

<https://doi.org/10.18527/2024111024RU>

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ СТАТЬЯ

Однократная интраназальная иммунизация высокой дозой гриппозного вектора вызывает защитный эффект при заражении гетерологичным вирусом гриппа и SARS-CoV-2 у хорьков и хомяков

А. Ю. Егоров^{1*} , А. А. Крохин¹ , И. А. Ленева² , П. Кораблев³, П. Лойтерис⁴, В. Е. Небольсин⁵ 

¹ Capricorn Biotech GmbH, Technopark 1C, Tulln, 3993, Австрия

² НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Малый Казенный переулок, д. 5а, Москва, 105064 Россия

³ LT Biotech Ltd, Литва

⁴ Holding Baltic Biotech Group, Литва

⁵ ООО ФАРМ БИОТЕХ, Инновационный центр Сколково, Большой бульвар, д. 42/1, Москва, 121205 Россия

АННОТАЦИЯ

ПРЕДПОСЫЛКИ: Проблема эффективности вакцинации в отношении вирусов, претерпевающих постоянные антигенные изменения в процессе эволюции, в настоящее время решается за счет обновления состава вакцин для обеспечения соответствия циркулирующим штаммам. В случае внезапного появления в популяции вируса, значительно отличающегося от циркулирующего (антигенный шифт или дрейф), или нового вируса, каким стал SARS-CoV-2, этот подход не работает. В связи с этим существует необходимость создания универсальной вакцины, индуцирующей Т-клеточный иммунный ответ к консервативным антигенным детерминантам вируса.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: Получение вакцинного кандидата на основе аттенуированного гриппозного вектора для иммунизации с целью индукции защиты от гетерологичного вируса гриппа и коронавируса.

МЕТОДЫ: На основе вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (PR/8/34) был сконструирован рекомбинантный вектор FluCoV-N, содержащий аттенуирующие мутации в генах *ns1* и *np* и экспрессирующий N-концевую последовательность белка N (N₁₋₂₀₉) вируса SARS-CoV-2. Для моделирования защиты хорьков от гриппа через 24 дня после однократной вакцинации вектором в дозе 9.4 log₁₀ ЭИД₅₀ их заражали гетерологичным штаммом вируса гриппа A/Austria/1516645/2022 (H3N2). Для проверки защиты хомяков от коронавируса проводили их однократную иммунизацию вектором в дозе 8.2 log₁₀ ЭИД₅₀, а через 21 день их инфицировали SARS-CoV-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Полученный вектор характеризовался температурочувствительностью (ts), способностью к стимуляции системы интерферонов I типа (IFN I) и безвредностью для животных при интраназальном применении в высокой дозе. Однократная интраназальная иммунизация хорьков FluCoV-N приводила к ускоренному разрешению инфекции, вызванной гетерологичным вирусом гриппа H3N2. Аналогичная иммунизация хомяков обеспечивала снижение титров вируса SARS-CoV-2 в легких в 10000 раз на второй день после инфекции и уменьшала патологию в легких животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Однократная интраназальная иммунизация хорьков или хомяков гриппозным вектором FluCoV-N защищала животных, ослабляя развитие заболевания, вызванного гетерологичным вирусом гриппа или SARS-CoV-2 соответственно.

Ключевые слова: вирус гриппа, коронавирус, *ns* ген, SARS-CoV-2, живая вакцина, вектор

***Автор, ответственный за переписку:** Андрей Юрьевич Егоров, Capricorn Biotech GmbH, Technopark 1C, Tulln, 3993, Австрия, e-mail: aeviro1@gmail.com

Цитирование: Егоров АЮ, Крохин АА, Ленева ИА, Кораблев П, Лойтерис П, Небольсин ВЕ. Однократная интраназальная иммунизация высокой дозой гриппозного вектора вызывает защитный эффект при заражении гетерологичным вирусом гриппа и SARS-CoV-2 у хорьков и хомяков. MIR J 2024; 11(1), 10-24. <https://doi.org/10.18527/2024111024RU>.

Получена: 29 ноября 2023

Принята к печати: 25 января 2024

Опубликована: 15 февраля 2024

Авторские права: © 2024 Егоров и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

Финансирование: Работа была выполнена на средства ООО ФАРМ БИОТЕХ и ООО Каприкорн Биотех.

Конфликт интересов: Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.



Single intranasal immunization with a high dose of influenza vector causes a protective effect against infection with heterologous influenza virus and SARS-CoV-2 in ferrets and hamsters

Andrej Y. Egorov^{1*} , Artem A. Krokhin¹ , Irina A. Leneva² , Pavel Korabliov³, Pavelas Loiteris⁴, Vladimir E. Nebolsin⁵ 

¹ Capricorn Biotech GmbH, Technopark 1C, Tulln, Austria, 3992

² Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

³ LT Biotech Ltd, Lithuania

⁴ Holding Baltic Biotech Group, Lithuania

⁵ PHARM Biotech Ltd, Skolkovo Innovation Center, Bolshoy Boulevard, house 42, building 1, Moscow, 121205 Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The problem of vaccine effectiveness against viruses that undergo constant antigenic changes during evolution is currently being addressed by updating the vaccine formulation to match the circulating strains. In the case of the sudden emergence of a virus significantly different from those circulating in a population (antigenic shift or drift) or a new virus, such as SARS-CoV-2, this approach does not work. Therefore, there is a need to develop a universal vaccine that induces a T-cell immune response to the conservative antigenic determinants of the virus.

OBJECTIVE: To develop a vaccine candidate against the influenza virus and coronavirus based on an attenuated influenza vector.

METHODS: To achieve this goal, a recombinant vector FluCoV-N carrying attenuating modifications in the *ns1* and *nep* genes and expressing the N-terminal sequence of the N protein (N₁₋₂₀₉) of the SARS-CoV-2 virus was constructed based on the influenza virus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (PR/8/34). To assess the protection efficacy against influenza, ferrets were infected with a heterologous influenza virus A/Austria/1516645/2022 (H3N2) on the 25th day after single vaccination with the studied vector at a dose of 9.4 log₁₀EID₅₀. To test protection against coronavirus, hamsters were immunized once with the vector at a dose of 8.2 log₁₀EID₅₀ and 21 days later challenged with SARS-CoV-2.

RESULTS: The constructed vector was temperature sensitive (ts), stimulated the production of type I interferons (IFNs) and was harmless to animals when administered intranasally at a high dose. A single intranasal immunization with FluCoV-N resulted in accelerated resolution of infection caused by the heterologous H3N2 influenza virus. A similar immunization of hamsters led to a 10,000-fold reduction in SARS-CoV-2 viral titers in the lungs on the second day after challenge and reduced lung pathology.

CONCLUSION: Single intranasal immunization of ferrets and hamsters with the influenza vector FluCoV-N protected the animals by attenuating the disease caused by heterologous influenza virus and SARS-CoV-2, respectively.

Keywords: influenza virus, coronavirus, SARS-CoV-2, live vaccine, vector, *ns* gene

* **For correspondence:** Andrej Egorov, Capricorn Biotech, Technopark 1C, Tulln, Austria, e-mail: aeviro@gmail.com

Citation: Egorov AY, Krokhin AA, Leneva IA, Korabliov P, Loiteris P, Nebolsin VE. Single intranasal immunization with a high dose of influenza vector causes a protective effect against infection with heterologous influenza virus and SARS-CoV-2 in ferrets and hamsters. *MIR J* 2024; 11(1), 10-24. <https://doi.org/10.18527/2024111024>.

Received: November 29, 2023

Accepted: January 25, 2024

Published: February 15, 2024

Copyright: © 2024 Egorov et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BYNC-SA), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the material is not used for commercial purposes, provided that the original author and source are cited.



Funding: The study was financed by Capricorn Biotech GmbH and PHARM Biotech Ltd

Conflict of interests: The authors declare no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективная борьба с респираторными вирусными патогенами требует создания новых вакцин, эффективных против быстро мутирующих вирусов. Пандемия SARS-CoV-2 продемонстрировала высокую эффективность массовой вакцинации с помощью векторных аденовирусных и mRNA вакцин [1]. Однако вакцинная компания против COVID-19 наглядно показала способность SARS-CoV-2 уклоняться от действия нейтрализующих антител, образующихся при вакцинации или естественной инфекции [2]. Эффект снижения эффективности вакцин против COVID-19 был отмечен с появлением Дельта и Омикрон мутантов SARS-CoV-2, вызывающих у привитых индивидуумов повторные заболевания [3, 4]. Дальнейшая циркуляция SARS-CoV-2 в популяции ведет к селекции новых мутантных вариантов, что вызывает необходимость постоянного обновления вакцин, созданных на основе S белка.

