

**ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО Т-КЛЕТОЧНОГО  
ИММУННОГО ОТВЕТА НА ЖИВУЮ ГРИППОЗНУЮ ВАКЦИНУ ПРИ  
ВКЛЮЧЕНИИ В СОСТАВ ВАКЦИННОГО ШТАММА ГЕНА  
НУКЛЕОПРОТЕИНА ОТ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА**

Прокопенко П. И. <sup>1</sup>,

Степанова Е. А. <sup>1</sup>,

Матюшенко В. А. <sup>1</sup>,

Чистякова А. К. <sup>1</sup>,

Костромитина А. Д. <sup>1</sup>,

Котомина Т. С. <sup>1</sup>,

Рак А. Я. <sup>1</sup>,

Рубинштейн А. А. <sup>2</sup>,

Кудрявцев И. В. <sup>2</sup>,

Новицкая В. В. <sup>1</sup>,

Руденко Л. Г. <sup>1</sup>,

Исакова-Сивак И. Н. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Отдел вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д.12.

<sup>2</sup> Отдел иммунологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д.12.

**EPIDEMIC INFLUENZA VIRUS NUCLEOPROTEIN GENE  
INCORPORATED INTO VACCINE INFLUENZA VIRUS STRAIN  
GENOME TO OPTIMIZE SYSTEMIC AND LOCAL T-CELL IMMUNE  
RESPONSE AGAINST LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE**

Prokopenko P. I. <sup>a</sup>,

Stepanova E. A. <sup>a</sup>,

Matyushenko V. A. <sup>a</sup>,

Chistyakova A. K. <sup>a</sup>,

Kostromitina A. D. <sup>a</sup>,

Kotomina T. S. <sup>a</sup>,

Rak A. Y. <sup>a</sup>,

Rubinstein A. A. <sup>b</sup>,

Kudryavtsev I. V. <sup>b</sup>,

Novitskaya V. V. <sup>a</sup>,

Rudenko L. G. <sup>a</sup>,

Isakova-Sivak I. N. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg 12,  
Acad. Pavlov Street.

<sup>b</sup> Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg  
12, Acad. Pavlov Street.

## Резюме

*Введение:* Оптимизация поствакцинального репертуара Т-клеток – один из способов расширения спектра защитного потенциала живой гриппозной вакцины (ЖГВ). Улучшить кросс-протективные свойства ЖГВ можно путем внесения в состав генома вакцинного штамма гена нуклеопротеина (NP) от эпидемического родительского вируса, т.е. при замене классической формулы генома 6:2 на 5:3. Ранее на примере вирусов гриппа H1N1, H3N2 и H7N9 было показано, что вакцинные штаммы ЖГВ 5:3 стимулируют более выраженный Т-клеточный ответ к эпитопам NP эпидемического родительского вируса, чем классические варианты ЖГВ 6:2. *Основной целью* настоящего исследования явилась детальная оценка субпопуляций вирусспецифических системных и тканерезидентных Т-клеток памяти у мышей, иммунизированных штаммами сезонной ЖГВ подтипа H1N1 с формулами генома 6:2 и 5:3. *Материалы и методы:* методами обратной генетики были сконструированы вакцинные штаммы ЖГВ подтипа H1N1, отличающихся источником гена NP (ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3). Мышей линии C57BL/6J иммунизировали интраназально вакцинными кандидатами, двукратно с трехнедельным интервалом. Через 7 дней после повторной иммунизации у мышей выделяли клетки из тканей селезенки и легких, стимулировали цельным вирусом гриппа H1N1 и оценивали уровни цитокин-продуцирующих Т-клеток памяти с фенотипом CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> методами проточной цитометрии. Для клеток, выделенных из легких, также определяли экспрессию поверхностных маркеров CD69 и CD103. Гуморальный иммунитет к вирусу H1N1 оценивали в иммуноферментном анализе сывороток крови мышей, собранных через 3 недели после повторной иммунизации. *Результаты:* Вакцинный штамм ЖГВ 5:3, несущий NP ген от эпидемического родителя, индуцировал достоверно более выраженный гуморальный иммунный ответ к актуальному вирусу гриппа, чем классический вариант ЖГВ 6:2. В группе мышей, привитых ЖГВ 5:3, наблюдались более высокие уровни вирусспецифических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-

клеток эффекторной памяти ( $T_{EM}$ ) в селезенках мышей, включая субпопуляцию полифункциональных ( $IFN\gamma+TNF\alpha+IL-2+$ )  $CD4+$   $T_{EM}$ , по сравнению с группой ЖГВ 6:2. Также наблюдалась тенденция к выработке более высоких уровней вирусспецифических Т-клеток памяти в тканях легких при иммунизации ЖГВ 5:3 в сравнении с ЖГВ 6:2, однако достоверной разницы в стимуляции тканерезидентных Т-клеток с фенотипами  $CD69+CD103-$  и  $CD69+CD103+$  между группами не наблюдалось. *Заключение:* Получены дополнительные экспериментальные свидетельства перспективности модификации генома вакцинного штамма сезонной живой гриппозной вакцины с целью актуализации эпитопного состава вакцинных вирусов, поскольку такая модификация усиливает вирусспецифический Т-клеточный иммунный ответ как на системном уровне, так и в тканях легких, что в итоге может повысить эффективность вакцины в отношении циркулирующих вирусов гриппа.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, живая гриппозная вакцина, нуклеопротеин, гуморальный иммунитет, IgG, эффекторная память,  $T_{EM}$ , тканерезидентные Т-клетки памяти,  $T_{RM}$ .

## Abstract

**Introduction:** Optimization of the vaccine-induced T-cell repertoire is one of the strategies to expand the spectrum of protective potential for live attenuated influenza vaccine (LAIV). LAIV cross-protective properties can be improved by introducing the nucleoprotein (NP) gene derived from epidemic parental virus into vaccine strain genome, i.e. by replacing the classical 6:2 genome formula with 5:3. *The main objective* of the present study was to detail evaluation for virus-specific systemic and tissue-resident memory T-cells subsets in mice immunized with seasonal H1N1 LAIV of the genome formula 6:2 and 5:3. **Materials and Methods:** Two H1N1 LAIV strains with varying NP genes (LAIV 6:2 and LAIV 5:3) were generated using reverse genetics techniques. C57BL/6J mice were immunized intranasally with the vaccine candidates, twice, 3 weeks apart. Cells from the spleen and lung tissues were isolated 7 days after booster immunization to be stimulated with whole H1N1 influenza virus for assessing cytokine-producing memory CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T-cells as well as expression of CD69 and CD103 surface markers using flow cytometry. Humoral murine serum immunity against H1N1 virus was assessed by ELISA. **Results:** The LAIV 5:3 vs. classical 6:2 vaccine strain carrying the epidemic parental NP gene induced significantly more pronounced humoral immune response against recent influenza virus. The group of mice immunized with LAIV 5:3 demonstrated higher levels of virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector memory T cells (T<sub>EM</sub>) in the spleen, including a subset of polyfunctional (IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ +IL-2<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>, compared to LAIV 6:2 group. Virus-specific memory T cell levels in lung tissues after immunization with LAIV 5:3 vs. LAIV 6:2 also tended to increase, but no significant difference in stimulated tissue-resident CD69<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> and CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> T cells between the groups were found. **Conclusion:** Modification of the seasonal LAIV strain genome for updating its epitope composition allowed to enhance the virus-specific T-cell immune response both at systemic level and in lung tissues, thereby shoeing that the effectiveness of the vaccine against circulating influenza viruses can be potentially increased.

**Keywords:** influenza virus, live influenza vaccine, nucleoprotein, humoral immunity, IgG, effector memory, T<sub>EM</sub>, tissue-resident memory T cells, T<sub>RM</sub>.

