10.46235/1028-7221-17539-DAI

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМОГО ВИРУСОМ ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА A/H9

Яковлев В. А. [1],
Боргоякова М. Б. [1],
Яковлева Е. В. [1],
Рудометова Н. Б. [1],
Макарова К. П. [1],
Старостина Е. В. [1],
Вахитов Д. И. [1],
Литвинова В. Р. [1],
Кисаков Д. Н. [1],
Карпенко Л. И. [1],
Ильичев А. А. [1],
Рудометов А. П. [1]

[1] ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, Отдел Биоинженерии, Россия

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.46235/1028-7221-17539-DAI

DEVELOPMENT AND IMMUNOGENICITY EVALUATION OF A DNA VACCINE AGAINST A DISEASE CAUSED BY THE AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE A/H9

Yakovlev V. A. [a],
Borgoyakova M. B. [a],
Yakovleva E. V. [a],
Rudometova N. B. [a],
Makarova K. P. [a],
Starostina E. V. [a],
Vahitov D. I. [a],
Litvinova V. R. [a],
Kisakov D. N. [a],
Karpenko L. I. [a],
Ilyichev A. A. [a],
Rudometov A. P. [a]

[a] FBIS SSC VB "Vector" of Rospotrebnadzor, Department of Bioengineering, Russia

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.46235/1028-7221-17539-DAI

Резюме

Подтип вируса гриппа птиц A/H9 отличается низкой патогенностью, но, несмотря на это, вызывает обеспокоенность ВОЗ из-за своей способности к быстрой генетической эволюции и активной реассортации с высокопатогенными вирусами гриппа птиц. Установлено, что вирусы A/H9 стали донорами сегментов генов для нескольких вызывающих опасения вирусов, включая A/H5N1 и A/H7N9. Нельзя исключать и потенциальное увеличение вирулентности вируса гриппа птиц подтипа A/H9 за счёт приобретения мутаций, влияющих на репликацию вируса, его стабильность, патогенность и интенсивность внутривидовой и межвидовой передачи. В связи с этим очевидна необходимость разработки эффективных вакцин против данного подтипа вируса. Вакцины на основе нуклеиновых кислот обладают рядом весьма важных преимуществ по сравнению с другими типами вакцин. Они способны стимулировать как гуморальный, так и Т-клеточный иммунный ответ, могут быть быстро наработаны, их крупномасштабное производство относительно простое и носит универсальный характер, не требуя работы с опасным патогеном и высоких экономических затрат. ДНК-вакцины – это платформенная технология, которая даёт возможность быстро менять целевой ген в конструкции без изменения условий производства. **Целью** данной работы были разработка ДНК-вакцины против заболевания, вызываемого ВГП подтипа A/H9, и анализ её иммуногенности на модели мышей линии BALB/c. **Материалы и методы.** В нашей работе был проведен дизайн и получение иммуногена, кодирующего гемагглютинин вируса гриппа птиц подтипа A/H9. Из нативной последовательности были удалены трансмембранный и цитоплазматический домены, а также внесен ряд мутаций для стабилизации белка. Для получения структуры иммуногена, соответствующей нативной, на С-конец был добавлен тримеризующий домен бактериофага Т4. Ген *h9*, кодирующий разработанный иммуноген, был клонирован в составе вектора pVAX1, и полученная конструкция была названа pVAX-H9. **Результаты.** Анализ иммуногенности полученной конструкции показал, что вакцина способна стимулировать как гуморальный, так и Т-клеточный иммунный ответ при иммунизации мышей линии BALB/c в дозе 100 мкг. При этом, количество спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на специфическую стимуляцию, в группе, иммунизированной pVAX-H9, было в 2 раза выше, чем в группе, иммунизированной рекомбинантным белком. Активация Т-клеточного иммунитета **имеет большое значение в защите организма от вирусов, в особенности вирусов гриппа, которые отличаются высокой изменчивостью**. **Выводы.** Полученные в ходе работы результаты указывают на перспективность разработанной ДНК-вакцины, а также используемого подхода к проектированию иммуногена. **ДНК-вакцину pVAX-H9 можно рассматривать как самостоятельный вакцинный препарат,** а также как компонент комбинированных схем иммунизации.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.46235/1028-7221-17539-DAI