Вакцинопрофилактика COVID-19 в этом отношении схожа с защитой от гриппозной инфекции, когда антигенный дрейф и шифт вируса гриппа являются причиной постоянного обновления противогриппозных вакцин. Поскольку вирус гриппа способен вызывать глобальные эпидемии и пандемии, приводя к значительному количеству смертельных исходов и тяжелых осложнений [5, 6], ежегодная вакцинация остается одним из наиболее эффективных методов борьбы с данной инфекцией [7].

В настоящее время для профилактики гриппа используют два типа вакцин: инактивированные вакцины, вводимые внутримышечно или подкожно, и живые аттенуированные вакцины. Каждая из вакцин получена на основе 3-4 актуальных штаммов вируса гриппа. Большинство лицензированных вакцин против сезонного гриппа представляют собой инактивированные вакцины, отличающиеся по технологии производства, а именно: цельновирионные, сплит- или субъединичные вакцины. Живые вакцины лицензированы в США и Европе для вакцинации детей и сублицензированы в Китае и Индии [8, 9]. Живая аттенуированная, холодадаптивная вакцина вводится интраназально

(i.n.) и предусматривает эффективную репликацию вакцинных штаммов в верхнем респираторном тракте прививаемых. Для повышения эффективности вакцинации против гриппа ведутся исследования по созданию универсальной вакцины, обеспечивающей перекрестно-реагирующий (гетеросубтипический) иммунитет, защищая от новых дрейф- и шифт-вариантов вируса гриппа [10]. При создании универсальной вакцины против гриппа живая i.n. вакцина имеет больше преимуществ, поскольку, в отличие от инактивированной, индуцирует мукозальный иммунитет в респираторном тракте за счет секреторных иммуноглобулинов класса A (sIgA) и резидентных Т-клеток (Tm), обеспечивая более широкую кросс-реактивную защиту за счет взаимодействия с консервативными эпитопами вирусов [11-14].

Ранее мы показали возможность создания живых аттенуированных рекомбинантных вирусных векторов, полученных путем модификации NS1 белка вируса гриппа [15-17]. Вирусы с укороченным NS1 белком обладали повышенной стимуляцией клеток врожденного иммунитета с усиленной антигенпрезентирующей функцией за счет образования полифункциональных Т-лимфоцитов, ответственных за распознавание широкого спектра антигенов вируса гриппа [18, 19]. Рекомбинантные штаммы, экспрессирующие чужеродный антиген в процессе репродукции с рамки считывания NS1 белка, проявили защитную активность как от гомологичных, так и от гетерологичных штаммов вируса гриппа на различных экспериментальных моделях [20-25]. Живая аттенуированная вакцина, в которой вместо NS1 был вставлен рецептор-связывающий домен (receptor binding domain, RBD) SARS-CoV-2, индуцировала системный и мукозальный иммунные ответы и блокировала размножение вируса SARS-CoV-2 в мышечной модели [26]. В исследованиях на людях (фаза 1 и 2) была продемонстрирована безопасность и иммуногенность данного вектора для взрослых добровольцев [27].

В рамках концепции создания универсальной вакцины против гетерологичных штаммов вируса

гриппа мы сконструировали оригинальный вектор на основе вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (PR/8/34), содержащий не только делецию в *ns1* гене, но и гетерологичный ген *ner*, заимствованный от вируса гриппа другого подтипа A/Singapore/1/57 (H2N2) (патент PCT WO 2014/168522). Рекомбинантный вирус приобрел *ts* фенотип, характерный для холодоадаптированных гриппозных вакцин, и цитокиногенность, присущую NS1 мутантам вируса гриппа [28, 29]. Дополнительно в вектор была введена часть последовательности белка N₁₋₂₀₉ коронавируса SARS-CoV-2, соединенная с транкированной последовательностью, кодирующей белок NS1₁₋₁₂₄. Несмотря на существенную реконструкцию генома, вакцинный вектор обладал способностью к репродукции в 10-дневных куриных эмбрионах до титров 9.5 log₁₀ ЭИД₅₀/мл (50% эмбриональных инфекционных доз). Одновременно высокая степень аттенуации вектора позволила проводить *i.n.* иммунизацию животных в дозе, превышающей 8.0 log₁₀ ЭИД₅₀/мл, без нежелательных токсических эффектов. Цель данного исследования состояла в изучении протективного иммунитета в отношении SARS-CoV-2 и гетерологичного вируса гриппа после однократной иммунизации вектором хорьков и хомячков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы

Вирус A/Austria/1516645/2022 (H3N2) был получен из коллекции Института вирусологии (Вена, Австрия). Вирус был выделен от больного гриппом и прошел 5 пассажей на культуре Vero в бессывороточной среде OptiPRO (Gibco™) при 37°C и 5% CO₂ с добавлением 2 mM GlutaMAX™ (Thermo Fisher) и 1 мг/мл трипсина, как описано ранее [30].

Для заражения вакцинированных хомячков использовали лабораторный штамм SARS-CoV-2 (GenBank: MW161041.1), выделенный на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного COVID-19 и соответствующий по антигенным свойствам вирусу Wuhan. Культивирование вируса проводили при 37°C в питательной среде DMEM с L-глутамином (300 мкг/мл), глюкозой (4.5 г/л), 5%-ной фетальной телячьей сывороткой (fetal calf serum, FCS), гентамицином (40 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂. Штамм прошел 20 последовательных пассажей и вызывал выраженное цитопатическое действие на клетках. Образцы вирусного материала хранили при температуре -80°C в виде аликвот.

Клеточные культуры

Получение и культивирование рекомбинантного штамма проводили на клеточной культуре Vero, которая была получена из Американской коллекции клеточных культур и вирусов (ATTC). Клетки альвеолярного базального эпителия карциномы человека (A549) (получены от J. Seipelt, Австрия) культивировали в MEM с добавлением 10% FCS (Gibco™) и 2 mM L-глутамин.

Для титрования легочной суспензии хомячков использовали перевиваемую культуру Vero, полученную из ATTC, культивированную в ростовой среде DMEM, с добавлением 10% инактивированной нагреванием FCS (ПанЭко, Россия), 2 mM L-глутамин (Sigma, США) и антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Поддерживающая среда содержала все указанные выше ингредиенты и 2% сыворотки. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂.

Конструирование вектора

Конструирование рекомбинантного вируса гриппа FluCoV-N осуществляли с помощью метода обратной генетики [31, 32]. Были использованы следующие плазмиды, полученные синтетическим путем (GeneArt, Германия): pHW-PR8-NA, кодирующая NA вируса гриппа PR/8/34 (H1N1) (GenBank: CY033577), pHW-PR8-NA, кодирующая NA вируса A/PR/8/34 (H1N1) (GenBank: EF467823), pHW-PR8-PB2, кодирующая PB2 геномный сегмент A/PR/8/34 (H1N1) (Genbank: AB671295), pHW-PR8-PB1, кодирующая PB1 сегмент A/PR/8/34 (H1N1) (Genbank: CY033583), pHW-PR8-PA, кодирующая PA сегмент A/PR/8/34 (H1N1) (Genbank: AF389117), pHW-PR8-NP, кодирующая NP сегмент A/PR/8/34 (H1N1) (Genbank AF389119), pHW-PR8-M, кодирующая M сегмент A/PR/8/34 (H1N1) (Genbank AF389121). Плазида pHW-PR8-NN_c кодировала химерный *ns* ген, содержащий транкированный NS1₁₂₄ вируса гриппа и N-терминальную часть N₁₋₂₀₉ белка вируса SARS-CoV-2. Клетки трансфицировали полным набором плазмид, кодирующих 7 геномных фрагментов вируса гриппа (PB2, PB1, PA, NA, NP и M) в комбинации с плазмидой, кодирующей химерный NS фрагмент. Клетки Vero для трансфекции пассировали в среде DMEM/F12 (не выше 150 пассажа), содержащей 10% FCS (Gibco™) и 2 mM Gluta-Max I. Для трансфекции использовали кит Nucleofector™ I/II/2b (Lonza), клетки сеяли в 6-луночные панели и инкубировали при 37°C. На следующий день добавляли трипсин до конечной концентрации 1 мг/мл. Собранный супернатант использовали

для заражения 10-дневных куриных эмбрионов и культивировали двое суток при температуре 34°C. Генетическую стабильность FluCoV-N проверяли путем 10 последовательных пассажей в куриных эмбрионах с последующим контролем вставки методом ПЦР. Для этого вирусную РНК изолировали с помощью QIAamp Viral RNA Mini Kit согласно инструкции производителя с последующей обратной транскрипцией и амплификацией методом ПЦР. Для ПЦР использовали кит QIAGEN® OneStep RT-PCR. Для амплификации *ns* гена использовали праймеры F-NS-372: 5'-GTATCAGAATGGACCAGG и Len R: 5'-CTCTTGTCCACTTCAAAT, контроль амплификации проводили методом электрофореза в агарозном геле. Контрольный вирус Flu-NS₁₂₄, не содержащий вставки трансгена, был получен аналогичным методом.

