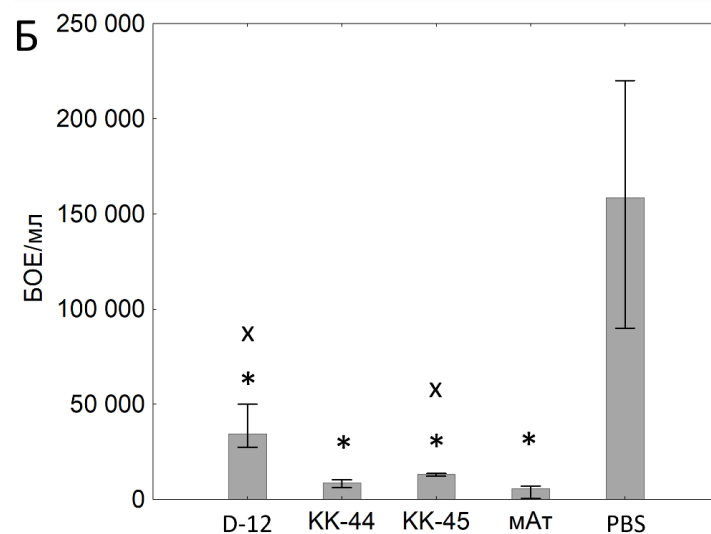
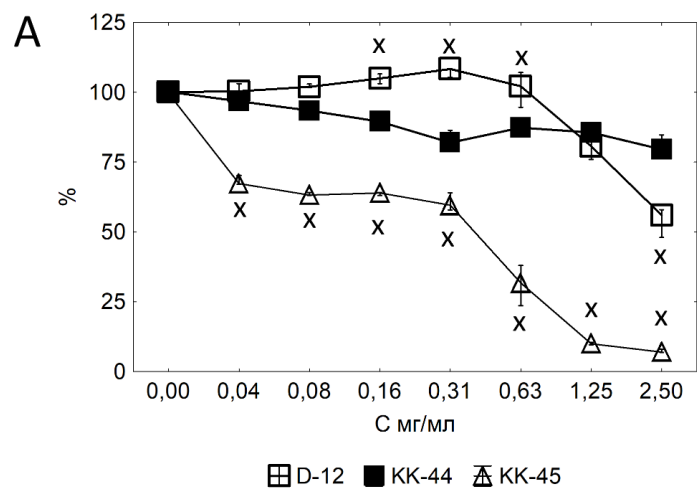
Линейный пептид КК-44 и малый дендримерный пептид сравнения D-12 нетоксичны в исследованном диапазоне концентраций от 0 до 2,5 мг/мл; жизнеспособность клеток при максимальной концентрации существенно не отличалась от контрольного уровня, а значение полумаксимальной цитотоксической концентрации ( $CC_{50}$ ) для обоих пептидов превышало 2,5 мг/мл. В то же время дендримерный пептид КК-45 проявлял дозозависимый цитотоксический эффект в указанном диапазоне концентраций; значение  $CC_{50}$  составило  $0,50 \pm 0,09$  мг/мл, что статистически значимо отличалось от аналогичного показателя для КК-44 и D-12 (рисунок 9 А). Вероятнее всего, это обусловлено особенностями молекулярной структуры КК-45; суммарный положительный заряд пептида составляет +9 (против +3 у КК-44 и +8 у D-12), а молярная масса — 2247 г/моль. По-видимому, именно сочетание высокой плотности положительного заряда и сравнительно большого молекулярного размера обуславливает более выраженное дестабилизирующее воздействие КК-45 на клеточную мембрану и как следствие негативно влияет на жизнеспособность клеток. Необходимо отметить, что, несмотря на сопоставимо высокий суммарный заряд (+8), контрольный пептид D-12, лишённый линейной последовательности а.о. 201–212, не проявлял цитотоксичности в исследованных концентрациях. Это свидетельствует о том, что именно совокупность дендримерного фрагмента ( $R_4K_2K$ ) и линейной части, воспроизводящей антигенный  $\emptyset$ -сайт F-белка, определяет токсический потенциал КК-45 в отношении клеточных мембран.

### 3.3 Вирулицидная активность пептидов *in vitro*

Вирулицидную активность пептидов оценивали путём инкубации каждого из них с РСВ (титр 200 тысяч БОЕ/мл) при 37°C в течение 2 часов с последующим титрованием вируса на монослое клеток МА-104 и инкубацией в течение 5 дней. По завершении инкубации с помощью световой микроскопии определяли количество синцитиев (бляшек), отражающих жизнеспособность вируса после контакта с пептидами. В качестве отрицательного контроля

вирус обрабатывали ФСБ, в качестве положительного контроля использовали нейтрализующие МАТ в концентрации 10 мкг/мл.

Нейтрализующие МАТ оказали наиболее выраженный вирулицидный эффект среди всех исследованных агентов, снизив количество синцитиев в 37 раз по сравнению с отрицательным контролем. Оба пептида, содержащих последовательность антигенного  $\Theta$ -сайта F-белка (а.о. 201–212), проявили выраженную вирулицидную активность. Линейный пептид КК-44 и дендримерный пептид КК-45 при концентрации 250 мкг/мл приводили к статистически значимому снижению числа синцитиев — в 21 и 13 раз, соответственно, по сравнению с отрицательным контролем (рисунок 9 Б). Вместе с тем малый дендримерный пептид сравнения D-12 (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K), лишённый последовательности а.о. 201–212, при той же концентрации 250 мкг/мл оказывал менее выраженный вирулицидный эффект в сравнении с КК-44 и КК-45, что подчёркивает определяющую роль линейной части молекулы в реализации данного эффекта.



А. Цитотоксичность пептидов изучали на клетках МА-104. Пептиды инкубировали с клетками в течение 24 часов с последующей оценкой жизнеспособности клеток МТТ-тестом.

Жизнеспособность клеток показана в % относительно необработанных клеток (0 мкг/мл). Данные представлены как медиана с интерквартильным размахом ( $Me \pm IQR$ ). × — значимое отличие от «КК-44» по критерию Краскела-Уоллиса. N=3. Б. Вирулицидная активность пептидов. Пептиды в концентрации 250 мкг/мл инкубировали с вирусом в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего вирус титровали на монослое клеток МА-104, инкубировали 5 дней с последующим подсчётом количества бляшек с помощью световой микроскопии. В качестве отрицательного контроля вирус обрабатывали ФСБ, в качестве положительного — нейтрализующими МАТ в концентрации 10 мкг/мл. Данные представлены как медиана с интерквартильным размахом ( $Me \pm IQR$ ). \* — значимое отличие от «ФСБ»; × — значимое отличие от «КК-44» по критерию Краскела-Уоллиса. N=6.

Рисунок 9 – Цитотоксичность и вирулицидная активность пептидов

### 3.4 Предварительная обработка РСВ пептидом КК-45 ингибирует его инфекционность

Чтобы определить, подавляют ли пептиды инфекционность вируса, воздействуя на лиганды на поверхности вириона, РСВ предварительно обрабатывали пептидами в различных концентрациях, как описано в главе «Материалы и методы» в разделе 2.2.5.

Было показано, что предобработка вируса коммерческими анти-Ф МАТ в концентрации 0,4 мкг/мл снижала его инфекционную активность в 2 раза. Инкубация линейного КК-44 с вирусом не подавляла вирусную активность; даже при максимальной исследуемой концентрации в 500 мкг/мл среднее количество синцитиев составило  $32 \pm 2,7$  БОЕ/0,1 мл, тогда как в отсутствие пептида —  $43 \pm 2,5$  БОЕ/0,1 мл. Таким образом,  $EC_{50}$  для КК-44 составила  $>500$  мкг/мл или  $>400$  мкМ. В то же время предобработка РСВ дендримерным пептидом КК-45 в концентрации 250 мкг/мл приводила к значительному подавлению роста вируса; КК-45 снижал количество синцитиев почти в 20 раз, с  $40 \pm 2,3$  до  $2,2 \pm 0,5$  БОЕ/0,1 мл. Рассчитанная  $EC_{50}$  для КК-45 составила  $33 \pm 3$  мкг/мл или  $14 \pm 1$  мкМ. Малый дендримерный пептид сравнения D-12 также оказывал анти-РСВ эффект в данном тесте, но существенно слабее  $EC_{50}$  составила  $197 \pm 48$  мкг/мл или  $192 \pm 45$  мкМ (рисунок 10 А).

### 3.5 Предварительная обработка клеток пептидом КК-45 ингибирует образование синцитиев

Способность пептидов подавлять активность вируса, воздействуя на клеточные поверхностные рецепторы, исследовали в эксперименте *in vitro*. Для этого клетки МА-104 подвергали воздействию различных концентраций пептидов перед заражением РСВ. В качестве

положительного контроля в данном эксперименте использовали гепарин, так как он за счет сходства с гепарансульфатами поверхности клеток, блокирует проникновение вируса в клетку.

Было показано, что преинкубация клеток с линейным пептидом КК-44 или малым дендримерным пептидом D-12 не влияла на инфекцию: значение  $EC_{50}$  составило более 500 мкг/мл или более 400 мкМ. В то же время дендримерный пептид КК-45 существенно ингибировал РСВ- инфекцию;  $EC_{50} = 35 \pm 4$  мкг/мл или  $16 \pm 2$  мкМ, что было сопоставимо с положительным контролем гепарином ( $EC_{50} = 48 \pm 11$  мкг/мл) (рисунок 10 Б).

Дополнительные эксперименты с использованием клеток респираторного эпителия человека A549 подтвердили противовирусную активность пептида КК-45. Преварительная обработка клеток A549 пептидом КК-45 приводила к дозозависимому снижению вирусной нагрузки в лизатах клеток и супернатантах со снижением в 17 раз (рисунок 10 В).

### 3.6 Пептид КК-44 взаимодействует с РСВ

Для оценки способности синтезированных пептидов непосредственно связываться с вирионами РСВ применяли метод ИФА. Пептиды в концентрации 250 мкг/мл сорбировали на поверхности 96-луночного планшета в течение 2 часов при  $37^{\circ}C$ , после чего вносили РСВ (10 тысяч БОЕ/мл). Детекцию связавшегося вируса осуществляли с помощью моноклональных антител к F-белку РСВ.

Было установлено, что линейный пептид КК-44, содержащий последовательность а.о. 201–212 антигенного Ø-сайта F-белка, демонстрировал наиболее выраженное связывание с РСВ среди всех исследованных соединений:  $\Delta ОП = 0,97 \pm 0,10$  (рисунок 10 Г). Дендримерный пептид КК-45 и малый дендримерный пептид сравнения D-12 также взаимодействовали с вирусом, однако в значительно меньшей степени:  $\Delta ОП$  составили  $0,67 \pm 0,14$  и  $0,73 \pm 0,13$  соответственно (рисунок 10 Г), что статистически значимо отличалось от показателя КК-44.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что линейная последовательность а.о. 201–212, воспроизводящая антигенный Ø-сайт F-белка, определяет способность пептида связываться с вирионами РСВ. По всей видимости, именно эта последовательность, включающая ключевые аминокислотные остатки Q202, P205, K209 и Q210, обеспечивает специфическое взаимодействие с поверхностными структурами вириона — прежде всего с F-белком в его префузионной конформации.

Пептид КК-45 взаимодействовал с РСВ хуже, чем КК-44 несмотря на наличие в обоих пептидах идентичной линейной части. Вероятно, это связано со стерическими ограничениями,

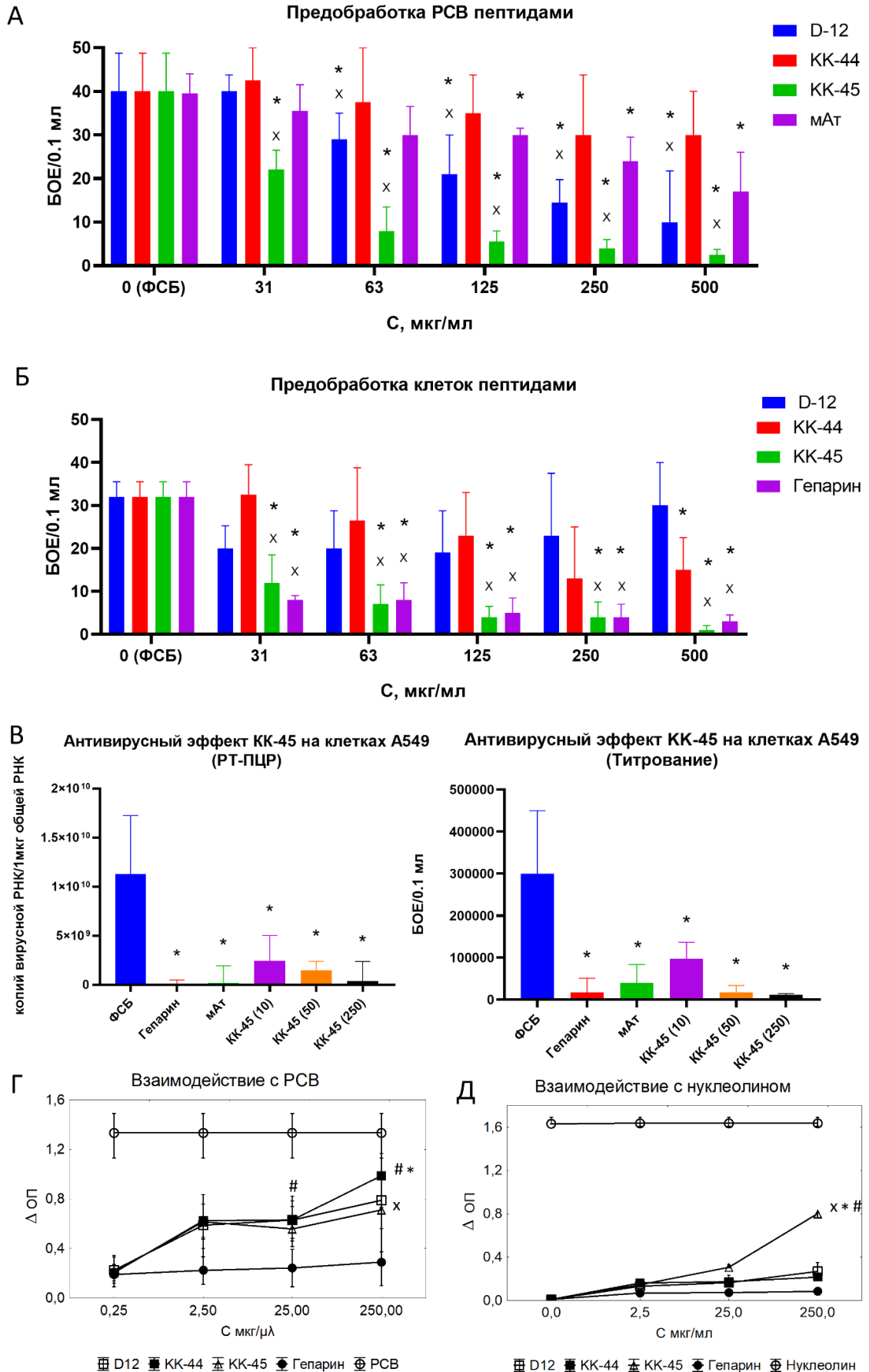
которые создаёт дендримерный фрагмент (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K) на С-конце пептида КК-45; он может затруднять доступ последовательности Ø-сайта к лигандам вируса.

### 3.7 Пептид КК-45 взаимодействует с нуклеолином

Поверхностный нуклеолин связывается с F-белком РСВ и может функционировать не только как фактор прикрепления, но и как полноценный рецептор, запускающий слияние мембран вируса и клетки [180]. С учётом этого была исследована способность синтезированных пептидов связываться с рекомбинантным нуклеолином человека методом ИФА как описано в главе «Материалы и методы» в разделе 2.2.7.

Дендримерный пептид КК-45 проявлял наиболее выраженное связывание с нуклеолином: ΔОП в ИФА =  $0,79 \pm 0,01$  (рисунок 10 Д). В то же время линейный пептид КК-44 и малый дендримерный пептид D-12 демонстрировали менее выраженное взаимодействие с данным белком: ΔОП составили  $0,22 \pm 0,01$  и  $0,28 \pm 0,04$ , соответственно (рисунок 10 Д), что статистически значимо отличалось от показателя для КК-45.

Примечательно, что наибольшую способность связываться с нуклеолином проявлял именно КК-45, сочетающий в своей структуре линейную последовательность а.о. 201–212 и дендримерный фрагмент R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K с суммарным положительным зарядом +9. Ни линейный КК-44 (+3), ни пептид сравнения D-12 (+8) в отдельности не воспроизводят этого эффекта. По всей видимости, именно сочетание разветвлённой дендримерной архитектуры и высокой плотности положительного заряда обеспечивает мультивалентные электростатические взаимодействия КК-45 с доменами нуклеолина, определяя его высокую аффинность к данному рецептору. Таким образом, взаимодействие КК-45 с нуклеолином, по всей видимости, является одним из ключевых механизмов, опосредующих его способность конкурентно ингибировать прикрепление/слияние РСВ с клеткой-мишенью.



А. Активность пептидов при предварительной обработке РСВ. Пептиды инкубировали с РСВ с последующим титрованием на монослое МА-104. В качестве положительного контроля использовали анти-F МАТ в концентрациях: 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 и 0,00125 мкг/мл. N=8.

Б. Активность пептидов при предварительной обработке клеток МА-104. Пептиды инкубировали с клетками МА-104 с последующим заражением РСВ. N=8. В. Активность пептида КК-45 при предварительной обработке клеток А549. КК-45 инкубировали с клетками А549 с последующим заражением РСВ. Вирусную нагрузку определяли методом ПЦР-РВ или титрованием. N=7. Данные представлены как медиана с интерквартильным размахом ( $Me \pm IQR$ ). × — значимое отличие от «КК-44»; \* — значимое отличие от «ФСБ» по критерию Краскела-Уоллиса. Г. Связывание пептидов с РСВ. Данные представлены как медиана оптической плотности ( $\Delta OP$ ) с интерквартильным размахом ( $Me \pm IQR$ ). × — значимое отличие от «КК-44»; \* — значимое отличие от «D-12»; # — значимое отличие от «Гепарин» по критерию Краскела-Уоллиса. N=4. Д. Связывание пептидов с нуклеолином. Данные представлены как медиана оптической плотности ( $\Delta OP$ )  $\pm$  интерквартильный размах ( $Me \pm IQR$ ). × — значимое отличие от «КК-44»; \* — значимое отличие от «D-12»; # — значимое отличие от «Нуклеолин» по критерию Краскела-Уоллиса. N=4.

Рисунок 10 – Противовирусный эффект пептидов *in vitro*

### **3.8 Дендримерный пептид КК-45 снижает вирусную нагрузку и воспаление дыхательных путей, но не гиперреактивность бронхов *in vivo***

Противовирусную активность пептидов и их способность влиять на иммунопатогенез РСВ-инфекции изучали на модели у мышей, разработанной ранее [11, 12]. Мышам интраназально вводили вирус в дозе  $5 \times 10^6$  БОЕ/мышь и проводили экспериментальную терапию путем интраназального введения пептидов (рисунок 11 А). Дозы и режим введения указаны в главе «Материалы и методы», раздел 2.2.8. в таблице 1.

Количественный ПЦР-анализ показал 5-кратное снижение количества копий вирусной РНК (вРНК) в лёгких инфицированных мышей, получавших КК-45 в дозе 10 мкг (рисунок 11 Б). Интраназальное введение линейного пептида КК-44 и малого дендримерного пептида сравнения D-12 снижало количество вРНК в лёгких в 2,3 и 2,9 раза, соответственно, по сравнению с мышами, получавшими ФСБ, но незначимо ( $p = 0,12$  и  $p = 0,19$ ) (рисунок 11 Б). Титрование образцов БАЛ на клетках МА-104 дало сходные результаты. Линейный пептид КК-44 не влиял на вирусную нагрузку, тогда как КК-45 обеспечивал наиболее выраженный эффект, снижая количество БОЕ в 13 раз по сравнению с мышами, получавшими ФСБ. Использование малого дендримерного пептида сравнения D-12 также снижало вирусную нагрузку, но в меньшей степени (в 2,3 раза) (рисунок 11 Б).

Кроме того, оценивали тяжесть воспаления путём анализа клеточного состава образцов БАЛ. РСВ-инфекция вызывала воспаление респираторного тракта, увеличивая общее количество клеток, количество макрофагов и лимфоцитов в БАЛ. Было показано значительное снижение общего количества клеток в БАЛ у инфицированных животных, получавших D-12 и КК-45, на 45% и 50%, соответственно по сравнению с мышами, получавшими ФСБ (рисунок 11 В).

Количество макрофагов и лимфоцитов в БАЛ также снижалось при терапии пептидами D-12 и КК-45 по сравнению с мышами, получавшими ФСБ; количество макрофагов уменьшалось на 42% для обоих пептидов, а количество лимфоцитов — на 51% и 66%, соответственно. Линейный пептид КК-44, при интраназальном введении не влиял на общее количество клеток и макрофагов в БАЛ, но снижал количество лимфоцитов в 2 раза по сравнению с мышами, получавшими ФСБ (рисунок 11 В).

Воспаление лёгких, вызванное РСВ, обычно приводит к повышению ГРБ. Было обнаружено, что инфекция значительно повышала ГРБ на 35% по сравнению с неинфицированными животными. При этом интраназальное введение пептидов не влияло на ГРБ (рисунок 12).

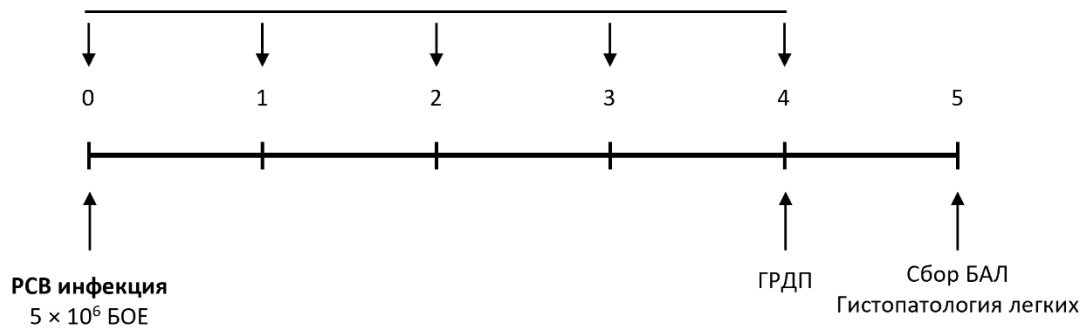
Кроме того, РСВ-инфекция у мышей приводила к повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Ifng*, *Tnfa*, *Il6* и *Il1b*) в клетках БАЛ. Интраназальное введение инфицированным мышам пептидов (особенно КК-45) приводило к значительному снижению экспрессии генов данных цитокинов (рисунок 13).

Гистологический анализ ткани лёгких подтвердил, что РСВ-инфекция индуцирует воспаление респираторного тракта. Интраназальное введение инфицированным мышам пептидов КК-44, D-12 и КК-45 приводило к снижению тяжести воспаления; площадь перибронхиальных инфильтратов уменьшалась на 25%, 27% и 35%, соответственно, а количество инфильтрирующих клеток снижалось на 23%, 34% и 46% по сравнению с мышами, получавшими ФСБ (рисунок 14 А). По совокупности полученных данных максимальный противовоспалительный эффект наблюдался при введении пептида КК-45 (рисунок 14 Б).

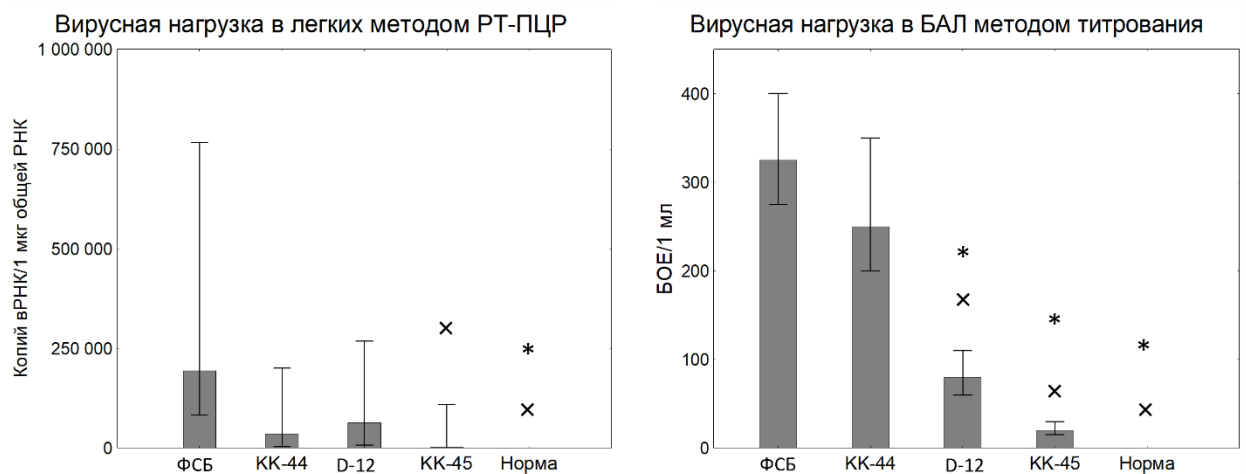
Дополнительно были оценены признаки ремоделирования дыхательных путей: толщина стенок бронхов и доля муцин-секретирующих бокаловидных клеток в бронхиальном эпителии. При РСВ-инфекции наблюдалось увеличение толщины стенок бронхов, но влияния интраназального введения пептидов на этот параметр не отмечено (рисунок 15 А, Б). Наибольшая доля бокаловидных клеток в 38% была зафиксирована у инфицированных мышей, получавших ФСБ, тогда как у неинфицированных животных она составила 10%. Введение пептидов КК-44, D-12 и КК-45 приводило к снижению количества муцин-продуцирующих бокаловидных клеток на 57%, 46% и 47%, соответственно (рисунок 15 А, В).