Ключевые слова: Вирус гриппа, подтип A/H9, ДНК-вакцина, гемагглютинин, иммуногенность, струйная инжекция, Т-клеточный иммунный ответ.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

Abstract

The A/H9 avian influenza virus subtype is classified as low-pathogenic. However, this subtype remains a concern for the WHO due to its ability to undergo rapid genetic evolution and active reassortment with highly pathogenic avian influenza viruses. In this regard, there is a clear need to develop effective vaccines against this virus subtype. It is evident that nucleic acid-based vaccines possess numerous significant advantages in comparison to other vaccine types. These vaccines have the capacity to stimulate both humoral and T-cell immune responses and can be rapidly developed; their large-scale production is relatively straightforward and versatile, requiring neither work with dangerous pathogens nor high economic costs. **The aim** of this study was to develop a DNA vaccine against the disease caused by avian influenza virus subtype A/H9 and to evaluate its immunogenicity in a BALB/c mouse model. **Materials and methods.** In the present study, an immunogen encoding the hemagglutinin of the avian influenza virus subtype A/H9 was designed and produced. The transmembrane and cytoplasmic domains were excised from the native sequence, and a number of mutations were introduced to stabilize the protein. In order to obtain an immunogen structure corresponding to the native one, a T4 bacteriophage trimerization domain was added to the C-terminus. The H9 gene, which is responsible for encoding the developed immunogen, was then cloned into the pVAX1 vector. The resulting construct was named pVAX-H9. **Results.** Analysis of the immunogenicity of the construct demonstrated that the vaccine has the capacity to stimulate both humoral and T-cell immune responses when administered to BALB/c mice at a dose of 100 μg. Concurrently, the number of splenocytes producing IFN-γ in response to specific stimulation in the group immunized with pVAX-H9 was twice as high as in the group immunized with the recombinant protein. **Conclusions.** The results obtained in this study indicate the potential of the developed DNA vaccine and of the approach used for immunogen design. The pVAX-H9 DNA vaccine can be regarded as both a single vaccine and a component of combined immunization regimens.

Keywords: Influenza virus, subtype A/H9, DNA vaccine, hemagglutinin, immunogenicity, jet injection, T-cell immune response.

1 Введение

Глобальное распространение различных подтипов вируса гриппа птиц (ВГП) среди дикой и домашней птицы наносит ущерб сельскохозяйственной отрасли и обеспечивает предпосылки для межвидовой передачи вирусов. В последние два десятилетия документируется все больше случаев инфицирования людей ВГП подтипов A/H5, A/H7, A/H9 и A/H10. Подтип A/H9 был впервые обнаружен в Северной Америке во время вспышки низкопатогенного гриппа птиц у индеек в феврале 1966 года в Висконсине, США [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**,**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Впоследствии, ВГП этого подтипа стали одними из самых распространенных ВГП в Азиатском регионе. Для предотвращения заражения кур ВГП подтипа A/H9N2 в Китае с 1998 года проводится программа вакцинации с использованием инактивированных масляно-эмульсионных вакцин [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. За последние годы вирус активно мутировал, что привело к возникновению новых антигенных вариантов, из-за чего старые вакцины становятся менее эффективны для профилактики заболевания [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Подтип A/H9 отличается низкой патогенностью, но, несмотря на это, вызывает обеспокоенность ВОЗ из-за своей способности к быстрой генетической эволюции и активной реассортации с высокопатогенными вирусами гриппа птиц. Установлено, что вирусы A/H9 стали донорами сегментов генов для нескольких вызывающих опасения вирусов, включая подтипы A/H5N1 и A/H7N9 [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Нельзя исключать и потенциальное увеличение вирулентности ВГП подтипа A/H9 за счёт приобретения мутаций, влияющих на репликацию вируса, его стабильность, патогенность и интенсивность внутривидовой и межвидовой передачи [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. В связи с этим очевидна необходимость разработки эффективных вакцин против данного подтипа вируса [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Вакцины на основе нуклеиновых кислот обладают рядом весьма важных преимуществ по сравнению с другими типами вакцин. Они способны стимулировать как гуморальный, так и Т-клеточный иммунный ответ, могут быть быстро наработаны, их крупномасштабное производство относительно простое и носит универсальный характер, не требуя работы с опасным патогеном и высоких экономических затрат. Создание ДНК-вакцин – это платформа, которая даёт возможность быстро менять целевой ген в конструкции без изменения условий производства [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Это позволяет быстро реагировать на возникновение новых возбудителей, что особенно важно в контексте вакцин против гриппа [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Важность роли Т-клеточного ответа в развитии защитного поствакцинального иммунитета в последнее время становится всё более очевидной. И хотя для вакцин против гриппа наиболее релевантным критерием оценки эффективности остаётся уровень нейтрализующих антител,