Иммунофлуоресценция

Проверку функциональной активности белка вставки определяли в реакции иммунофлуоресценции с окраской специфическими антителами. Для этого свежий монослой клеток A549 в 24-луночных планшетах инфицировали вектором FluCoV-N с множественностью заражения 2. Клетки инкубировали при 34°C в течение 24 ч, пермеабелизировали Triton X100 и фиксировали 4%-м параформальдегидом в течение 20 мин. Далее клетки обрабатывали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (bovine serum albumin, BSA) в течение ночи. Специфические к N белку SARS-CoV-2 антитела (2019-nCoV, Nucleocapsid Antibody, Rabbit PAb, Antigen Affinity Purified, SinoBiological, Cat: 40588-T62) разводили 1:200 в блокирующем растворе и добавляли к клеткам на 2 часа. Связывание первичных антител визуализировали с использованием антикроличьих антител, меченных AlexaFluor 488 FITC (Thermo Fisher), после 30 мин инкубации.

Культивирование вектора в развивающихся куриных эмбрионах

Свободные от патогенов эмбрионы получали от VALIO Biomedica (Германия). Вирус культивировали в 10-дневных эмбрионах при 34°C в течение 48 ч. Репродукцию вируса определяли по наличию гемагглютинирующей активности с куриными эритроцитами. Далее вирус очищали от аллантаоиса и концентрировали с помощью тангенциальной фильтрации в буфере, содержащем сахарозу, разливали по пробиркам и замораживали. Титр вируса составил $9.4 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл.

Определение уровня IFN α в репортерных клетках HEK-Blue™ IFN α / β

Клетки HEK-Blue™ IFN α / β , созданные путем стабильной трансфекции клеток HEK293 генами человека *STAT2* и *IRF9* для получения активного сигнального пути IFN I, позволяют обнаруживать биологически активные IFN I типа человека путем мониторинга активации пути ISGF3. Клетки дополнительно трансфицировали геном *SEAP* под контролем индуцируемого IFN α / β промотора ISG54. Стимуляция клеток HEK-Blue™ IFN α / β человеческим IFN α или IFN β активирует путь JAK/STAT/ISGF3 и впоследствии индуцирует выработку *SEAP*. Уровни *SEAP* в супернатанте определяли с помощью QUANTI-Blue™ (<http://www.invivogen.com/hek-blue-ifn-ab>). Репортерную клеточную линию поддерживали и культивировали в среде MEM Дульбекко в присутствии 10% FCS и 30 мкг/мл бластицидина (100 мкг/мл, Zeocin™) и пассировали до достижения 70-80%-ного монослоя. Клетки A549 инфицировали вирусами при множественности инфекции 2. Через 24 ч после заражения супернатанты отбирали и измеряли наличие IFN α в репортерных клеточных линиях.

Протективная эффективность вектора FluCoV-N против гетерологического вируса гриппа на хорьках

Исследование на хорьках было выполнено в компании VOXCAN (Франция). Свободные от патогенов (specific pathogen free, SPF) хорьки (*Mustela putorius furo*), самцы, в возрасте 11 недель, были получены из Marshall Bioresources (США). Животных чипировали и проверяли на содержание антител к актуальным вирусам гриппа A/Noway/16606/2021(H3N2), A/Victoria/1/2020 (H1N1), B/Austria/1359417/2021 и B/Phuket /3073/2013. Содержали животных в специальных клетках для хорьков в помещении 2-го уровня биобезопасности (biosafety level 2, BSL2) до инфицирования и BSL3 после заражения. В помещении поддерживали температуру 18°C и световой режим 12/12 ч. Животных обеспечивали кормом для хорьков и водой ad libitum.

На день -25 исследования животных делили на группы по 6 особей в каждой и иммунизировали под легким наркозом (изофлуран) i.n. вирусом FluCoV-N в объеме 1 мл ($9.4 \log_{10}$ ЭИД₅₀/животное). Животные контрольной группы получали PBS. Два животных служили отрицательным контролем. Через 24 дня (день 0) животных заражали эпидемическим вирусом гриппа A/Austria/1516645/2022 (H3N2) в объеме 0.5 мл в дозе 5×10^4 ТЦИД₅₀/животное (ТЦИД — 50%-я тканевая

цитопатическая инфекционная доза). После заражения у животных оценивали клинические симптомы, включающие активность (1-3 балла), чихание (1-2 балла), выделения из носа (1-2 балла), выделения из глаз (1-2 балла), затрудненное дыхание (1-3 балла), состояние слизистых поверхностей, температуру (1-3 балла) и вес. В день -1 у животных брали кровь, а в дни -20, -18, -16, 2, 4 и 6 собирали носовые смывы для проверки наличия вируса. Титрование носовых смывов осуществляли на клетках Vero и титр выражали в ТЦИД₅₀, как описано ранее [30]. На день 6 исследования животных взвешивали, подвергали эвтаназии и собирали легкие и селезенку для макроскопического контроля и выявления вируса в гомогенатах.

Протективная эффективность против SARS-CoV-2 на хомяках

В опытах были использованы сирийские золотистые хомяки (самки и самцы в равной пропорции), из одной партии, весом 50-60 г, полученные из питомника Пушино Московской области. Исследование проводили в Отделе вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова (Москва). Всех животных перед началом испытаний осматривали, исключали животных с внешними признаками недомогания (нарушение координации, вялость, снижение аппетита). При формировании экспериментальных групп каждому животному был присвоен индивидуальный номер от 1 до 10 в группах. Рандомизацию животных проводили по массе. Животных содержали в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными»). В помещении поддерживали температуру окружающего воздуха 20-24°C, световой режим 12/12 ч, относительную влажность 45-65%, вентилирование без рециркуляции со сменой воздуха 7-12 объемов комнаты в час.

В эксперименте было 3 группы животных, иммунизированных вектором FluCoV-N, вектором, не содержащим вставки, Flu-NS₁₂₄ и PBS. Вакцинирование обоими векторами проводили i.p. под легким наркозом в объеме 100 мкл в эквивалентной дозе 8.2 log₁₀ ЭИД₅₀/животное. Животным контрольной группы вводили PBS. На 21-й день после вакцинации животных заражали i.p. под легким наркозом вирусом SARS-CoV-2 в дозе 100 ТЦИД₅₀ на животное, в объеме

50 мкл. После вакцинации и на протяжении всего опыта животных осматривали, отмечая клинические признаки, включая общее состояние, интерес к воде и пище и активность животных. На 2-й и 5-й дни после заражения вирусом SARS-CoV-2 забивали половину животных, собирали легкие. Для анализа патологии в легких готовили гистологические срезы легких, которые окрашивали HE&E. Органы для титрования вируса гомогенизировали, центрифугировали, надосадочную жидкость разливали по аликвотам и замораживали.