## 1 Введение

Вирусы гриппа являются высококонтагиозными респираторными патогенами, которые представляют постоянную угрозу для мирового здравоохранения. Ежегодные эпидемии гриппа вызывают до 5 млн случаев тяжелых респираторных заболеваний, до 650 000 которых приводят к летальному исходу [9]. Вакцинация является наиболее эффективным средством профилактики гриппа, поскольку она может значительно снизить риск заражения гриппом, а также тяжесть и продолжительность заболевания [4,6].

В настоящее время в мировой практике существует большое разнообразие вакцин против вируса гриппа, однако их общим недостатком является достаточно узкая специфичность, что приводит к снижению эффективности вакцинации при циркуляции дрейфовых вариантов вируса, и, как следствие – к необходимости регулярного обновления штаммового состава вакцин [16,17]. Лицензированные сезонные вакцины против гриппа направлены на поверхностные антигены вируса – гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА). В результате вакцинации преимущественно индуцируются нейтрализующие антитела против иммунодоминантных гипервариабельных эпитопов поверхностных вирусных белков, обеспечивая ограниченную защиту от антигенно удаленных вирусов гриппа. Поэтому поиск новых подходов для повышения иммуногенности и эффективности гриппозных вакцин является приоритетной задачей здравоохранения. За последнее десятилетие был достигнут существенный прогресс в разработке противогриппозных вакцин широкого спектра действия, которые направлены на индукцию антител к консервативным вирусным антигенам, таким как НА, НА или внеклеточный домен М2 белка (М2е) [8,29]. Кроме того, активно разрабатываются подходы на основе Т-клеток, поскольку такие вакцины имеют наибольший потенциал для индукции долгоживущих кросс-протективных факторов иммунной защиты [22]. Однако разработка новых Т-

клеточных вакцин сопровождается серьезными трудностями, такими как большое разнообразие генов главного комплекса гистосовместимости в популяции, отсутствие адекватных животных моделей для тестирования таких вакцин в доклинических исследованиях, а также недостаток информации о том, какие уровни субпопуляций Т-клеток коррелируют с защитой от инфекции [8]. Соответственно, помимо создания новых вакцин, нацеленных на индукцию Т-клеток памяти к консервативным вирусным антигенам, не менее важной задачей является усовершенствование лицензированных гриппозных вакцин. В частности, одним из способов расширения спектра защитного потенциала живой гриппозной вакцины (ЖГВ) является оптимизация репертуара Т-клеток, которые образуются после вакцинации.

Известно, что, изолированного в 1957 году, вполне вероятно, что некоторые индуцированные ЖГВ Т-клетки больше не смогут распознавать эпитопы циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа. Несмотря на достаточно высокий уровень консервативности NP среди различных вирусов гриппа А, за последние десятилетия данный белок приобрел значительное количество мутаций, входящих в иммуногенные Т-клеточные эпитопы [19,31]. Ранее нами была показана принципиальная [7,21].

**Целью** настоящего исследования явилась детальная оценка субпопуляций вирусспецифических системных и тканерезидентных Т-клеток памяти у мышей, иммунизированных штаммами сезонной ЖГВ подтипа H1N1 с формулами генома 6:2 и 5:3.

## 2 Материалы и методы

**Вирусы.** Экспериментальные реассортантные штаммы подтипа H1N1 были получены стандартными методами обратной генетики на основе донора аттенуации отечественной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17) по описанной ранее методике [21]. В качестве родительского эпидемического вируса гриппа выступал штамм А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1) [H1N1/wt], полученный из

коллекции NIBSC (Великобритания). Вакцинные штаммы содержали гены PB2, PB1, PA, M, NS от донора аттенуации Лен/17, а гены гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) – от вируса H1N1/wt. Ген нуклеопротеина (NP) у штамма ЖГВ 6:2 был унаследован от донора аттенуации Лен/17, а у штамма ЖГВ 5:3 – от эпидемического вируса H1N1/wt. Вирусы культивировали в 10-11 дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) при 33°C (для вакцинных штаммов ЖГВ) или при 37°C (для эпидемического штамма H1N1/wt). Инфекционные титры определяли методом предельных разведений на РКЭ, подсчитывали по методу Рида и Менча [20] и выражали в lgЭИД<sub>50</sub>/мл.

Для проведения иммунологических тестов вирус гриппа H1N1/wt очищали методом ультрацентрифугирования на градиенте плотности сахарозы. Для этого вирусную биомассу наращивали в РКЭ, и после осаждения дебриза низкоскоростным центрифугированием надосадочную жидкость подвергали центрифугированию с ускорением 34000g в течение 2-х часов с использованием ультрацентрифуги Optima L-100 XP (Beckman Coulter, США). После этого ресуспендированный в PBS осадок очищали на ступенчатом градиенте сахарозы (30% и 60%) с ускорением 23000g в течение 1 часа. Фракцию, содержащую вирусные частицы, собирали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), после чего проводили финальное центрифугирование с ускорением 23000g в течение 1 часа. Осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ, аликвотили и хранили при -70°C.

**Иммунизация мышей.** Для эксперимента по оценке иммуногенности и кросс-протективного действия сконструированных вакцинных кандидатов подтипа H1N1 использовали самок мышей линии C57BL/6J, поставляемых из питомника Филиал Столбовая ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Через 3 недели после повторной иммунизации у мышей собирали сыворотки крови для оценки гуморального иммунного ответа в иммуноферментном анализе (ИФА). Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол №1/20 от 27.02.2020).

**Оценка гуморального иммунного ответа.** Уровни сывороточных IgG-антител к цельному вирусу A/H1N1wt были определены с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) по стандартному протоколу. Планшеты с высокой сорбцией покрывали очищенным на градиенте плотности сахарозы вирусом гриппа A/H1N1wt. После отмывок и блокировки неспецифического связывания с помощью раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА), в лунки вносили 2-кратные разведения сывороток мышей. После инкубации и соответствующих промывок проводили детекцию связанных с антигеном IgG-антител при помощи вторичных антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (BioRad, США). Проявку планшетов осуществляли с использованием субстрата 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo, США). Реакцию останавливали добавлением 1М раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, после чего измеряли оптическую плотность раствора при 450 нм (ОП<sub>450</sub>) с помощью спектрофотометра xMark (BioRad, США). За титр сыворотки принимали максимальное разведение образца, при котором ОП<sub>450</sub> превышало в 2 раза среднее значение ОП<sub>450</sub> контрольных лунок (антиген без добавления сыворотки).

**Оценка Т-клеточного иммунного ответа.** Определение системных и локализованных в легких Т-клеток памяти проводилось по ранее описанному методу [18] с некоторыми модификациями. В отличие от указанного исследования, где иммунный ответ оценивался путем стимуляции клеток синтетическими пептидами, соответствующими иммунодоминантным CD8<sup>+</sup> Т-клеточным эпитопам NP<sub>366</sub> современного и устаревшего вирусов, в настоящей работе проводили стимуляцию иммунных клеток цельным очищенным вирусом А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1). Такая стимуляция лучше отражает реальную клиническую ситуацию, поскольку при гриппе организм сталкивается с циркулирующим вирусом в его естественном виде, и инфицированные клетки презентруют на комплексах МНС-I и МНС-II большое разнообразие Т-клеточных вирусных эпитопов. Одиночные