клеточный иммунный ответ также способствует развитию гуморального ответа через индукцию Т-хелперов, а действие цитотоксических лимфоцитов помогает ликвидировать заражённые клетки, препятствуя развитию заболевания [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. К тому же Т-клеточный иммунный ответ часто оказывается перекрёстно-реактивным по отношению к разным субтипам вируса гриппа, так как его мишенями являются консервативные участки вирусных белков [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Для успешной стимуляции иммунного ответа при введении ДНК-вакцин необходимо использование систем доставки, так как в голом виде ДНК является низкоиммуногенной. В нашей работе мы выбрали в качестве метода доставки струйную инжекцию, уже показавшую свою состоятельность [**Ошибка! Источник ссылки не найден.,Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Данный метод является перспективным способом доставки вакцин на основе нуклеиновых кислот, который не только усиливает иммуногенность ДНК- и мРНК-вакцин, но и обеспечивает безопасное и мало болезненное введение препарата, а также позволяет уменьшить использование дополнительных компонентов, благодаря чему снижается реактогенность вакцины.

Целью данной работы были разработка ДНК-вакцины против заболевания, вызываемого ВГП подтипа A/H9, и анализ её иммуногенности на модели мышей линии BALB/c.

2 Материалы и методы

В нашей работе для проектирования ДНК-вакцины был выбран ген, кодирующий гемагглютинин ВГП подтипа A/H9, циркулировавшего в Приморском крае РФ среди сельскохозяйственной птицы в 2018 году - A/chicken/Primorsky_Krai/03/2018 (H9N2). В последовательность гена был внесен ряд изменений, обеспечивающий получение стабильного белка, подобного нативному.

Последовательность гена *h9,* кодирующего модифицированный гемагглютинин ВГП подтипа A/H9, была оптимизирована по кодонному составу для эффективной трансляции в клетках эукариот, синтезирована «ДНК-синтез» (Москва, РФ). Синтезированный ген клонировали в составе вектора pVAX1 по сайтам эндонуклеаз рестрикции *CciNI* и *EcoRI*. Структуру полученной конструкции, обозначенной как pVAX-H9, подтверждали секвенированием по Сэнгеру**.** Рекомбинантную плазмиду наработали и очистили в препаративных количествах с чистотой, необходимой для проведения иммунологических экспериментов.

Для оценки иммуногенных свойств ДНК-вакцины была проведена иммунизация мышей линии BALB/c. Работу с животными проводили в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Протоколы были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) при Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

В исследовании использовали самок мышей линии BALB/c массой 16–18 г, которых разделили на 3 группы. Группам вводили следующие препараты: 1 группе (n=6) вводили pVAX-H9 с использованием струйной инжекции (доза 100 мкг ДНК в 50 мкл физиологического раствора), 2 группе (n=6) (положительный контроль) внутримышечно вводили рекомбинантный белок H9 с 1% гидроокисью алюминия (доза 15 мкг белка на мышь), 3 группа (n=4) была сформирована для негативного контроля и состояла из интактных мышей. Иммунизацию ДНК-вакциной осуществляли с использованием опытного образца инжектора, разработанного по заказу ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия). Процедуру проводили двукратно с интервалом 21 день. Иммунный ответ оценивали на 35 сутки методами ИФА и ELISpot.

Для ИФА в качестве антигена использовали рекомбинантный белок H9, полученный в клетках CHO-K1, очищенный с помощью аффинной хроматографии с чистотой более 98% (белок получен в лаборатории рекомбинантных технологий ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора). ИФА проводили по стандартной методике, как описано ранее [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Титр определяли по последнему разведению сыворотки, давшему положительный ответ (значение оптической плотности, которое более чем в два раза превышало значение отрицательного контроля в лунках без добавления сыворотки).