А

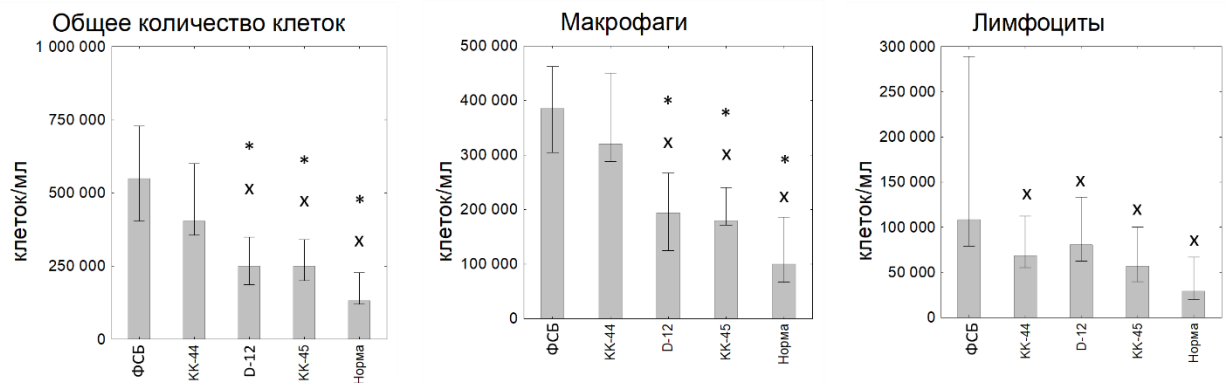
**Экспериментальная терапия пептидом**  
(одно интраназальное введение 50 мкл в течении 5 дней)



Б

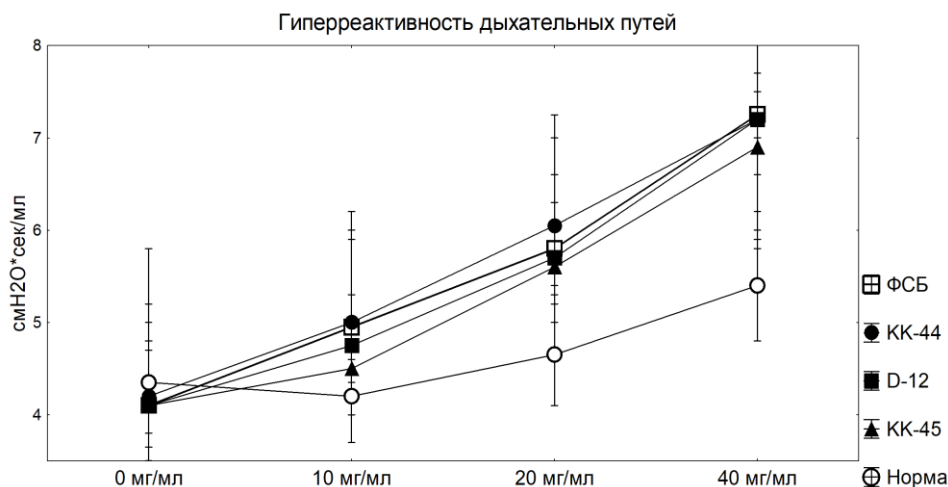


В



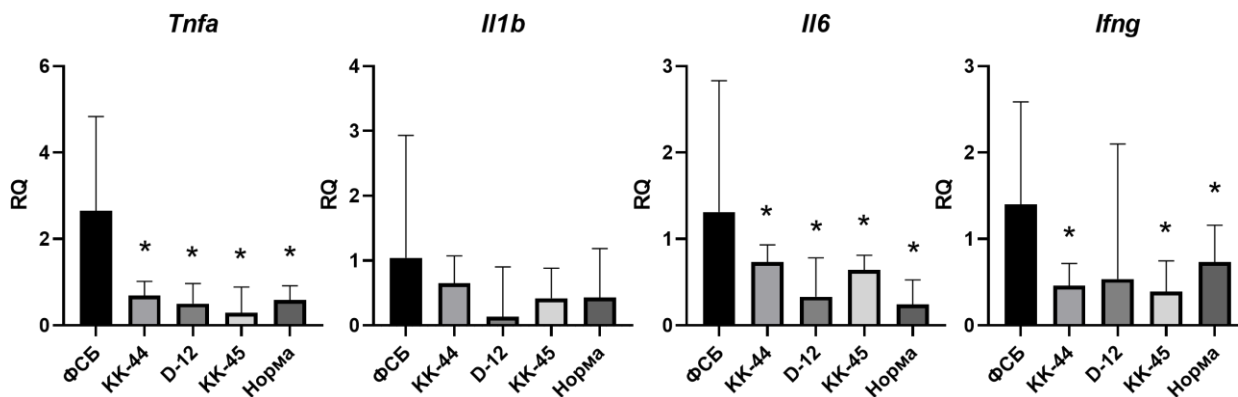
А. Схема исследования *in vivo*. Мышей инфицировали РСВ и интраназально вводили пептиды. На 4-й день измеряли ГРБ. На 5-й день собирали образцы БАЛ для анализа клеточного состава и титрования. Кроме того, лёгкие собирали для гистопатологического анализа и измерения вирусной нагрузки методом количественной ПЦР. Б. Вирусная нагрузка в лёгких, определённая количественной ПЦР (слева) и титрованием образцов БАЛ (справа). В. Клеточный состав БАЛ. Данные представлены как медиана  $\pm$  интерквартильный размах (Me  $\pm$  IQR).  $\times$  — значимое отличие от «ФСБ»; \* — значимое отличие от «КК-44» по критерию Краскела-Уоллиса. N=10.

Рисунок 11 – Противовирусный эффект пептидов на модели РСВ-инфекции у мышей



Мышей инфицировали РСВ и интраназально вводили пептиды. На 4-й день измеряли ГРБ (гиперреактивность бронхов). Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильный размах (Me  $\pm$  IQR).  $\times$  — значимое отличие от группы «ФСБ»; \* — значимое отличие от группы «КК-44» по критерию Краскела — Уоллиса. N=10.

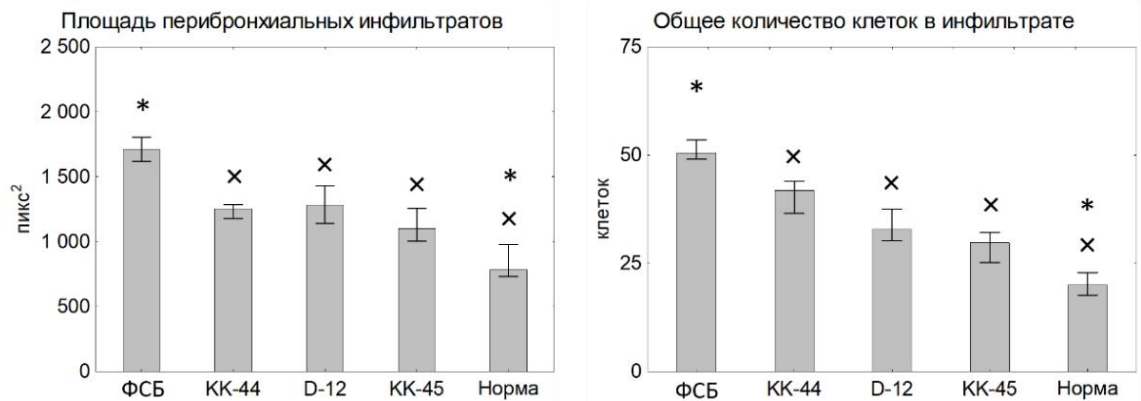
Рисунок 12 – Влияние пептидов КК-45, КК-44, D-12 на гиперреактивность бронхов при моделировании РСВ инфекции



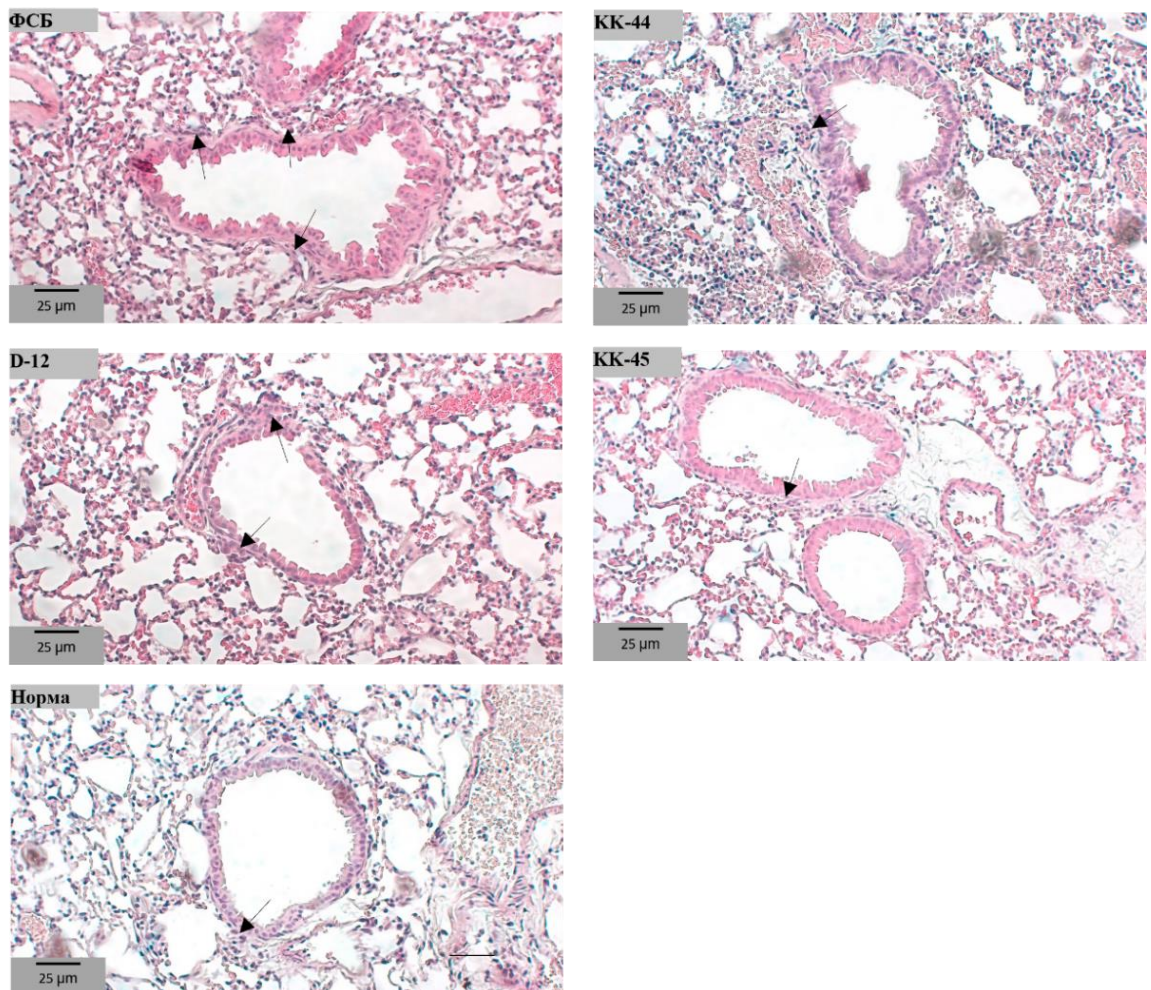
Мышей инфицировали РСВ и интраназально вводили пептиды. На 5-й день собирали клетки БАЛ и лизировали их для проведения ПЦР-анализа в реальном времени. Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильный размах (Me  $\pm$  IQR). \* — значимое отличие от группы «ФСБ»;  $\times$  — значимое отличие от группы «КК-44» по критерию Краскела — Уоллиса. N=10.

Рисунок 13 – Влияние интраназального введения пептидов инфицированным мышам на экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины (Ifng, Tnfa, Il6 и Il1b)

А

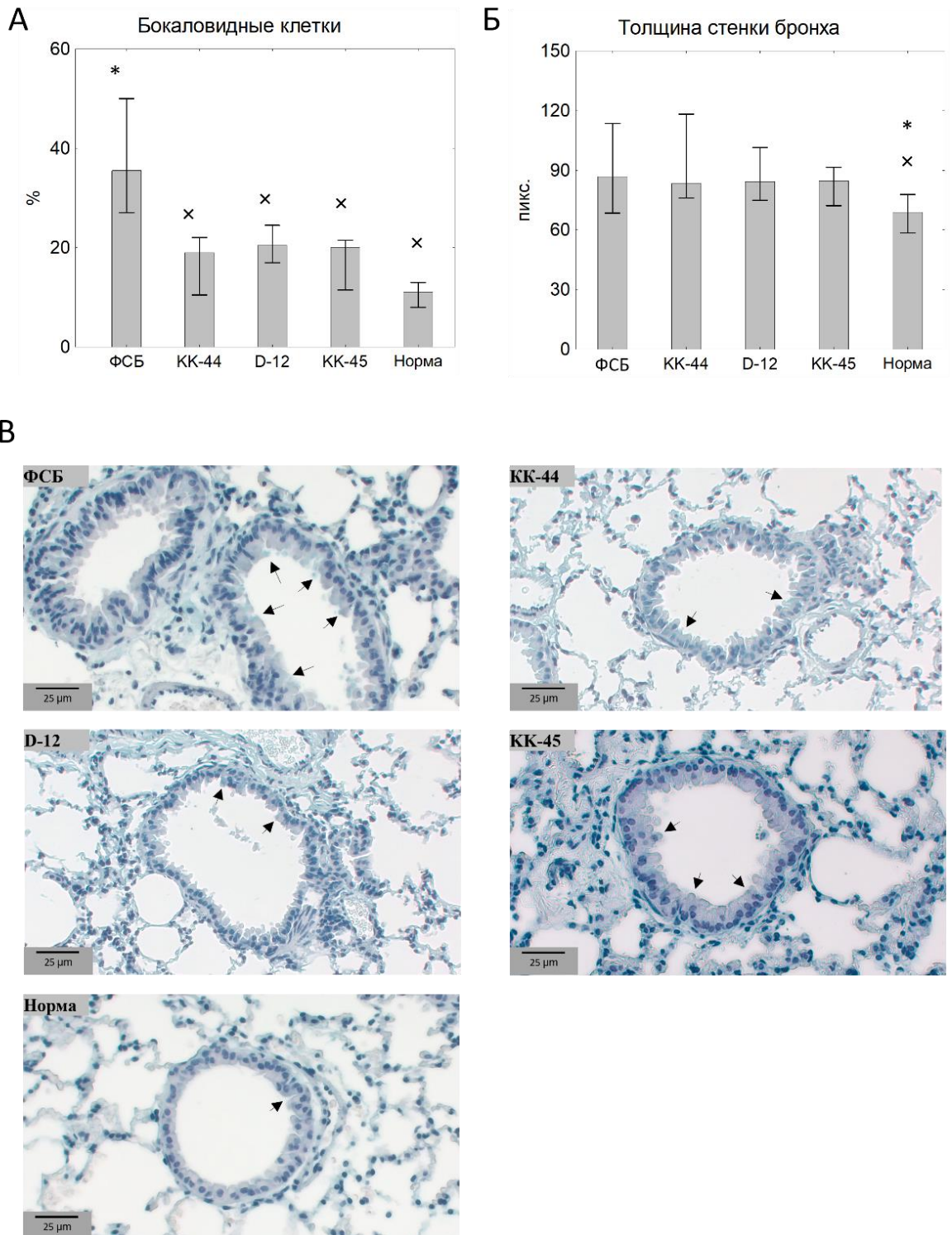


Б



А. Площадь перибронхиальных инфильтратов и общее количество клеток в инфильтрате. Срезы лёгких окрашивали гематоксилином и эозином для подсчета площади перибронхиальных инфильтратов и количества клеток. Анализировали пять бронхов для каждого лёгкого при увеличении  $\times 400$ . Данные представлены как медиана  $\pm$  интерквартильный размах (Me  $\pm$  IQR).  $\times$  — значимое отличие от «ФСБ»; \* — значимое отличие от «КК-44» по критерию Краскела-Уоллиса. N=8. Б. Микрофотографии (увеличение  $\times 400$ ), иллюстрирующие перибронхиальную клеточную инфильтрацию. Стрелки указывают на перибронхиальную клеточную инфильтрацию.

Рисунок 14 – Влияние пептидов на гистологические изменения в ткани лёгких



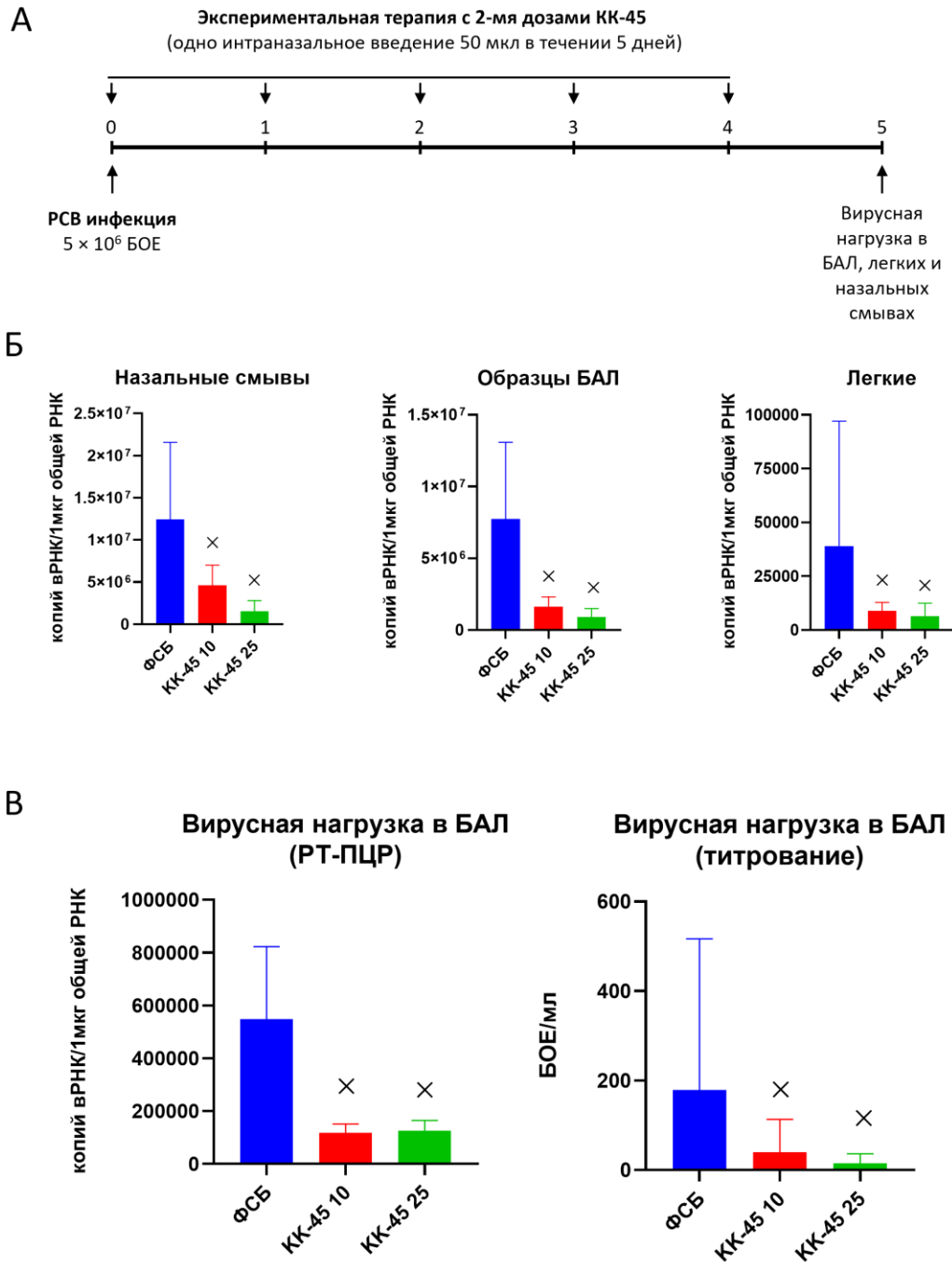
А, Б. Бокаловидные клетки и толщина стенок бронхов. Срезы лёгких окрашивали альциановым синим с последующим количественным определением муцин-положительных бокаловидных клеток и измерением толщины стенок дыхательных путей. Анализировали пять бронхов для каждого лёгкого; анализ всех бронхов проводили при увеличении  $\times 600$ . Данные представлены как медиана  $\pm$  интерквартильный размах ( $Me \pm IQR$ ) (процент бокаловидных клеток в бронхиальном эпителии).  $\times$  — значимое отличие от «ФСБ»; \* — значимое отличие от «КК-44» по критерию Краскела-Уоллиса.  $N=8$ . В. Микрофотографии (увеличение  $\times 600$ ), иллюстрирующие гиперплазию бокаловидных клеток бронхиального эпителия. Стрелками указаны бокаловидные клетки в эпителии.

Рисунок 15 – Влияние пептидов на количество муцин-секретирующих бокаловидных клеток

Дополнительные эксперименты *in vivo* были проведены для оценки противовирусного эффекта различных доз КК-45 (рисунок 16 А). Инфицированным мышам интраназально вводили пептиды в двух дозах 10 и 25 мкг. Количественный ПЦР-анализ выявил значительное снижение числа копий вРНК в носовых смывах (в 8,1 раза), в образцах БАЛ (в 8,8 раза) и в лёгких (в 9,4 раза) мышей, получавших максимальную дозу КК-45, по сравнению с группой контроля (рисунок 16 Б).

Для того чтобы определить наличие жизнеспособного вируса в дыхательных путях образцы БАЛ вносили на монослой культуры клеток Нер-2 на 4 часа для наращивания вируса. Не связавшийся вирус отмывали, а клетки, зараженные вирусом, находящимся в образцах БАЛ, культивировали в течение 5 дней. Данные манипуляции позволили увеличить чувствительность способа детекции вируса, так как проводили его дополнительное наращивание перед определением вирусной нагрузки. Далее супернатанты титровали на монослой клеток МА-104 с последующим выявлением количества синцитиев методом световой микроскопии, а лизаты клеток Нер-2 использовали для оценки вирусной нагрузки методом количественной ПЦР. Результаты титрования демонстрировали значительное снижение вирусной нагрузки в образцах БАЛ мышей, получавших 10 и 25 мкг пептида в 4,5 и 12 раз по сравнению с контрольной группой. В то время как результаты количественной ПЦР демонстрируют одинаковое снижение вирусной нагрузки в 4,5 раза в обеих экспериментальных группах (рисунок 16 В). Такое несовпадение результатов можно объяснить особенностями методов детекции; при титровании выявляется жизнеспособный вирус, который формирует в монослой клеток синцитии, а количественный ПЦР идентифицирует как жизнеспособные, так и инактивированные вирусные частицы, неспособные к размножению.

Таким образом КК-45 продемонстрировал дозозависимую противовирусную активность. В минимальной дозе 10 мкг он снижал уровень вРНК в лёгких в 5 раз. Более высокая доза КК-45 в 25 мкг приводила к более значительному снижению вРНК (в 9,4 раза в ткани лёгких). Несмотря на отсутствие влияния на ГРБ, пептид КК-45 значительно ослаблял воспаление респираторного тракта, вызванного вирусом.



А. Дизайн исследования. Мышей инфицировали РСВ и интраназально вводили пептид КК-45 в двух дозах: 10 мкг, 25 мкг. В качестве контроля интраназально вводили ФСБ. Б. Оценка вирусной нагрузки в дыхательных путях. На 5-й день собирали образцы БАЛ, легких и назальных смывов для оценки вирусной нагрузки методом количественной ПЦР. N=10. В. Вирусная нагрузка в БАЛ. Для выявления жизнеспособного вируса образцы БАЛ были прокультивированы на монослое клеток Нер-2 в течение 5 дней, после чего надосадов был раститрован на монослое клеток МА-104 с целью подсчета количества бляшек (правый график). Дополнительно в лизатах клеток Нер-2 определено количество копий вирусной РНК (вРНК). N=8. Данные представлены как медиана ± интерквартильный размах (Me ± IQR). × — значимое отличие от «ФСБ» по критерию Краскела-Уоллиса.

Рисунок 16 – Противовирусный эффект различных доз пептида КК-45

### 3.9 Токсичность, иммуногенность и аллергизирующие свойства пептида КК-45 при интраназальном введении

Была оценена безопасность пептида КК-45 в эксперименте на лабораторных животных. Оценивались токсические эффекты, а также его иммуногенность и аллергизирующие свойства при длительном интраназальном пути введения в широком диапазоне доз (10, 25 и 100 мкг/мышь). Выбор доз 10 и 25 мкг/мышь обусловлен тем, что при этих дозах пептид КК-45 проявлял противовирусный эффект и снижал выраженность иммунопатологических изменений РСВ-инфекции в модели *in vivo*. Кроме того, целесообразно изучить потенциальный токсический эффект пептида в дозе, 10-кратно превышающей минимальную биологически активную дозу (10 мкг), чем обусловлено включение в этот эксперимент дозы 100 мкг/мышь.

Пептид вводили мышам ежедневно на протяжении 14 суток — по одному интраназальному введению в сутки в трёх указанных дозах. После окончания 14-дневного введения КК-45 осуществляли наблюдение за лабораторными животными еще в течение 14 дней. Данная продолжительность курса для токсикологического исследования обусловлена тем, что биологический эффект пептида КК-45 проявляется уже после 5 интраназальных ежедневных введений. Чтобы полноценно оценить потенциальные токсические эффекты соединения, необходимо существенно продлить период его применения; в данном случае выбранный 14-дневный курс почти втрое превышает длительность воздействия, использовавшуюся в экспериментах по изучению биологической активности КК-45. Помимо этого, двухнедельный период введения даёт возможность выявить иммуногенность пептида и определить, обладает ли он аллергизирующими свойствами.

Ежедневное интраназальное введение пептида КК-45 в течение 14 дней в дозах 10 и 25 мкг не влияло на массу тела. Мыши, получавшие самую высокую дозу (100 мкг), продемонстрировали статистически значимое снижение массы тела к концу периода введения (14-й день), показав снижение на 5% по сравнению с животными, получавшими ФСБ. Масса тела этой группы оставалась сниженной на 5–7% на протяжении всего периода наблюдения (в течение 2 недель после окончания лечения — до 28-го дня) (рисунок 17 А). Эти данные позволяют предположить, что пептид КК-45 не вызывает признаков токсичности при интраназальном введении в дозе до 25 мкг/мышь.