спленоциты выделяли в среде CR-0 (RPMI-1640, с содержанием антибиотика-антимикотика, 25 мМ HEPES (все от Carlsberg, Германия) и 50 мкМ 2-меркаптоэтанолом (Sigma, США)), используя фильтры с размером пор 70 мкм (BD Biosciences, США). Затем эритроциты лизировали с помощью буфера для лизиса эритроцитов (Biolegend, США). Для внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS)  $2 \times 10^6$  клеток добавляли в стерильные микропланшеты с U-образным дном в 100 мкл среды CR-10 (среда CR-0, содержащая 10% эмбриональной бычьей сыворотки). Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл среды CR-10, содержащей очищенный вирус H1N1/wt в дозе 2 инфекционные единицы на клетку, и инкубировали в течение 18 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем к пробам добавляли раствор GolgiPlug™ (BD Biosciences, США), в конечной концентрации 1:1000 для остановки белкового транспорта. Стимуляция фторболмиристатом ацетата (PMA) (Sigma, США) использовалась в качестве положительного контроля; также были приготовлены нестимулированные контрольные образцы и образцы изотипического контроля. Клетки инкубировали в течение 5 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, затем окрашивали в течение 20 мин при 4°C в темноте с помощью флуоресцентного красителя для фиксации живых/мертвых клеток (ZombieAqua, Invitrogen, США) и смесью следующих флуоресцентно меченных поверхностных антител: CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-APC/Cy7, CD44-PE, и CD62LBV421 (все от BioLegend, США). Набор Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, США) использовался для фиксации/пермеабиллизации, после чего клетки окрашивали антителами к цитокинам IFN $\gamma$ -FITC, TNF $\alpha$ -APC и IL2-PE/Cy7 (все от BioLegend) в течение 20 мин при 4°C в темноте. Образцы фиксировали буфером Cytolast (Biolegend) и анализировали с помощью флуориметра Navios (Beckman Coulter, США).

Для обнаружения тканерезидентных Т-клеток памяти (T<sub>RM</sub>) перфузированные легкие разрезали на мелкие кусочки стерильными ножницами и обрабатывали смесью ДНКазы I и коллагеназы (обе от Sigma) в

течение 40 мин при 37°C. Затем готовили суспензию отдельных клеток с помощью фильтров с размером пор 70 мкм. Эритроциты лизировали, как описано выше, а стимуляцию клеток проводили по той же процедуре, что и для спленоцитов, только для окраски поверхностных маркеров и внутриклеточных цитокинов использовали другой набор антител. Набор поверхностных антител включал CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-APC/Cy7, CD44-APC, CD62L-BV421, CD69-PE/Cy7, и CD103-FITC (все от BioLegend, США), в то время как внутриклеточно проводили окраску на один цитокин – IFN $\gamma$ -PE/Dazzle. Подсчитывали количество цитокин-позитивных клеток в стимулированных группах и вычитали уровень спонтанной секреции цитокинов в нестимулированных контрольных образцах.

**Статистическая обработка результатов.** Для анализа данных проточной цитометрии использовали программу Kaluza Analysis (Beckman Coulter). Для расчетов, статистического анализа и подготовки иллюстраций использовали программу GraphPad Prism 7.0. Сравнение данных проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки или U-критерия Манна-Уитни, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### 3 Результаты и обсуждение

Для данного исследования с использованием методов обратной генетики были сконструированы два вакцинных штамма ЖГВ, отличающиеся источником гена NP. У штамма ЖГВ 6:2 гены NA и NP унаследованы от эпидемического вируса H1N1/wt, остальные гены – от донора аттенуации Лен/17. У штамма ЖГВ 5:3 три гена – NA, NP и NP – были унаследованы от H1N1/wt, остальные гены также принадлежали Лен/17. Накопленные в РКЭ вирусы характеризовались высокой инфекционной активностью: штамм ЖГВ 6:2 размножался в РКЭ при оптимальной температуре 33°C до титра 9,5 lgЭИД<sub>50</sub>/мл, а штамм ЖГВ 5:3 – до 8,9 lgЭИД<sub>50</sub>/мл. Эти данные указывают на отсутствие негативного влияния NP гена от эпидемического родителя на репликативные свойства вакцинного штамма ЖГВ.

У мышей, двукратно иммунизированных исследуемыми штаммами, собирали иммунные сыворотки и оценивали уровни IgG антител в ИФА с использованием цельного эпидемического вируса в качестве антигенной подложки. Было показано, что кандидат, несущий NP ген от эпидемического родителя (штамм ЖГВ 5:3), индуцировал достоверно более выраженный гуморальный иммунный ответ к вирусу гриппа, чем классический вариант ЖГВ 6:2 (Рисунок 1). Эти данные могут указывать на то, что при иммунизации ЖГВ антитела формируются не только к поверхностным антигенам вируса гриппа, но и к его нуклеопротеину. Действительно, гриппозная инфекция и вакцинация цельновирioнными вакцинами (как живыми, так и инактивированными) приводит к выработке сывороточных IgG антител к NP белку [5], при этом они не обладают вирус-нейтрализующей активностью. Несмотря на то, что этот антиген не представлен на поверхности вириона, он детектируется в большом количестве на поверхности зараженных вирусом клеток [1,28], что делает его потенциальной мишенью для антитело-зависимых иммунных реакций, таких как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность или комплемент-зависимая цитотоксичность [10,27]. Поскольку NP белок донора аттенуации Лен/17 и современного эпидемического вируса H1N1 отличается на 29 аминокислотных остатка, эти различия могут оказывать существенное действие на антигенные свойства данного белка. Соответственно, анти-NP антитела, выработанные в ответ на иммунизацию вариантом ЖГВ 6:2, могут распознавать не все В-клеточные эпитопы NP белка современного вируса гриппа.

Основной целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка уровней вирусспецифических Т-клеток, индуцируемых в ответ на иммунизацию штаммами ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3, как на системном (в селезенках), так и на локальном уровне (в тканях легких). В более раннем исследовании нами было показано, что вакцинный штамм подтипа H1N1 с формулой генома 5:3 стимулирует более выраженный системный Т-

клеточный иммунный ответ по сравнению с классическим вариантом ЖГВ 6:2, что выявлялось в результате стимуляции спленоцитов иммунизированных мышей цельным вирусом H1N1/wt [21]. При этом иммунный ответ ранее оценивался по продукции одного цитокина в ответ на стимуляцию вирусом, а именно IFN $\gamma$ . Данный цитокин относится к интерферонам II типа – семейству белков, изначально ассоциированных с ингибированием вирусной репликации [30]. В настоящее время известно, что IFN $\gamma$  активно продуцируется антиген-активированными Т-лимфоцитами и цитокин-активированными врожденными лимфоидными клетками группы 1 (ILC1) [11], вследствие чего именно этот цитокин чаще всего используется для выявления вирусспецифических Т-клеток в экспериментальных исследованиях. Однако не менее важно оценивать способность иммунных клеток продуцировать и другие ключевые провоспалительные цитокины, участвующие в противовирусном ответе, такие как фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ) и интерлейкин 2 (IL-2). Полифункциональные Т-клетки, способные продуцировать сразу несколько цитокинов, являются более точными предикторами способности организма противостоять реинфекции, чем монофункциональные клетки с секрецией IFN $\gamma$  [15], причем CD4 $^{+}$  Т-клетки, продуцирующие только IFN $\gamma$ , значительно отличаются от полифункциональных клеток даже по транскрипционному профилю [2].