Уровень Т-клеточного иммунного ответа у мышей определяли с помощью метода ELISpot с использованием набора Mouse Interferon gamma ELISPOT Kit (Abcam, США). Клетки спленоцитов, выделенные из селезёнок экспериментальных и контрольных животных, стимулировали пулом перекрывающихся вирус-специфических пептидов, рестриктируемых MHC класса I (H-2-Dd, H-2-Kd, H-2-Ld) и II (H2-IAd, H2-IEd) мышей BALB/c из последовательности гемагглютинина HA/H9, в концентрации 20 мкг/мл для каждого пептида. Число IFN-γ-продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpot-ридера (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Количественные данные представлены в виде среднего с диапазоном значений. Межгрупповые различия оценивались с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. При $p<0,05$ различия между группами считали статистически значимыми.

3 Результаты и обсуждение

Гемагглютинин является основным антигеном для разработки вакцин против гриппа. Иммунизация вакцинами на основе гемагглютинина индуцирует выработку нейтрализующих антител [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Для того, чтобы антиген сохранял структуру, приближенную к нативной, и при этом оставался стабильным, необходимо было внесение ряда модификаций в его последовательность. Ранее такой подход показал свою работоспособность в проводимых нами работах по

созданию иммуногена, кодирующего гемагглютинин вируса гриппа A/H5 [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Так, для стабилизации белка HA/H9 при изменении pH среды были внесены мутации в области pH-переключателей: H26W, K51I и E103I в регионе, кодирующем стебель гемагглютинина. Для сохранения нативной тримерной конформации, а также для получения стабильного растворимого продукта, на C-конец гемагглютинина был добавлен тримеризующий домен фибритина бактериофага T4, а цитоплазматический и трансмембранный домены были удалены из последовательности (рис. 1A).

Спроектированный ген *h9* был синтезирован и клонирован в составе плазмидного вектора pVAX1. На рисунке 1Б представлена карта полученной плазмиды, получившей название pVAX-H9.

Для оценки иммуногенности была проведена иммунизация мышей линии BALB/c препаратом полученной ДНК-вакцины pVAX-H9.

Анализ сывороток крови иммунизированных животных показал (рис. 2), что после двукратной иммунизации мышей ДНК-вакциной pVAX-H9 было выявлено статистически значимое увеличение уровня гуморального иммунного ответа (средний титр в ИФА составил $1:10^6$), что было сопоставимо с ответом на рекомбинантный белок H9, вводимый с гидроокисью алюминия в качестве адъюванта.

Т-клеточный ответ оценивали по способности спленоцитов реагировать высвобождением IFN-γ в ответ на стимуляцию пептидами, входящими в состав гемагглютинина H9. С помощью ELISpot было показано, что в группе животных, иммунизированных ДНК-вакциной, активировался специфический Т-клеточный иммунитет, выражающийся в значительном увеличении числа лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ. При этом в данной группе было отмечено двукратное увеличение уровня Т-клеточного ответа по сравнению с группой, иммунизированной рекомбинантным белком (51 спот против 22). Эти данные могут свидетельствовать о том, что ДНК-вакцина pVAX-H9 эффективно стимулирует специфический гуморальный и клеточный иммунные ответы за счет внутриклеточного синтеза белка [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

4 Заключение

Таким образом, ДНК-вакцина pVAX-H9, кодирующая модифицированный тример гемагглютинина ВГП подтипа A/H9, является перспективной разработкой в качестве средства иммунопрофилактики заболевания, вызываемого ВГП. Введение pVAX-H9 методом струйной инжекции привело к индукции как гуморального, так и Т-клеточного иммунного ответа, что имеет большое значение в защите организма от вирусов, в особенности вирусов гриппа, которые отличаются высокой изменчивостью. ДНК-вакцину pVAX-H9 можно рассматривать как самостоятельный вакцинный препарат, а также как компонент комбинированных схем иммунизации.

 10.46235/1028-7221-17539-DAI

Мы предполагаем, что доза в 100 мкг не является оптимальной, в соответствии с чем будет проведено дальнейшее изучение дозозависимых свойств полученной вакцины, а также исследование её протективного потенциала.