Анализ образцов БАЛ, собранных через 1 день после интраназального введения пептида, выявил значительное увеличение общего количества клеток у мышей, получавших самую высокую дозу (100 мкг); увеличение общего числа клеток на 55% по сравнению с контрольной группой. Однако к концу двухнедельного периода наблюдения (через 14 дней после лечения)

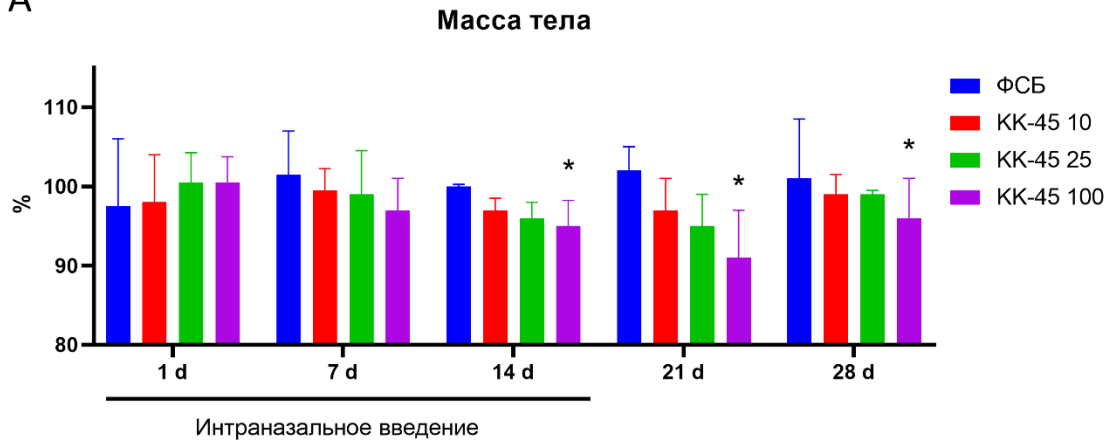
количество клеток в БАЛ этой группы вернулось к уровням, сопоставимым с контрольной группой, получавшей ФСБ. В то же время общее количество клеток в образцах БАЛ мышей, получавших дозы пептида 10 и 25 мкг, не отличалось от такового у контрольных животных в обеих временных точках: на 1-й и 14-й дни после курса введения (рисунок 17 Б).

Анализ клеточного состава БАЛ в 1-й день после курса введения показал, что количество макрофагов осталось неизменным по сравнению с контрольной группой. Введение пептида в максимальной дозе (100 мкг) вызывало значительное двукратное увеличение количества лимфоцитов по сравнению с контролем. Примечательно, что интраназальное введение КК-45 даже в самой низкой дозе вызывало появление эозинофилов в БАЛ. У мышей, получавших 10 мкг и 25 мкг пептида, количество эозинофилов составляло 10% от общего числа клеток БАЛ, и этот процент увеличивался до 18% у животных, получавших максимальную дозу – 100 мкг (рисунок 17 В).

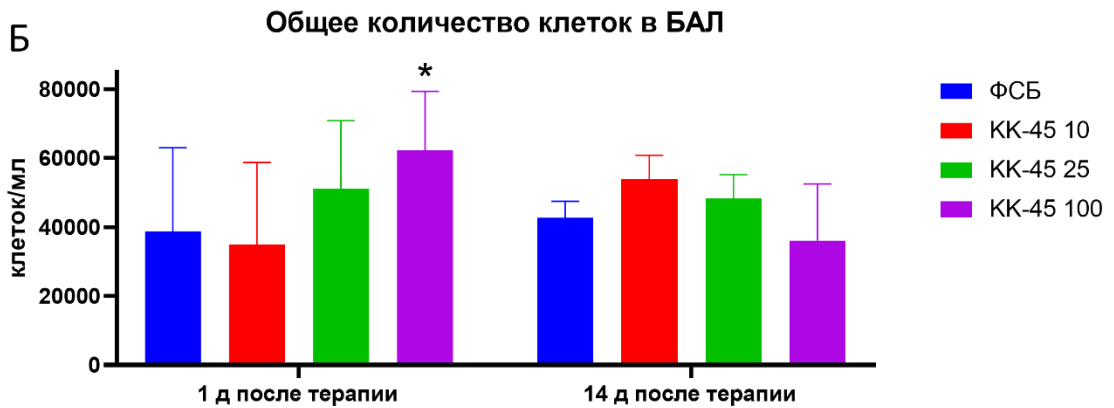
Гистологическое исследование тканей носовой полости показало, что на первые и 14-ые сутки после введения пептида КК-45 в дозах 10 и 25 мкг/мышь структура слизистой оболочки не менялась по сравнению с контролем, при этом отмечались умеренные признаки клеточной инфильтрации ткани и незначительное утолщение эпителиального слоя (рисунок 18 А, Б). Морфологические изменения слизистой оболочки носа мышей, получавших КК-45 в дозах 10 и 25 мкг/мышь не носили выраженного характера и не различались между группами.

В то же время введение пептида в дозе 100 мкг/мышь приводило к статистически значимому увеличению толщины эпителия, числа инфильтрирующих клеток и площади инфильтрата на 1-е сутки после терапии. Данный эффект свидетельствует о развитии выраженной локальной воспалительной реакции. К 14-ым суткам после введения высокой дозы (100 мкг) наблюдалось снижение всех исследуемых параметров до уровней, сопоставимых с контрольной группой, что указывало на обратимый характер индуцированных изменений (рисунок 18 А, В).

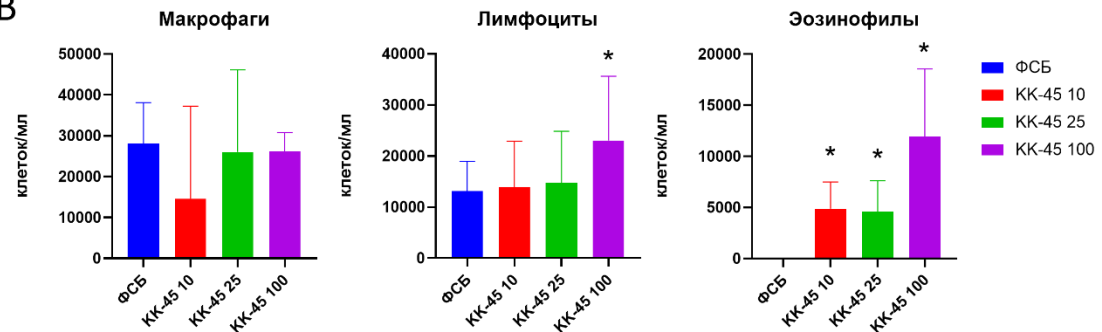
А



Б

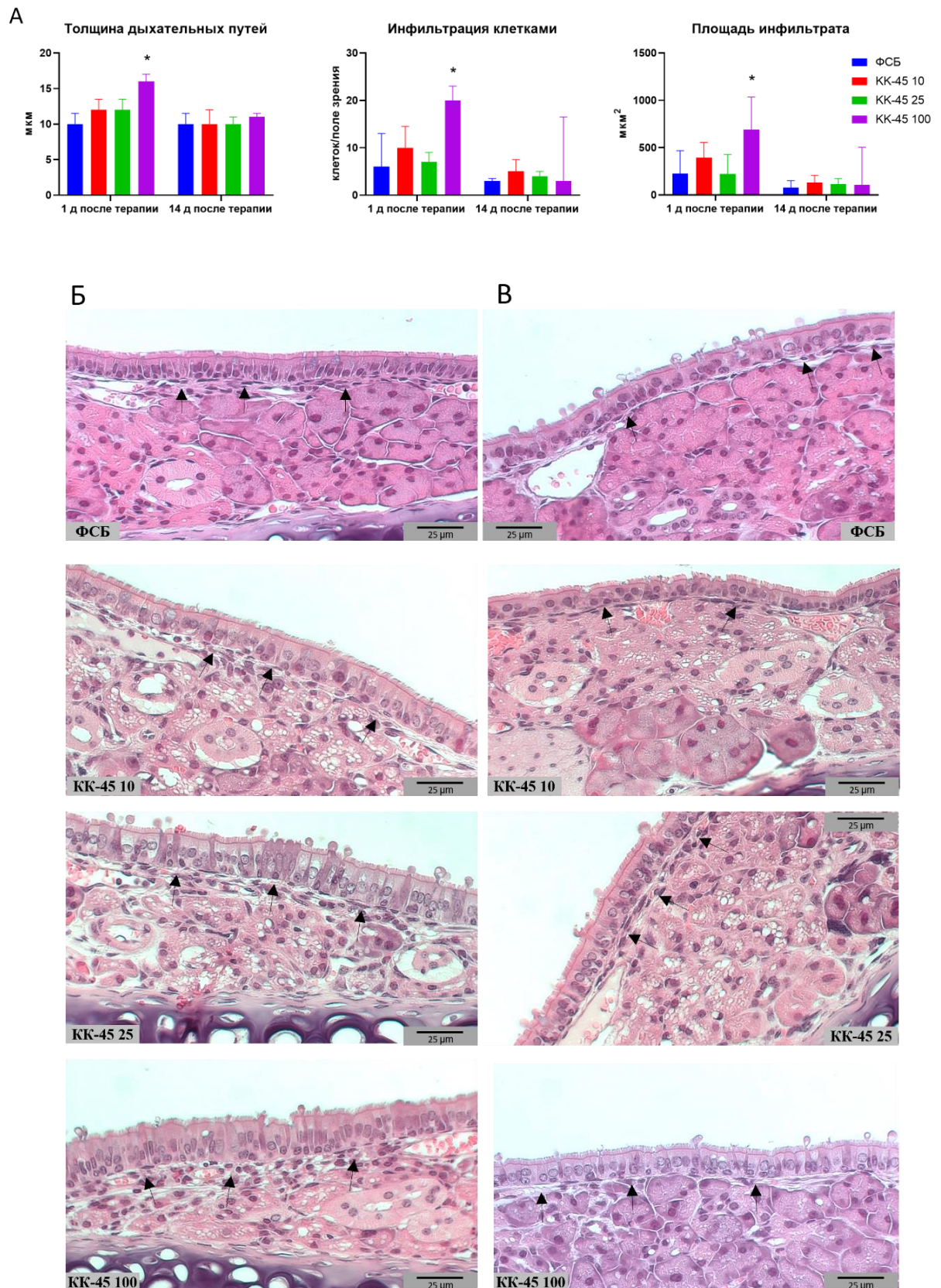


В



А. Масса тела мышей, получавших интраназальное введение пептида КК-45. Мыши получали КК-45 интраназально в дозах 10, 25 и 100 мкг/мышь в течение 14 дней. Мыши, получавшие ФСБ, служили контролем. Измерения массы тела проводили: во время фазы лечения (на 1, 7 и 14-й день); в течение 2-недельного периода наблюдения (на 21 и 28-й день). Масса тела на 1-й день (до первого интраназального введения) принята за 100%. N = 10 для периода лечения, N=5 для периода наблюдения. Б. Общее количество клеток в БАЛ, оцененное через 1 и 14 дней после экспериментальной терапии. Данные представлены как медиана  $\pm$  интерквартильный размах (Me  $\pm$  IQR) (клеток/мл). N = 5. В. Влияние пептида КК-45 на клеточный состав БАЛ. На следующий день после курса экспериментальной терапии анализировали клеточный состав БАЛ. N = 5. \* — значимое отличие от «ФСБ» по критерию Краскела-Уоллиса. Данные представлены как медиана  $\pm$  интерквартильный размах (Me  $\pm$  IQR).

Рисунок 17 – Токсичность пептида КК-45

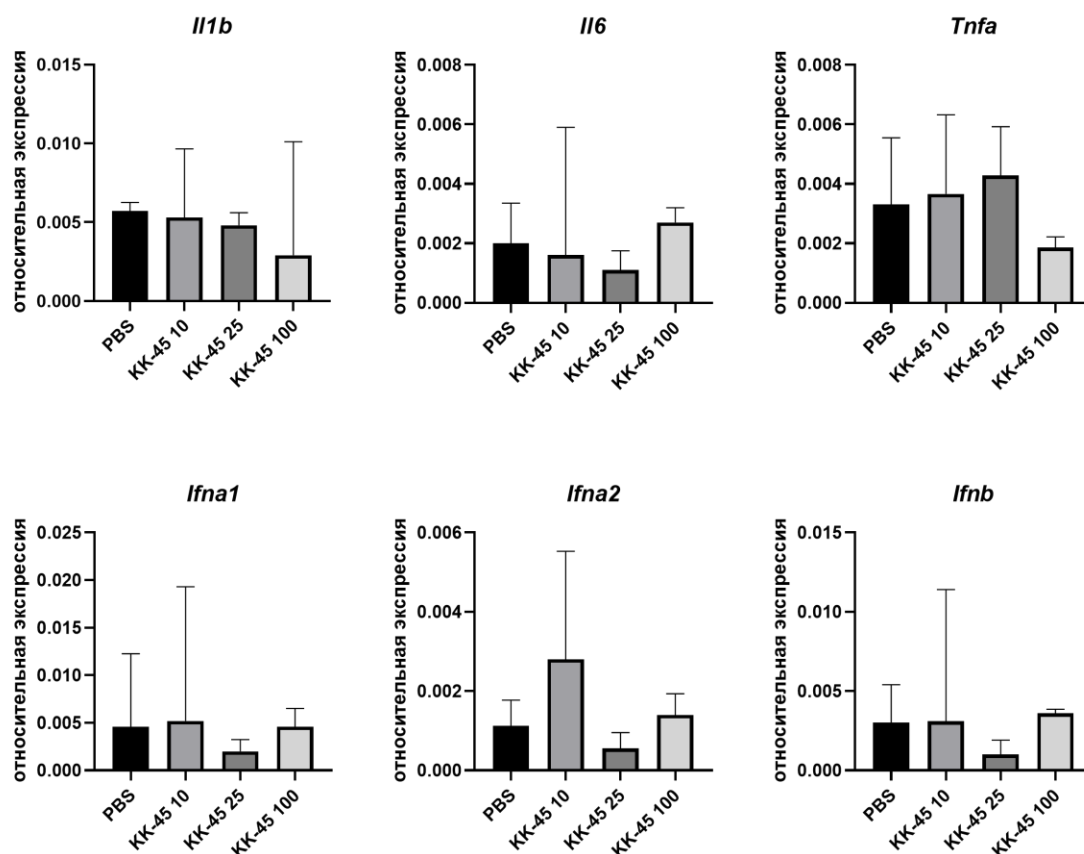


Мышам интраназально вводили пептид КК-45 в течение 14 дней в трёх дозах: 10, 25 и 100 мкг/мышь. На 1 и на 14 день после экспериментальной терапии забивали по 5 животных, отбирали головы для гистологического анализа. А. Толщина респираторного эпителия, количество инфильтрирующих клеток и площадь инфильтратов в срезах носовой полости. Срезы носы окрашивали гематоксилином и эозином, анализировали пять полей зрения для каждого образца; анализ всех носовых срезов проводили при увеличении  $\times 600$ . Данные

представлены как медиана  $\pm$  интерквартильный размах ( $Me \pm IQR$ ). \* — значимое отличие от «ФСБ» по критерию Краскела-Уоллиса. N=5. Б, В. Микрофотографии срезов носа через 1 день (Б) и 14 дней (В) после экспериментальной терапии пептидом. Стрелками указаны клеточные инфильтраты.

Рисунок 18 – Влияние пептида КК-45 на эпителий носовой полости

Кроме того, с помощью ПЦР-РВ оценивали экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины (*Il1b*, *Il6* и *Tnfa*), а также генов противовирусной защиты (*Inga1*, *Ifna2* и *Ifnb*). Результаты показали, что 14-дневный курс введения пептида КК-45 во всех трех дозах не влиял на экспрессию этих генов в клетках БАЛ (рисунок 19). Данные результаты позволяют предположить, что пептид КК-45 при интраназальном введении в дозах  $\leq 25$  мкг не вызывает воспаления дыхательных путей. Повышение дозы пептида до 100 мкг вызывало временную воспалительную реакцию, которая полностью разрешается в течение двух недель.



Мышам интраназально вводили пептид КК-45 в течение 14 дней в трёх дозах: 10, 25 и 100 мкг/мышь. На следующий день после экспериментальной терапии собирали клетки БАЛ и лизировали их для проведения ПЦР-анализа в реальном времени. Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильный размах ( $Me \pm IQR$ ). RQ – уровень экспрессии целевого гена относительно уровня экспрессии нормализующего. N = 5. \* — значимое отличие от группы «ФСБ» по критерию Краскела-Уоллиса.

Рисунок 19 – Влияние пептида КК-45 на экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины (*Il1b*, *Il6* и *Tnfa*), и генов противовирусной защиты (*Inga1*, *Ifna2* и *Ifnb*) в клетках БАЛ

Гематологический анализ, выполненный через 1 день после завершения 14-дневного курса введения КК-45, не выявил значительного влияния пептида на общий состав лейкоцитов (включая нейтрофилы, лимфоциты, моноциты и базофилы). Наблюдалась незначительная дозозависимая тенденция к снижению количества моноцитов: с  $0,12 \times 10^3$  клеток/мкл в группе ФСБ до  $0,06 \times 10^3$  клеток/мкл у мышей, получавших самую высокую дозу. Количество моноцитов оставалось в пределах референсного диапазона для мышей ( $0,005 - 0,190 \times 10^3$  кл/мкл), указанного в таблице 4. Примечательно, что 14-дневное интраназальное введение самой высокой дозы пептида (100 мкг) значительно повышало уровень эозинофилов в крови по сравнению с группой ФСБ, превышая референсный интервал ( $0,17 \times 10^3$  клеток/мкл против  $0,07 \times 10^3$  клеток/мкл), указанного в таблице 4. Таким образом, многократное (в течение 14 дней) интраназальное введение пептида КК-45 в дозах  $\leq 25$  мкг/мышь не влияло на состав клеток крови, тогда как более высокая доза вызывала эозинофилию.

Таблица 4 – Гематологические параметры

Параметр $10^3$ клеток/мкл	РИ клеток/мкл	ФСБ 0 мкг/мышь	КК-45 10 10 мкг/мышь	КК-45 25 25 мкг/мышь	КК-45 100 100 мкг/мышь
Лейкоциты	1,14 – 6,69	6,22 [4,36; 6,69]	2,52 [2,33; 6,99]	3,49 [2,7; 4,11]	3,96 [3,88; 4,32]
Нейтрофилы	0,25 – 1,38	1,32 [1,31; 1,37]	0,57 [0,46; 0,97]	0,81 [0,63; 0,93]	0,76 [0,75; 0,85]
Лимфоциты	0,65 – 5,27	4,71 [2,89; 5,02]	1,78 [1,75; 5,86]	2,39 [1,8; 2,96]	2,93 [2,77; 3,24]
Моноциты	0,005 – 0,190	0,12 [0,08; 0,16]	0,05 [0,05; 0,08]	0,07 [0,05; 0,09]	0,06 [0,04; 0,08]
Эозинофилы	0,01– 0,17	0,07 [0,05; 0,07]	0,07 [0,04; 0,15]	0,13 [0,1; 0,16]	<b>0,17 [0,15; 0,19]</b> #*
Базофилы	0,003 – 0,070	0,01 [0,01; 0,03]	0,01 [0,01; 0,03]	0,01[0,01; 0,01]	0,02 [0,01; 0,03]

Примечание – кровь для гематологического анализа была взята через 1 день после интраназального (и.н.) введения пептида КК-45. Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильный размах ( $Me \pm IQR$ ) [Q25; Q75] ( $\times 10^3$ /мкл); N = 10. \* — значимое отличие от группы «ФСБ» по критерию Краскела — Уоллиса, # — выход за пределы референсного интервала (РИ).

Биохимический анализ сыворотки крови, собранной через 1 день после окончания курса введения пептида, не выявил влияния КК-45 на показатели АСТ, АЛТ, азот мочевины и

креатинин, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния пептида на функцию печени и почек, данные приведены в таблице 5.

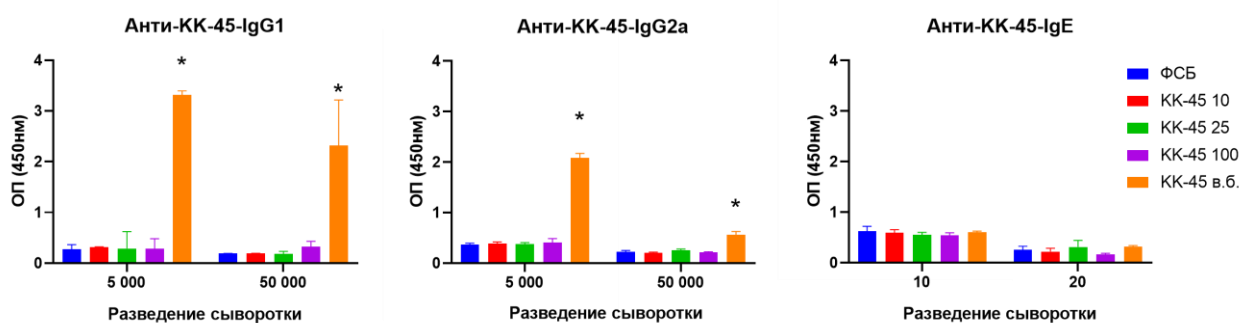
Таблица 5 – Биохимический анализ сыворотки крови

Параметр	РИ	ФСБ 0 мкг/мышь	КК-45 10 10 мкг/мышь	КК-45 25 25 мкг/мышь	КК-45 100 100 мкг/мышь
АСТ (U/Л)	54 – 202	113 [103; 116]	118 [105; 140]	126 [107; 149]	126 [124; 139]
АЛТ (U/Л)	30 – 100	59 [53; 77]	137 [98; 156]	113 [90; 124]	105 [86; 117]
Креатинин (мкмоль/Л)	10 – 30	15 [13; 20]	23 [18; 25]	18 [14; 21]	16 [11; 20]
Азот мочевины (ммоль/Л)	2,5 – 11	6 [6; 7]	7 [7; 7]	7 [7; 7]	6 [6; 6]

Примечание – кровь для получения сыворотки с целью последующего биохимического анализа была взята через 1 день после интраназального (i.n.) введения пептида КК-45. Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом (Me ± IQR). [Q25; Q75]; N = 10. \* — значимое отличие от группы «ФСБ» по критерию Краскела — Уоллиса, # — выход за пределы референсного интервала (РИ). АСТ — аспаратаминотрансфераза, АЛТ — аланинаминотрансфераза.

Исследования иммуногенности показали, что интраназальное введение КК-45 в течение 14 дней во всех тестируемых дозах (до 100 мкг) не вызывало продукции пептид-специфических антител IgG1 и IgG2a, в то время как внутрибрюшинные инъекции пептида в сочетании с адьювантом индуцировали выраженный антительный ответ (рисунок 20).

Аллергизирующий потенциал пептида КК-45 определяли путём оценки его способности индуцировать продукцию пептид-специфических IgE-антител. Примечательно, что ни интраназальное, ни внутрибрюшинное введение пептида не вызывало продукции IgE (рисунок 20), что указывает на гипоаллергенную природу КК-45.



Пептид КК-45 вводили мышам интраназально в течение 14 дней в трёх дозах. Образцы сыворотки собирали через 14 дней после курса экспериментальной терапии и анализировали

методом ИФА. Мыши, получавшие ФСБ, служили отрицательной контрольной группой, а мыши, получавшие внутривнутрибрюшинно пептид в сочетании с адьювантом Фрейнда — положительной контрольной группой. N=5. \* — значимое отличие от группы «ФСБ» по критерию Краскела-Уоллиса.

Рисунок 20 – Оценка иммуногенности и аллергенности пептида КК-45

Результаты проведённого исследования свидетельствуют о благоприятном профиле безопасности пептида КК-45 при многократном интраназальном введении лабораторным животным в дозах до 25 мкг/мышь. В рамках эксперимента не выявлено токсического воздействия на функцию печени и почек, а также признаков иммуногенности. Кроме того, не зарегистрирована продукция пептид-специфических IgG1-, IgG2a- и IgE-антител после многократного интраназального введения КК-45. При использовании дозы 100 мкг/мышь отмечались определённые нежелательные эффекты: снижение массы тела на 5–7 %, временная воспалительная реакция в дыхательных путях (характеризующаяся увеличением общего числа клеток в БАЛ на 55 % и двукратным ростом количества лимфоцитов), а также повышение уровня эозинофилов в крови ( $0,17 \times 10^3$  клеток/мкл против  $0,07 \times 10^3$  клеток/мкл в контрольной группе). Однако эти изменения носили обратимый характер; через 14 дней после завершения курса введения показатели возвращались к норме.

Таким образом, пептид КК-45 продемонстрировал приемлемую безопасность, а также отсутствие аллергизирующих и иммуногенных свойств при интраназальном пути введения в дозах  $\leq 25$  мкг/мышь, тогда как повышение дозы может провоцировать временные местные воспалительные реакции, не приводящие к стойким нарушениям.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка терапевтического потенциала пептида КК-45 базируется на анализе ключевых закономерностей иммунопатогенеза РСВ-инфекции. Данное заболевание характеризуется дисбалансом цитокинового профиля и массивной инфильтрацией дыхательных путей иммунокомпетентными клетками. Воссоздание этих патоморфологических признаков на модели *in vivo* позволило точно определить влияние препарата как на репликацию вируса, так и на выраженность Th1-опосредованного воспалительного ответа. Направленное воздействие пептидного конструкта на молекулярные мишени патогена снижает интенсивность иммунопатологии легких без развития токсических или аллергических реакций.

### 4.1 Анализ структур пептидов с противовирусной активностью в отношении РСВ

РСВ-инфекция является одной из важнейших медицинских проблем. Недавний прогресс в понимании молекулярных механизмов инфекции позволил предложить использовать природные и синтетические пептиды в качестве компонентов противовирусных препаратов. Как было упомянуто выше в главе «Обзор литературы» в разделе 1.4, в литературе описаны как природные, так и синтетические пептиды, обладающие доказанной противовирусной активностью в отношении РСВ. Несмотря на широкое разнообразие их структур, они обладают некоторым сходством, что, по всей видимости, определяет их активность.

#### 4.1.1 Бета-дефензин-2 человека

Бета-дефензин-2 человека (human beta-defensin-2, HBD2) – это богатый цистеином катионный пептид, размером 41 аминокислотный остаток (а.о.). У человека идентифицировано 2 бета-дефензина: HBD1 и HBD2. Ген, кодирующий HBD1, *DEFB1*, не содержит регуляторного элемента для NF-κB и экспрессируется конституционно, главным образом в эпителии уrogenитального тракта. Наоборот, ген *DEFB4A*, кодирующий HBD-2, содержит регуляторный элемент для связывания с фактором NF-κB, а его экспрессия индуцируется в ответ на провоспалительные стимулы. Экспрессия HBD-2 зафиксирована преимущественно в коже и

легких. В ряде исследований показано, что провоспалительный цитокин  $\text{TNF}\alpha$  обладает противовирусной активностью в отношении РСВ, которая развивается по NF-kB-зависимому и интерфероннезависимому механизму [9, 28, 95]. При более детальном исследовании доказано, что HBD2, активирующийся в эпителиальных клетках легких по TNF/NF-kB-пути, обладает выраженными противовирусными свойствами по отношению к РСВ; при этом инактивация HBD2 в клетках частично, но не полностью нивелирует противовирусные свойства  $\text{TNF}\alpha$ . По всей видимости, помимо HBD2 есть и другие факторы противовирусной защиты, активирующиеся в ответ на  $\text{TNF}\alpha$  [9, 95]. Предполагается, что HBD2 дестабилизирует оболочку вируса и, как следствие, блокирует его проникновение в клетку, так как предварительная инкубация РСВ с HBD2 в диапазоне концентраций от 1 до 6 мкг/мл (оптимум 2 мкг/мл, что соответствует 0,46 мкМ) снижала титр вируса в зараженных клетках более чем в 100 раз, данные приведены в таблице 6. Цитотоксичность, изученная в стандартном МТТ-тесте на культуре клеток карцинома легкого человека (A549), зарегистрирована для HBD2 в концентрации 80–100 мкг/мл [9, 95]. Таким образом, HBD2 обладает анти-РСВ-активностью в нетоксичном диапазоне концентраций, что позволяет рассматривать его как перспективный противовирусный препарат. Однако размер HBD2 довольно внушительный (41 а.о.), поэтому искусственно синтезировать его экономически нецелесообразно.