В настоящем исследовании выявляли субпопуляции полифункциональных вирусспецифических Т-клеток памяти у мышей, двукратно иммунизированных вакцинными штаммами ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3. Для этого спленоциты иммунизированных животных стимулировали цельным вирусом H1N1/wt и определяли пропорции CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-клеток памяти с фенотипом CD44 $^{+}$ CD62L $^{-}$  (T<sub>EM</sub>), отвечающих на стимуляцию продукцией цитокинов IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  или IL-2 (Рисунок 2). Оба вакцинных штамма приводили к образованию высоких уровней CD4 $^{+}$  цитокин-продуцирующих Т-клеток значительно отличаясь от контрольной группы животных (Рисунок

233 2Б), что указывает на наличие в белках вакцинных штаммов консервативных  
234 Т-клеточных эпитопов, которые могут распознавать эпитопы эпидемического  
235 вируса H1N1/wt. Важно отметить, что уровень CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ -продуцирующих  
236 T<sub>ЕМ</sub> в группе ЖГВ 5:3 был значительно выше такового в группе ЖГВ 6:2, что  
237 свидетельствует о более релевантном стимулировании Т-клеток памяти при  
238 иммунизации вакцинным штаммом с актуализированным геном NP (Рисунок  
239 2В). Наиболее важным результатом данного раздела работы явилось  
240 обнаружение значительного уровня полифункциональных (IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ +IL-  
241 2+) CD4<sup>+</sup> T<sub>ЕМ</sub> в спленоцитах мышей, привитых ЖГВ 5:3, который значительно  
242 превышал содержание таких клеток в группе классической ЖГВ 6:2 (Рисунок  
243 2Б). Для CD8<sup>+</sup> T<sub>ЕМ</sub> клеток также была выявлена тенденция к увеличению  
244 пропорции полифункциональных Т-клеток, однако из-за небольшого  
245 количества животных в группе и высокой дисперсии различия между  
246 группами не были достоверными (Рисунок 2В). Таким образом, исследование  
247 системного Т-клеточного иммунитета, образованного в ответ на иммунизацию  
248 экспериментальными штаммами ЖГВ подтипа H1N1, выявило преимущества  
249 модифицированного варианта с формулой генома 5:3 по сравнению с  
250 классическим штаммом ЖГВ 6:2 в плане индукции системных моно- и  
251 полифункциональных вирусспецифических Т-клеток эффекторной памяти,  
252 что согласуется с данными, полученными нами ранее для вакцинных штаммов  
253 ЖГВ подтипа H7N9, где спленоциты были стимулированы пептидом,  
254 соответствующим иммунодоминантному эпитопу NP<sub>366</sub> современного вируса  
255 [18].

256 Следует отметить, что в ранних исследованиях с сезонным вирусом  
257 гриппа H1N1 не изучалось формирование субпопуляций тканерезидентных  
258 (локализующихся в тканях легких) Т-клеток памяти (T<sub>RM</sub>), которые  
259 представляют собой первую линию адаптивной клеточной защиты организма  
260 от схожего по эпитопному составу респираторного патогена [25,26]. На  
261 предыдущем этапе исследования были изучены особенности формирования

262 T<sub>RM</sub> клеток в ответ на иммунизацию вакцинным штаммом ЖГВ 5:3 подтипа  
263 H7N9, однако в том случае стимуляцию клеток, выделенных из легких  
264 иммунизированных мышей, стимулировали одним пептидом,  
265 соответствующим иммунодоминантному эпитопу NP<sub>366</sub> [18]. В настоящем  
266 эксперименте с вакцинными штаммами сезонной ЖГВ подтипа H1N1  
267 представлялось важным оценить субпопуляции T<sub>RM</sub> клеток к полному  
268 протеому эпидемического вируса гриппа, т.е. при стимуляции иммунных  
269 клеток цельным живым вирусом H1N1/wt. В легких изучали фенотип  
270 лимфоцитов, продуцирующих интерферон в ответ на стимуляцию очищенным  
271 вирусом гриппа, в том числе оценивали экспрессию  
272 интерферонпродуцирующими клетками маркеров тканерезидентных клеток  
273 памяти CD69 и CD103. Лектин CD69 является классическим ранним маркером  
274 активации лимфоцитов благодаря своему быстрому появлению на  
275 поверхности плазматической мембраны после стимуляции, а также считается  
276 маркером тканевой локализации клеток за счет противодействия S1P1  
277 рецептору, тем самым препятствуя выходу лимфоцитов в кровоток [3,14,23].  
278 Молекула CD103 представляет собой альфа-субъединицу интегрина  $\alpha E\beta 7$ ,  
279 связывающегося с молекулой клеточной адгезии E-кадгерин, активно  
280 экспрессируемой эпителиальными клетками для поддержания целостности  
281 барьерных тканей. Соответственно, экспрессия маркера CD103 на T<sub>RM</sub> клетках  
282 способствует их удержанию в эпителиальном пласте [13,24].

283 Соответственно, на 7-е сутки после двукратной иммунизации  
284 вакцинными штаммами ЖГВ H1N1 6:2 и ЖГВ H1N1 5:3 у мышей выделяли  
285 клетки из тканей легких и стимулировали цельным вирусом H1N1/wt с  
286 последующим выявлением вирусспецифических (т.е. IFN $\gamma$ +) Т-клеток  
287 эффекторной памяти (CD44+CD62L-), экспрессирующих маркеры  
288 тканерезидентности (CD69+CD103+). Было показано, что T<sub>EM</sub> клетки мышей,  
289 иммунизированных штаммом ЖГВ 5:3, имеют тенденцию к экспрессии более  
290 высоких уровней IFN $\gamma$  в ответ на стимуляцию цельным вирусом H1N1/wt, по

сравнению с группой ЖГВ 6:2, что говорит о большей интенсивности клеточного ответа после иммунизации модифицированной вакциной (Рисунок 3А,Г). Эти данные указывают на более выраженную индукцию вирусспецифических Т-клеток памяти, локализующихся в легких мышей, при иммунизации вакцинным прототипом ЖГВ 5:3, по сравнению с классическим вариантом ЖГВ 6:2. Среди интерферон-продуцирующих Т-клеток эффекторной памяти более 70% экспрессировали маркер CD69 (рисунок 3Б,Д). Кроме того, значительное количество CD8+CD69+ T<sub>ЕМ</sub> клеток несли маркер CD103+, свидетельствующий о локализации данных клеток в барьерных тканях, в непосредственной близости от потенциального места проникновения патогена (рисунок 3Е).

Таким образом, в настоящем исследовании были получены подтверждающие экспериментальные свидетельства о перспективности модификации генома вакцинного штамма сезонной живой гриппозной вакцины с целью актуализации эпитопного состава вакцинных штаммов. Достаточно простой для практической реализации способ – замена гена нуклеопротеина с устаревшего (от донора аттенуации Лен/17) на актуальный (от эпидемического родительского вируса) – приводит к существенному повышению уровней вирусспецифических Т-клеток памяти, как на системном уровне, так и в тканях легких, что должно повысить эффективность вакцины в отношении циркулирующих вирусов гриппа. Также ранее была продемонстрирована безопасность вакцинных штаммов ЖГВ с формулой генома 5:3 с использованием разных животных моделей [7,12,21], что обосновывает перспективность их дальнейшего изучения в клинических исследованиях на добровольцах.

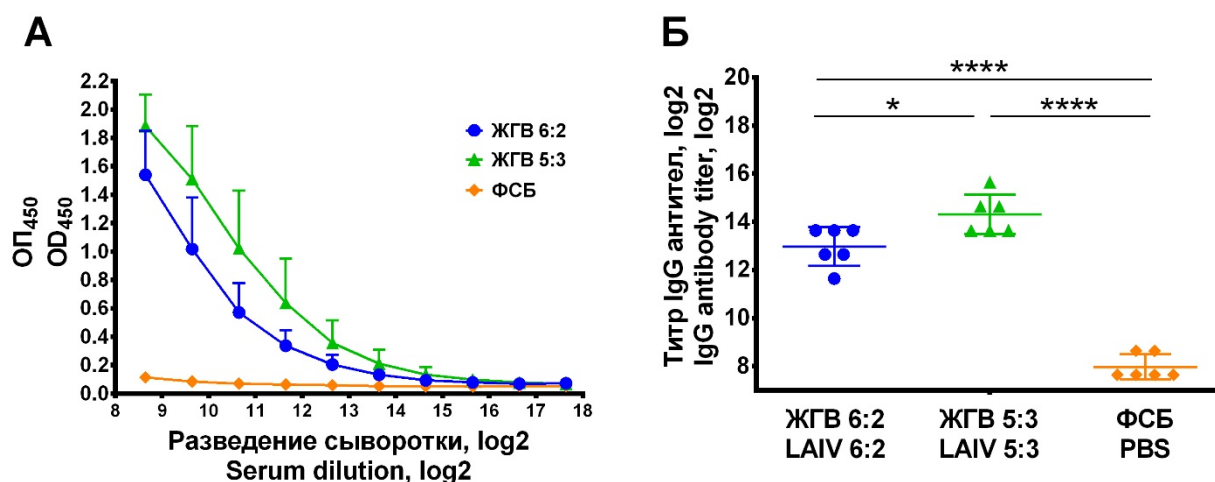
Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки FGWG-2022-0001.