Для определения инфекционного титра вируса в легких хомяков клетки Vero CCL81 сеяли в 96-луночные планшеты (Costar) со средней плотностью 20000 клеток на лунку и выращивали в среде MEM в присутствии 5% FCS, 10 mM глутамина и антибиотиков (пенициллин 100 ME/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) в течение 3 дней до формирования полного монослоя. Перед заражением вирусом культуру клеток дважды промывали средой DMEM без сыворотки. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы легких. Приготовленные разведения в объеме 200 мкл вносили в планшеты с культурой клеток и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 5 дней до появления цитопатического эффекта в клетках вирусного контроля. Учет проводили с использованием количественного теста МТТ. Титр вируса выражали в log₁₀ ТЦИД₅₀/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура и свойства рекомбинантного вектора FluCoV-N

Вектор FluCoV-N представляет собой рекомбинантный вирус PR/8/34 (H1N1), в котором ген, кодирующий белок NS1, укорочен до 124 aa, что обеспечивает аттенуацию вируса, с одной стороны, и повышенную иммуногенность, с другой [33] (Рис. 1А). Вместо удаленного участка гена *ns1* после стоп-кодона (красный участок) встроен N-концевой участок гена N белка вируса SARS-CoV-2 длиной 627 нуклеотидов. Ген, кодирующий NEP белок вируса PR/8/34, был заменен на соответствующий ген вируса другого подтипа A/Singapore/1/57 (H2N2), отличающийся 6 аминокислотными заменами. Данная модификация привела к появлению ts фенотипа (Рис. 1Б). При заражении клеток A549 вектор вызывал достоверное увеличение индукции IFN I типа по сравнению с контрольным штаммом дикого типа PR/8/34 (Рис. 1В). Активность N белка определяли в реакции иммунофлуоресценции с окраской специфическими

антителами против белка N коронавируса (Рис. 1Г, Д). Важно отметить, что химерный белок NS₁₋₁₂₄-N₁₋₂₀₉ выявлялся в основном в цитоплазме зараженных клеток, хотя белок NS1 и ранее полученные химерные конструкции этого белка имели выраженную ядерную локализацию [34].

Для осуществления доклинических исследований вектор FluCoV-N накапливали в куриных эмбрионах. Вирусосодержащие аллантоисные жидкости очищали с помощью тангенциальной фильтрации с целью концентрации и очистки вируса от овальбумина, как описано в разделе «Материалы и методы». Концентрат содержал $9.4 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл вируса, который разводили до рабочих концентраций непосредственно перед заражением животных.

Защитная эффективность FluCoV-N вектора против гетерологичного штамма вируса гриппа A/Austria/1516645/2022(H3N2) и против коронавируса SARS-CoV-2 была изучена на хорьках и хомяках соответственно.

Защитная эффективность вектора FluCoV-N против вируса гриппа A/Austria/1516645/2022(H3N2) на хорьках

Вакцинный вектор FluCoV-N при i.n. иммунизации хорьков в дозе $9.4 \log_{10}$ ЭИД₅₀ не вызывал изменения веса животных, повышения температуры или появления клинических симптомов. Через 24 дня после однократной иммунизации FluCoV-N вектором животных заражали гетерологичным штаммом вируса гриппа A/Austria/1516645/2022 (H3N2). У иммунизированных животных, в отличие от группы контроля, не отмечали падение веса в период после инфицирования (вечер дня 2, $p < 0.001$). Вес продолжал равномерно повышаться до последнего, 6-го дня наблюдения (Рис. 2). У контрольных животных, иммунизированных PBS, через 2 дня после заражения эпидемическим вирусом A/Austria/1516645/2022 (H3N2) отмечали снижение веса с потерей $3.2 \pm 0.8\%$ и $2.2 \pm 1.2\%$ на 2-й день утром и вечером соответственно (Рис. 2).

Начиная со 2-го дня после заражения, у хорьков контрольной группы (PBS) также отмечали клинические симптомы, проявляющиеся в легких выделениях из носа. Аналогичные выделения были отмечены и у животных, вакцинированных вирусом FluCoV-N, которые пропали к 5-му дню наблюдения. Однако у 3 из 6 животных контрольной группы, иммунизированных PBS, начиная с 5-го дня, отмечали усиление клинических признаков, которые проявлялись в апатичном поведении, треморе, чихании, выделениях из носа и учащенном дыхании

(тахипноэ) (Рис. 3). Индекс клинических симптомов в группе хорьков, получившей PBS на 5-й и 6-й дни, составил 2.3 ± 2.9 и 1.8 ± 2.6 соответственно. В группе животных, вакцинированных вирусом FluCoV-N, начиная с 5-го дня клинические проявления пропали (0.0 ± 0.0).

На день 6 после инфицирования животные были подвергнуты эвтаназии. Определение вирусной нагрузки в легких показало наличие вируса H3N2 у половины контрольных животных (Рис. 4). У этих же животных отмечали усиление клинических симптомов начиная с 5-го дня. В селезенке вирус был обнаружен только у одного из 6 животных и составил 1.59×10^5 ТЦИД₅₀/мл. В легких и селезенке хорьков, иммунизированных вектором FluCoV-N, вирус выявлен не был.

Защитная эффективность вектора FluCoV-N против SARS-CoV-2 на хомяках

Хомяков иммунизировали i.n. препаратом FluCoV-N или вектором без вставки трансгена Flu-NS₁₂₄ в дозе $8.2 \log_{10}$ ЭИД₅₀ в объеме 100 мкл под легким эфирным наркозом. Животные контрольной группы получали PBS. Вакцинация не вызывала у животных симптомов недомогания, слабости, пониженного аппетита или других клинических признаков аллергической или воспалительной природы. После вакцинации животные стабильно набирали вес, случаев гибели выявлено не было. Местных реакций также не наблюдали.

На 21-й день после вакцинации животных заражали i.n. вирусом SARS-CoV-2 (штамм Wuhan) в дозе 100 ТЦИД₅₀ на животное под легким наркозом в объеме 50 мкл. На 2-й и 5-й дни после заражения животных подвергали эвтаназии и собирали легкие и селезенку для определения в них наличия вируса. В контрольной группе невакцинированных животных на 2-й день после инфицирования титр вируса в легких составил $6.45 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/0.1 мл, что свидетельствовало об остром развитии инфекции. Иммунизация препаратом FluCoV-N приводила к достоверному снижению титра вируса в легких на 2-й день до $2.25 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/0.1 мл (Рис. 5). Иммунизация вектором без вставки трансгена не приводила к достоверному снижению титра коронавируса в легких хомяков, что свидетельствовало об отсутствии эффекта неспецифической защиты, обусловленной введением гриппозного вектора. На 5-й день после контрольного заражения титры вируса в легких всех экспериментальных групп не иммунизированных и иммунизированных обоими векторами животных находились в диапазоне $4.0-4.5 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/0.1 мл.