#### 4.1.2 Пептид Т-118 белка F

В исследованиях ВИЧ-1 показано, что синтетические пептиды DP-107 и DP-178 – производные спирализованных доменов трансмембранного белка gp41 – эффективно ингибируют вирусную инфекцию. Учитывая хорошо изученную структуру белка gp41, Lambert с соавт. [100] провели биоинформационный анализ белка F РСВ и идентифицировали в нем аналогичные домены. Как упоминалось выше, белок F необходим для слияния вириона с клеткой-мишенью. В составе F-белка есть два гидрофобных участка: первый, близкий к С-концу, заякоревает белок в оболочке вируса, второй, близкий к N-концу, взаимодействует с клеткой-мишенью, тем самым иницируя процесс слияния. Затем была синтезирована библиотека из 16 пептидов размером 35 а.о. каждый, перекрывающих идентифицированные домены белка F, и проведен скрининг их антивирусной активности на предмет способности блокировать образование синцития при РСВ-инфекции. Проведенный скрининг выявил, что 13 из 16 пептидов проявляли противовирусные свойства в диапазоне  $\text{EC}_{50}$  от 6 до 30 мкг/мл, что соответствует 0,1–0,5 мкМ. Для более детального изучения некоторые высокоактивные пептиды очистили и

проанализировали их противовирусную активность. В результате выявлен наиболее активный в отношении РСВ пептид – Т-118 с  $EC_{50}$  0,05 мкМ. Показано, что пептид Т-118 специфичен именно к РСВ – репликацию других вирусов, таких как вируса парагриппа и ВИЧ-1, не ингибировал или ингибировал в значительно более высокой концентрации. Его цитотоксичность проявлялась только при высоких концентрациях – 50%-ная цитотоксическая концентрация,  $CC_{50}$ , установленная на основе экспериментов *in vitro*, превышала 500 мкг/мл или 128 мкМ, данные приведены в таблице 6. По мнению авторов, наиболее вероятный молекулярный механизм действия пептида Т-118 – его связывание с белком F, что приводит к неспособности последнего изменять свою конформацию и осуществлять слияние РСВ с клеткой-мишенью. Несмотря на высокую биологическую активность пептида, его химический синтез в промышленном масштабе будет нерентабельным – из-за большого размера (35 а.о.) [9, 100].

#### 4.1.3 Пептид из белка G

Белок G – гликопротеин, необходимый для прикрепления РСВ к клетке-мишени, состоит из нескольких доменов: цитоплазматического (I), трансмембранного (II) и эктодомена (III). В последнем выделяют три субдомена: негликозилированный центральный и два гликозилированных переменных, которые фланкируют центральный. В результате биоинформационного анализа аминокислотной последовательности белка G субтипов А и В вируса РСВ человека, а также РСВ крупного рогатого скота и овец установлено, что именно центральный негликозилированный субдомен высоко консервативен и, по-видимому, важен для реализации функциональной активности G-белка – взаимодействия с его рецептором на клетке [9]. Gorman и др. [66] привели экспериментальные доказательства значимости этой области белка G для инфекционного процесса. Автор с коллегами синтезировали пептид из центрального негликозилированного субдомена белка G (G149–197) размером 48 а.о., который в экспериментах *in vitro* ингибировал РСВ-инфекцию в культуре клеток HEp-2;  $EC_{50}$  составила 80 мкМ, данные приведены в таблице 6. Противовирусный эффект пептида можно объяснить его взаимодействием с рецептором РСВ на поверхности клетки, что препятствует связыванию с ним G-белка и, следовательно, абсорбции вирионов РСВ на клетке-мишени [9, 66]. Все эти данные указывают на значимость белка G для жизненного цикла РСВ и на перспективность его использования в качестве мишени при разработке препаратов прямого противовирусного действия.

#### 4.1.4 Пептид, формирующий $\alpha$ -спираль белка F

Как упоминалось выше, белок F необходим для процесса слияния РСВ и клетки-мишени. Стоит отдельно упомянуть, что после трансляции внутри инфицированной клетки белок F разрезается протеазой на две субъединицы: F1 и F2, – которые остаются связаны между собой дисульфидными мостиками. На поверхности зрелого вириона белок F находится в виде тримера F1/F2-гетеродимеров. На N-конце субъединицы F1 располагается пептид слияния (FP) с прилегающим к нему  $\alpha$ -спиральным участком HR-1. На C-конце F1 располагается трансмембранный домен (TM) с  $\alpha$ -спиральным участком HR-2, который обеспечивает закоревание белка в оболочке вируса. В процессе слияния пептид FP взаимодействует с мембраной клетки-мишени, после чего происходит реорганизация пространственной структуры белка F, в ходе которой участки HR-1 и HR-2 сближаются, формируя шпилечную структуру. Это приводит к сближению мембран клетки и вириона и, в итоге, к их слиянию (рисунок 2) [9].

На основании анализа молекулярных механизмов процесса слияния вириона РСВ и клетки гидрофобный участок HR-1 рассматривают как перспективную мишень для дизайна ингибиторов слияния, так как при нарушении структуры этого участка шпилечная структура F-белка не образуется и, как следствие, не происходит сближения мембран вириона и клетки [9]. Также перспективной мишенью считается домен HR-2. Shepherd и соавт. [162] изучили функциональную значимость  $\alpha$ -спирального участка HR-2 длиной 13 а.о. (483 – FPSDEFDASISQV – 495). Искусственно синтезированный линейный пептид HR-S483–495, формирующий эту спиралевидную область в белке F, не проявлял противовирусных свойств в экспериментах *in vitro*. По всей видимости, это связано с тем, что 13-членный пептид не способен формировать вторичную структуру, которая присуща этой области в полноразмерном белке, и тем самым не может быть его конкурентным ингибитором. На основе той же последовательности синтезирован пептид Ac-cyclo-(3,7), (8,12)-FP[KDEFD][KSIRD]V-NH<sub>2</sub>, который содержал лактамные мостики между остатками 3K и 7D, а также 8K и 12D, стабилизирующие  $\alpha$ -спиральную структуру этого короткого пептида. Стабилизированный пептид обладал выраженными противовирусными свойствами в отношении РСВ значение EC<sub>50</sub> составило 0,036 мкМ при CC<sub>50</sub> более 80 мкМ, данные приведены в таблице 6 [9, 162].

#### 4.1.5 Дендримерный пептид SB105-A10

PCB взаимодействует с протеогликанами гепарансульфата, HSPG, на поверхности клеток-мишеней, в связи с чем HSPG рассматривают как возможную мишень анти-PCB-препаратов. Donalisio с соавт. [48] синтезировали библиотеку из 9 пептидных конструкций с различной структурой (линейные, димерные, дендримерные пептиды), которые содержат кластер положительно заряженных аминокислотных остатков, потенциально способных взаимодействовать с HSPG и блокировать инфекционный процесс [9, 48].

HSPG состоит из белкового кора, содержащего гликозаминогликановые цепи, которые в свою очередь содержат неразветвленные цепи гепарансульфатов, структурно схожих с гепарином [24]. Отрицательно заряженные сульфатированные или карбоксильные группы HSPG или гепарина взаимодействуют с кластером положительно заряженных аминокислотных остатков гепаринсвязывающего домена (heparin-binding domain) HBD белка G PCB. Сходные с HBD домены выявлены и в вирусном белке F [9, 57].

В экспериментах *in vitro* выявлена противовирусная активность четырех пептидов этой библиотеки: димерного пептида SB056-dim5 и трех тетрамерных пептидов: SB007-пугЕ, SB105, и SB105-A10 [48]. Значения  $EC_{50}$  варьировали в диапазоне концентраций 0,25–4,40 мкМ; при этом самым эффективным ингибитором PCB оказался тетрамерный (разветвленный дендримерный пептид) пептид SB105-A10,  $EC_{50}$  составила 0,25 мкМ. Значения  $CC_{50}$  для этих пептидов превышали 20 мкМ, так что их анти-PCB-активность не связана с цитотоксическим действием, данные приведены в таблице 6. При исследовании механизма действия пептидов PCB инкубировали с SB105-A10, заражали клетки и определяли титр вируса. Показано, что преинкубация PCB с пептидом не влияла на репликативную активность вируса, то есть SB105-A10 не проявлял вирулицидных свойств в отношении PCB. Однако пептид SB105-A10 взаимодействовал с HSPG на поверхности клеток HEp-2 и A549, что показано конкурентным ингибированием гепарина [9, 48]. Следовательно, пептид SB105-A10, связываясь с клеточным рецептором PCB, HSPG, ингибирует их взаимодействие.

Известно, что образование синцитиев (слившихся инфицированных клеток) – один из механизмов передачи вируса от клетки к клетке. С целью оценить влияние SB105-A10 на этот процесс Donalisio с соавт. [48] инфицировали вирусом культуру клеток HEp-2, после чего добавляли пептид и инкубировали его с клетками с последующей оценкой числа и размера синцитиев. В концентрации 21,3 мкМ дендримерный пептид SB105-A10 подавлял процесс образования синцитиев; при этом гепарин не ингибировал инфекционность PCB [47, 48].

Пептид SB105-A10 содержит область основных аминокислотных остатков ASLRVRIKK, которые имитируют HBD-домены гликопротеинов G и F вируса. По всей видимости, противовирусные свойства этого пептида обусловлены конкурентным ингибированием белков G и F за связывание с клеточным рецептором – HSPG. Эта гипотеза отчасти подтверждается тем, что SB105-A10 блокирует инфекционность других вирусов, использующих HSPG в качестве рецептора для проникновения в клетки-мишени (вирус папилломы человека, вирус простого герпеса и цитомегаловирус), но не проявляет противовирусной активности против ротавирусов и аденовирусов, которые используют другие клеточные рецепторы в инфекционном цикле [47]. Нельзя исключать и иных механизмов противовирусного действия SB105-A10, например, блокирование межклеточной передачи вируса [48].

#### 4.1.6 Кателицидин – пептид LL-37

Единственный кателицидин, обнаруженный у человека, – катионный антимикробный пептид LL-37, активная форма которого образуется в результате протеолитического расщепления белка-предшественника hCAP-18. LL-37 продуцируется нейтрофилами и эпителиальными клетками. Антибактериальные свойства этого пептида хорошо изучены и накапливаются сведения и о его противовирусной активности [9]. Currie с соавт. [41] провели серию экспериментов *in vitro*, в которых клетки HEp-2 инфицировали РСВ и одновременно обрабатывали пептидом, а через 24 часа оценивали количество бляшек. Как оказалось, LL-37 в концентрациях от 3 до 25 мкг/мл или 1,1–9,3 мкМ значительно снижал репликацию РСВ, данные приведены в таблице 6. Этот пептид секретируется во внеклеточное пространство, поэтому для имитации естественных условий, когда вирус и пептид контактируют до попадания вируса в клетку, РСВ инкубировали с LL-37 до заражения клеток. В такой постановке эксперимента антивирусный эффект пептида регистрировали, но он был ниже, чем при совместной инкубации пептида, РСВ и клеток. В то же время отложенная на 2 часа и более инкубация пептида с клетками (пептид вносили в культуру клеток через 2 часа после их инфицирования РСВ) нивелировала противовирусный эффект; в случае же преинкубации пептида с клетками его антивирусная активность была хорошо выражена. Таким образом, анти-РСВ-активность пептида LL-37 обусловлена прямым воздействием как на клетки-мишени, так и на вирионы [9, 41].

С целью выяснить молекулярные механизмы антивирусного действия LL-37 Currie и др. [41] конъюгировали его с флуоресцентным красителем TAMRA и с помощью конфокальной микроскопии исследовали его клеточную локализацию. Установлено, что пептид проникает

внутри клетки и локализуется вокруг ядра. По-видимому, используя пока не известный механизм, LL-37 активирует внутри клетки так называемое “антивирусное состояние”, чем и объясняется его противовирусный эффект в режиме преинкубации с клетками – до их заражения РСВ. Ранее показано [102], что LL-37 модулирует активность интерферонов I типа – факторов с доказанными противовирусными свойствами, поэтому дополнительно были проведены исследования на культуре клеток с нокаутом по генам этих интерферонов. Показано, что инактивация интерферонов не снижала противовирусный эффект LL-37. Таким образом LL-37 защищает клетки от действия РСВ по неустановленному интерфероннезависимому механизму. Не исключено, что интернализированный пептид ингибирует внутриклеточные стадии репликации РСВ, приводя к снижению числа отпочковавшихся вирионов. С целью выяснить влияние пептида на появление новых инфекционных вирионов клетки Her-2 инфицировали РСВ и культивировали в присутствии LL-37. По сравнению с необработанными клетками в присутствии пептида накопление жизнеспособных вирусных частиц в супернатанте клеток, что определяли методом титрования на клетках Her-2, происходило значительно медленнее. Из этого следует, что пептид LL-37 может ингибировать распространение РСВ, например, посредством блокирования почкования вирионов от инфицированной клетки [9, 41].

Три года спустя эта же группа исследователей опубликовала новые данные по анти-РСВ-активности LL-37 – уже в системе *in vivo*. Мышей заражали РСВ интраназально; одновременно, тоже интраназально, вводили LL-37 в дозе 10 мкг/мышь, после чего продолжали курс LL-37 в течение 6 суток. У животных, получавших пептид в таком режиме, не наблюдали потери массы тела, при этом репликация РСВ в ткани легких была снижена в 2 раза [42]. Как обсуждалось выше, в экспериментах *in vitro* введение LL-37 в клетки перед заражением их РСВ ингибировало инфекционный процесс [41]. Однако аналогичный режим введения пептида – перед инфицированием в экспериментах *in vivo* (пептид LL-37 вводили за 1 час до инфекции) – не оказывал протективного действия на мышей. В то же время при одновременном введении РСВ и LL-37 животным противовирусный эффект проявлялся. Следовательно, LL-37 работает как противовирусный агент при контакте с РСВ [9, 42].

Как обсуждалось выше, в исследовании Currie и соавт. [41] показано, что LL-37 проявляет антивирусные свойства по механизмам, не зависимым от экспрессии интерферонов I и III типов. По всей видимости, анти-РСВ эффект LL-37 связан с прямым повреждающим действием на вирионы. При профилактическом режиме введения (за 1 час до инфекции) LL-37 не защищал животных от заражения РСВ, что, скорее всего, связано с коротким периодом полужизни пептида или с его интернализацией внутрь клетки [42].

При исследовании механизмов антивирусного действия LL-37 Currie и соавт. [41] оценивали аффинность связывания РСВ с LL-37 в формате иммуноферментного анализа (ИФА)

и выявили специфическое взаимодействие между ними. Чтобы понять, приводит ли это связывание к разрушению вирионов, проводили окрашивание вирусных частиц флуоресцентно меченными моноклональными антителами против поверхностного белка F и белка N, который локализуется внутри вириона. Интактные вирусные частицы имели высокий уровень колокализации белков N и P, в то время как при контакте с LL-37 происходило двукратное снижение степени колокализации указанных белков, что свидетельствует о нарушении целостности вирионов. Чтобы убедиться в способности LL-37 подавлять инфекцию эпителиальных клеток проведены эксперименты *in vitro*, в которых клетки HEp-2 инкубировали с пептидом и РСВ при +4°C (при данной температуре происходит прикрепление вируса к клетке, но не происходит его слияния с ней) с последующим окрашиванием вируса моноклональными антителами к F-белку и детекцией методом проточной цитометрии. В результате выявлено, что в присутствии LL-37 с клетками связано меньше вирионов РСВ, чем в его отсутствие. На основании полученных данных авторы сделали вывод, что контакт РСВ с LL-37 на начальном этапе инфекционного цикла приводит к повреждению вирусных частиц и, как следствие, к утрате их способности связываться с клетками-мишенями [9, 42].

#### 4.1.7 Катионные пептиды из С-концевых участков хемокинов CXCL9 и CXCL12 $\gamma$

Гликозаминогликаны представляют собой полисахариды, локализующиеся на поверхности многих типов клеток. Они подразделяются на несколько подклассов: гепарин, гепарансульфаты, хондроитинсульфаты, дерматансульфаты, кератансульфаты и гиалуроновые кислоты. Гепарансульфаты за счет сульфатных групп обладают значительным отрицательным зарядом, что позволяет им взаимодействовать с положительно заряженными белками, например, поверхностными белками вирусов (в том числе РСВ), и участвовать в инициации инфекционного процесса. Недавно показано, что хемокины CXCL9 и CXCL12 $\gamma$  обладают значительным положительным зарядом, особенно на С-концевых участках, где до 50% аминокислотных остатков положительно заряжены, причем это не характерно для других хемокинов [9]. Такие особенности первичной структуры CXCL9 и CXCL12 $\gamma$  могут придавать им противовирусную активность.

Vanheule и др. [187] синтезировали 8 пептидов из С-концевых участков CXCL9 и CXCL12 $\gamma$  (6 пептидов из CXCL9 и 2 пептида из CXCL12 $\gamma$ ). Прежде всего исследовали способность синтезированных пептидов взаимодействовать с гепарином, предварительно меченным биотином. Методом поверхностного плазмонного резонанса установлено, что 6 из 8

изучаемых пептидов с большой аффинностью связываются с гепарином и гепарансульфатами. Это связывание, по всей видимости, обеспечивается присутствием в структуре пептидов гликозаминогликансвязывающих доменов (ВВХВ и ХВВВХХВХ), где В – положительно заряженный аминокислотный остаток, а Х – остаток любой другой аминокислоты. Действительно, пептиды CXCL9(74-103), Acetyl-CXCL9(74-103)-amide, CXCL9(74-93), CXCL12 $\gamma$ (68-98) и CXCL12 $\gamma$ (77-98), содержащие по 2 гликозаминогликансвязывающих домена, обладали максимальной аффинностью. Аффинность пептида CXCL9 (86 - 103), в составе которого этих доменов нет, к гепарину оказалась на 2 порядка ниже, чем вышеупомянутых с двумя доменами. Пептиды CXCL9 (79 - 103) и CXCL9 (74 - 86) с одним гликозаминогликансвязывающим доменом также оказались низкоаффинными. По-видимому, наличие 2 гликозаминогликансвязывающих доменов необходимо для стабилизации взаимодействия пептидов с рецептором [9, 187].

Выявив варианты пептидов с высоким сродством к гепарину, авторы изучили их способность связываться с гликозаминогликанами на поверхности клеток. Для этого по N-концу пептида вводили биотиновую метку, инкубировали с клетками яичника китайского хомячка (СНО) и окрашивали их флуоресцентно меченным стрептавидином; интенсивность флуоресценции детектировали методом проточной цитометрии. Обнаружено, что пептиды связываются с поверхностью клеток, причем через гликозаминогликаны – это показано с использованием ингибитора экспрессии гликозаминогликанов, хлорат натрия (NaClO<sub>3</sub>) [9, 187].

Противовирусная активность в отношении РСВ выявлена для 5 из 8 исследованных пептидов: CXCL9 (74 - 103), Acetyl-CXCL9 (74 - 103)-amide, CXCL9 (74 - 93), CXCL12 $\gamma$  (68 - 98) и CXCL12 $\gamma$  (77 - 98). Значения EC<sub>50</sub> варьировали от 23 до 115 мкМ, а CC<sub>50</sub> превышали 150 мкМ, данные представлены в таблице 6. Учитывая, что противовирусная активность пептидов коррелировала с их аффинностью к гепарину, логично предположить, что они блокируют процесс связывания РСВ с клеточными рецепторами – гликозаминогликанами [9, 187].

#### 4.1.8 Мелиттин

Пептид мелиттин представляет собой катионный пептид с  $\alpha$ -спиральной структурой размером 26 а.о. Мелиттин, главный компонент пчелиного яда (до 40%), с выраженной антимикробной активностью, а также противовирусным действием в отношении ряда оболочечных вирусов (вируса гриппа, вируса везикулярного стоматита, вируса простого герпеса и другими) [9, 186]. Uddin с соавт. [186] исследовали противовирусную активность мелиттина в

отношении РСВ. Мелиттин вносили в культуру клеток Нер-2 на 2 часа, после чего клетки инфицировали РСВ. Рассчитанное значение  $EC_{50}$  составило 0,35 мкг/мл или 0,12 мкМ, данные указаны в таблице 6, что сопоставимо со значениями для других оболочечных вирусов: 1,18 мкг/мл или 0,4 мкМ для вируса везикулярного стоматита и 0,94 мкг/мл или 0,32 мкМ для вируса простого герпеса, – а также необолочечных: 0,76 мкг/мл или 0,26 мкМ для энтеровируса-71 и 0,99 мкг/мл или 0,33 мкМ для вируса Коксаки [9].

При изучении механизма действия мелиттина на оболочечные вирусы выявлено, что 5- минутная инкубация пептида с вирусом везикулярного стоматита приводит к ингибированию репликации вируса, при этом процесс прикрепления и внедрения вируса в клетку не нарушается [9]. На примере вируса гриппа показано, что при инкубации с мелиттином и последующем центрифугировании в градиенте плотности поверхностные вирусные гликопротеины, гемагглютинин и нейраминидаза, оказываются в верхних слоях сахарозного градиента (20%-ная сахароза), тогда как цельные вирионы в нижних слоях (40%-ная сахароза). По-видимому, мелиттин разрушает вирионы оболочечных вирусов. Механизм антивирусного действия мелиттина по отношению к необолочечным вирусам остается неизвестным. Ранее предполагали, что мелиттин индуцирует систему интерферонов I типа и тем самым активирует в клетке “антивирусное состояние”. Однако Uddin и др. [186] не нашли подтверждения этой гипотезе: хотя препарат пчелиного яда активировал экспрессию интерферона- $\beta$ , очищенный мелиттин не проявлял такого действия.

Ввиду высокой противовирусной активности мелиттин считается перспективным соединением для внедрения в медицинскую практику, однако технология его выделения и очистки из природного сырья – пчелиного яда – сложный и дорогостоящий процесс [9]. Необходимы дальнейшие исследования по его картированию и выявлению минимального фрагмента, обладающего антивирусной активностью, – это позволит удешевить его наработку, в том числе в промышленном масштабе.

#### 4.1.9 Пептиды из ГТРаза RhoA

Белки, поддерживающие целостность мембраны клетки, могут участвовать в РСВ- инфекции. Один из таких белков – ГТРаза RhoA, локализуемая на мембране клетки, для которой показана способность связываться с F-белком РСВ и облегчать процесс прикрепления/слияния вириона с клеткой [9]. Pasteu с соавт. [138] синтезировали ряд взаимно перекрывающихся пептидов из RhoA размером 19 а.о. и изучили их противовирусные свойства.

Обработка вируса одним из пептидов, RhoA77-95, предотвращала образование синцития; величина  $EC_{50}$  для него составила 0,54 мкг/мл или 0,25 мкМ, данные приведены в таблице 6 [9]. Иммуноферментным анализом не выявлено вирусных белков внутри клеток, обработанных пептидом, что свидетельствует о блокировании ранних стадий инфекционного процесса – этапа прикрепления и/или слияния вириона и клетки-мишени. Анти-PCB-активность RhoA77-95 изучена в экспериментах *in vivo* и показано, что при интраназальном введении пептида в дозе 500 мкг/мышь непосредственно перед заражением или через 2 часа после него признаки инфекции были нивелированы: у животных не происходило значительного падения массы тела и наблюдалось значимое снижение вирусной нагрузки в легких [9, 138].

Механизм действия, посредством которого RhoA77-95 предотвращает PCB-инфекцию, по всей видимости, заключается в конкурентном ингибировании процессов прикрепления и/или слияния вириона и клетки-мишени. Это предположение авторы проверили методом ИФА в формате конкурентного ингибирования связывания белка F, сенсibilизированного на планшете, с RhoA в присутствии пептида RhoA77-95. Для детекции использовали моноклональные антитела к RhoA. Показано, что пептид RhoA77-95 эффективно ингибирует связывание RhoA с F и, следовательно, его можно рассматривать в качестве потенциального анти-PCB-препарата [9, 138].

#### 4.1.10 Дендримерный пептид LTP

Учитывая тот факт, что противовирусная активность катионных пептидов, таких как HBD2 [9, 95], LL-37 [9, 42] и мелиттина [9, 186], направлена непосредственно на вирионы PCB, в работах [6, 175] сконструировали дендримерный пептид LTP, богатый аргинином и лизином, обеспечивающих высокую плотность положительно заряда. Показано, что LTP с высокой эффективностью подавляет репликацию PCB: значение  $EC_{50}$  составляет 1,5 мкг/мл или 0,64 мкМ. Высокой противовирусной активности этого пептида, по-видимому, удалось достичь за счет разветвленной структуры с высокой плотностью положительного заряда: из 17 а.о. 16 несут положительный заряд. Как правило, заряженные пептиды оказывают литическое действие не только на мембрану вируса, но и на мембраны клеток, приводя к их гибели. В связи с этим важно заметить, что цитотоксичность LTP оказалась невысокой – величина  $CC_{50}$  составляла 1 мг/мл или 427 мкМ, что значительно выше  $EC_{50}$  [6, 175].

#### 4.1.11 Влияние структуры пептидов на противовирусную активность в отношении РСВ

Таким образом, в литературе описано более 30 пептидов с доказанной противовирусной активностью в отношении РСВ. Среди них как природные (дефензины, кателицидины и прочие), так и синтетические, спроектированные *de novo* [9]. Несмотря на широкое разнообразие анализ последовательностей этих пептидов демонстрирует чёткую взаимосвязь между их структурными особенностями и противовирусной активностью.

Линейные пептиды, такие как НВD2 и Т-118, проявляют высокую активность благодаря определённой последовательности аминокислот и оптимальной длине молекулы. При этом размер пептида играет критическую роль: слишком большие структуры, как в случае с НВD2 (41 а.о.), могут создавать стерические препятствия, снижающие эффективность взаимодействия клеток с вирусом [9].