## РИСУНКИ

**Рисунок 1.** Выявление вирусспецифических IgG антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных двукратно вакцинными штаммами ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3. Уровни антител выявлялись в иммуноферментном анализе с использованием цельного вируса А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1).

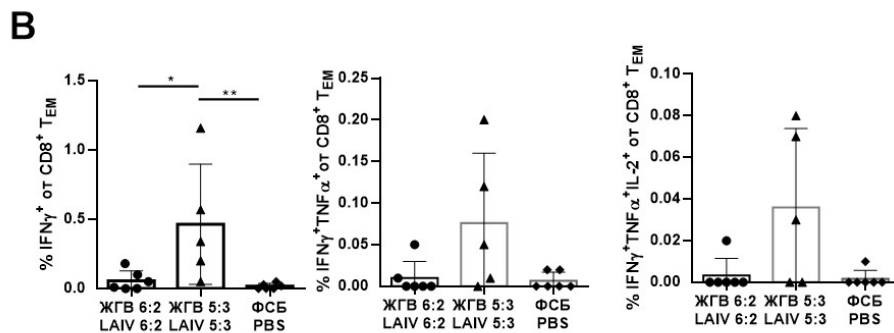
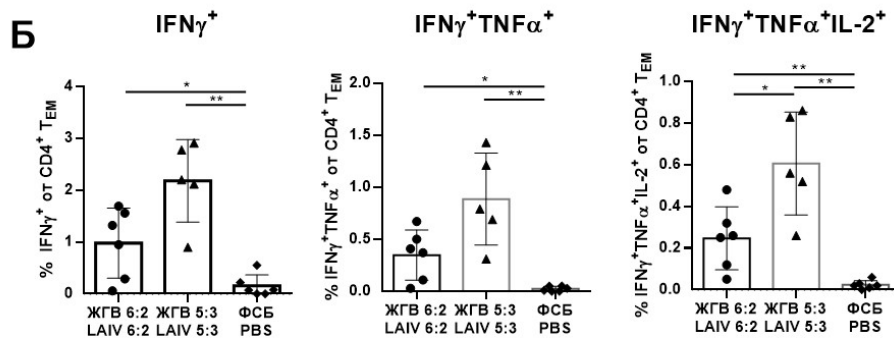
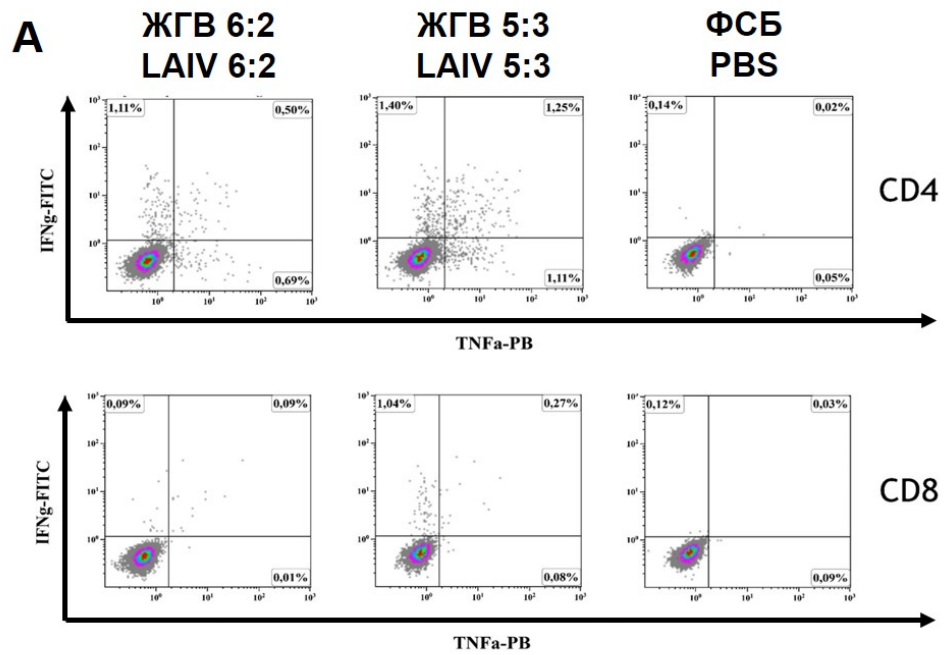
**А.** Средние значения оптической плотности в лунках при каждом разведении сывороток. **Б.** Значения титров антител в каждой исследуемой группе. Сравнение данных проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

**Figure 1.** Detection of blood serum virus-specific IgG antibodies in mice immunized twice with LAIV 6:2 and LAIV 5:3 strains. Antibody levels were detected by ELISA using whole virus A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1). **A.** Average values of optical density in wells at each serum dilution. **B.** Values of antibody titers in each study group. The data were compared using the ANOVA variance analysis with Tukey's correction (\* $p < 0, 05$ ; \*\*\*\* $p < 0, 0001$ ).



**Рисунок 2.** Индукция системного Т-клеточного ответа в ответ на иммунизацию вакцинными штаммами ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3. **А.** Репрезентативные дот-плот графики данных проточной цитометрии спленоцитов мышей после стимуляции цельным вирусом H1N1/wt. **Б.** Уровни цитокин-продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток среди популяции эффекторной памяти (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). **В.** Уровни цитокин-продуцирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток среди популяции эффекторной памяти (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). Представлены субпопуляции T<sub>ЕМ</sub>, продуцирующие IFN $\gamma$  (слева), IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  (посередине), и IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2 (справа) в ответ на двукратную вакцинацию. \* p<0.05, \*\* p<0.01.