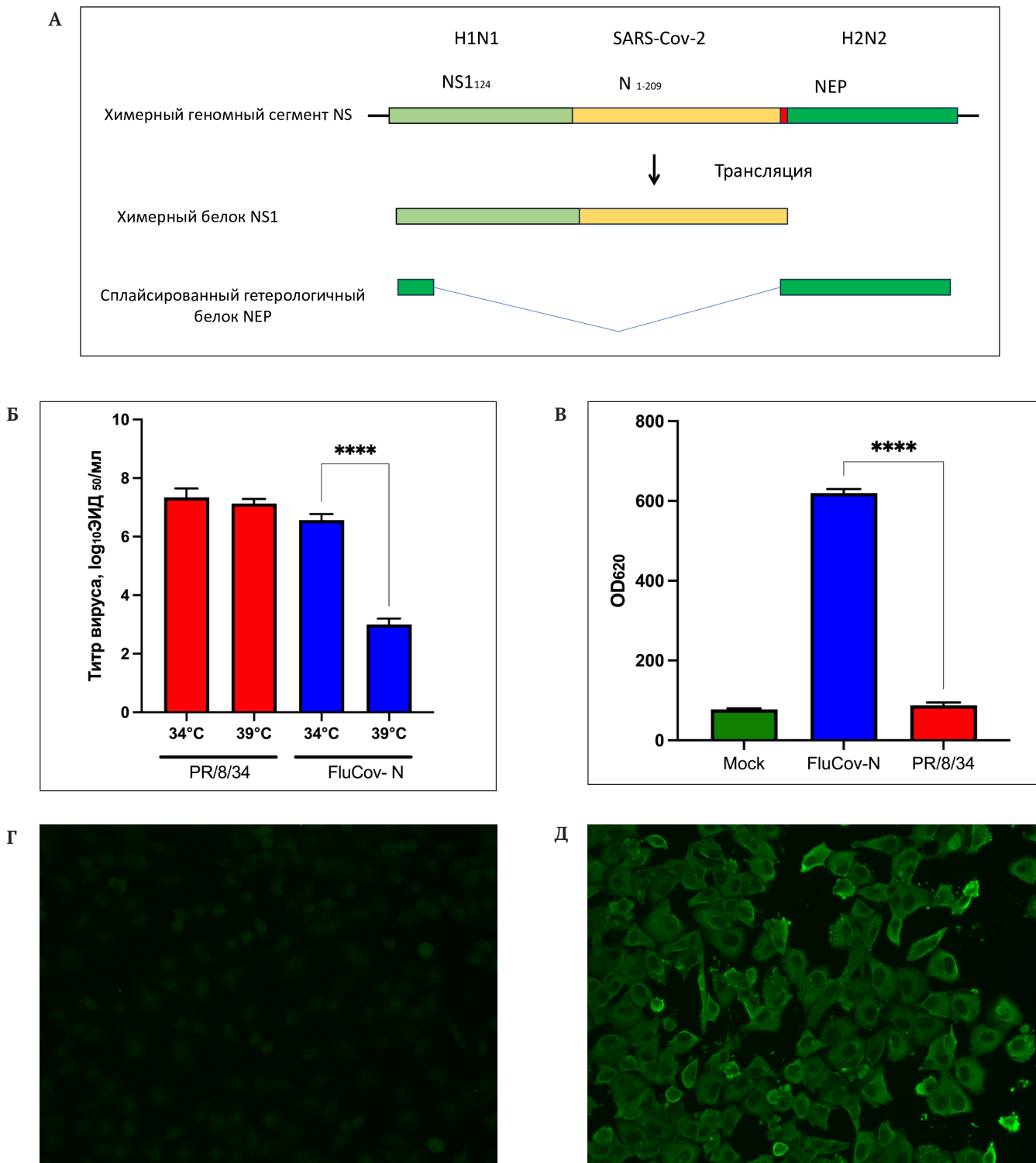


Рис. 1. Структура и характеристика вектора FluCoV-N. **А.** Схематическое изображение структуры рекомбинантного *ns* гена FluCoV-N; **Б.** Репродукция вектора FluCoV-N и вируса PR/8/34 в куриных эмбрионах при температурах 34°C и 39°C. Данные представлены как среднее трех опытов (Mean±SD); **В.** Индукция IFN I типа вирусами FluCoV-N и PR/8/34 в клетках A549, которую оценивали в клеточном супернатанте через 24 ч после заражения путем стимуляции репортерных клеток HEK-Blue™ IFN-α/β. Данные представлены как среднее OD₆₂₀ трех лунок (Mean±SD); **Г, Д.** Специфическая окраска интактных клеток Vero (**Г**) или инфицированных вектором FluCoV-N клеток (**Д**) антителами к N белку вируса SARS-CoV-2. (****) означает достоверную разницу между соответствующими значениями согласно t-критерию Стьюдента, p<0.0001.

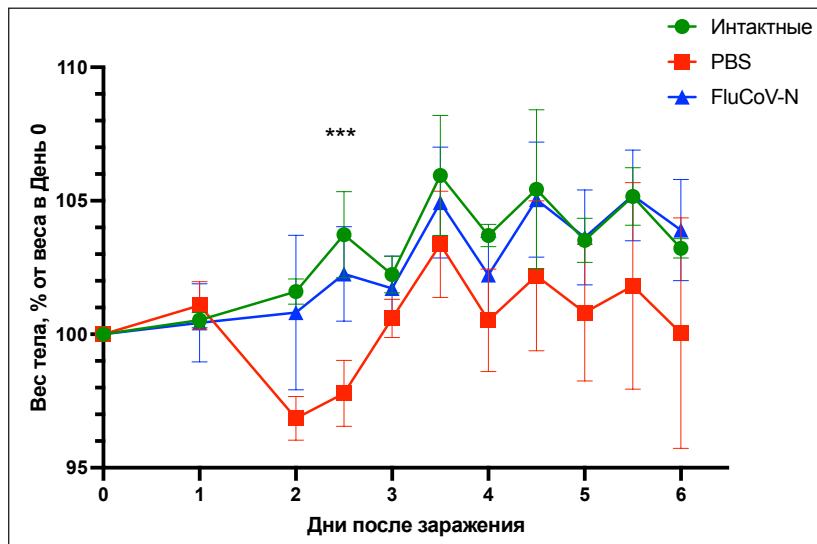


Рис. 2. Средний вес тела иммунизированных хорьков после заражения гетерологичным эпидемическим вирусом A/Austria/1516645/2022 (H3N2). Опытные группы включали по 6 животных, группа интактных – 2 животных. Данные представлены как среднее от веса в день 0 (в %) шести животных (Mean±SD). Иммунизацию животных осуществляли на день -25. Заражение хорьков эпидемическим вирусом A/Austria/1516645/2022 (H3N2) проводили в день 0. (***) означает достоверную разницу в весе иммунизированных хорьков по сравнению с контрольной группой согласно t-критерию Стьюдента ($p < 0.001$).

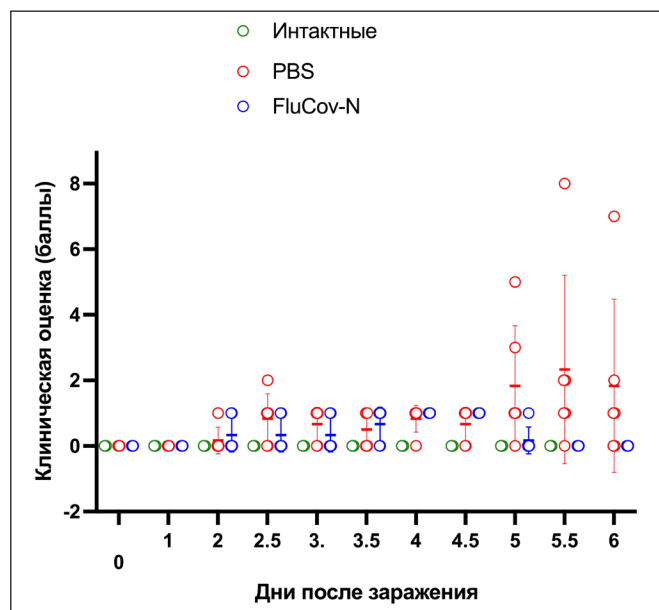


Рис. 3. Клинические симптомы у животных после заражения вирусом A/Austria/1516645/2022 (H3N2). Опытные группы включали по 6 животных, группа интактных – 2 животных. Симптомы выражали в баллах, данные представлены как Mean±SD.

Таким образом, эффект вакцинации вирусом FluCoV-N проявился в достоверном ($p < 0.0001$) снижении титров коронавируса в легких на 2-й день после контрольного заражения, но на 5-й день титры выравнялись с контрольной группой.

Гистологическое изучение легких сирийских хомячков контрольной группы выявило характерные для инфекции SARS-CoV-2 выраженные альтеративно-воспалительные изменения во всех долях, которые по морфологическим признакам соответствовали вирусной (интерстициальной) пневмонии. Площадь

обширных сливных безвоздушных зон пневмонии с прилегающими к ним участками альвеолита составляла у животных от 30 до 60% от общей площади среза доли лёгкого (Рис. 6А, Б).

При изучении гистопрепаратов лёгких хомячков, вакцинированных вектором FluCoV-N, отмечали тенденцию к снижению показателей повреждения тканей по сравнению с состоянием легких в контрольной группе по выраженности альтеративных и воспалительных изменений в респираторном и воздухопроводящем отделах

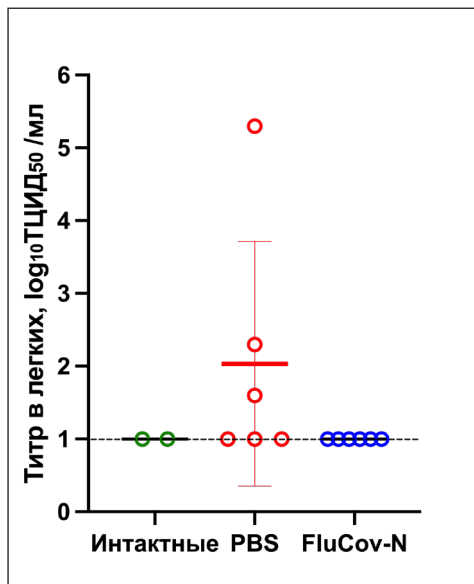


Рис. 4. Титры вируса A/Austria/1516645/2022 (H3N2) в легких хорьков на 6-й день после инфицирования. Опытные группы включали по 6 животных, группа интактных – 2 животных. Данные представлены как Mean±SD. Пунктирной линией обозначен предел титрования, равный $1.0 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл.