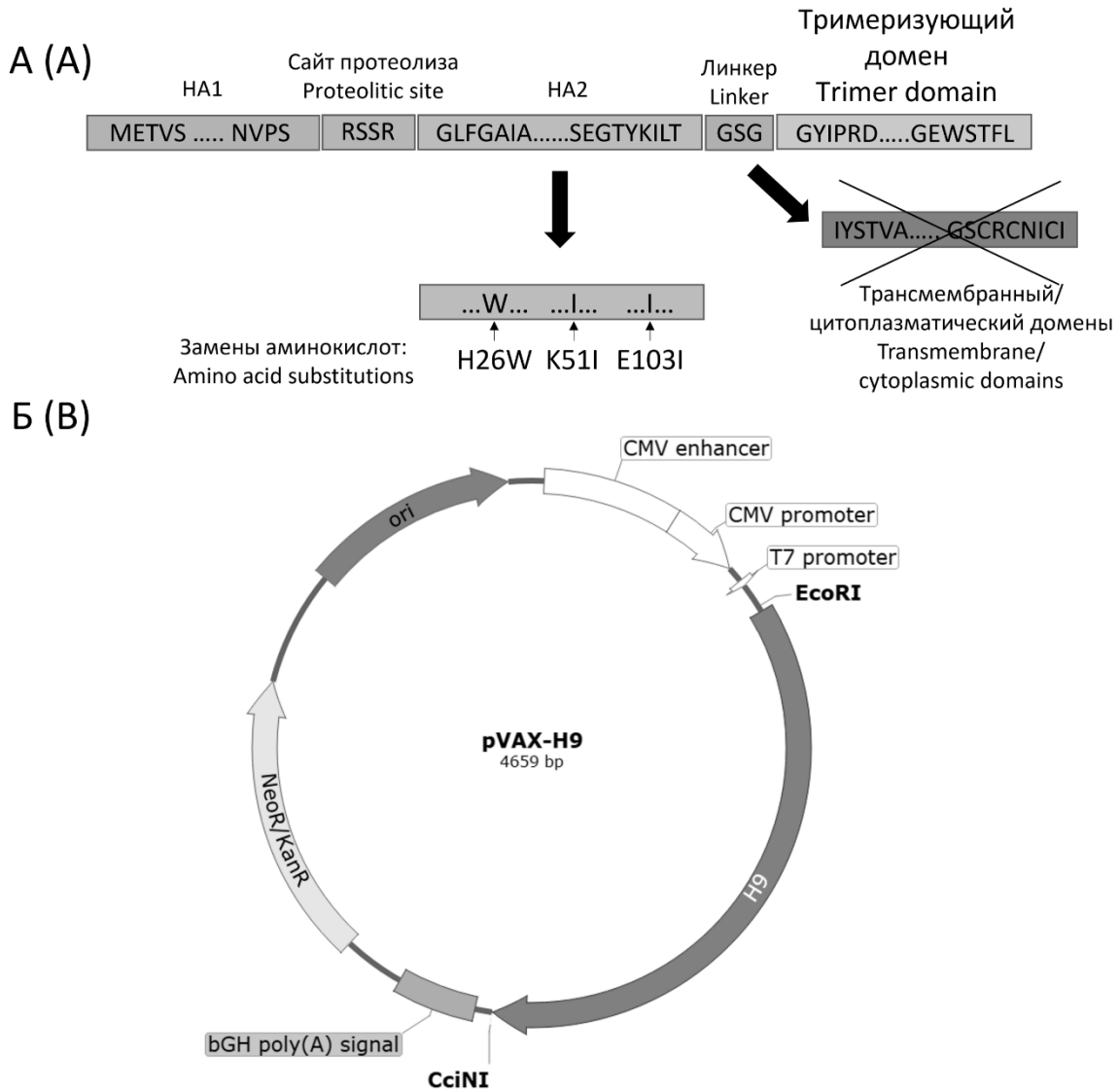
Работа выполнена в рамках Государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.46235/1028-7221-17539-DAI

РИСУНКИ

Рисунок 1. Модифицированный гемагглютинин h9 и ДНК-вакцина pVAX-H9.
Figure 1. Modified hemagglutinin h9 and the pVAX-H9 DNA vaccine.