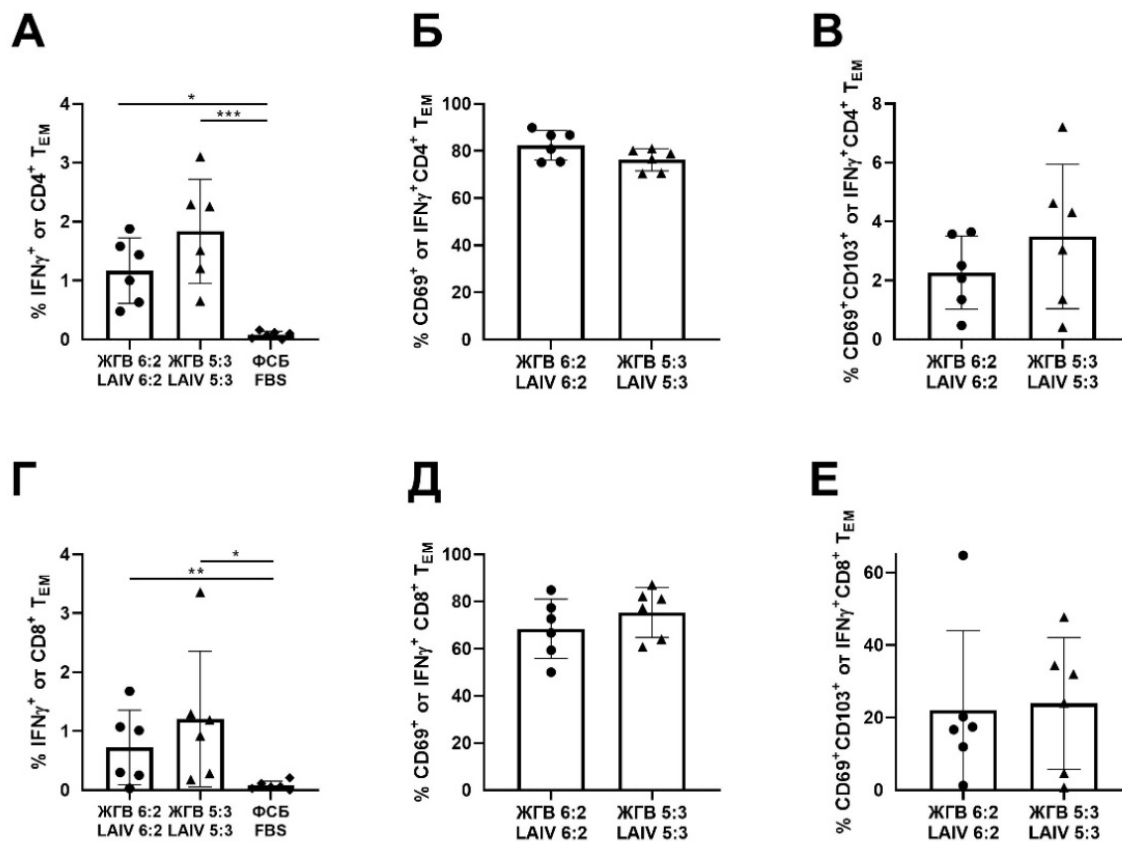
**Figure 2.** Induction of systemic T-cell response by immunization with LAIV 6:2 and LAIV 5:3 strains. **A.** Representative dot-plot graphs of mouse splenocyte flow cytometry data after stimulation with whole H1N1/wt virus. **B.** Levels of cytokine-producing CD4<sup>+</sup> T cells among the effector memory population (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). **C.** Cytokine-producing CD8<sup>+</sup> T cell levels among effector memory population (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). The subpopulations of TEM producing IFN $\gamma$  (left), IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  (middle), and IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-2 (right) in response to double vaccination are presented. \* p<0.05, \*\* p<0.01.



**Рисунок 3.** Уровни тканерезидентных CD4<sup>+</sup> (верхняя панель) и CD8<sup>+</sup> (нижняя панель) Т-клеток памяти у мышей, иммунизированных ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3, а также получивших препарат плацебо (ФСБ). Количество клеток, экспрессирующих IFN $\gamma$  среди популяции CD4<sup>+</sup> (А) и CD8<sup>+</sup> (Г) Т-клеток эффекторной памяти (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) в образцах легких иммунизированных мышей. Второй столбец: представлена доля CD69<sup>+</sup> клеток среди соответствующих популяций (Б, Д). Третий столбец: доля CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> клеток (В, Е). Достоверные различия между группами (критерий Манна-Уитни) показаны на рисунках, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 3.** Levels of tissue-resident CD4<sup>+</sup> (upper panel) and CD8<sup>+</sup> (lower panel) memory T cells in mice immunized with LAIV 6:2 and LAIV 5:3 as well as placebo treated (PBS). The number of cells expressing IFN $\gamma$  among CD4<sup>+</sup>(А) and CD8<sup>+</sup> (Д) effector memory T cells (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) in lung samples from immunized mice. Column 2: the proportion of CD69<sup>+</sup> cells among the corresponding populations (Б, Е). Column 3: the proportion of CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> cells (С, F). Significant differences

between the groups (Mann-Whitney criteria) are shown, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДАННЫЕ**

**Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку**

**Прокопенко Полина Игоревна** – младший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева;

адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

e-mail: pi.prokopenko@gmail.com.

**Polina I. Prokopenko** – junior researcher, Department of Virology;

address 197022, Saint-Petersburg 12, Acad. Pavlov Street;

telephone: 8(812)234-92-14;

e-mail: pi.prokopenko@gmail.com.

**Блок 2. Информация об авторах**

**Степанова Екатерина Алексеевна** – к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0002-8670-8645;

e-mail: [stepanova.ea@iemspb.ru](mailto:stepanova.ea@iemspb.ru)

**Ekaterina A. Stepanova** – PhD, leading researcher;

telephone: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0002-8670-8645;

e-mail: [stepanova.ea@iemspb.ru](mailto:stepanova.ea@iemspb.ru)

**Матюшенко Виктория Аркадьевна** – научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0002-4698-6085;

e-mail: [matyshenko@iemspb.ru](mailto:matyshenko@iemspb.ru)

**Victoria A. Matyushenko** – researcher;

telephone: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0002-4698-6085;

e-mail: [matyshenko@iemspb.ru](mailto:matyshenko@iemspb.ru)

**Чистякова Анна Константиновна** – лаборант-исследователь отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0001-9541-5636;

e-mail: [anna.k.chistiakova@gmail.com](mailto:anna.k.chistiakova@gmail.com)

**Anna K. Chistyakova** – research assistant;

telephone: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0001-9541-5636;

e-mail: [anna.k.chistiakova@gmail.com](mailto:anna.k.chistiakova@gmail.com)

**Костромитина Арина Дмитриевна** – лаборант-исследователь отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812) 234-92-14;

ORCID: 0000-0001-5432-0171;

e-mail: [arina8goshina@gmail.com](mailto:arina8goshina@gmail.com)

**Arina D. Kostromitina** – research assistant, PhD student;

telephone: 8(812) 234-92-14;

ORCID: 0000-0001-5432-0171;

e-mail: [arina8goshina@gmail.com](mailto:arina8goshina@gmail.com)

**Котомина Татьяна Сергеевна** – научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812) 234-92-14;

ORCID: 0000-0001-9999-089;

e-mail: [kotomina@iemspb.ru](mailto:kotomina@iemspb.ru)

**Tatiana S. Kotomina** – researcher;

telephone: 8(812) 234-92-14;

ORCID: 0000-0001-9999-089;

e-mail: [kotomina@iemspb.ru](mailto:kotomina@iemspb.ru)

**Рак Александра Яковлевна** – к.б.н., старший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0001-5552-9874

e-mail: [rak.ay@iemspb.ru](mailto:rak.ay@iemspb.ru)

**Alexandra Y. Rak** – PhD, senior researcher;

telephone: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0001-5552-9874

e-mail: [rak.ay@iemspb.ru](mailto:rak.ay@iemspb.ru)

**Рубинштейн Артём Аркадьевич** – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0002-8493-5211;

e-mail: [arrubin6@mail.ru](mailto:arrubin6@mail.ru)

**Artem A. Rubinstein** – junior researcher;

telephone: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0002-8493-5211;

e-mail: [arrubin6@mail.ru](mailto:arrubin6@mail.ru)

**Кудрявцев Игорь Владимирович** – к.б.н., доцент, заведующий лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

e-mail: kudryavtsev.iv@iemspb.ru;

**Igor V. Kudryavtsev** – assistant professor, head of the laboratory of cellular immunology;

telephone: 8(812)234-92-14;

e-mail: kudryavtsev.iv@iemspb.ru;

**Новицкая Влада Владиславовна** – лаборант-исследователь отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0009-0004-4260-7748;

e-mail: [novitskaya.vv@iemspb.ru](mailto:novitskaya.vv@iemspb.ru)

**Vlada V. Novitskaya** – research assistant, PhD student;

telephone: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0009-0004-4260-7748;

e-mail: [novitskaya.vv@iemspb.ru](mailto:novitskaya.vv@iemspb.ru)