лёгких. У двух животных гистологическая картина была существенно лучше, чем в группе контроля. Локусы дистрофически изменённых мерцательных эпителиоцитов в бронхах и бронхиолах встречались редко, повреждение межальвеолярных перегородок и нарушения гемодинамики были менее выражены, чем у животных контрольной группы. В очагах пневмонии отмечено снижение содержания клеток, погибающих путём апоптоза. Степень инфильтрации межальвеолярных перегородок макрофагами и лимфоцитами была умеренной. Диффузный перибронхиальный и периваскулярный лимфоидно-гистиоцитарный инфильтрат был скудным, реже – умеренным (Рис. 7).

Таким образом, вакцинация сирийских хомяков вектором FluCoV-N приводила к демпфированию репродукции коронавируса в легких на ранних сроках после инфекции, что отражалось в улучшении гистологической картины легких в момент их эвтаназии на 5-й день после инфицирования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проблема эффективности вакцинации против вирусов, подвергающихся постоянным антигенным изменениям в процессе эволюции, в настоящее время решается с помощью мониторинга вирусных изолятов и обновления состава вакцин для обеспечения их соответствия циркулирующим

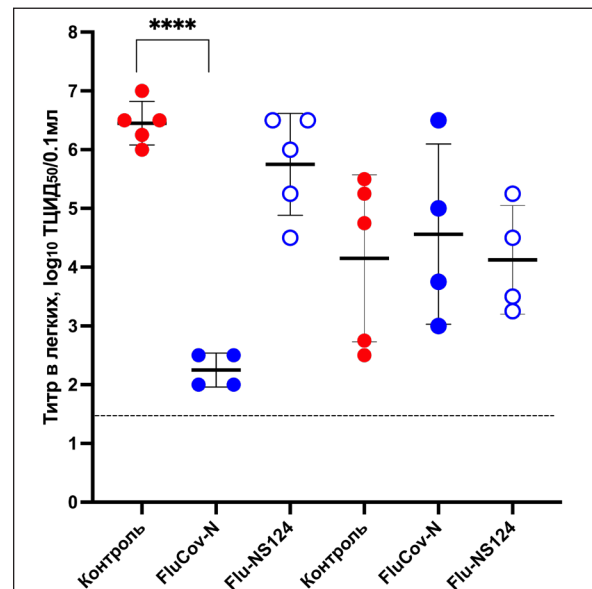


Рис. 5. Репродукция вируса SARS-CoV-2 в легких хомяков на день 2 и 5 после заражения SARS-CoV-2 (Wuhan). Титры вируса представлены как Mean±SD. Число животных в группах: контроль – 5, FluCoV-N – 4 (один из хомяков был выведен из исследования по причине, не связанной с экспериментом), Flu-NS₁₂₄ – 5. Пунктирной линией обозначен предел титрования, равный $1.5 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/мл. (****) означает достоверную разницу по сравнению с контрольной группой, получавшей PBS вместо вектора, согласно критерию Стьюдента t, $p < 0.0001$.

штаммам. Помимо сложности и дороговизны, такая процедура не годится в случае внезапного появления новых вирусов в человеческой популяции, как это недавно случилось с коронавирусом SARS-CoV-2 или вирусами гриппа А, вызывающими пандемии. В связи с этим существует насущная необходимость создания вакцин, которые могли бы служить вакцинами резерва. Такие препараты должны быть основаны на принципе индукции иммунного ответа к консервативным антигенным детерминантам и благодаря этому являться универсальными. Общеизвестно, что универсальность вакцины не может быть достигнута только за счет антительного нейтрализующего ответа, поскольку вирусы легко преодолевают этот барьер путем мутаций, ведущих к изменению конформации или гликозилированию поверхностных гликопротеинов [35]. Роль Т-кросс-протективного клеточного ответа в контроле над вирусными респираторными инфекциями была продемонстрирована в опытах на животных [18, 19] и в эпидемиологических наблюдениях на людях [36].

Особое место в составе множественных популяций Т-лимфоцитов занимают резидентные Т_{rm} клетки, ассоциированные с мукозными поверхностями, в частности, респираторного тракта. Эти клетки, при

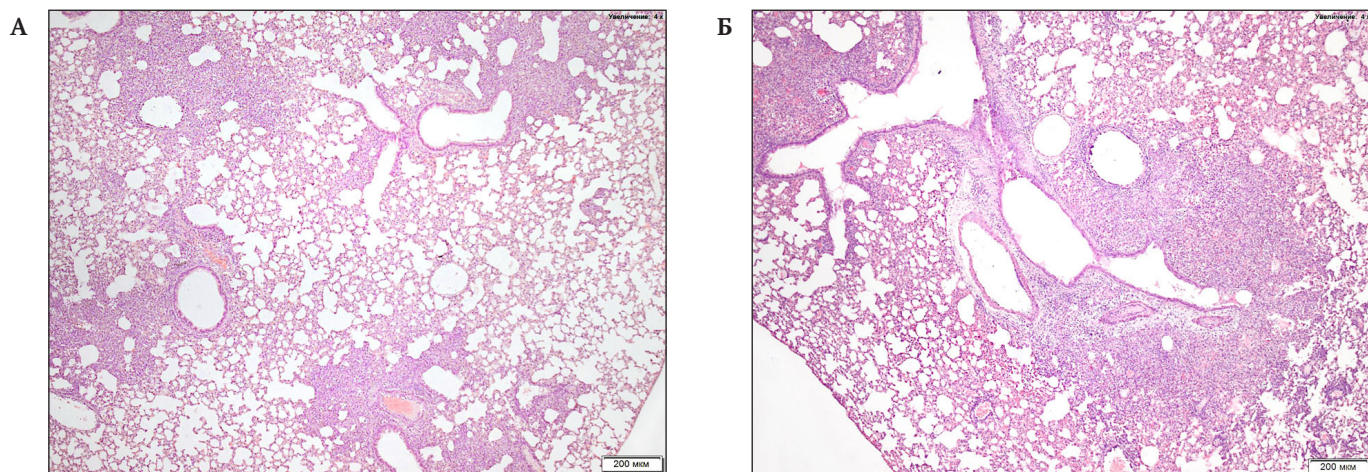


Рис. 6. Морфологическая характеристика лёгких хомяков контрольной группы на 5-е сутки после заражения SARS-CoV-2. **А, Б** — выраженные воспалительные изменения в лёгких, вызванные SARS-CoV-2: безвоздушные очаги интерстициальной пневмонии, расположенные перибронхиально. Окраска HE&E, увеличение 40× (**А, Б**).

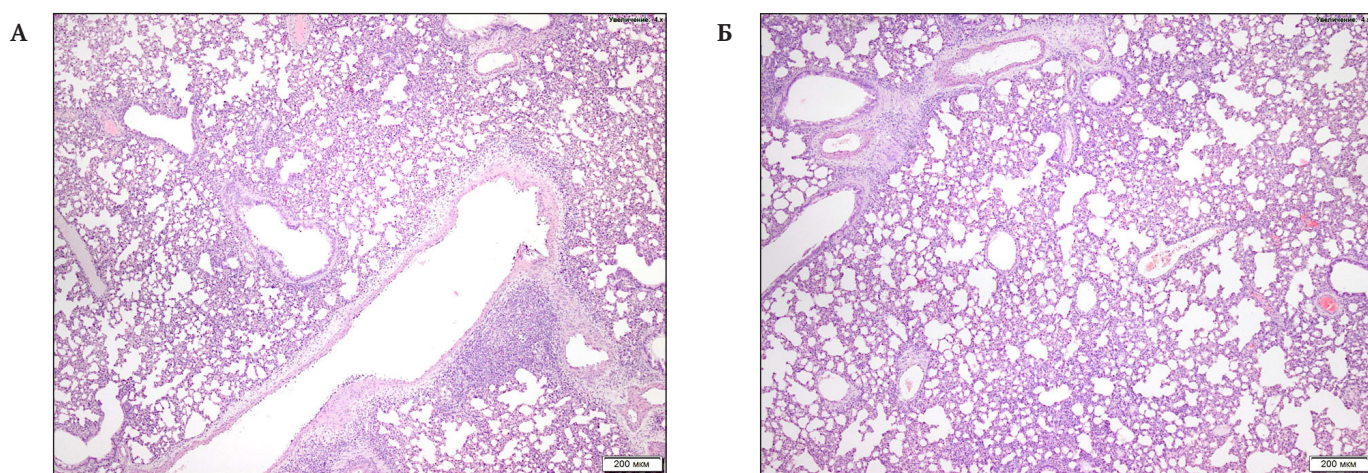


Рис. 7. Морфологическая характеристика лёгких хомяков, вакцинированных вирусом FluCoV-N, на 5-е сутки после заражения SARS-CoV-2. **А, Б** — умеренно выраженные воспалительные изменения в лёгких, вызванные SARS-CoV-2: небольшие локусы альвеолита в перибронхиальных участках респираторного отдела. Окраска HE&E. Увеличение 40×.