Особую эффективность проявляют пептиды с определённой спиральной пространственной организацией. Например, стабилизированные  $\alpha$ -спиральные пептидные структуры, как в случае с модифицированным пептидом HR-C483–495, демонстрируют более высокую активность по сравнению с неспиральными линейными аналогами. Это подтверждает важность вторичной структуры в реализации противовирусного эффекта [9].

Важную роль играет также наличие специфических функциональных доменов. Пептиды, содержащие гликозаминогликансвязывающие мотивы (ВВХВ и ХВВВХХВХ), как в случае с производными CXCL9 и CXCL12 $\gamma$ , проявляют выраженную противовирусную активность благодаря способности конкурировать с вирусом за клеточные рецепторы.

Дендримерные (разветвленные) конструкции, такие как SB105-A10 и LTP, а также пептид КК-45, описанные в данной работе, демонстрируют выраженную активность благодаря разветвлённой структуре и высокой плотности положительно заряженных групп. При этом LTP, содержащий 16 положительно заряженных остатков из 17 аминокислот, показывает противовирусную активность при относительно низкой цитотоксичности [9].

Таким образом, наиболее эффективными оказываются пептиды с оптимальным сочетанием следующих характеристик:

- 1) наличие специфических аминокислотных последовательностей, или присутствие функциональных доменов, обеспечивающих взаимодействие с вирусными или клеточными мишенями,
- 2) определённая пространственная организация, например спиральная или разветвленная (дендримерная) структура,

3) наличие большого количества аминокислотных остатков, обеспечивающих положительный заряд молекулы пептида.

Спроектированный в данной работе пептид КК-45 сочетает в себе большинство указанных характеристик. Так, пептид КК-45 на С-конце содержит линейный фрагмент, включающий аминокислотные остатки антигенного сайта Ø белка F вируса (а.о. 200–213). Примечательно, что Ø-сайт располагается домене HR-1 F-белка, который характеризуется спиральной структурой и играет ключевую роль в обеспечении процесса слияния вируса с клеткой. Помимо С-концевой последовательности аминокислот из Ø-сайта, пептид КК-45 на N-конце содержит разветвленный фрагмент (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K). Этот фрагмент богат лизином и аргинином, что придает пептиду КК-45 высокую плотность положительного заряда (+9).

Таблица 6 – Пептиды, обладающие противовирусной активностью в отношении РСВ

Пептид	Последовательность	Структура	EC <sub>50</sub> , мкМ	Ссылки
HBD2	GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	н.д.	0,46	[95]
T-118	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAOKST	н.д.	0,051	[100]
G149–197	KQRQNKPPSKPNNDFHFEVFNFVPCISCSNNPTCWAICKRIP NKKPGKK	н.д.	80,0	[66]
G163–197	FHFEVFNFVPCISCSNNPTCWAICKRIPNKKPGKK	н.д.	80,0	[66]
G149–189	KQRQNKPPSKPNNDFHFEVFNFVPCISCSNNPTCWAICKR	н.д.	12,0	[66]
G154–189	KPPSKPNNDFHFEVFNFVPCISCSNNPTCWAICKR	н.д.	12,0	[66]
G158–189	KPNNDFHFEVFNFVPCISCSNNPTCWAICKR	н.д.	25,0	[66]
G149–177	KQRQNKPPSKPNNDFHFEVFNFVPBSIBG	н.д.	4,0	[66]
G154–177	KPPSKPNNDFHFEVFNFVPBSIBG	н.д.	5,0	[66]
G158–177	KPNNDFHFEVFNFVPBSIBG	н.д.	50,0	[66]
G162–177	DFHFEVFNFVPBSIBG	н.д.	60,0	[66]
G166–177	EVFNFPBSIBG	н.д.	80,0	[66]
G149–173	KQRQNKPPSKPNNDFHFEVFNFVPB	н.д.	80,0	[66]
G154–171	KPPSKPNNDFHFEVFNFV	н.д.	14,0	[66]
G154–170	KPPSKPNNDFHFEVFNF	н.д.	7,0	[66]
HPCB-B G154-177	NPPKKPKDDYHFEVFNFVPBSIBG	н.д.	21,0	[66]
Б.Н.	Ac-cyclo-(3,7),(8,12)-FP[KDEFD][KSIRD]V-NH <sub>2</sub>	αC	0,036	[162]
SB056-dim	WKKIRVRLSA	Д.П.	3,2	[47, 48]
SB007-pyrE	pyrE-KKIRVRLSA	Р.П.	2,4	[47, 48]
SB105	ASLRVRIKKQ	Р.П.	3,0	[47, 48]
SB105-A10	ASLRVRIKK	Р.П.	0,25	[47, 48]
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE	н.д.	0,67–5,60	[41, 42]
LL-37 (Core)	KIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVP	н.д.	1,1–9,3	[41, 42]

Продолжение таблицы 6

CXCL9 (74–103)	CLNPDSADVKELIKKEKQVSQKKKQKNGK	н.д.	23,0	[187]
Acetyl-CXCL9(74–103)-amide	CLNPDSADVKELIKKEKQVSQKKKQKNGK	н.д.	31,0	[187]
CXCL9 (74–93)	CLNPDSADVKELIKKEKQV	н.д.	50,0	[187]
CXCL12 $\gamma$ (68–98)	RQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKGRREEKVGK	н.д.	115,0	[187]
CXCL12 $\gamma$ (77–98)	KWIQEYLEKALNKGRREEKVGK	н.д.	109,0	[187]
Мелиттин	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	$\alpha$ C	0,12	[186]
RhoA77–95	TDVILMCFSIDSPDSLENI	н.д.	0,25	[132, 138]
LTP	R <sub>8</sub> K <sub>4</sub> K <sub>2</sub> KAC-NH <sub>2</sub>	Р.П.	0,64	[6, 175]

Примечание – EC<sub>50</sub> – концентрация, при которой агент подавляет активность вируса на 50%; Б.Н. – без названия; н.д. – нет данных,  $\alpha$ C –  $\alpha$ -спираль, Д.П. – димерный пептид, Р.П. – разветвленный (дендримерный) пептид.

## 4.2 Механизм противовирусной активности пептида КК-45 в отношении РСВ

Как указано выше в главе «Обзор литературы» в разделе 1.1 гликопротеин F играет главную роль в жизненном цикле вируса, обеспечивая его слияние с клетками. Белок F синтезируется внутри инфицированной клетки как предшественник F<sub>0</sub>, который протеолитически расщепляется на субъединицы F1 и F2, ковалентно связанные в гетеродимер. Функциональный белок F существует в виде тримера гетеродимеров F1/F2 в префузионной конформации. На N-конце субъединицы F1 расположен фузионный пептид (FP) с прилегающим α-спиральным сайтом HR-1. На C-конце F1 находится трансмембранный домен (ТМ) с прилегающим α-спиральным сайтом HR-2, который обеспечивает якорение белка в вирусной оболочке (рисунок 2АБ). Во время слияния FP взаимодействует с клеточной мембраной, после чего белок F меняет конформацию с префузионной на постфузионную. В процессе реорганизации области HR-1 и HR-2 сближаются и образуют структуру типа «шпилька», приводящую к сближению мембран клетки и вириона и, в конечном итоге, к их слиянию (рисунок 2В) [9, 20].

Многие оболочечные вирусы проникают в клетку с помощью белков слияния [9]. Одним из первых был изучен белок слияния gp41 ВИЧ-1. Была продемонстрирована значительная роль спиральных областей этого белка в процессе слияния. Синтетические пептиды DP-107 и DP-178, имитирующие эти области, значительно ингибировали процесс слияния и последующую инфекцию [195]. Позже было показано, что белок слияния F РСВ имеет доменную организацию, сходную с gp41 ВИЧ-1. Внутри белка F были идентифицированы α-спиральные HR-домены: HR-1 и HR-2, которые имеют решающее значение для процесса слияния. Основываясь на таком сходстве, были разработаны пептиды, имитирующие домены HR-1 и HR-2 F-белка, которые подавляли РСВ-инфекцию за счёт физического взаимодействия с HR-доменами, предотвращая перестройку белка F из префузионной в постфузионную конформацию [100].

Экспериментально было показано, что пептиды, полученные из HR-1, обладали более слабыми противовирусными эффектами по сравнению с пептидами из домена HR-2 [100]. Результаты, полученные в данной работе, в целом подтверждают эти данные. Линейный пептид КК-44, имитирующий домен HR-1, не проявлял значительных противовирусных свойств в тесте *in vitro*, когда пептид предварительно инкубировали с РСВ (рисунок 10 А), несмотря на его способность связываться с вирусом (рисунок 10 Г). Эти данные указывают на более важную роль HR-2 по сравнению с доменом HR-1, что, вероятно, связано с его пространственной близостью к трансмембранному домену, участвующему в заякоривании белка F в вирусной оболочке.

Однако недавние исследования показали важность домена HR-1 в процессе инфекции. Был идентифицирован антигенный сайт Ø (а.о. 200-213), расположенный на границе доменов HR-1 и D1 (рисунок 6 А). Этот сайт представлен только в префузионной конформации белка F. Антитела, направленные против антигенного сайта Ø, обладали в 50 раз более сильным противовирусным эффектом по сравнению с паливизумабом. Такая высокая активность антител была обусловлена их способностью взаимодействовать с префузионной, а не постфузионной конформацией белка F, стабилизируя его в этом состоянии и предотвращая процесс слияния. Кроме того, антигенный сайт Ø расположен на апикальной части белка F, что делает его легкодоступным для антител [117].

Учитывая вышесказанное, был разработан линейный пептид КК-44 (а.о. 201–212), который включал большую часть сайта Ø F-белка (а.о. 200–213), и разветвлённый пептид КК-45, который включает последовательность а.о. 201–212, объединённую с дендримерным фрагментом (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K). Короткий дендримерный пептид D-12 (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K) использовали в качестве пептида-сравнения (рисунок 6 Б). Противовирусную активность этих пептидов изучали в эксперименте *in vitro*, осуществляя предварительную обработку РСВ пептидами с последующим внесением вируса в клетки. Инкубация вируса с линейным пептидом КК-44 не снижала инфекцию, тогда как дендримерный пептид КК-45 значительно подавлял образование синцитиев. Контрольный дендримерный пептид D-12 также проявлял анти-РСВ эффект в этом анализе, но более слабый, чем КК-45 (рисунок 10 А). Интересно, что, несмотря на отсутствие влияния на инфекцию, метод ИФА продемонстрировал, что линейный пептид КК-44 связывался с РСВ гораздо лучше по сравнению с КК-45 и D-12 (рисунок 10 Г). По-видимому, КК-44 связывается, но не нарушает функцию F-белка, тогда как пептид КК-45 способен ингибировать инфекцию, взаимодействуя с РСВ. Вероятно, КК-45 связывается с вирионами через свою линейную С-концевую последовательность, имитирующую домен HR-1, в то время как разветвлённая структура на N-конце стерически препятствует структурной перестройке F-белка из префузионной в постфузионную конформацию. Несмотря на отсутствие фрагмента, имитирующего сайт Ø F-белка, малый пептид D-12 также связывался с РСВ (рисунок 10 Г), но имел более слабый противовирусный эффект по сравнению с КК-45 (рисунок 10 А). Это можно объяснить его неспецифическим связыванием с РСВ за счёт электростатического взаимодействия. Кроме того, D-12 обладает высокой плотностью положительного заряда (+8), что указано в таблице 3, это делает его способным взаимодействовать с отрицательно заряженными участками поверхности вириона. Противовирусная активность пептида D-12, скорее всего, обусловлена его способностью дестабилизировать оболочку вируса.

Эксперименты *in vitro* выявили противоречивые эффекты КК-44 на РСВ-инфекцию в зависимости от используемого анализа. В то время как пептид демонстрировал прямой

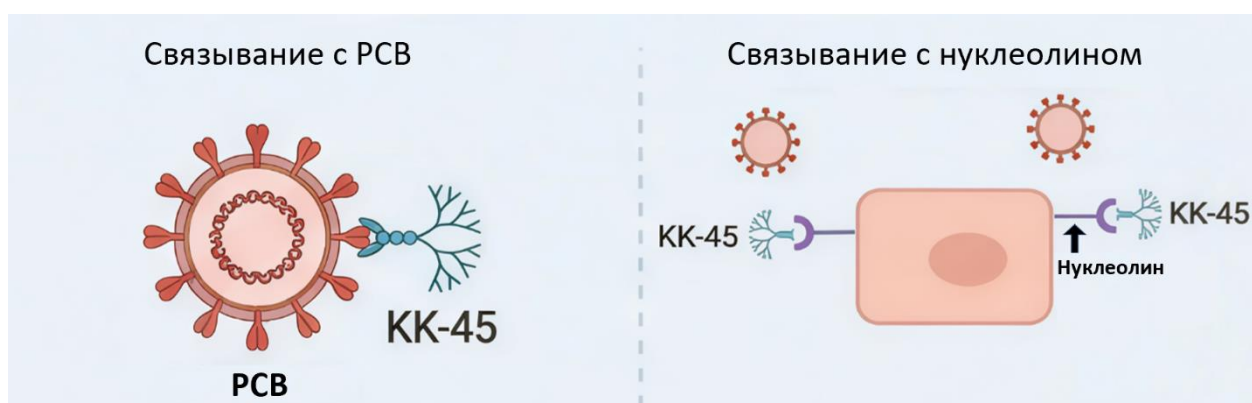
вирулицидный эффект (рисунок 9 Б), он не ингибировал инфекцию в тесте с предварительной обработкой вируса (рисунок 10 А). Это расхождение можно объяснить различиями в методологии этих тестов. Вирулицидный тест включает 2-часовую инкубацию пептида с высокой дозой РСВ  $10^5$  БОЕ на образец при  $37^\circ\text{C}$  с последующим титрованием вируса. Этот метод оценивает способность пептида повреждать вирусные частицы. В то же время, второй тест также подразумевает предобработку вируса пептидом, но в отличие от первого пептид инкубировали с низкой дозой РСВ ( $\sim 50$  БОЕ/образец) в течение 1 часа на льду, после чего смесь пептид/РСВ вносили в клетки и инкубировали 2 часа при  $4^\circ\text{C}$ . При этой низкой температуре РСВ может связываться с клетками-мишенями, но не может инициировать слияние мембран (так как это энергозависимый процесс). После отмывки несвязавшегося вируса этот метод позволяет оценить, может ли пептид препятствовать прикреплению РСВ, воздействуя на вирусные лиганды. Основываясь на этих результатах, мы предполагаем, что КК-44 действует в первую очередь путём прямой дестабилизации оболочки РСВ, а не путём блокирования прикрепления вируса к клеткам-мишеням, тогда как КК-45 задействует оба этих механизма.

Противовирусную активность пептидов исследовали в еще одном тесте *in vitro*, предварительно обрабатывая ими клетки с последующим заражением. Было показано, что только КК-45 оказывал значительный эффект в этом тесте (рисунок 10 Д). Поэтому еще одним механизмом противовирусного действия КК-45 может являться конкурентное ингибирование клеточных поверхностных рецепторов, например, многофункционального клеточного белка нуклеолина. Нуклеолин является идентифицированным рецептором для РСВ [115, 180]; N-концевая область этого белка содержит отрицательно заряженные фрагменты аминокислотных остатков глутамина и аспарагина, что делает ее способной взаимодействовать с катионными пептидами [96]. По данным иммуноферментного анализа (ИФА) было установлено, что дендримерный пептид КК-45 связывался с нуклеолином, в то время как линейный пептид КК-44 и контрольный пептид D-12 взаимодействовали с этим белком слабее (рисунок 10 Д).

В итоге, выраженная противовирусная активность пептида КК-45, скорее всего, обусловлена его способностью конкурентно связываться с рецептором нуклеолином благодаря наличию остатков аргинина в его структуре. Более низкая активность D-12 по сравнению с КК-45 в этом тесте может объясняться тем, что для взаимодействия с нуклеолином требуется не только разветвленная структура, но и линейный C-концевой фрагмент. Линейный пептид КК-44, с другой стороны, не проявлял значительной анти-РСВ активности в данном тесте, что можно объяснить гораздо более слабой способностью связываться с рецептором (рисунок 10 Д) из-за отсутствия катионных сайтов.

РСВ-инфекция поражает не только верхние, но и нижние дыхательные пути, что приводит к более тяжёлым клиническим исходам [128]. Поэтому в дополнение к экспериментам с использованием клеточной культуры МА-104 (рисунок 10 В) мы провели исследования для оценки противовирусных свойств пептида КК-45 в клетках альвеолярного эпителия человека А549. Эти клетки обеспечивают более физиологически релевантную модель нижних дыхательных путей по сравнению с клетками МА-104 [18]. Дополнительные *in vitro* эксперименты подтвердили противовирусную активность пептида КК-45 в этой клеточной линии (рисунок 10 В).

Таким образом, среди тестируемых пептидов КК-45 демонстрирует наиболее выраженную противовирусную активность против РСВ в экспериментах *in vitro*. Этот пептид включает линейную последовательность антигенного сайта Ø и дендримерный фрагмент (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K). Он эффективно подавляет РСВ-инфекцию во всех тестах *in vitro*. Благодаря линейной С-концевой последовательности КК-45 связывается с вирионом, имитируя домен HR-1 гликопротеина F, нарушая его функционирование. Разветвлённая N-концевая структура с дендримерным фрагментом (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K) создаёт стерическое препятствие, которое блокирует конформационный переход белка F из префузионного состояния в постфузионное, что в итоге препятствует слиянию вирусной и клеточной мембран. Дополнительно, пептид КК-45 проявляет конкурентное ингибирование; остатки аргинина в его составе обеспечивают связывание с клеточным рецептором нуклеолином, блокируя тем самым взаимодействие вируса с клеткой-мишенью (рисунок 21). Такая двойная направленность (воздействие на вирион и на клеточные мишени) обуславливает более высокую противовирусную активность КК-45.



Слева показана блокирование пептидом поверхностных рецепторов РСВ, справа – связывание пептида с рецептором (нуклеолин) на поверхности клетки хозяина.

Рисунок 21 – Схематичное изображение механизма действия КК-45

### 4.3 Влияние пептида КК-45 на иммунопатогенез РСВ-инфекции

Шимпанзе – это единственный вид животных, природно-восприимчивый к РСВ человека [15, 179]. Широкое использование шимпанзе в качестве модельного организма ограничено значительными издержками на их содержание, поэтому наиболее часто для моделирования РСВ-инфекции используют грызунов, в частности мышей. Значительное количество данных о молекулярных и клеточных механизмах патогенеза РСВ было получено именно с использованием мышей. Чаще всего применяют мышей линии BALB/c, так как вирус способен реплицироваться, хотя и ограниченно, в их респираторном тракте [125]. Использование мышей для моделирования РСВ-инфекции имеет ряд значительных преимуществ: во-первых, их использование экономически более целесообразно по сравнению с крупными животными; во-вторых, для мышей доступен широкий спектр коммерческих реагентов позволяющих изучать патогенез заболевания на молекулярном и клеточном уровнях.

Для заражения мышей в большинстве опубликованных работ используют три лабораторных штамма: A2, *line 19* и *long*, однако в некоторых исследованиях животных инфицировали изолятами, полученными от пациентов. Недостатком применения клинических изолятов служит то, что они индуцируют у мышей различные признаки патологии, а инфекция некоторыми штаммами протекает практически бессимптомно. Так, в работе K.L. Stokes с соавт. для инфекции мышей применяли 6 клинических изолятов РСВ, однако лишь 2 штамма индуцировали выраженные проявления инфекции, такие как снижение массы тела, развитие гиперреактивности бронхов, а также гиперсекреция слизи. Однако лабораторный штамм A2 реплицировался в дыхательных путях животных интенсивнее изолятов. Кроме того, репликация клинических изолятов преимущественно протекала в эпителии бронхиол, в то время как лабораторный штамм A2 обнаруживался в эпителии альвеол [171], что соответствует естественной локализации вируса в дыхательных путях человека [86]. Поэтому в данном исследовании для воссоздания признаков патологии использовали мышей линии BALB/c, а в качестве патогена РСВ штамм A2.

Несмотря на то, что штамм A2 интенсивней реплицируется в респираторном тракте мышей, по сравнению с клиническими изолятами и другими популярными лабораторными штаммами (*line 19* и *long*), его использование для создания РСВ-инфекции у мышей сопряжено с рядом недостатков. Многие авторы [75, 112, 171] указывают, что штамм A2 не вызывает у мышей таких клинически-значимых проявлений патологии, как гиперпродукция слизи и бронхиальная гиперреактивность. В проведенном исследовании была проведена инфекция мышей высокой дозой РСВ A2, которая составила  $5 \times 10^6$  БОЕ/мышь, что в 10 – 100 раз больше, чем доза вируса,

использованная в большинстве других аналогичных исследований [75, 112, 171]. Использование такой дозы вируса позволило воссоздать эти важные признаки патологии; наблюдался статистически значимый рост гиперреактивности бронхов, в среднем на 30% (рисунок 12), а также у животных отмечалось повышение числа слизепродуцирующих бокаловидных клеток в респираторном эпителии (рисунок 15 А, Б).

Чаще всего для количественной детекции РСВ в легких используют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [92]. Кроме того, подсчитывают количество бляшек в образцах БАЛ и гомогенатах легких путем титрования на монослое клеток и окрашивания белков РСВ антителами [25], а также применяют полуколичественный иммуногистохимический метод окрашивания антигенов вируса в срезах цельного легкого [171]. В проведенном исследовании мы оценивали вирусную нагрузку в легких на 5-е сутки после инфекции двумя методами. Методом количественной ПЦР в гомогенатах легких идентифицировано значительное количество копий РНК вируса. Дополнительно, в данном исследовании выявляли жизнеспособный вирус в легких мышей методом титрования, для чего образцы БАЛ наносили на монослой чувствительных клеток МА-104 с последующей детекцией синцитиев (рисунок 11). Эти данные подтверждают наличие жизнеспособного вируса в дыхательных путях животных.

Стоит отдельно упомянуть, что в данном исследовании для достижения дозы  $5 \times 10^6$  БОЕ/мышь вирус предварительно концентрировали и очищали от культуральной среды в градиенте плотности сахарозы. Процедура очистки РСВ перед его введением мышам в подавляющем большинстве исследований других научных коллективов не проводилась [68, 75, 84, 123, 171]. Введение животным неочищенного вируса может вызвать реакции, в том числе со стороны иммунной системы, на невирусные компоненты, например на факторы, выделяемые культурой клеток, на которой осуществлялось наращивание вируса, или на компоненты питательной среды. Такие реакции искажают результаты исследований и маскируют истинные эффекты модельного животного на вирусную инфекцию [15, 179].

У человека РСВ-инфекция приводит к инфильтрации ткани легких макрофагами, нейтрофилами и лимфоцитами [86]. В наших экспериментах мы также наблюдали значительные количества лимфоцитов и макрофагов в легких, в то время как нейтрофилы практически не обнаруживались (рисунок 11 В). Известно, что рекрутирование нейтрофилов в очаг воспаления происходит в ответ на бактериальную инвазию, которая у человека может наблюдаться, как осложнение после перенесенной РСВ-инфекции [168]. По всей видимости в краткосрочном эксперименте, длящемся 5 суток, бактериальная инфекция не успевала развиваться, что объясняет отсутствие нейтрофилов в легких.

РСВ-инфекция у человека вызывает экспрессию провоспалительных цитокинов в легких, что приводит к избыточному воспалительному сигналу. В частности, РСВ активирует

продукцию: TNF $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-17F, IFN- $\gamma$  и другие [152]. При этом интересно отметить, что ряд исследователей выявил одновременную активацию у человека как Th1- (IFN $\gamma$ ), так и Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13) в ответ на РСВ-инфекцию [184], несмотря на то что IFN- $\gamma$  является антагонистом экспрессии IL-4, и наоборот [53]. Однако последние исследования утверждают, что РСВ-инфекция активирует преимущественно Th1-иммунный ответ [62]. В проведенном исследовании выявлена значительная активация Th1-иммунного ответа после инфекции мышей вирусом, что выражалось в повышении экспрессии соответствующих генов IFN $\gamma$  (рисунок 13). Также мы обнаружили активацию провоспалительного TNF $\alpha$  в клетках БАЛ в 3 раза (рисунок 13), что согласуется с клинической картиной, наблюдаемой у человека [142, 149].

В исследовании Lukacs с коллегами было показано, что РСВ штамм A2, в отличие от других лабораторных штаммов (*long* и *line 19*), не приводил к развитию гиперсекреции слизи и гиперреактивности бронхов, что авторы связывают с неспособностью штамма A2 активировать IL-13, вовлеченного в процесс секреции слизи бронхиальным эпителием [112]. Тем не менее в нашем исследовании штамм A2 индуцировал сопротивляемость бронхов (рисунок 12) и гиперплазию бокаловидных клеток эпителия респираторного тракта (рисунок 15 А, Б), при этом экспрессии *IL-13* нами не зафиксировано. Развитие гиперплазии бокаловидных клеток, основных продуцентов слизи, наблюдаемое в данном исследовании, можно объяснить эффектом TNF $\alpha$ , экспрессия которого была увеличена на фоне РСВ-инфекции в 3 раза; этот цитокин, как и IL-13, способен активировать секрецию слизи эпителием бронхов [109], а повышенное слизиобразование является одним из факторов, приводящим к нарушению функции дыхания за счет механического затруднения потока воздуха в дыхательных путях [84].

Таким образом, в данном исследовании применена экспериментальная модель РСВ-инфекции у мышей с использованием концентрированного и очищенного вируса. Эта модель воссоздает у животных основные проявления патологии человека: гиперреактивность бронхов, структурные нарушения бронхиального эпителия, а также воспаление в ткани легких. РСВ-инфекция у мышей активирует у них преимущественно Th1-иммунный ответ, что свидетельствует о соответствии созданной модели клиническим наблюдениям у человека. Кроме того, показана способность РСВ реплицироваться в дыхательных путях мышей. Эта модель была использована для изучения биологических эффектов пептида КК-45.

С использованием этой модели РСВ-инфекции *in vivo* подтверждена противовирусную активность дендримерного пептида КК-45. При интраназальном введении этот пептид значительно снижал количество вирусной РНК в лёгких мышей и количество БОЕ в БАЛ. Малый дендримерный пептид D-12 также снижал лёгочную вирусную нагрузку, хотя и в меньшей степени. Напротив, линейный пептид КК-44 не проявлял противовирусной активности на мышинной модели РСВ-инфекции (рисунок 11 Б). В целом эти данные подтверждают результаты

*in vitro* исследований, указывая на то, что КК-45 обладает наиболее выраженной противовирусной активностью среди тестированных пептидов. Он эффективно предотвращает РСВ-инфекцию как в верхних, так и в нижних дыхательных путях дозозависимым образом (рисунок 16 Б).