**Руденко Лариса Георгиевна** – д.м.н., профессор, заведующая отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0002-0107-9959;

e-mail: [rudenko.lg@iemspb.ru](mailto:rudenko.lg@iemspb.ru)

**Larisa G. Rudenko** – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the virology department;

telephone: 8(812)234-92-14;

ORCID: 0000-0002-0107-9959;

e-mail: [rudenko.lg@iemspb.ru](mailto:rudenko.lg@iemspb.ru)

**Исакова-Сивак Ирина Николаевна** – д.б.н., член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12Д;

телефон: 8(812) 234-92-14;

ORCID: 0000-0002-2801-1508;

e-mail: [isakova.sivak@iemspb.ru](mailto:isakova.sivak@iemspb.ru)

**Irina N. Isakova-Sivak** – Doctor of Biological Sciences, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, head of the laboratory of immunology and prevention of viral infections;

telephone: 8(812) 234-92-14;

ORCID: 0000-0002-2801-1508;

e-mail: [isakova.sivak@iemspb.ru](mailto:isakova.sivak@iemspb.ru)

**Блок 3. Метаданные статьи**

ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО Т-КЛЕТОЧНОГО  
ИММУННОГО ОТВЕТА НА ЖИВУЮ ГРИППОЗНУЮ ВАКЦИНУ ПРИ  
ВКЛЮЧЕНИИ В СОСТАВ ВАКЦИННОГО ШТАММА ГЕНА  
НУКЛЕОПРОТЕИНА ОТ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА  
EPIDEMIC INFLUENZA VIRUS NUCLEOPROTEIN GENE INCORPORATED  
INTO VACCINE INFLUENZA VIRUS STRAIN GENOME TO OPTIMIZE  
SYSTEMIC AND LOCAL T-CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST LIVE  
ATTENUATED INFLUENZA VACCINE

**Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:**

УСИЛЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА ЖГВ  
ENHANCED T-CELL RESPONSE TO LAIV

**Ключевые слова:** вирус гриппа, живая гриппозная вакцина, нуклеопротеин, гуморальный иммунитет, IgG, эффекторная память, T<sub>ЕМ</sub>, тканерезидентные Т-клетки памяти, T<sub>RM</sub>.

**Keywords:** influenza virus, live influenza vaccine, nucleoprotein, humoral immunity, IgG, effector memory, T<sub>ЕМ</sub>, tissue-resident memory T cells, T<sub>RM</sub>.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 16, количество таблиц – 0, количество рисунков – 3.

01.02.2024

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

| Порядковый номер ссылки | Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные                                                                                                                                                                                                                                             | Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована | Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи                                                             |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                       | Bodewes R., Geelhoed-Mieras M. M., Wrammert J., Ahmed R., Wilson P. C., Fouchier R. A., Osterhaus A. D., Rimmelzwaan G. F. In vitro assessment of the immunological significance of a human monoclonal antibody directed to the influenza A virus nucleoprotein. Clin Vaccine Immunol., 2013, vol. 20, no. 8., pp. 1333-7. | -                                                                              | <a href="https://doi.org/10.1128/CVI.00339-13">https://doi.org/10.1128/CVI.00339-13</a>                   |
| 2                       | Burel J. G., Apte S. H., Groves P. L., McCarthy J. S., Doolan D. L. Polyfunctional and IFN- $\gamma$ monofunctional human CD4(+) T cell populations are molecularly distinct. JCI Insight, 2017, vol. 2, no 3, p. e87499.                                                                                                  | -                                                                              | <a href="https://doi.org/10.1172/jci.insight.87499">https://doi.org/10.1172/jci.insight.87499</a>         |
| 3                       | Cibrian D., Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. Eur J Immunol., 2017, vol. 47, no. 6, pp. 946-953.                                                                                                                                                                                     | -                                                                              | <a href="https://doi.org/10.1002/eji.201646837">https://doi.org/10.1002/eji.201646837</a>                 |
| 4                       | Deiss R. G., Arnold J. C., Chen W. J., Echols S., Fairchok M. P., Schofield C., Danaher P. J., McDonough E., Ridore M., Mor D., Burgess T. H., Millar E. V. Vaccine-associated reduction in                                                                                                                                | -                                                                              | <a href="https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.004">https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.004</a> |