распознавании консервативного эпитопа патогена во входных воротах инфекции способны к быстрой выработке $IFN\gamma$, который стимулирует выработку хемокинов – агонистов CXCR3 рецептора. При этом в первичный очаг инфекции привлекаются различные субпопуляции лимфоцитов, способные к уничтожению зараженных клеток [37]. При малой множественности заражения, как это происходит в естественных условиях, неспецифические молекулы и специфические лимфоциты способны нейтрализовать инфекцию до широкого распространения вируса в респираторном тракте и реализации им разнообразных иммуносупрессорных механизмов, препятствующих развитию эффективного врожденного и адаптивного иммунитетов [38]. При парентеральной иммунизации формирование T_{rm} является проблематичным, что вызывает постоянный

поиск вариантов *i.n.* вакцин для создания кросс-протективного мукозального иммунитета [39].

Другой проблемой современной вакцинологии является необходимость многократных вакцинаций. Так, во время пандемии SARS-CoV-2 вакцины, полученные на основе mRNA или аденовирусного вектора, применялись до 4-5 раз, чтобы сдержать мутирующий вирус [40].

Цель настоящего исследования состояла в создании вакцины против вируса гриппа и коронавируса, пригодной для однократной *i.n.* иммунизации в чрезвычайных условиях пандемии. Вакцинация такой вакциной должна создавать перекрестную защиту и защитить от вновь появляющегося нового вируса с целью выигрыша времени для создания специфической вакцины, вызывающей нейтрализующий антительный ответ

против нового возбудителя. Для достижения этой цели мы сконструировали базовый вектор FluCoV-N на основе штамма PR/8/34 (H1N1). Вакцинный вектор представляет собой рекомбинантный вирус гриппа, в который были введены аттенуирующие изменения в генах *ns1* и *np*, позволившие создать ts вирус, стимулирующий систему IFN I типа. Уровень безопасности такого вируса позволил вводить животным высокие дозы вакцины, превышающие $8.0 \log_{10}$ ЭИД₅₀, без токсических эффектов или повреждения легких. Базовый вектор был дополнен последовательностью N-терминальной половины белка N вируса SARS-CoV-2, содержащей B- и T-клеточные эпитопы [41]. Вектор FluCoV-N обладает способностью к росту в куриных эмбрионах до высоких титров и при этом проявляет генетическую стабильность, сохраняя ts и интерферогенность. Данные иммунофлюоресцентного анализа подтвердили высокую интенсивность накопления N антигена коронавируса в цитоплазме зараженных клеток. Среди белков коронавируса, способных вызывать перекрестно-реактивные ответы, белок N представляет повышенный интерес как один из наиболее обильных белков, образующихся в ходе репликации вируса, и имеющий высокую степень гомологии среди коронавирусов [42]. Показано, что белок N является важной мишенью специфичных для SARS-CoV-2 ответов T-клеток во время COVID-19. При этом N-специфичные CD8⁺ T-клетки SARS-CoV-2 связаны с защитой от тяжелого заболевания, контролем репликации вируса и сохранением противовирусной эффективности против нескольких вариантов вируса (Альфа, Бета, Гамма и Дельта) по крайней мере через 6 месяцев после заражения [43]. Следовательно, иммунный ответ против N белка может защитить от заболевания различными штаммами SARS-CoV-2.

При изучении профилактической эффективности против гриппа и SARS-CoV-2 мы преследовали цель индукции протективного иммунного ответа уже после однократной i.p. иммунизации. С этой целью использовали максимальную дозу вирусного вектора для каждого вида животных. Для моделирования защиты от гриппа использовали хорьков, зараженных современным штаммом вируса гриппа A/Austria/1516645/2022 (H3N2), эволюционно удаленным от вакцинного вируса H1N1 подтипа. После челленджа хорьки продемонстрировали способность к быстрому разрешению инфекции, в то время как у половины животных контрольной группы усиливались клинические симптомы гриппа на протяжении 6 дней до дня эвтаназии. Более того, только в контрольной группе наблюдалось выделение вируса из легочной

ткани. Следует отметить, что инфекция вирусом H3N2 была весьма умеренной и не вызывала лихорадочных реакций у хорьков. Обнаруженный защитный эффект в отношении гетерологичного штамма следует в будущем подтвердить с использованием более вирулентного вируса гриппа – например, высокопатогенного штамма птичьего гриппа.

Наибольший интерес представляло наличие защитного эффекта от вакцинации вектором при инфекции SARS-CoV-2 у хомяков. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что иммунизация хомяков высокой дозой ($8.2 \log_{10}$ ЭИД₅₀) вектора также не вызывала существенных клинических проявлений гриппозной инфекции у этих животных. В отличие от модели гриппозной инфекции у хорьков заражение хомяков SARS-CoV-2 сопровождалось чрезвычайно высокой вирусной нагрузкой в легких через 2 дня после заражения. Удивительно, но однократная вакцинация гриппозным вектором смогла снизить титры вируса в гомогенатах легкого примерно в 10000 раз на второй день после контрольного заражения. Гистологические исследования на 5-й день после контрольного заражения выявили тенденцию к улучшению состояния легочной ткани по сравнению с контрольной группой. Вместе с тем следует отметить, что вирусные титры в легких зараженных хомяков выровнялись между контрольной и вакцинированной группой на 5-й день после заражения, составляя примерно $4.0 \log_{10}$ ТЦИД₅₀/0.1 мл. Таким образом, в отличие от модели гриппозной инфекции у хорьков, эффект вакцинации, с точки зрения вирусной нагрузки, терялся с течением времени у хомяков, зараженных коронавирусом. Данный феномен может быть объяснен наличием у коронавируса целого набора неструктурных белков, способных подавлять цитотоксическую активность лимфоцитов [44]. Обнаруженный эффект требует дальнейших исследований и усилий по оптимизации данного вектора за счет включения протективных эпитопов ранних белков. Возможной альтернативой может быть использование мукозальных адъювантов для усиления формирования иммунитета, ассоциированного с респираторным трактом.