РСВ-инфекция вызывает воспаление дыхательных путей. Наблюдалось значительное увеличение общего количества клеток в БАЛ, включая макрофаги и лимфоциты, после инфекции. Нейтрофилы и эозинофилы присутствовали в меньшем количестве (данные не показаны). Экспериментальная терапия пептидами КК-45 или D-12 значительно снижала количество этих клеток в БАЛ. Напротив, интраназальное введение линейного пептида КК-44 не влияло на общее количество клеток или макрофагов в БАЛ (рисунок 11 В).

Предыдущие исследования показали, что альвеолярные макрофаги могут ингибировать репликацию вируса, продуцируя IFN- $\alpha/\beta$  [49]. CD8<sup>+</sup> лимфоциты также ограничивают репликацию вируса [44]. В настоящем исследовании показано, что экспериментальная терапия инфицированных мышей пептидом КК-45 в дозе 10 мкг снижает количество макрофагов и лимфоцитов (рисунок 11 В). Чтобы определить, является ли это снижение результатом негативного влияния пептида на эти клетки, был проведён дополнительный эксперимент. Неинфицированные мыши длительно получали этот пептид интраназально в различных дозах (до 100 мкг). Это исследование не выявило негативного влияния пептида на количество макрофагов и лимфоцитов в БАЛ (рисунок 17 В). Более того, пептид КК-45 не влиял на экспрессию генов интерферонов, участвующих в противовирусной защите (рисунок 19). Эти данные указывают на то, что КК-45 устраняет РСВ-индуцированное воспаление, не нарушая врождённые противовирусные иммунные ответы.

Гистологический анализ ткани лёгких подтвердил уменьшение выраженности вирус-индуцированного воспаления респираторного тракта, что выражалось в снижении количества инфильтрирующих клеток и площади перибронхиальных инфильтратов на фоне экспериментальной терапии пептидами. При этом КК-45 обеспечивал максимальное снижение уровня воспаления (рисунок 14 А, Б). Метаплазия бокаловидных клеток является частой патологией при РСВ-инфекции. Повышенная продукция слизи из-за снижения активности мерцательного эпителия и увеличения количества слизистых клеток нарушает функцию лёгких. Наблюдалось увеличение количества муцин-секретирующих бокаловидных клеток в респираторном эпителии после РСВ-инфекции. Интраназальное лечение всеми тремя пептидами снижало долю этих клеток (рисунок 15 А). В то время как толщина стенок бронхов не изменялась при лечении пептидами (рисунок 15 Б).

РСВ-инфекция обычно приводит к нарушению функции лёгких. Полученные данные показывают, что инфицированные животные демонстрировали значительное повышение

гиперреактивности бронхов по сравнению с неинфицированными. Несмотря на то, что экспериментальная терапия пептидами успешно снижала воспаление, не отмечалось восстановления функции легких. Вероятно, гиперреактивность бронхов при РСВ-инфекции развивается не только по причине воспалительной реакции, но и с участием других факторов.

Таким образом, пептид КК-45 демонстрирует выраженное противовирусное и противовоспалительное действие при РСВ-инфекции как *in vitro*, так и *in vivo*. В экспериментах на модели у мышей его интраназальное введение дозозависимо снижало вирусную нагрузку как в верхних, так и в нижних дыхательных путях. Важным аспектом влияния КК-45 на иммунопатогенез РСВ-инфекции стала его способность уменьшать РСВ-индуцированное воспаление. Экспериментальная терапия пептидом КК-45 снижала общее количество иммунных клеток в том числе макрофагов и лимфоцитов в БАЛ, а гистологический анализ показал уменьшение инфильтрации тканей и площади перибронхиальных инфильтратов в лёгких. При этом пептид не подавлял врождённые иммунные механизмы защиты организма.

#### **4.4 Токсикологическая, иммунологическая и аллергологическая безопасность пептида КК-45**

Для оценки профиля безопасности пептида КК-45 его вводили мышам интраназально в течение 14 дней в возрастающих дозах (до 100 мкг). КК-45 в дозах  $\leq 25$  мкг не вызывает воспаления дыхательных путей. Однако в дозе 100 мкг пептид оказывает местное раздражающее действие на слизистую оболочку носа (рисунок 18 А). При этом эти нежелательные эффекты полностью обратимы в течение двух недель и не вызывают активации экспрессии провоспалительных генов (рисунок 19). Кроме того, отсутствие влияния на активацию генов противовирусной защиты позволяет предположить, что механизм действия этого пептида, вероятно, включает его прямое взаимодействие с вирионами или вмешательство в процесс слияния, без вовлечения врождённой иммунной системы.

Кроме того, интраназальное введение КК-45 в дозах  $\leq 25$  мкг/мышь не влияло на состав клеток крови, тогда как более высокая доза вызывала эозинофилию, что отражено в таблице 4. Эозинофилия также наблюдалась в БАЛ (рисунок 17 В), что подтверждает местное раздражающее действие пептида.

Исследования иммуногенности показали, что внутрибрюшинное введение пептида в сочетании с адьювантом Фрейнда приводило к продукции пептид-специфических антител IgG1 и IgG2a (рисунок 20). Напротив, интраназальное введение КК-45 даже в максимальной дозе 100

мкг не вызывало специфического антительного ответа. Примечательно, что антител IgE против пептида не было обнаружено ни после внутрибрюшинного, ни после интраназального введения, что указывает на гипоаллергенную природу этого пептида (рисунок 20).

В целом, интраназальное введение пептида КК-45 в дозах 25 мкг или ниже демонстрирует благоприятный профиль безопасности. При этом пути введения пептид не вызывает изменений массы тела, воспаления дыхательных путей, изменений гематологических или биохимических параметров. Пептид КК-45 также не вызывает активацию иммунной системы, включая продукцию антител, таких как IgE. Отсутствие иммуногенности и аллергенности при интраназальном введении даже в самой высокой дозе подчёркивает важность этого безопасного пути введения.

Минимальная эффективная противовирусная доза была установлена как 10 мкг, что позволило оценить терапевтический индекс для пептида КК-45, который составил 2,5 (25/10). Более высокие дозы (100 мкг) связаны с временными, саморазрешающимися негативными эффектами (незначительная потеря веса, местное респираторное воспаление и эозинофилия в крови и в дыхательных путях). Полученные данные подтверждают перспективность пептида КК-45 для создания на его основе безопасного лекарственного средства.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Итоги

Настоящее исследование было направлено на создание и валидацию мышинной модели РСВ-инфекции, воспроизводящей ключевые аспекты иммунопатогенеза заболевания у человека, и последующее наблюдение за этим процессом. В рамках комплексного экспериментального подхода изучалось влияние на иммунопатогенез инфекции дендримерного пептида КК-45, несущего антигенный Ø-сайт F-белка респираторно-синцитиального вируса человека. Работа включала дизайн и синтез линейного и дендримерных пептидов на основе указанного сайта, оценку их противовирусной активности и принципов действия *in vitro*, а также комплексную оценку токсикологической, иммунологической и аллергологической безопасности пептида КК-45.

Результаты, полученные в данной работе, позволили обосновать использование антигенного сайта Ø F-белка РСВ в качестве молекулярной мишени для разработки противовирусных пептидных соединений. Показано, что молекулы дендримерной структуры принципиально важны для реализации высокой противовирусной активности: катионный дендримерный пептид КК-45 демонстрировал значительно более выраженный эффект по сравнению с линейным аналогом КК-44 и малым дендримерным пептидом D-12, лишённым последовательности Ø-сайта, как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*.

Установлено, что противовирусное действие пептида КК-45 в отношении РСВ реализуется через два взаимодополняющих механизма: прямое взаимодействие пептида с вирионами и конкурентное связывание вируса с рецептором нуклеолином на поверхности клеток-мишеней. Таким образом, пептид КК-45 воздействует одновременно на вирусную частицу и на ключевом этапе ее проникновения в клетки, что обуславливает эффективность соединений.

Важным достижением работы стало комплексное изучение пептида КК-45 в иммунопатогенезе РСВ-инфекции в экспериментальной модели на мышах. Интраназальное введение пептида позволяло не только дозозависимо снижать вирусную нагрузку в верхних и нижних дыхательных путях более чем в 10 раз, но и значительно ослаблять вирус-индуцированные изменения респираторного тракта: содержание клеток в бронхоальвеолярном лаваже снизилось на 40–60%, площадь перибронхиальных инфильтратов в тканях лёгкого сократилась на 35–45%. При этом пептид не оказывал подавляющего воздействия на компоненты врожденного

иммунитета: экспрессия генов интерферонов I типа оставалась без изменений, что свидетельствует об избирательности его противовоспалительного эффекта.

Отдельное внимание в работе было уделено вопросу безопасности пептида КК-45 при интраназальном пути введения. Было показано, что 14-дневное введение пептида в дозах до 25 мкг не приводило к потере массы тела, воспалительным изменениям дыхательных путей, отклонения в гематологических и биохимических показателях крови. В дозах до 100 мкг пептид не проявляет иммуногенных и аллергизирующих свойств. Таким образом, был установлен благоприятный профиль безопасности, принципиально важный для его дальнейшего практического развития.

### **Рекомендации**

В совокупности, полученные данные доказывают возможность использования катионных дендримерных пептидов, основанных на антигенных сайтах вирусных белков, в качестве противовирусных агентов перспективного класса. Пептид КК-45 представляет собой обоснованный кандидат для проведения доклинических исследований в качестве потенциального препарата для интраназальной терапии РСВ-инфекции. Применение данного соединения способно обеспечить одновременное снижение вирусной нагрузки и ослабление иммунопатогенного компонента инфекции, что особенно актуально для уязвимых групп пациентов — детей раннего возраста, больных с иммунодефицитными состояниями.

### **Перспективы дальнейшего развития темы**

Таким образом, проведенное исследование не только расширяет представление о механизмах противовирусного действия катионных дендримерных пептидов, но и формирует экспериментальные предпосылки для их клинической реализации. В ближайшей перспективе это открывает возможность эффективного создания пептидных соединений с консервативной структурой — дальнейшей модификации дендримерного фрагмента, замены аминокислотных элементов или конъюгации с последовательной адресной доставки — с целью повышения биологической активности и селективности действия. Отдельный интерес представляет изучение синергетических эффектов при сочетании пептида КК-45 со стандартными методами

симптоматической терапии РСВ-инфекции, а также изучение его активности в отношении других респираторных вирусов, использующих нуклеолин в качестве рецепторов. Разработка комплексных подходов, включающих воздействие как на вирионы, так и на ключевые рецепторные механизмы проникновения вируса в клетки, может стать важным этапом в разработке эффективных и доступных средств терапии респираторных вирусных инфекций.

## ВЫВОДЫ

1. С помощью химического синтеза были получены линейный пептид КК-44, содержащий Ø-сайт F-белка, и его дендримерный вариант – пептид КК-45, содержащий линейную последовательность антигенного Ø-сайта, соединенную с разветвленным фрагментом (R<sub>4</sub>K<sub>2</sub>K); подлинность пептидов подтверждена методом масс-спектрометрии, а чистота методами хроматографии и капиллярного электрофореза.

2. Создана экспериментальная модель РСВ-инфекции на мышах, воссоздающая ключевые проявления иммунопатогенеза заболевания, характерные для человека: гиперреактивность бронхов, структурные повреждения бронхиального эпителия, активацию провоспалительных цитокинов в легких и воспаление респираторного тракта.

3. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* катионный дендримерный пептид КК-45, содержащий последовательность Ø-сайта, продемонстрировал высокую противовирусную активность по сравнению с линейным пептидом КК-44 и малым дендримерным пептидом D-12.

4. Противовирусное действие пептида КК-45 в отношении РСВ реализуется через два механизма: прямое взаимодействие с вирусными частицами (вирионами) и конкурентное ингибирование связывания вируса с рецептором нуклеолином на поверхности клеток-мишеней.

5. Интраназальное введение пептида КК-45 зараженным мышам в течение 5 дней в дозах 10 и 25 мкг уменьшает выраженность патологических изменений в лёгких при РСВ-инфекции; отмечено не только дозозависимое снижение вирусной нагрузки в верхних и нижних дыхательных путях более чем в 10 раз, но и уменьшение выраженности вирус-индуцированного воспаления респираторного тракта, что выражалось в снижении содержания общего количества клеток, макрофагов и лимфоцитов в БАЛ на 40-60%, а также в уменьшении количества клеток инфильтрирующих ткань легких и площади перибронхиальных инфильтратов на 35-45%; при этом пептид КК-45 не влиял на экспрессию генов интерферонов I типа, являющихся компонентами врождённой иммунной системы.

6. Пептид КК-45 характеризуется благоприятным профилем безопасности; 14-дневное интраназальное введение пептида в дозах до 25 мкг включительно не вызывало потери массы тела у лабораторных мышей, воспалительных изменений дыхательных путей, отклонений в гематологических и биохимических показателях крови, а также в дозе до 100 мкг включительно пептид КК-45 не проявляет иммуногенных и аллергизирующих свойств.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- а.о. – аминокислотный остаток (аминокислотные остатки);  
АЛТ – аланинаминотрансфераза;  
АСТ – аспаргатаминотрансфераза;  
АФК – активные формы кислорода;  
БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж;  
БОЕ – бляшкообразующие единицы;  
БСА – бычий сывороточный альбумин;  
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;  
ГРБ – гиперреактивность бронхов;  
ДК – дендритные клетки;  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;  
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;  
ИФА – иммуноферментный анализ;  
кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота;  
МАТ – моноклональные антитела;  
миРНК – малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты;  
МКР – межквартильный размах;  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;  
ОП – оптическая плотность;  
ППС – префузионная сыворотка (префузионно-специфические антитела);  
ПЦР – полимеразная цепная реакция;  
РНК – рибонуклеиновая кислота;  
РСВ – респираторно-синцитиальный вирус;  
СГБ – синдром Гийена — Барре;  
ТМ – трансмембранный домен;  
ТЦИД<sub>50</sub> (ТЦИД50) – 50% тканевая цитопатогенная доза;  
ФСБ – фосфатно-солевой буфер;  
ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с добавлением детергента Твин-20;  
ЦПД – цитопатическое действие;  
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты;  
BALB/c – инбредная линия лабораторных мышей альбиносов;

CD (в т. ч. CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) – (англ. Cluster of differentiation) кластер дифференцировки (поверхностные маркеры клеток);

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

Da (кДа, kDa) – (англ. Dalton) дальтон (килодальтон), единица атомной массы;

EDTA – (англ. Ethylenediaminetetraacetic acid) этилендиаминтетрауксусная кислота;

EMA – (англ. European Medicines Agency) Европейское агентство по лекарственным средствам;

EMEM – (англ. Eagle's Minimum Essential Medium) минимальная поддерживающая среда Игла;

F-белок – (англ. Fusion glycoprotein) вирусный белок слияния;

FBS – (англ. Fetal Bovine Serum) фетальная бычья сыворотка;

FDA – (англ. Food and Drug Administration) Управление по контролю за продуктами и лекарствами США;

G-белок – (англ. Attachment glycoprotein) вирусный белок прикрепления;

GAG – (англ. Glycosaminoglycans) гликозаминогликаны;

HBD – (англ. Heparin-binding domain) гепаринсвязывающий домен;

HBD2 – (англ. Human beta-defensin 2) бета-дефензин-2 человека;

HEp-2 – (англ. Human Epithelioma larynx cells) линия клеток карциномы гортани человека;

HEPES – (англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;

HR1 – (англ. Heptad repeat 1) первый гептадный повтор F-белка;

HR2 – (англ. Heptad repeat 2) второй гептадный повтор F-белка;

HSGAG – (англ. Heparan sulfate glycosaminoglycans) гепарансульфатные гликозаминогликаны;

IFN (в т. ч. IFN-I, IFN-III, IFN- $\gamma$ , IFN- $\lambda$ ) – (англ. Interferon) интерферон;

Ig (в т. ч. IgA, IgG, IgG1, IgG2a, IgM) – (англ. Immunoglobulin) иммуноглобулин;

IL (в т. ч. IL-4, IL-5, IL-13, IL-28, IL-29) – (англ. Interleukin) интерлейкин;

L-белок – (англ. Large polymerase) большой белок полимеразы РСВ;

M-белок – (англ. Matrix protein) матриксный белок РСВ;

MALDI-MS – (англ. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry) масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией;

MIP-1 $\alpha$  – (англ. Macrophage inflammatory protein 1-alpha) воспалительный белок макрофагов 1-альфа (CCL3);

MOI – (англ. Multiplicity of infection) множественность заражения;

m/z – (англ. Mass-to-charge ratio) отношение массы к заряду в масс-спектрометрии;

N-белок – (англ. Nucleoprotein) нуклеокапсидный белок РСВ;

NOD – (англ. Nucleotide-binding oligomerization domain) домен олигомеризации, связывающий нуклеотиды;

NS1 / NS2 – (англ. Non-structural proteins 1 / 2) неструктурные вирусные белки 1 и 2;

P-белок – (англ. Phosphoprotein) фосфопротеин РСВ;

P-value – (англ. Probability value) величина уровня значимости в статистике;

PKC – (англ. Protein kinase C) протеинкиназа C;

RANTES – (англ. Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) хемокин CCL5;

SD – (англ. Standard deviation) стандартное (среднеквадратичное) отклонение;

SH-белок – (англ. Small hydrophobic protein) малый гидрофобный белок РСВ;

STAT1 – (англ. Signal transducer and activator of transcription 1) сигнальный белок и активатор транскрипции 1;

Th1 / Th2 – (англ. T helper type 1 / 2) Т-хелперы 1-го и 2-го типа;

TLR (в т. ч. TLR3, TLR4, TLR7) – (англ. Toll-like receptors) рецепторы, подобные Toll-рецепторам;

TNF (TNF- $\alpha$ ) – (англ. Tumor necrosis factor alpha) фактор некроза опухоли-альфа;

Vero – линия клеток эпителия почки зеленой мартышки

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент № 2611399 С1 Российская Федерация, МПК А61К 38/03 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01). Меченые дендримерные пептиды : № 2016101410 : заявл. 19.01.2016 : опубл. 21.02.2017 / С.М. Андреев, И.П. Шиловский, М.С. Сундукова, А.В. Маерле, И.В. Сергеев. – Бюллетень № 6. – 1 с. : ил. – Текст : непосредственный.
2. Изучение баланса Th1/Th2-иммунного ответа при вирус-индуцированных осложнениях бронхиальной астмы / А.Р. Гайсина, И.П. Шиловский, А.А. Никонова [и др.]. – Текст : электронный // Российский аллергологический журнал. – 2016. – Т. 4, № 5. – С. 20–28. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=28125256> (дата обращения: 08.12.2025).
3. Некоторые особенности воспаления у пациентов с атопической бронхиальной астмой при воздействии респираторных вирусов / М.А. Галицкая, И.П. Шиловский, А.А. Никонова [и др.]. – Текст : электронный // Иммунология. – 2020. – Т. 41, № 2. – С. 154–163. – URL: [https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles\\_immunology/80.html?SSr=07EA060DBE43E](https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles_immunology/80.html?SSr=07EA060DBE43E) (дата обращения: 10.12.2025).
4. Подавление репликации респираторно-синцитиального вируса *in vitro* комплексом молекул малых интерферирующих РНК и бифункционального пептида-носителя / Е.Д. Тимотиевич, И.П. Шиловский, К.В. Юмашев [и др.]. – Текст : электронный // Иммунология. – 2023. – Т. 44, № 5. – С. 545–556. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/podavlenie-replikatsii-respiratorno-sintsitalnvm-virusa-in-vitro-kompleksom-molekul-malyh-interferiruyuschih-rnk-i/viewer> (дата обращения: 10.12.2025).
5. Патент № 2609857 С1 Российская Федерация, МПК А61К 38/08 (2006.01) А61К 31/7088 (2006.01) А61Р 31/16 (2006.01). Использование композиции, состоящей из катионного пептида LTR и молекул РНК против респираторных вирусов : № 2015147049 : заявл. 02.11.2015 : опубл. 06.02.2017 / М.Р. Хаитов, С.М. Андреев, И.В. Сергеев, А.В. Маерле, С.Б. Лобанова, Е.В. Калинина, Д.В. Ерошкина, И.П. Шиловский. – Бюллетень № 4. – 1 с. : ил. – Текст : непосредственный.
6. Патент № 2020134974 А Российская Федерация, МПК С07К 7/08 (2006.01) А61К 38/10 (2006.01) А61К 47/42 (2006.01) А61К 48/00 (2006.01). Пептиды для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот : № 2020134974 : заявл. 26.10.2020 : опубл. 26.04.2022 / М.Р. Хаитов, К.В. Кожихова, О.О. Колоскова, С.М. Андреев, А.В. Тимофеева, А.А. Шатилов, И.П. Шиловский, И.А. Кофиади, В.В. Смирнов, А.А. Никонова. – Бюллетень № 12. – 1 с. : ил. – Текст : непосредственный.

7. Патент № 2810986 С2 Российская Федерация, МПК А61К 38/10 (2006.01) А61Р 31/16 (2006.01) А61Р 11/06 (2006.01). Катионный разветвленный пептид для ингибирования респираторных вирусов : № 2022111711 : заявл. 28.04.2022 : опубл. 09.01.2024 / М.Р. Хайтов, И.П. Шиловский, В.В. Смирнов, К.В. Кожихова, С.М. Андреев, К.В. Юмашев, Л.И. Вишнякова, А.А. Шатилов, А.В. Шатилова. – Бюллетень № 1. – 34 с. : ил. – Текст : непосредственный.

8. Новые синтетические противовирусные пептиды. Проектирование, получение, физико-химический анализ, изучение активности / А.А. Шатилов, А.В. Шатилова, Л.В. Сапрыгина [и др.]. – Текст : электронный // Иммунология. – 2024. – Т. 45, № 2. – С. 162–170. – URL: [https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles\\_immunology/396.html?SSr=07E906165BF01](https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles_immunology/396.html?SSr=07E906165BF01) (дата обращения: 10.12.2025). – URL:

9. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЕПТИДОВ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА / И.П. Шиловский, С. М. Андреев, К. В. Кожихова [и др.]. – Текст : электронный // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53, № 4. – С. 484–500. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?doi=10.1134/S002689841904013X>

10. Молекулярные и клеточные механизмы патогенеза респираторно-синцитиальной вирусной инфекции. Новые данные на экспериментальных моделях / И.П. Шиловский, К.В. Юмашев, А.А. Никольский [и др.]. – Текст : электронный // Биохимия. – 2021. – Т. 86, № 3. – С. 341–359. – URL: [https://sciencejournals.ru/view-article/?j=biokhsm&y=2021&v=86&n=3&a=BioKhsm\\_2103005Shilovskiy](https://sciencejournals.ru/view-article/?j=biokhsm&y=2021&v=86&n=3&a=BioKhsm_2103005Shilovskiy) (дата обращения: 10.12.2025).

11. Инфекция мышей респираторно-синцитиальным вирусом, вызывающая дисфункцию дыхательных путей, связанную с воспалением в ткани легких, как модель патологии человека / И.П. Шиловский, А.А. Никольский, А.А. Никонова [и др.]. – Текст : электронный // Иммунология. – 2019. – Т. 40, № 5. – С. 72–83. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/infektsiya-myshey-respiratorno-sintsitalnym-virusom-vyzyvayuschaya-disfunktsiyu-dyhatelnyh-puteysvyazannuyu-s-vozpалением-v-tkani/viewer> (дата обращения: 10.12.2025).

12. Модель респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у мышей, имитирующая основные проявления патологии человека / И.П. Шиловский, Е.Д. Барвинская, А.А. Никольский [и др.]. – Текст : электронный // Иммунология. – 2022. – Т. 43, № 4. – С. 423–439. – URL: [https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles\\_immunology/266.html?SSr=280134ff3e15ffffff27c\\_\\_07e9041e0f1c36-4b77](https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles_immunology/266.html?SSr=280134ff3e15ffffff27c__07e9041e0f1c36-4b77) (дата обращения: 10.12.2025).

13. Аддитивный эффект синтетических малых интерферирующих РНК в отношении респираторно-синцитиального вируса / И.П. Шиловский, Е.Д. Тимотиевич, К.В. Юмашев [и др.]. – Текст : электронный // Иммунология. – 2023. – Т. 44, № 4. – С. 419–428. – URL: <https://www.immunologiya->

journal.ru/ru/jarticles\_immunology/341.html?SSr=360134b30317ffffff27c\_\_07e7090f112425-2c25  
(дата обращения: 10.12.2025).

14. Синтетический пептид, имитирующий антигенный сайт белка F, подавляет инфекцию респираторно-синцитиального вируса в экспериментах *in vitro* / И.П. Шиловский, К.В. Кожихова, К.В. Юмашев [и др.]. – Текст : электронный // Иммунология. – 2023. – Т. 44, № 2. – С. 134–146. – URL: [https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles\\_immunology/312.html?SSr=07EA060DCF87E](https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles_immunology/312.html?SSr=07EA060DCF87E)  
(дата обращения: 10.12.2025).

15. Current animal models for understanding the pathology caused by the respiratory syncytial virus / M.J. Altamirano-Lagos, F.E. Díaz, M.A. Mansilla [et al.]. – Текст : электронный // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 873. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6510261/> (дата обращения: 10.12.2025).

16. Temporal relationship of myocarditis and pericarditis following COVID-19 vaccination: A pragmatic approach / C. Anastassopoulou, S. Hatziantoniou, C. Vlachopoulos [et al.]. – Текст : электронный // *International Journal of Cardiology*. – 2022. – Vol. 358, № 1. – P. 136–139. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9011898/> (дата обращения: 10.12.2025).

17. Development, Current Status, and Remaining Challenges for Respiratory Syncytial Virus Vaccines / C. Anastassopoulou, S. Medić, S. Feroos [et al.]. – Текст : электронный // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13, № 2. – P. 97. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11860200/> (дата обращения: 10.12.2025).

18. Short-chain fatty acid acetate triggers antiviral response mediated by RIG-I in cells from infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis / К.Н. Antunes, R.T. Stein, C. Franceschina [et al.]. – Текст : электронный // *eBioMedicine*. – 2022. – Vol. 77. – P. 103891. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8871125/> (дата обращения: 10.12.2025).

19. Clinical outcomes in COVID-19 patients treated with tocilizumab: An individual patient data systematic review / D. Antwi-Amoabeng, Z. Kanji, B. Ford [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92, № 11. – P. 2516–2522. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7280615/> (дата обращения: 10.12.2025).

20. Respiratory syncytial virus entry and how to block it / M.B. Battles, J.S. McLellan. – Текст : электронный // *Nature Reviews Microbiology*. – 2019. – Vol. 17, № 4. – P. 233–245. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0149-x> (дата обращения: 10.12.2025).

21. Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance / S. Beaucourt, M. Vignuzzi. – Текст : электронный // *Current Opinion in Virology*. – 2014. – Vol. 8. – P. 10–15. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7102760/> (дата обращения: 10.12.2025).

22. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection / A.K. Behera, H. Matsuse, M. Kumar [et al.]. – Текст : электронный // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2001. – Vol. 280, № 1. – P. 188–195. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11162498/> (дата обращения: 10.12.2025).
23. MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus / V.G. Bhoj, Q. Sun, E.J. Bhoj [et al.]. – Текст : электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105, № 37. – P. 14046–14051. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18780793/> (дата обращения: 10.12.2025).
24. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology / J.R. Bishop, M. Schuksz, J.D. Esko. – Текст : электронный // Nature. – 2007. – Vol. 446. – P. 1030–1037. – URL: <https://www.nature.com/articles/nature05817> (дата обращения: 10.12.2025).
25. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA / V. Bitko, A. Musiyenko, O. Shulyayeva [et al.]. – Текст : электронный // Nature Medicine. – 2005. – Vol. 11, № 1. – P. 50–55. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15619632/> (дата обращения: 10.12.2025).
26. Dendrimers in drug research / U. Voas, P.M. Heegaard. – Текст : электронный // Chemical Society Reviews. – 2004. – Vol. 33, № 1. – P. 43–63. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14737508/> (дата обращения: 10.12.2025).
27. Randomized Controlled Multicenter Trial of Aerosolized Ribavirin for Respiratory Syncytial Virus Upper Respiratory Tract Infection in Hematopoietic Cell Transplant Recipients / M. Bockh, J. Englund, Y. Li [et al.]. – Текст : электронный // Clinical Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 44, № 2. – P. 245–249. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17173225/> (дата обращения: 10.12.2025).
28. Temporal activation of NF- $\kappa$ B regulates an interferon-independent innate antiviral response against cytoplasmic RNA viruses / S. Bose, N. Kar, R. Maitra [et al.]. – Текст : электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – Vol. 100, № 19. – P. 10890–10895. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC196898/> (дата обращения: 10.12.2025).
29. Expression of Interleukin-4 by Recombinant Respiratory Syncytial Virus Is Associated with Accelerated Inflammation and a Nonfunctional Cytotoxic T-Lymphocyte Response following Primary Infection but Not following Challenge with Wild-Type Virus / A. Bukreyev, I.M. Belyakov, G.A. Prince [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Virology. – 2005. – Vol. 79, № 15. – P. 9515–9526. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1181599/> (дата обращения: 10.12.2025).
30. The Secreted G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Antagonizes Antibody-Mediated Restriction of Replication Involving Macrophages and Complement / A. Bukreyev, L. Yang,

P.L. Collins. – Текст : электронный // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86, № 19. – P. 10880–10884. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22837211/> (дата обращения: 10.12.2025).

31. Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primed T cells / M.J. Cannon, E.J. Stott, G. Taylor [et al.]. – Текст : электронный // *Immunology*. – 1987. – Vol. 62, № 1. – P. 133–138. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3498683/> (дата обращения: 10.12.2025).

32. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus / M.J. Cannon, P.J. Openshaw, B.A. Askonas. – Текст : электронный // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1988. – Vol. 168, № 3. – P. 1163–1168. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2189034/> (дата обращения: 10.12.2025).

33. Virus-Specific Memory CD8 T Cells Provide Substantial Protection from Lethal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection / R. Channappanavar, C. Fett, J. Zhao [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88, № 19. – P. 11034–11044. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25056892/> (дата обращения: 10.12.2025).

34. Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants / A.F. Christiaansen, M.A. Syed, P.P. Ten Eyck [et al.]. – Текст : электронный // *Pediatric Research*. – 2016. – Vol. 80, № 5. – P. 702–709. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27486703/> (дата обращения: 10.12.2025).

35. The Impact of the COVID-19 Pandemic on Respiratory Syncytial Virus Infection: A Narrative Review / Y.C. Chuang, K.P. Lin, L.A. Wang [et al.]. – Текст : электронный // *Infection and Drug Resistance*. – 2023. – Vol. 16. – P. 661–675. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9897071/> (дата обращения: 10.12.2025).

36. Biological applications of dendrimers / M.J. Cloninger. – Текст : электронный // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2002. – Vol. 6, № 6. – P. 742–748. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12470726/> (дата обращения: 10.12.2025).

37. Reinfection With SARS-CoV-2: Implications for Vaccines / J.I. Cohen, P.D. Burbelo. – Текст : электронный // *Clinical Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 73, № 11. – P. e4223–e4228. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33338197/> (дата обращения: 10.12.2025).

38. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease / P.L. Collins, R. Fearn, B.S. Graham. – Текст : электронный // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2013. – Vol. 372. – P. 3–38. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362682/> (дата обращения: 10.12.2025).

39. Airway CD8+ T Cells Are Associated with Lung Injury during Infant Viral Respiratory Tract Infection / T.J. Connors, T.M. Ravindranath, K.L. Bickham [et al.]. – Текст : электронный // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 54, № 6. – P. 822–830. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4942220/> (дата обращения: 10.12.2025).

40. Limited Type I Interferons and Plasmacytoid Dendritic Cells during Neonatal Respiratory Syncytial Virus Infection Permit Immunopathogenesis upon Reinfection / S.A. Cormier, B. Shrestha, J.F. Saravia [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88, № 16. – P. 9350–9360. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24920801/> (дата обращения: 10.12.2025).
41. The Human Cathelicidin LL-37 Has Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus / S.M. Currie, E.G. Findlay, B.J. McHugh [et al.]. – Текст : электронный // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. e73659. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24023689/> (дата обращения: 10.12.2025).
42. Cathelicidins Have Direct Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus In Vitro and Protective Function In Vivo in Mice and Humans / S.M. Currie, E. Gwyer Findlay, A.J. McFarlane [et al.]. – Текст : электронный // *The Journal of Immunology*. – 2016. – Vol. 196, № 6. – P. 2699–2710. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26873992/> (дата обращения: 10.12.2025).
43. EGFR Interacts with the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Strain 2-20 and Mediates Infection and Mucin Expression / M.G. Currier, S. Lee, C.C. Stobart [et al.]. – Текст : электронный // *PLoS Pathogens*. – 2016. – Vol. 12, № 5. – P. e1005622. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27152417/> (дата обращения: 10.12.2025).
44. Human T cells efficiently control RSV infection / C. De, R.J. Pickles, W. Yao [et al.]. – Текст : электронный // *JCI Insight*. – 2023. – Vol. 11, № 8. – P. e168110. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37159271/> (дата обращения: 10.12.2025).
45. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease / M.F. Delgado, S. Coviello, A.C. Monsalvo [et al.]. – Текст : электронный // *Nature Medicine*. – 2009. – Vol. 15, № 1. – P. 34–41. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19079256/> (дата обращения: 10.12.2025).
46. RSV Prefusion F Protein-Based Maternal Vaccine — Preterm Birth and Other Outcomes / I. Dieussaert, J.H. Kim, P. Luik [et al.]. – Текст : электронный // *New England Journal of Medicine*. – 2024. – Vol. 390, № 11. – P. 1009–1021. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38477988/> (дата обращения: 10.12.2025).
47. Identification of a Dendrimeric Heparan Sulfate-Binding Peptide That Inhibits Infectivity of Genital Types of Human Papillomaviruses / M. Donalisio, M. Rusnati, A. Cibra [et al.]. – Текст : электронный // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – Vol. 54, № 10. – P. 4290–4299. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2944621/> (дата обращения: 10.12.2025).
48. Inhibition of human respiratory syncytial virus infectivity by a dendrimeric heparan sulfate-binding peptide / M. Donalisio, M. Rusnati, V. Cagno [et al.]. – Текст : электронный // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56, № 10. – P. 5278–5288. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3457392/> (дата обращения: 10.12.2025).

49. Control of IFN-I responses by the aminopeptidase IRAP in neonatal C57BL/6 alveolar macrophages during RSV infection / C. Drajac, D. Laubretton, Q. Marquant [et al.]. – Текст : электронный // *Mucosal Immunology*. – 2021. – Vol. 14, № 4. – P. 949–962. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41385-021-00402-w> (дата обращения: 10.12.2025).
50. Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: Clinical features and outcome / J.O. Ebbert, A.H. Limper. – Текст : электронный // *Respiration*. – 2005. – Vol. 72, № 3. – P. 263–269. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15942295/> (дата обращения: 10.12.2025).
51. The potential of anti-infectives and immunomodulators as therapies for asthma and asthma exacerbations / M.R. Edwards, R.P. Walton, D.J. Jackson [et al.]. – Текст : электронный // *Allergy*. – 2018. – Vol. 73, № 1. – P. 50–63. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28722755/> (дата обращения: 10.12.2025).
52. Data describing IFN $\gamma$ -mediated viral clearance in an adult mouse model of respiratory syncytial virus (RSV) / K.M. Eichinger, K.M. Emrey. – Текст : электронный // *Data in Brief*. – 2017. – Vol. 14. – P. 272–277. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28861450/> (дата обращения: 10.12.2025).
53. IFN- $\gamma$  represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2 / B. Elser, M. Lohoff, S. Kock [et al.]. – Текст : электронный // *Immunity*. – 2002. – Vol. 6, № 17. – P. 703–712. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12479817/> (дата обращения: 10.12.2025).
54. Antibacterial activity and specificity of the six human alpha-defensins / B. Ericksen, Z. Wu, W. Lu [et al.]. – Текст : электронный // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49, № 1. – P. 269–275. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15616305/> (дата обращения: 10.12.2025).
55. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity / A. Fabisiak, N. Murawska, J. Fichna. – Текст : электронный // *Pharmacological Reports*. – 2016. – Vol. 68, № 4. – P. 802–808. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27117377/> (дата обращения: 10.12.2025).
56. The Burden and Long-term Respiratory Morbidity Associated with Respiratory Syncytial Virus Infection in Early Childhood / B. Fauroux, E.A.F. Simões, P.A. Checchia [et al.]. – Текст : электронный // *Infectious Diseases and Therapy*. – 2017. – Vol. 6, № 2. – P. 173–197. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28357706/> (дата обращения: 10.12.2025).
57. The Fusion Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Virus Facilitates Virus Attachment and Infectivity via an Interaction with Cellular Heparan Sulfate / S.A. Feldman, S. Audet, J.A. Beeler. – Текст : электронный // *Journal of Virology*. – 2000. – Vol. 74, № 14. – P. 6442–6447. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10864656/> (дата обращения: 10.12.2025).
58. Identification of a Linear Heparin Binding Domain for Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein G / S.A. Feldman, R.M. Hendry, J.A. Beeler. – Текст : электронный //

Journal of Virology. – 1999. – Vol. 73, № 8. – P. 6610–6617. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10400758/> (дата обращения: 10.12.2025).

59. Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics / G. Findlay, S.M. Currie, D.J. Davidson [et al.]. – Текст : электронный // BioDrugs. – 2013. – Vol. 27, № 5. – P. 479–493. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23649937/> (дата обращения: 10.12.2025).

60. Designing antimicrobial peptides: Form follows function / C.D. Fjell, L.A. Hiss, R.E. Hancock [et al.]. – Текст : электронный // Nature Reviews Drug Discovery. – 2012. – Vol. 11, № 1. – P. 37–51. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22173434/> (дата обращения: 10.12.2025).

61. Foxp3+ CD4 Regulatory T Cells Limit Pulmonary Immunopathology by Modulating the CD8 T Cell Response during Respiratory Syncytial Virus Infection / R.B. Fulton, D.K. Meyerholz, S.M. Varga. – Текст : электронный // The Journal of Immunology. – 2010. – Vol. 185, № 4. – P. 2382–2392. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20639494/> (дата обращения: 10.12.2025).

62. Cell-mediated immune responses to respiratory syncytial virus infection: Magnitude, kinetics, and correlates with morbidity and age / B. Geevarghese, A. Weinberg. – Текст : электронный // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2014. – Vol. 10, № 4. – P. 1047–1056. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24513666/> (дата обращения: 10.12.2025).

63. Peptide-Mediated Interference with Influenza A Virus Polymerase / A. Ghanem, D. Mayer, G. Chase [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Virology. – 2007. – Vol. 81, № 14. – P. 7801–7804. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17494067/> (дата обращения: 10.12.2025).

64. Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors / M.S. Gilman, C.A. Castellanos, M. Chen [et al.]. – Текст : электронный // Science Immunology. – 2016. – Vol. 1, № 6. – P. aah5052. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5244814/> (дата обращения: 10.12.2025).

65. Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy / M. Gordon-Grossman, H. Zimmermann, S.G. Wolf [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – Vol. 116, № 1. – P. 179–188. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22091896/> (дата обращения: 10.12.2025).

66. Antiviral Activity and Structural Characteristics of the Nonglycosylated Central Subdomain of Human Respiratory Syncytial Virus Attachment (G) Glycoprotein / J.J. Gorman, J.L. McKimm-Breschkin, R.S. Norton [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276, № 42. – P. 38988–38994. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11487583/> (дата обращения: 10.12.2025).

67. Humoral Immunogenicity of mRNA-1345 RSV Vaccine in Older Adults / J. Goswami, A.H. Vaqui, P.A. Doreski [et al.]. – Текст : электронный // The Journal of Infectious Diseases. – 2024.

– Vol. 230, № 5. – P. e996–e1006. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38889247/> (дата обращения: 10.12.2025).

68. Primary Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice / B.S. Graham, M.D. Perkins, P.F. Wright [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Medical Virology*. – 1988. – Vol. 26, № 2. – P. 153–162. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3183639/> (дата обращения: 10.12.2025).

69. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice / B.S. Graham, L.A. Bunton, P.F. Wright [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Clinical Investigation*. – 1991. – Vol. 88, № 3. – P. 1026–1033. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1909350/> (дата обращения: 10.12.2025).

70. Protecting the Family to Protect the Child: Vaccination Strategy Guided by RSV Transmission Dynamics / B.S. Graham. – Текст : электронный // *Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 209, № 11. – P. 1679–1681. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4038969/> (дата обращения: 10.12.2025).

71. Immunological goals for respiratory syncytial virus vaccine development / B.S. Graham. – Текст : электронный // *Current Opinion in Immunology*. – 2019. – Vol. 59. – P. 57–64. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31029910/> (дата обращения: 10.12.2025).

72. Impaired Antibody-Mediated Protection and Defective IgA B-Cell Memory in Experimental Infection of Adults with Respiratory Syncytial Virus / M.S. Habibi, A. Jozwik, S. Makris [et al.]. – Текст : электронный // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2015. – Vol. 191, № 9. – P. 1040–1049. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25730467/> (дата обращения: 10.12.2025).

73. Respiratory Syncytial Virus Disease Severity in Young Children / Z. Haddadin, S. Beveridge, K. Fernandez [et al.]. – Текст : электронный // *Clinical Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 73, № 11. – P. e4384–e4391. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33095882/> (дата обращения: 10.12.2025).

74. Medical and economic impact of a respiratory syncytial virus outbreak in a neonatal intensive care unit / N.B. Halasa, J.V. Williams, G.J. Wilson [et al.]. – Текст : электронный // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2005. – Vol. 24, № 12. – P. 1040–1044. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16371862/> (дата обращения: 10.12.2025).

75. Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT1 results in airway dysfunction, airway mucus, and augmented IL-17 levels / K. Hashimoto, J.E. Durbin, W. Zhou [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2005. – Vol. 116, № 3. – P. 550–557. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16159623/> (дата обращения: 10.12.2025).

76. Sequence variability of the respiratory syncytial virus (RSV) fusion gene among contemporary and historical genotypes of RSV/A and RSV/B / A.M. Hause, L.E. Henke, V. Avadhanula

[et al.]. – Текст : электронный // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12, № 4. – P. e0175792. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28414749/> (дата обращения: 10.12.2025).

77. Early Safety Findings Among Persons Aged  $\geq 60$  Years Who Received a Respiratory Syncytial Virus Vaccine — United States, May 3, 2023–April 14, 2024 / A.M. Hause, P.L. Moro, J. Baggs [et al.]. – Текст : электронный // MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2024. – Vol. 73, № 21. – P. 489–494. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38814851/> (дата обращения: 10.12.2025).

78. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery / E. Heylen, J. Neyts, D. Jochmans. – Текст : электронный // Biochemical Pharmacology. – 2017. – Vol. 127. – P. 1–12. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27659812/> (дата обращения: 10.12.2025).

79. Type I Interferon Potentiates IgA Immunity to Respiratory Syncytial Virus Infection During Infancy / D.R. Hijano, D.T. Siefker, B. Shrestha [et al.]. – Текст : электронный // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 11034. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-29391-2> (дата обращения: 10.12.2025).

80. Protecting infants against RSV disease: an impact and cost-effectiveness comparison of long-acting monoclonal antibodies and maternal vaccination / D. Hodgson, N. Wilkins, E. van Leeuwen [et al.]. – Текст : электронный // The Lancet Regional Health – Europe. – 2024. – Vol. 38. – P. 100829. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38476752/> (дата обращения: 10.12.2025).

81. Defensins in Viral Infection and Pathogenesis / M.K. Holly, K. Diaz, J.G. Smith. – Текст : электронный // Annual Review of Virology. – 2017. – Vol. 4. – P. 369–391. – URL: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-101416-041933> (дата обращения: 10.12.2025).

82. Overview of Viral Pneumonia Associated With Influenza Virus, Respiratory Syncytial Virus, and Coronavirus, and Therapeutics Based on Natural Products of Medicinal Plants / Z. Hu, J. Lin, J. Chen [et al.]. – Текст : электронный // Frontiers in Pharmacology. – 2021. – Vol. 12. – P. 660856. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34234668/> (дата обращения: 10.12.2025).

83. Efficacy and Safety of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Prefusion F Protein Vaccine (RSVPreF3 OA) in Older Adults Over 2 RSV Seasons / M.G. Ison, A. Papi, E. Athan [et al.]. – Текст : электронный // Clinical Infectious Diseases. – 2024. – Vol. 78, № 6. – P. 1732–1744. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38253338/> (дата обращения: 10.12.2025).

84. Respiratory Syncytial Virus Induces Pneumonia, Cytokine Response, Airway Obstruction, and Chronic Inflammatory Infiltrates Associated with Long-Term Airway Hyperresponsiveness in Mice / H.S. Jafri, S. Chavez-Bueno, A. Mejias [et al.]. – Текст : электронный

// The Journal of Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 189, № 10. – P. 1856–1865. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15122522/> (дата обращения: 10.12.2025).

85. Ribavirin: adverse drug reactions, 1986 to 1988 / H.K. Janai, M.I. Marks, M. Zaleska [et al.]. – Текст : электронный // The Pediatric Infectious Disease Journal. – 1990. – Vol. 9, № 3. – P. 209–211. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2139930/> (дата обращения: 10.12.2025).

86. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection / J.E. Johnson, R.A. Gonzales, S.J. Olson [et al.]. – Текст : электронный // Modern Pathology. – 2007. – Vol. 20, № 1. – P. 108–111. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17143259/> (дата обращения: 10.12.2025).

87. Structural basis for recognition of the central conserved region of RSV G by neutralizing human antibodies / H.G. Jones, T. Ritschel, G. Pascual [et al.]. – Текст : электронный // PLoS Pathogens. – 2018. – Vol. 14, № 3. – P. e1006935. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29509814/> (дата обращения: 10.12.2025).

88. Alternative conformations of a major antigenic site on RSV F / H.G. Jones, M.B. Battles, C.C. Lin [et al.]. – Текст : электронный // PLoS Pathogens. – 2019. – Vol. 15, № 7. – P. e1007944. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31306469/> (дата обращения: 10.12.2025).

89. RSV-specific airway resident memory CD8<sup>+</sup> T cells and differential disease severity after experimental human infection / A. Jozwik, M.S. Habibi, A. Paras [et al.]. – Текст : электронный // Nature Communications. – 2015. – Vol. 6. – P. 10224. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4703893/> (дата обращения: 10.12.2025).

90. Bivalent Prefusion F Vaccine in Pregnancy to Prevent RSV Illness in Infants / B. Kampmann, S.A. Madhi, I. Munjal [et al.]. – Текст : электронный // New England Journal of Medicine. – 2023. – Vol. 388, № 16. – P. 1451–1464. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37018474/> (дата обращения: 10.12.2025).

91. Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccines / R.A. Karron, U.J. Buchholz, P.L. Collins. – Текст : электронный // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2013. – Vol. 372. – P. 259–284. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362694/> (дата обращения: 10.12.2025).

92. Small Interfering RNAs Targeted to Interleukin-4 and Respiratory Syncytial Virus Reduce Airway Inflammation in a Mouse Model of Virus-Induced Asthma Exacerbation / M.R. Khaitov, И.П. Шиловский, А.А. Никонова [и др.]. – Текст : электронный // Human Gene Therapy. – 2014. – Vol. 25, № 7. – P. 642–650. – URL: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1089/hum.2013.142> (дата обращения: 10.12.2025).

93. RNA interference. New approaches to the development of antiviral agents / M.R. Khaitov, I.P. Shilovskiy, A.A. Nikonova [et al.]. – Текст : электронный // Immunologiya. – 2010. – Vol. 31, № 2. – P. 69–76. (дата обращения: 10.12.2025).

94. Airway T cells protect against RSV infection in the absence of antibody / E. Kinnear, L. Lambert, J.U. McDonald [et al.]. – Текст : электронный // *Mucosal Immunology*. – 2018. – Vol. 11, № 1. – P. 249–256. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28537249/> (дата обращения: 10.12.2025).
95. Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-кappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus / S. Kota, A. Sabbah, T.H. Chang [et al.]. – Текст : электронный // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, № 33. – P. 22417–22429. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18567888/> (дата обращения: 10.12.2025).
96. Linear and dendrimeric antiviral peptides: Design, chemical synthesis and activity against human respiratory syncytial virus / K.V. Kozhikhova, I.P. Shilovskiy, A.A. Shatilov [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2020. – Vol. 8, № 13. – P. 2607–2617. – URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/tb/c9tb02485a> (дата обращения: 10.12.2025).
97. The study of pharmacological efficiency of sirna tarfeted to il-33 on the mouse model of virus-induced exacerbations of bronchial asthma / L.M. Krasnikh, A.R. Gaisina [et al.]. – Текст : электронный // *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. – 2018. – Vol. 10, № 1. – P. 49–55. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/332712738> (дата обращения: 10.12.2025).
98. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus / E.A. Kurt-Jones, L. Popova, L. Kwinn [et al.]. – Текст : электронный // *Nature Immunology*. – 2000. – Vol. 1, № 5. – P. 398–401. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11062499/> (дата обращения: 10.12.2025).
99. LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs / Y. Lai, S. Adhikarakunnathu, K. Bhardwaj [et al.]. – Текст : электронный // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 10, № 6. – P. e26632. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22039520/> (дата обращения: 10.12.2025).
100. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion / D.M. Lambert, S. Barney, A.L. Lambert [et al.]. – Текст : электронный // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93, № 5. – P. 2186–2191. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC39932/> (дата обращения: 10.12.2025).
101. Tocilizumab for severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis / S.H. Lan, C.C. Lai, H.T. Huang [et al.]. – Текст : электронный // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2020. – Vol. 56, № 3. – P. 106103. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32712333/> (дата обращения: 10.12.2025).
102. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide / R. Lande, J. Gregorio, V. Facchinetti [et al.]. – Текст : электронный // *Nature*. – 2007. – Vol. 449, № 7162. – P. 564–569. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17873860/> (дата обращения: 10.12.2025).

103. High Serum IgE Level in the Children with Acute Respiratory Syncytial Virus Infection Is Associated with Severe Disease / L.H. Chung, Y.Y. Jang. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 137, № 2. – P. AB110. – URL: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(15\)02834-8/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(15)02834-8/fulltext) (дата обращения: 10.12.2025).
104. IFN- $\gamma$  Production during Initial Infection Determines the Outcome of Reinfection with Respiratory Syncytial Virus / Y.M. Lee, S. Miyahara, K. Takeda [et al.]. – Текст : электронный // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2008. – Vol. 177, № 2. – P. 208–218. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2204078/> (дата обращения: 10.12.2025).
105. Truncated antimicrobial peptides from marine organisms retain anticancer activity and antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* / M.C. Lin, S.B. Lin, J.C. Chen [et al.]. – Текст : электронный // *Peptides*. – 2013. – Vol. 44. – P. 139–148. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23598079/> (дата обращения: 10.12.2025).
106. Epitope-Specific Regulatory CD4 T Cells Reduce Virus-Induced Illness while Preserving CD8 T-Cell Effector Function at the Site of Infection / J. Liu, T.J. Ruckwardt, M. Chen [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84, № 20. – P. 10501–10509. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20686045/> (дата обращения: 10.12.2025).
107. Reactive Oxygen Species Mediate Virus-induced STAT Activation / T. Liu, S.M. Castro, A.R. Brasier [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 4. – P. 2461–2469. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14578356/> (дата обращения: 10.12.2025).
108. IL-10 Regulates Viral Lung Immunopathology during Acute Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice / J.oebbermann, C. Schnoeller, H. Thornton [et al.]. – Текст : электронный // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. e32371. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22393401/> (дата обращения: 10.12.2025).
109. Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers mucus production in airway epithelium through an I $\kappa$ B kinase  $\beta$ -dependent mechanism / J.M. Lora, D.M. Zhang, S.M. Liao [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 43. – P. 36570–36577. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16123045/> (дата обращения: 10.12.2025).
110. Peptide-derivatized dendrimers inhibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate / A. Luganini, A. Giuliani, G. Pirri [et al.]. – Текст : электронный // *Antiviral Research*. – 2010. – Vol. 85, № 3. – P. 532–540. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20083141/> (дата обращения: 10.12.2025).
111. Inhibition of herpes simplex virus type 1 and type 2 infections by peptide-derivatized dendrimers / A. Luganini, S.F. Nicoletto, L. Pizzuto [et al.]. – Текст : электронный // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55, № 7. – P. 3231–3239. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3122415/> (дата обращения: 10.12.2025).