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |   |                                                                                                                               |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | symptom severity among patients with influenza A/H3N2 disease. Vaccine, 2015, vol. 33, no. 51, pp. 7160-7167.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |   |                                                                                                                               |
| 5 | Flynn J. A., Weber T., Cejas P. J., Cox K. S., Touch S., Austin L. A., Ou Y., Citron M. P., Luo B., Gindy M. E., Bahl K., Ciaramella G., Espeseth A. S., Zhang L. Characterization of humoral and cell-mediated immunity induced by mRNA vaccines expressing influenza hemagglutinin stem and nucleoprotein in mice and nonhuman primates. Vaccine, 2022, vol. 40, no. 32, pp. 4412-4423.                        | - | <a href="https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.03.063">https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.03.063</a>                     |
| 6 | Godoy P., Romero A., Soldevila N., Torner N., Jane M., Martinez A., Cayla J. A., Rius C., Dominguez A., Working Group on Surveillance of Severe Influenza Hospitalized Cases in C. Influenza vaccine effectiveness in reducing severe outcomes over six influenza seasons, a case-case analysis, Spain, 2010/11 to 2015/16. Euro Surveill., 2018, vol. 23, no. 43.                                               | - | <a href="https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1700732">https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1700732</a> |
| 7 | Isakova-Sivak I., Stepanova E., Mezhenkaya D., Matyushenko V., Prokopenko P., Sychev I., Wong P. F., Rudenko L. Influenza vaccine: progress in a vaccine that elicits a broad immune response. Expert Rev Vaccines, 2021, vol. 20, no. 9, pp. 1097-1112.                                                                                                                                                         | - | <a href="https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.10.027">https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.10.027</a>                         |
| 8 | Isakova-Sivak I., Korenkov D., Smolonogina T., Tretiak T., Donina S., Rekstin A., Naykhin A., Shcherbik S., Pearce N., Chen L. M., Bousse T., Rudenko L. Comparative studies of infectivity, immunogenicity and cross-protective efficacy of live attenuated influenza vaccines containing nucleoprotein from cold-adapted or wild-type influenza virus in a mouse model. Virology, 2017, vol. 500, pp. 209-217. | - | <a href="https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1964961">https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1964961</a>                     |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |   |                                                                                                           |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9  | Iuliano A. D., Roguski K. M., Chang H. H., Muscatello D. J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J. M., Schanzer D., Cowling B. J., Wu P., Kyncl J., Ang L. W., Park M., Redlberger-Fritz M., Yu H., Espenhain L., Krishnan A., Emukule G., van Asten L., Pereira da Silva S., Aungkulanon S., Buchholz U., Widdowson M. A., Bresee J. S. Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. <i>Lancet</i> , 2018, vol. 391, no. 10127, pp. 1285-1300. | - | <a href="https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2">https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2</a> |
| 10 | Jegaskanda S., Co M. D. T., Cruz J., Subbarao K., Ennis F. A., Terajima M. Induction of H7N9-Cross-Reactive Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Antibodies by Human Seasonal Influenza A Viruses that are Directed Toward the Nucleoprotein. <i>J Infect Dis.</i> , 2017, vol. 215, no. 5, pp. 818-823.                                                                                                                                                                                                                                                           | - | <a href="https://doi.org/10.1093/infdis/jiw629">https://doi.org/10.1093/infdis/jiw629</a>                 |
| 11 | Kang S., Brown H. M., Hwang S. Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. <i>Immune Netw.</i> , 2018, vol. 18, no. 5, p. e33.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | - | <a href="https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e33">https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e33</a>               |
| 12 | Korenkov D. A., Laurie K. L., Reading P. C., Carolan L. A., Chan K. F., Isakova S., II, Smolonogina T. A., Subbarao K., Barr I. G., Villanueva J., Shcherbik S., Bousse T., Rudenko L. G. Safety, immunogenicity and protection of A(H3N2) live attenuated influenza vaccines containing wild-type nucleoprotein in a ferret model. <i>Infect Genet Evol.</i> , 2018, vol. 64, pp. 95-104.                                                                                                                                                                             | - | <a href="https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.019">https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.019</a>   |
| 13 | Lee Y.-T., Suarez-Ramirez J. E., Wu T., Redman J. M., Bouchard K., Hadley G. A., Cauley L. S. Environmental and antigen receptor-derived signals support sustained surveillance of the lungs                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | - | <a href="https://doi.org/10.1128/JVI.02493-10">https://doi.org/10.1128/JVI.02493-10</a>                   |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   |                                                                                                           |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | by pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. Journal of Virology, 2011, vol. 85, no. 9, pp. 4085-4094.                                                                                                                                                                                                                    |   |                                                                                                           |
| 14 | Mackay L. K., Braun A., Macleod B. L., Collins N., Tebartz C., Bedoui S., Carbone F. R., Gebhardt T. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. Journal of Immunology, 2015, vol. 194, no. 5, pp. 2059-2063.                                    | - | <a href="https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402256">https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402256</a>           |
| 15 | Makedonas G., Betts M. R. Polyfunctional analysis of human t cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. Springer Semin Immunopathol., 2006, vol. 28, no. 3, pp. 209-19.                                                                                                                   | - | <a href="https://doi.org/10.1007/s00281-006-0025-4">https://doi.org/10.1007/s00281-006-0025-4</a>         |
| 16 | Okoli G. N., Racovitan F., Abdulwahid T., Hyder S. K., Lansbury L., Righolt C. H., Mahmud S. M., Nguyen-Van-Tam J. S. Decline in Seasonal Influenza Vaccine Effectiveness With Vaccination Program Maturation: A Systematic Review and Meta-analysis. Open Forum Infect Dis., 2021, vol. 8, no. 3, p. ofab069.             | - | <a href="https://doi.org/10.1093/ofid/ofab069">https://doi.org/10.1093/ofid/ofab069</a>                   |
| 17 | Osterholm M. T., Kelley N. S., Sommer A., Belongia E. A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis., 2012, vol. 12, no. 1, pp. 36-44.                                                                                                                     | - | <a href="https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70295-X">https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70295-X</a> |
| 18 | Prokopenko P., Matyushenko V., Rak A., Stepanova E., Chistyakova A., Goshina A., Kudryavtsev I., Rudenko L., Isakova-Sivak I. Truncation of NS1 Protein Enhances T Cell-Mediated Cross-Protection of a Live Attenuated Influenza Vaccine Virus Expressing Wild-Type Nucleoprotein. Vaccines, 2023, vol. 11, no. 3, p. 501. | - | <a href="https://doi.org/10.3390/vaccines11030501">https://doi.org/10.3390/vaccines11030501</a>           |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |   |                                                                                                                     |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19 | Rak A., Isakova-Sivak I., Rudenko L. Nucleoprotein as a Promising Antigen for Broadly Protective Influenza Vaccines. Vaccines, 2023, vol. 11, no. 12, p. 1747.                                                                                                                                                                          | - | <a href="https://doi.org/10.3390/vaccines11121747">https://doi.org/10.3390/vaccines11121747</a>                     |
| 20 | Reed L. J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Epidemiology, 1938, vol. 27, no. 3, pp. 493-497.                                                                                                                                                                                       | - | <a href="https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408">https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408</a> |
| 21 | Rekstin A., Isakova-Sivak I., Petukhova G., Korenkov D., Losev I., Smolonogina T., Tretiak T., Donina S., Shcherbik S., Bousse T., Rudenko L. Immunogenicity and Cross Protection in Mice Afforded by Pandemic H1N1 Live Attenuated Influenza Vaccine Containing Wild-Type Nucleoprotein. Biomed Res Int., 2017, vol. 2017, p. 9359276. | - | <a href="https://doi.org/10.1155/2017/9359276">https://doi.org/10.1155/2017/9359276</a>                             |
| 22 | Schmidt A., Lapuente D. T Cell Immunity against Influenza: The Long Way from Animal Models Towards a Real-Life Universal Flu Vaccine. Viruses, 2021, vol. 13, no. 2, p. 199.                                                                                                                                                            | - | <a href="https://doi.org/10.3390/v13020199">https://doi.org/10.3390/v13020199</a>                                   |
| 23 | Skon C. N., Lee J.-Y., Anderson K. G., Masopust D., Hogquist K. A., Jameson S. C. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8 <sup>+</sup> T cells. Nature Immunology, 2013, vol. 14, no. 12, pp. 1285-1293.                                                                       | - | <a href="https://doi.org/10.1038/ni.2745">https://doi.org/10.1038/ni.2745</a>                                       |
| 24 | Szabo P. A., Miron M., Farber D. L. Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. Sci Immunol., 2019, vol. 4, no. 34.                                                                                                                                                                                | - | <a href="https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9673">https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9673</a>                 |
| 25 | Takamura S. Persistence in Temporary Lung Niches: A Survival Strategy of Lung-Resident Memory CD8(+) T Cells. Viral Immunol., 2017, vol. 30, no. 6, pp. 438-450.                                                                                                                                                                        | - | <a href="https://doi.org/10.1089/vim.2017.0016">https://doi.org/10.1089/vim.2017.0016</a>                           |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |   |                                                                                                         |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 26 | Topham D. J., Reilly E. C. Tissue-Resident Memory CD8(+) T Cells: From Phenotype to Function. <i>Front Immunol.</i> , 2018, vol. 9, p. 515.                                                                                                                                                                                                       | - | <a href="https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00515">https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00515</a>         |
| 27 | Vandervan H. A., Ana-Sosa-Batiz F., Jegaskanda S., Rockman S., Laurie K., Barr I., Chen W., Wines B., Hogarth P. M., Lambe T., Gilbert S. C., Parsons M. S., Kent S. J. What Lies Beneath: Antibody Dependent Natural Killer Cell Activation by Antibodies to Internal Influenza Virus Proteins. <i>EBioMedicine</i> , 2016, vol. 8, pp. 277-290. | - | <a href="https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.029">https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.029</a>   |
| 28 | Virelizier J. L., Allison A. C., Oxford J. S., Schild G. C. Early presence of ribonucleoprotein antigen on surface of influenza virus-infected cells. <i>Nature</i> , 1977, vol. 266, no. 5597, p. 52-4.                                                                                                                                          | - | <a href="https://doi.org/10.1038/266052a0">https://doi.org/10.1038/266052a0</a>                         |
| 29 | Wang W. C., Sayedahmed E. E., Sambhara S., Mittal S. K. Progress towards the Development of a Universal Influenza Vaccine. <i>Viruses</i> , 2022, vol. 14, no. 8.                                                                                                                                                                                 | - | <a href="https://doi.org/10.3390/v14081684">https://doi.org/10.3390/v14081684</a>                       |
| 30 | Wheelock E. F. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. <i>Science</i> , 1965, vol. 149, no. 3681, p. 310-1.                                                                                                                                                                                            | - | <a href="https://doi.org/10.1126/science.149.3681.310">https://doi.org/10.1126/science.149.3681.310</a> |
| 31 | Zhong W., Liu F., Dong L., Lu X., Hancock K., Reinherz E. L., Katz J. M., Sambhara S. Significant impact of sequence variations in the nucleoprotein on CD8 T cell-mediated cross-protection against influenza A virus infections. <i>PLoS One</i> , 2010, vol. 5, no. 5, p. e10583.                                                              | - | <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010583">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010583</a> |