Наше исследование показало, что получение параллельного защитного эффекта от гриппа и SARS-CoV-2 при однократной i.p. иммунизации высокой дозой высокоаттенуированного гриппозного вектора вполне достижимо. Векторы, аналогичные FluCoV-N, имеют хорошие перспективы с точки зрения продолжения клинических исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Blumenthal KG, Greenhawt M, Phillips EJ, Agmon-Levin N, Golden DBK, Shaker M. An Update in COVID-19 Vaccine Reactions in 2023: Progress and Understanding. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2023; 11(11), 3305-18. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2023.06.057>.
2. Zhou Z, Zhu Y, Chu M. Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants. *Front Immunol* 2022; 13, 898192. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.898192>.
3. Hornsby H, Nicols AR, Longet S, Liu C, Tomic A, Angyal A, et al. Omicron infection following vaccination enhances a broad spectrum of immune responses dependent on infection history. *Nat Commun* 2023; 14(1), 5065. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40592-4>.
4. Luo CH, Morris CP, Sachithanandham J, Amadi A, Gaston D, Li M, et al. Infection with the SARS-CoV-2 Delta Variant is Associated with Higher Infectious Virus Loads Compared to the Alpha Variant in both Unvaccinated and Vaccinated Individuals. *medRxiv* 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.08.15.21262077>.
5. Feng L, Feng S, Chen T, Yang J, Lau YC, Peng Z, et al. Burden of influenza-associated outpatient influenza-like illness consultations in China, 2006-2015: A population-based study. *Influenza Other Respir Viruses* 2020; 14(2), 162-72. <https://doi.org/10.1111/irv.12711>.
6. Monto AS, Koopman JS, Longini IM, Jr. Tecumseh study of illness. XIII. Influenza infection and disease, 1976-1981. *Am J Epidemiol* 1985; 121(6), 811-22. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114052>.
7. Bosaeed M, Kumar D. Seasonal influenza vaccine in immunocompromised persons. *Hum Vaccin Immunother* 2018; 14(6), 1311-22. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1445446>.
8. Turner PJ, Fleming L, Saglani S, Southern J, Andrews NJ, Miller E, et al. Safety of live attenuated influenza vaccine (LAIV) in children with moderate to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2020; 145(4), 1157-64 e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.12.010>.
9. Rudenko L, Yeolekar L, Kiseleva I, Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories. *Vaccine* 2016; 34(45), 5436-41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.018>.
10. Wang WC, Sayedahmed EE, Sambhara S, Mittal SK. Progress towards the Development of a Universal Influenza Vaccine. *Viruses* 2022; 14(8). <https://doi.org/10.3390/v14081684>.
11. Poehling KA, Caspard H, Peters TR, Belongia EA, Congeni B, Gaglani M, et al. 2015-2016 Vaccine Effectiveness of Live Attenuated and Inactivated Influenza Vaccines in Children in the United States. *Clin Infect Dis* 2018; 66(5), 665-72. <https://doi.org/10.1093/cid/cix869>.
12. Mohn KG, Brokstad KA, Islam S, Oftung F, Tondel C, Aarstad HJ, et al. Early Induction of Cross-Reactive CD8+ T-Cell Responses in Tonsils After Live-Attenuated Influenza Vaccination in Children. *J Infect Dis* 2020; 221(9), 1528-37. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz583>.
13. He XS, Holmes TH, Zhang C, Mahmood K, Kemble GW, Lewis DB, et al. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *J Virol* 2006; 80(23), 11756-66. <https://doi.org/10.1128/JVI.01460-06>.
14. Sun W, Luo T, Liu W, Li J. Progress in the Development of Universal Influenza Vaccines. *Viruses* 2020; 12(9). <https://doi.org/10.3390/v12091033>.
15. Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Egorov A, Romanova J, Niebler B, et al. Chimeric influenza virus replicating predominantly in the murine upper respiratory tract induces local immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in the genital tract. *J Infect Dis* 1998; 178(5), 1359-68. <https://doi.org/10.1086/314445>.
16. Sereinig S, Stukova M, Zabolotnyh N, Ferko B, Kittel C, Romanova J, et al. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13(8), 898-904. <https://doi.org/10.1128/CVI.00056-06>.
17. Stukova MA, Sereinig S, Zabolotnyh NV, Ferko B, Kittel C, Romanova J, et al. Vaccine potential of influenza vectors expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein. *Tuberculosis (Edinb)* 2006; 86(3-4), 236-46. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.01.010>.
18. Vasilyev KA, Yukhneva MA, Shurygina AP, Stukova MA, Egorov AY. Enhancement of the immunogenicity of influenza A virus by the inhibition of immunosuppressive function of NS1 protein. *MIR Journal* 2018; 5(1), 48-58. <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2018-5-1-48-58>.
19. Vasilyev KA, Shurygina AP, Stukova MA, Egorov AY. Enhanced CD8+ T-cell response in mice immunized with NS1-truncated influenza virus. *MIR Journal*

- 2020; 7(1), 24-33. <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2020-7-1-24-33>.
20. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Janke BH, Webby RJ, Garcia-Sastre A, et al. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine* 2007; 25(47), 7999-8009. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.09.019>.
 21. Hai R, Martinez-Sobrido L, Fraser KA, Ayllon J, Garcia-Sastre A, Palese P. Influenza B virus NS1-truncated mutants: live-attenuated vaccine approach. *J Virol* 2008; 82(21), 10580-90. <https://doi.org/10.1128/JVI.01213-08>.
 22. Wressnigg N, Shurygina AP, Wolff T, Redlberger-Fritz M, Popow-Kraupp T, Muster T, et al. Influenza B mutant viruses with truncated NS1 proteins grow efficiently in Vero cells and are immunogenic in mice. *J Gen Virol* 2009; 90(2), 366-74. <https://doi.org/10.1099/vir.0.006122-0>.
 23. Romanova J, Krenn BM, Wolschek M, Ferko B, Romanovskaja-Romanko E, Morokutti A, et al. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. *PLoS One* 2009; 4(6), e5984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005984>.
 24. Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solorzano A, Albrecht R, et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol* 2009; 83(4), 1742-53. <https://doi.org/10.1128/JVI.01920-08>.
 25. Wang P, Zheng M, Lau SY, Chen P, Mok BW, Liu S, et al. Generation of DelNS1 Influenza Viruses: a Strategy for Optimizing Live Attenuated Influenza Vaccines. *mBio* 2019; 10(5), e02180-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02180-19>.
 26. Zhou R, Wang P, Wong YC, Xu H, Lau SY, Liu L, et al. Nasal prevention of SARS-CoV-2 infection by intranasal influenza-based boost vaccination in mouse models. *EBioMedicine* 2022; 75, 103762. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103762>.
 27. Zhu F, Zhuang C, Chu K, Zhang L, Zhao H, Huang S, et al. Safety and immunogenicity of a live-attenuated influenza virus vector-based intranasal SARS-CoV-2 vaccine in adults: randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *Lancet Respir Med* 2022; 10(8), 749-60. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00131-X).
 28. Ghendon YZ, Polezhaev FI, Lisovskaya KV, Medvedeva TE, Alexandrova GI, Klimov AI. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants. *Infect Immun* 1984; 44(3), 730-3. <https://doi.org/10.1128/iai.44.3.730-733.1984>.
 29. Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol* 2005; 86(1), 185-95. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80422-0>.
 30. Romanova J, Katinger D, Ferko B, Voglauer R, Mochalova L, Bovin N, et al. Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology* 2003; 307(1), 90-7. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00064-8).
 31. Lee CW. Reverse genetics of influenza virus. *Methods Mol Biol* 2014; 1161, 37-50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_4.
 32. Perez DR, Seibert B, Ferreri L, Lee CW, Rajao D. Plasmid-Based Reverse Genetics of Influenza A Virus. *Methods Mol Biol* 2020; 2123, 37-59. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_4.
 33. Egorov A, Brandt S, Sereinig S, Romanova J, Ferko B, Katinger D, et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J Virol* 1998; 72(8), 6437-41. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.8.6437-6441.1998>.
 34. Pulkina A, Vasilyev K, Muzhikyan A, Sergeeva M, Romanovskaya-Romanko E, Shurygina AP, et al. IgGkappa Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *Int J Mol Sci* 2023; 24(14), 11445. <https://doi.org/10.3390/ijms241411445>.
 35. Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect* 2022; 28(2), 202-21. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.005>.
 36. Swadling L, Diniz MO, Schmidt NM, Amin OE, Chandran A, Shaw E, et al. Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2. *Nature* 2022; 601(7891), 110-7. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04186-8>.
 37. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2, Suppl 2), S3-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>.
 38. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2016; 38(4), 471-82. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0558-0>.

39. Zheng MZM, Wakim LM. Tissue resident memory T cells in the respiratory tract. *Mucosal Immunol* 2022; 15(3), 379-88. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00461-z>.
40. Larkin HD. Four Vaccine Doses Prevented Severe Omicron COVID-19 Better Than 3. *JAMA* 2022; 327(18), 1748. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.7248>.
41. Pacheco-Olvera DL, Saint Remy-Hernandez S, Garcia-Valeriano MG, Rivera-Hernandez T, Lopez-Macias C. Bioinformatic Analysis of B- and T-cell Epitopes from SARS-CoV-2 Structural Proteins and their Potential Cross-reactivity with Emerging Variants and other Human Coronaviruses. *Arch Med Res* 2022; 53(7), 694-710. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2022.10.007>.
42. Song W, Fang Z, Ma F, Li J, Huang Z, Zhang Y, et al. The role of SARS-CoV-2 N protein in diagnosis and vaccination in the context of emerging variants: present status and prospects. *Front Microbiol* 2023; 14, 1217567. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1217567>.
43. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020; 584(7821), 457-62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>.
44. Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol* 2021; 12, 809244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.809244>.