112. Differential immune responses and pulmonary pathophysiology are induced by two different strains of respiratory syncytial virus / N.W. Lukacs, M.L. Moore, B.D. Rudd [et al.]. – Текст : электронный // *American Journal of Pathology*. – 2006. – Vol. 169, № 3. – P. 977–986. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1698832/> (дата обращения: 10.12.2025).
113. Respiratory Virus-Induced TLR7 Activation Controls IL-17-Associated Increased Mucus via IL-23 Regulation / N.W. Lukacs, J.J. Smit, S. Mukherjee [et al.]. – Текст : электронный // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 185, № 4. – P. 2231–2239. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3006454/> (дата обращения: 10.12.2025).
114. Antimicrobial peptides: to membranes and beyond / J.F. Marcos, M. Gandía. – Текст : электронный // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2009. – Vol. 4, № 6. – P. 659–671. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23489158/> (дата обращения: 10.12.2025).
115. Identification of rsv fusion protein interaction domains on the virus receptor, nucleolin / P. Mastrangelo, A.K. Chin, S. Tan [et al.]. – Текст : электронный // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 261. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33567674/> (дата обращения: 10.12.2025).
116. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates / N.I. Mazur, D. Higgins, M.C. Nunes [et al.]. – Текст : электронный // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 18, № 10. – P. e295–e311. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29914800/> (дата обращения: 10.12.2025).
117. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody / J.S. McLellan, M. Chen, S. Leung [et al.]. – Текст : электронный // *Science*. – 2013. – Vol. 340, № 6136. – P. 1113–1117. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23618766/> (дата обращения: 10.12.2025).
118. Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus / J.S. McLellan, M. Chen, M.G. Joyce [et al.]. – Текст : электронный // *Science*. – 2013. – Vol. 342, № 6158. – P. 592–598. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24179220/> (дата обращения: 10.12.2025).
119. Type I interferons in infectious disease / F. McNab, K. Mayer-Barber, A. Sher [et al.]. – Текст : электронный // *Nature Reviews Immunology*. – 2015. – Vol. 15, № 2. – P. 87–103. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25614319/> (дата обращения: 10.12.2025).
120. Risk and severity of SARS-CoV-2 reinfections during 2020–2022 in Vojvodina, Serbia: A population-level observational study / S. Medić, C. Anastassopoulou, Z. Lozanov-Crvenković [et al.]. – Текст : электронный // *The Lancet Regional Health – Europe*. – 2022. – Vol. 20. – P. 100453. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35791336/> (дата обращения: 10.12.2025).
121. Incidence, Risk, and Severity of SARS-CoV-2 Reinfections in Children and Adolescents Between March 2020 and July 2022 in Serbia / S. Medić, C. Anastassopoulou, Z. Lozanov-Crvenković

[et al.]. – Текст : электронный // JAMA Network Open. – 2023. – Vol. 6, № 2. – P. e2255779. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36780157/> (дата обращения: 10.12.2025).

122. Whole Blood Gene Expression Profiles to Assess Pathogenesis and Disease Severity in Infants with Respiratory Syncytial Virus Infection / A. Mejias, B. Dimo, N.M. Suarez [et al.]. – Текст : электронный // PLoS Medicine. – 2013. – Vol. 10, № 11. – P. e1001549. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24265599/> (дата обращения: 10.12.2025).

123. A Chimeric A2 Strain of Respiratory Syncytial Virus (RSV) with the Fusion Protein of RSV Strain Line 19 Exhibits Enhanced Viral Load, Mucus, and Airway Dysfunction / M.L. Moore, M.H. Chi, C. Luongo [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Virology. – 2009. – Vol. 83, № 9. – P. 4185–4194. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19211758/> (дата обращения: 10.12.2025).

124. Intranasal administration of RSV antigen-expressing MCMV elicits robust tissue-resident effector and effector memory CD8<sup>+</sup> T cells in the lung / K.M. Morabito, T.J. Ruckwardt, E. Bar-Haim [et al.]. – Текст : электронный // Mucosal Immunology. – 2017. – Vol. 10, № 2. – P. 545–554. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27220815/> (дата обращения: 10.12.2025).

125. Functional and immune response to respiratory syncytial virus infection in aged BALB/c mice: A search for genes determining disease severity / R.A. Mosquera, J.M. Stark, C.L. Atkins [et al.]. – Текст : электронный // Experimental Lung Research. – 2014. – Vol. 40, № 1. – P. 40–49. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24354462/> (дата обращения: 10.12.2025).

126. A novel pre-fusion conformation-specific neutralizing epitope on the respiratory syncytial virus fusion protein / J.J. Mousa, N. Kose, P. Matta [et al.]. – Текст : электронный // Nature Microbiology. – 2017. – Vol. 2, № 4. – P. 16271. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28134924/> (дата обращения: 10.12.2025).

127. IL-17-Induced Pulmonary Pathogenesis during Respiratory Viral Infection and Exacerbation of Allergic Disease / S. Mukherjee, D.M. Lindell, A.A. Berlin [et al.]. – Текст : электронный // The American Journal of Pathology. – 2011. – Vol. 179, № 1. – P. 248–258. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21703407/> (дата обращения: 10.12.2025).

128. 180-day efficacy of nirsevimab against hospitalisation for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in infants (HARMONIE): a randomised, controlled, phase 3b trial / A.P.S. Munro, S.B. Drysdale, K. Cathie [et al.]. – Текст : электронный // The Lancet Child & Adolescent Health. – 2025. – Vol. 9, № 6. – P. 404–412. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40379431/> (дата обращения: 10.12.2025).

129. Respiratory Syncytial Virus Activates Innate Immunity through Toll-Like Receptor 2 / M.R. Murawski, G.N. Bowen, A.M. Cerny [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Virology. – 2009. – Vol. 83, № 3. – P. 1492–1500. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19019963/> (дата обращения: 10.12.2025).

130. Respiratory syncytial virus upregulates IL-33 expression in mouse model of virus-induced inflammation exacerbation in OVA-sensitized mice and in asthmatic subjects / A. Nikonova, I. Shilovskiy, M. Galitskaya [et al.]. – Текст : электронный // *Cytokine*. – 2021. – Vol. 138. – P. 155349. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33132030/> (дата обращения: 10.12.2025).
131. A Historical Perspective on Respiratory Syncytial Virus Prevention: A Journey Spanning Over Half a Century From the Setback of an Inactive Vaccine Candidate to the Success of Passive Immunization Strategy / A. Noor, L.R. Krilov. – Текст : электронный // *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. – 2024. – Vol. 13, № 2. – P. S103–S109. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38577737/> (дата обращения: 10.12.2025).
132. Engineering and expression of a RhoA peptide against respiratory syncytial virus infection in plants / B. Ortega-Berlanga, K. Musiyuchuk, Y. Shoji [et al.]. – Текст : электронный // *Planta*. – 2016. – Vol. 243, № 2. – P. 451–458. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26474991/> (дата обращения: 10.12.2025).
133. Porous silicon nanoparticles as scavengers of hazardous viruses / L.A. Osminkina, V.Y. Timoshenko, I.P. Shilovsky [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2014. – Vol. 16, № 6. – P. 24301–24310. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/262486489> (дата обращения: 10.12.2025).
134. Virus clearance and immunopathology by CD8+ T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN- $\gamma$  / T. Ostler, W. Davidson, S. Ehl. – Текст : электронный // *European Journal of Immunology*. – 2002. – Vol. 32, № 8. – P. 2117–2123. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12209623/> (дата обращения: 10.12.2025).
135. COVID-19: a case for inhibiting IL-17? / O. Pacha, M.A. Sallman, S.E. Evans. – Текст : электронный // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20, № 6. – P. 345–346. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7194244/> (дата обращения: 10.12.2025).
136. Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Vaccine in Older Adults / A. Papi, M.G. Ison, J.M. Langley [et al.]. – Текст : электронный // *New England Journal of Medicine*. – 2023. – Vol. 388, № 7. – P. 595–608. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36791160/> (дата обращения: 10.12.2025).
137. Metabolism and antiviral activity of ribavirin / W.B. Parker. – Текст : электронный // *Virus Research*. – 2005. – Vol. 107, № 2. – P. 165–171. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15649562/> (дата обращения: 10.12.2025).
138. A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 / M.K. Pasteur, T.L. Gower, P.W. Spearman [et al.]. – Текст : электронный // *Nature Medicine*. – 2000. – Vol. 6, № 1. – P. 35–40. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10613821/> (дата обращения: 10.12.2025).

139. An update on respiratory syncytial virus / A. Piralla, Z. Chen, H. Zaraket. – Текст : электронный // BMC Infectious Diseases. – 2023. – Vol. 23, № 1. – P. 734. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37891488/> (дата обращения: 10.12.2025).
140. Interactions Between Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication and Major Respiratory Viruses in Human Nasal Epithelium / A. Pizzorno, B. Padey, V. Dulière [et al.]. – Текст : электронный // The Journal of Infectious Diseases. – 2022. – Vol. 226, № 12. – P. 2095–2104. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36031537/> (дата обращения: 10.12.2025).
141. Respiratory Syncytial Virus Infection in Inbred Mice / G.A. Prince, R.L. Horswood, J. Berndt [et al.]. – Текст : электронный // Infection and Immunity. – 1979. – Vol. 26, № 2. – P. 764–766. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC414679/> (дата обращения: 10.12.2025).
142. Association of TNF- $\alpha$  with severe respiratory syncytial virus infection and bronchial asthma / B. Puthothu, S. Bierbaum, M. Kopp [et al.]. – Текст : электронный // Pediatric Allergy and Immunology. – 2009. – Vol. 20, № 2. – P. 153–163. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18811622/> (дата обращения: 10.12.2025).
143. Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology / C.J. Pyle, J.K. Uwadiae, D.P. Swieboda [et al.]. – Текст : электронный // PLOS Pathogens. – 2017. – Vol. 13, № 9. – P. e1006640. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28953978/> (дата обращения: 10.12.2025).
144. The central hinge link truncation of the antimicrobial peptide fowlicidin-3 enhances its cell selectivity without antibacterial activity loss / P. Qu, W. Gao, H. Chen [et al.]. – Текст : электронный // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2016. – Vol. 60, № 5. – P. 2798–2806. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26902768/> (дата обращения: 10.12.2025).
145. Incidence of Apnea in Infants Hospitalized with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis: A Systematic Review / S. Ralston, V. Hill. – Текст : электронный // Journal of Pediatrics. – 2009. – Vol. 155, № 5. – P. 728–733. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19647839/> (дата обращения: 10.12.2025).
146. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract / A.G. Randolph, E.E. Wang. – Текст : электронный // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2000. – № 2. – P. CD000181. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10796503/> (дата обращения: 10.12.2025).
147. Influenza, Tdap, and COVID-19 Vaccination Coverage and Hesitancy Among Pregnant Women — United States, April 2023 / H. Razzaghi, K.E. Kahn, K. Calhoun [et al.]. – Текст : электронный // MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2023. – Vol. 72, № 39. – P. 1065–1071. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37768879/> (дата обращения: 10.12.2025).

148. Suppression of IRG-1 Reduces Inflammatory Cell Infiltration and Lung Injury in Respiratory Syncytial Virus Infection by Reducing Production of Reactive Oxygen Species / К. Ren, Y. Lv, Y. Zhuo [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Virology*. – 2016. – Vol. 90, № 16. – P. 7313–7322. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27252532/> (дата обращения: 10.12.2025).
149. Inflammatory Responses to Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection and the Development of Immunomodulatory Pharmacotherapeutics / H.F. Rosenberg, J.B. Domachowske. – Текст : электронный // *Current Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 19, № 10. – P. 1424–1431. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22360479/> (дата обращения: 10.12.2025).
150. Immunological Lessons from Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development / T.J. Ruckwardt, K.M. Morabito, B.S. Graham. – Текст : электронный // *Immunity*. – 2019. – Vol. 51, № 3. – P. 429–442. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/335874221> (дата обращения: 10.12.2025).
151. Differential Role for TLR3 in Respiratory Syncytial Virus-Induced Chemokine Expression / B.D. Rudd, E. Burstein, C.S. Duckett [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79, № 6. – P. 3350–3357. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1075725/> (дата обращения: 10.12.2025).
152. The human immune response to respiratory syncytial virus infection / C.D. Russell, S.A. Unger, M. Walton [et al.]. – Текст : электронный // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2017. – Vol. 30, № 2. – P. 481–502. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28179378/> (дата обращения: 10.12.2025).
153. Quantitative Effects of Palivizumab and Donor-Derived T Cells on Chronic Respiratory Syncytial Virus Infection, Lung Disease, and Fusion Glycoprotein Amino Acid Sequences in a Patient Before and After Bone Marrow Transplantation / C.M. El Saleeby, J. Suzich, M.E. Conley [et al.]. – Текст : электронный // *Clinical Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 39, № 2. – P. e17–e20. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15307047/> (дата обращения: 10.12.2025).
154.  $\alpha$ -Defensin Inhibits Influenza Virus Replication by Cell-Mediated Mechanism(s) / M. Salvatore, A. Garcia-Sastre, P. Ruchala [et al.]. – Текст : электронный // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 196, № 6. – P. 835–843. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17703413/> (дата обращения: 10.12.2025).
155. Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33 / J. Saravia, D. You, B. Shrestha [et al.]. – Текст : электронный // *PLOS Pathogens*. – 2015. – Vol. 11, № 10. – P. e1005217. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26473724/> (дата обращения: 10.12.2025).
156. Memory CD8 T cells mediate severe immunopathology following respiratory syncytial virus infection / M.E. Schmidt, C.J. Knudson, S.M. Hartwig [et al.]. – Текст : электронный // *PLOS Pathogens*. – 2018. – Vol. 14, № 1. – P. e1006810. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29293660/> (дата обращения: 10.12.2025).

157. The CD8 T cell response to respiratory virus infections / M.E. Schmidt, S.M. Varga. – Текст : электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 678. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29686673/> (дата обращения: 10.12.2025).
158. Cytokines and CD8 T cell immunity during respiratory syncytial virus infection / M.E. Schmidt, S.M. Varga. – Текст : электронный // *Cytokine*. – 2020. – Vol. 133. – P. 154481. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30031680/> (дата обращения: 10.12.2025).
159. Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms / A. Seidel, Y. Ye, L.R. de Armas [et al.]. – Текст : электронный // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5, № 3. – P. e9737. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20305815/> (дата обращения: 10.12.2025).
160. Interferon lambda 1-3 expression in infants hospitalized for RSV or HRV associated bronchiolitis / C. Selvaggi, A. Pierangeli, M. Fabiani [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Infection*. – 2014. – Vol. 68, № 5. – P. 467–477. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24389019/> (дата обращения: 10.12.2025).
161. Safety and Immunogenicity of an mRNA-Based RSV Vaccine Including a 12-Month Booster in a Phase 1 Clinical Trial in Healthy Older Adults / C.A. Shaw, B. Essink, C. Harper [et al.]. – Текст : электронный // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 230, № 3. – P. e647–e656. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38385566/> (дата обращения: 10.12.2025).
162. Modular alpha-helical mimetics with antiviral activity against respiratory syncytial virus / N.E. Shepherd, H.N. Hoang, V.S. Desai [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128, № 40. – P. 13284–13289. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17017810/> (дата обращения: 10.12.2025).
163. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study / T. Shi, D.A. McAllister, K.L. O'Brien [et al.]. – Текст : электронный // *The Lancet*. – 2017. – Vol. 390, № 10098. – P. 946–958. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28689664/> (дата обращения: 10.12.2025).
164. Global Disease Burden Estimates of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Respiratory Infection in Older Adults in 2015: A Systematic Review and Meta-Analysis / T. Shi, A. Denouel, A.K. Tietjen [et al.]. – Текст : электронный // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 222, № 7. – P. S577–S583. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30880339/> (дата обращения: 10.12.2025).
165. IL-4 regulates neutrophilic pulmonary inflammation in a mouse model of bronchial asthma / I.P. Shilovskiy, A.A. Nikolskii, E.D. Timotievich [et al.]. – Текст : электронный // *Cytokine*.

– 2024. – Vol. 178. – P. 156563. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38479048/> (дата обращения: 10.12.2025).

166. The Obstetrician’s Role in Pregnant Women’s Decision-Making Process Regarding Influenza and COVID-19 Vaccination / A. Sienicka, A. Pisula, K.K. Pawlik [et al.]. – Текст : электронный // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11, № 10. – P. 1608. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37897010/> (дата обращения: 10.12.2025).

167. Lung Airway-Surveilling CXCR3hi Memory CD8+ T Cells Are Critical for Protection against Influenza A Virus / B. Slütter, L.L. Pewe, S.M. Kaech [et al.]. – Текст : электронный // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 5. – P. 939–948. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3872058/> (дата обращения: 10.12.2025).

168. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis / P.K. Smith, S.Z. Wang, K.D. Dowling [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Paediatrics and Child Health*. – 2001. – Vol. 37, № 2. – P. 146–151. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328469/> (дата обращения: 10.12.2025).

169. Considerations for a Respiratory Syncytial Virus Vaccine Targeting an Elderly Population / L.M. Stephens, S.M. Varga. – Текст : электронный // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9, № 6. – P. 624. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34207770/> (дата обращения: 10.12.2025).

170. Respiratory syncytial virus infection activates IL-13-producing group 2 innate lymphoid cells through thymic stromal lymphopoietin / M.T. Stier, M.H. Bloodworth, S. Toki [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 138, № 3. – P. 814–824.e11. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27156176/> (дата обращения: 10.12.2025).

171. Differential Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Clinical Isolates in BALB/c Mice / K.L. Stokes, M.H. Chi, K. Sakamoto [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85, № 12. – P. 5782–5793. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21471228/> (дата обращения: 10.12.2025).

172. Elevated Th17 response in infants undergoing respiratory viral infection / A.J. Stoppelenburg, S. de Roock, M.P. Hennis [et al.]. – Текст : электронный // *American Journal of Pathology*. – 2014. – Vol. 184, № 5. – P. 1274–1279. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24650560/> (дата обращения: 10.12.2025).

173. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10 / J. Sun, R. Madan, C.L. Karp [et al.]. – Текст : электронный // *Nature Medicine*. – 2009. – Vol. 15, № 3. – P. 277–284. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2693210/> (дата обращения: 10.12.2025).

174. Immunostimulatory Defective Viral Genomes from Respiratory Syncytial Virus Promote a Strong Innate Antiviral Response during Infection in Mice and Humans / Y. Sun, D. Jain, C.J. Koziol-

White [et al.]. – Текст : электронный // PLOS Pathogens. – 2015. – Vol. 11, № 9. – P. e1005122. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26336095/> (дата обращения: 10.12.2025).

175. Synthetic cationic peptides with linear helical and dendrimeric structures effectively reduce respiratory virus infection in vitro / М.С. Сундукова, А.А. Шатилов, К.В. Кожихова [и др.]. – Текст : электронный // Allergy. – 2017. – Vol. 72, № S103. – P. 300–301. (дата обращения: 10.12.2025).

176. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field / S. Svenson, D.A. Tomalia. – Текст : электронный // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2012. – Vol. 57, № 15. – P. 2106–2129. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16305813/> (дата обращения: 10.12.2025).

177. Anti-IL-4 treatment at immunization modulates cytokine expression, reduces illness, and increases cytotoxic T lymphocyte activity in mice challenged with respiratory syncytial virus / Y.W. Tang, B.S. Graham. – Текст : электронный // Journal of Clinical Investigation. – 1994. – Vol. 94, № 5. – P. 1953–1958. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7962541/> (дата обращения: 10.12.2025).

178. Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice / G. Taylor, E.J. Stott, M. Hughes [et al.]. – Текст : электронный // Infection and Immunity. – 1984. – Vol. 43, № 2. – P. 649–655. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6693171/> (дата обращения: 10.12.2025).

179. Animal models of respiratory syncytial virus infection / G. Taylor. – Текст : электронный // Vaccine. – 2017. – Vol. 35, № 3. – P. 469–480. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5244256/> (дата обращения: 10.12.2025).

180. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus / F. Tayyari, D. Marchant, T.J. Moraes [et al.]. – Текст : электронный // Nature Medicine. – 2011. – Vol. 17, № 9. – P. 1132–1135. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21841784/> (дата обращения: 10.12.2025).

181. Human Neutrophil Defensins Increase Neutrophil Uptake of Influenza A Virus and Bacteria and Modify Virus-Induced Respiratory Burst Responses / T. Tecle, M.R. White, D. Gantz [et al.]. – Текст : электронный // The Journal of Immunology. – 2007. – Vol. 178, № 12. – P. 8046–8052. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17548640/> (дата обращения: 10.12.2025).

182. Reduced Nasal Viral Load and IFN Responses in Infants with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis and Respiratory Failure / R.S. Thwaites, M. Coates, K. Ito [et al.]. – Текст : электронный // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2018. – Vol. 198, № 8. – P. 1074–1084. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29688024/> (дата обращения: 10.12.2025).

183. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein / R.A. Tripp, L.P. Jones, L. Haynes [et al.]. – Текст : электронный // Nature Immunology. – 2001. – Vol. 4, № 8. – P. 732–738. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11477410/> (дата обращения: 10.12.2025).

184. Peripheral Blood Mononuclear Cells from Infants Hospitalized Because of Respiratory Syncytial Virus Infection Express T Helper-1 and T Helper-2 Cytokines and CC Chemokine Messenger RNA / R.A. Tripp, D. Moore, A. Barskey [et al.]. – Текст : электронный // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2002. – Vol. 185, № 10. – P. 1388–1394. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11992272/> (дата обращения: 10.12.2025).
185. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 / C. Troeger, B. Blacker, M. Zhou [et al.]. – Текст : электронный // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 18, № 11. – P. 1191–1210. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30243584/> (дата обращения: 10.12.2025).
186. Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo / M.B. Uddin, H.G. Lee, C. Nikapitiya [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Microbiology*. – 2016. – Vol. 54, № 12. – P. 853–866. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27888461/> (дата обращения: 10.12.2025).
187. Basic chemokine-derived glycosaminoglycan binding peptides exert antiviral properties against dengue virus serotype 2, herpes simplex virus-1 and respiratory syncytial virus / V. Vanheule, P. Vervaeke, A. Mortier [et al.]. – Текст : электронный // *Biochemical Pharmacology*. – 2016. – Vol. 100. – P. 73–85. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26551597/> (дата обращения: 10.12.2025).
188. Fixing a failed vaccine / S.M. Varga. – Текст : электронный // *Nature Medicine*. – 2009. – Vol. 15, № 1. – P. 21–22. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19129777/> (дата обращения: 10.12.2025).
189. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children / K. Ventre, A.G. Randolph. – Текст : электронный // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2007. – № 1. – P. CD000181. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17253446/> (дата обращения: 10.12.2025).
190. Elevated Levels of Type 2 Respiratory Innate Lymphoid Cells in Human Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis / L.D. Vu, D. Siefker, T.L. Jones [et al.]. – Текст : электронный // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2019. – Vol. 200, № 11. – P. 1414–1423. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31237777/> (дата обращения: 10.12.2025).
191. RENOIR Trial — RSVpreF Vaccine Efficacy over Two Seasons / E.E. Walsh, G.P. Marc, A.R. Falsey [et al.]. – Текст : электронный // *New England Journal of Medicine*. – 2024. – Vol. 391, № 15. – P. 1459–1460. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39413383/> (дата обращения: 10.12.2025).
192. Immunoprophylaxis against respiratory syncytial virus (RSV) with palivizumab in children: a systematic review and economic evaluation / D. Wang, C. Cummins, S. Bayliss [et al.]. –

Текст : электронный // Health Technology Assessment. – 2008. – Vol. 12, № 36. – P. 1–86. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK76070/> (дата обращения: 10.12.2025).

193. Association of COVID-19 with respiratory syncytial virus (RSV) infections in children aged 0–5 years in the USA in 2022: a multicentre retrospective cohort study / L. Wang, P.B. Davis, N.A. Berger [et al.]. – Текст : электронный // Family Medicine and Community Health. – 2023. – Vol. 11, № 4. – P. e002456. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37832975/> (дата обращения: 10.12.2025).

194. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses / T.P. Welliver, R.P. Garofalo, Y. Hosakote [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 195, № 8. – P. 1126–1136. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17357048/> (дата обращения: 10.12.2025).

195. Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex / C. Wild, J.W. Dubay, T. Greenwell [et al.]. – Текст : электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – Vol. 91, № 26. – P. 12676–12680. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7809100/> (дата обращения: 10.12.2025).

196. Efficacy and Safety of an mRNA-Based RSV PreF Vaccine in Older Adults / E. Wilson, J. Goswami, A.H. Baqui [et al.]. – Текст : электронный // New England Journal of Medicine. – 2023. – Vol. 389, № 24. – P. 2233–2244. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38091530/> (дата обращения: 10.12.2025).

197. SOCS1 and SOCS3 Target IRF7 Degradation To Suppress TLR7-Mediated Type I IFN Production of Human Plasmacytoid Dendritic Cells / C.F. Yu, W.M. Peng, M. Schlee [et al.]. – Текст : электронный // The Journal of Immunology. – 2018. – Vol. 200, № 12. – P. 4024–4035. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29712772/> (дата обращения: 10.12.2025).

198. Pattern recognition receptors for respiratory syncytial virus infection and design of vaccines / R. Zeng, Y. Cui, Y. Hai [et al.]. – Текст : электронный // Virus Research. – 2012. – Vol. 167, № 2. – P. 138–145. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22698878/> (дата обращения: 10.12.2025).

199. Discovery of a Prefusion Respiratory Syncytial Virus F-Specific Monoclonal Antibody That Provides Greater In Vivo Protection than the Murine Precursor of Palivizumab / M. Zhao, Z.Z. Zheng, M. Chen [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Virology. – 2017. – Vol. 91, № 15. – P. e00176-17. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28539438/> (дата обращения: 10.12.2025).

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «ГНЦ Институт  
иммунологии» ФМБА России  
член-корреспондент РАН,  
доктор медицинских наук, профессор

М.Р. Хаитов

«19» июня 2025

## АКТ

о внедрении результатов НИР

Мы, нижеподписавшиеся: Зам. Директора по науке и инновациям, заведующий лабораторией №75 «Противовирусного иммунитета» ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России Шиловский Игорь Петрович и научный сотрудник лаборатории №75 «Противовирусного иммунитета» ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России Никольский Александр Аркадьевич, составили настоящий акт о том, что экспериментальная модель респираторно-синцитиальной вирусной инфекции *in vivo* на мышах линии BALB/c с использованием высокоочищенного вируса в высокой дозе для оценки противовирусных препаратов, разработанная в рамках диссертационной работы Юмашева Кирилла Валерьевича «Противовирусные свойства дендримерного пептида КК-45, несущего Q-сайт F-белка, и его влияние на иммунопатогенез респираторно-синцитиальной вирусной инфекции», внедрена в научно-исследовательскую работу лаборатории «Противовирусного иммунитета» №75 с 20 июня 2025 года.

К.б.н., научный сотрудник  
лаборатории «Противовирусного  
иммунитета» №75 ФГБУ «ГНЦ  
Институт иммунологии» ФМБА  
России

А.А. Никольский  
«18» июня 2025 г.

Д.б.н., Зам. Директора по науке и  
инновациям ФГБУ «ГНЦ Институт  
иммунологии» ФМБА России

И.П. Шиловский  
«18» июня 2025 г.