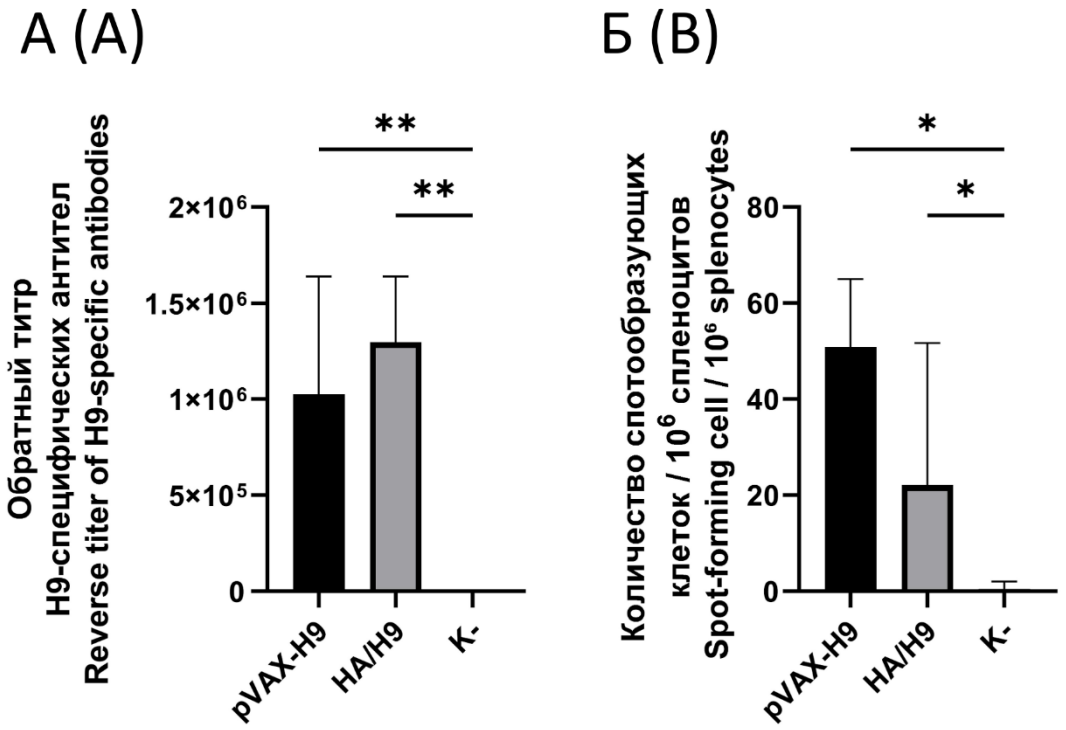
Примечание. А. Схематическое изображение модифицированного гемагглютинина, являющегося иммуногеном вакцины pVAX-H9. Б. Карта плазмиды pVAX-H9, составленная с использованием программы SnapGene 8.0.2.

Note. A. Schematic representation of modified hemagglutinin, which is the immunogen of the pVAX-H9 vaccine. B. Map of the pVAX-H9 plasmid, compiled using the SnapGene 8.0.2 program.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.46235/1028-7221-17539-DAI

Рисунок 2. Оценка иммунного ответа у иммунизированных мышей.
Figure 2. Evaluation of the immune response in immunized mice.



Примечание. А. Результат ИФА экспериментальных мышей линии BALB/c. Обратный титр (разведение) вирус-специфических антител (данные ИФА). Б. Результаты анализа ELISpot. Количество спленоцитов, экспрессирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определенное методом ELISpot. Данные на графиках представлены как среднее с диапазоном значений. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, по результатам анализа с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.
Note. A. ELISA results for experimental BALB/c mice. Reverse titer (dilution) of virus-specific antibodies (ELISA data). B. ELISpot results. The number of splenocytes expressing IFN-γ in response to stimulation with a pool of specific peptides was determined by the ELISpot. The data on the graphs are presented as the mean with a range. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ based on analysis using the nonparametric Mann–Whitney test.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.46235/1028-7221-17539-DAI

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Яковлев Владимир Андреевич, младший научный сотрудник отдела биоинженерии
Телефон: +7(950) 494-85-79
e-mail: yakovlev_va@vector.nsc.ru
Yakovlev Vladimir Andreevich, junior researcher of Bioengineering Department
Telephone: +7(950) 494-85-79
e-mail: yakovlev_va@vector.nsc.ru

Блок 2. Информация об авторах

Боргоякова Мария Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Borgoyakova Maria Borisovna, PhD in Biology, Senior Researcher

Яковлева Елена Витальевна, младший научный сотрудник
Yakovleva Elena Vitalievna, Junior Researcher

Рудометова Надежда Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Rudometova Nadezhda Borisovna, PhD in Biology, Senior Researcher

Макарова Кристина Петровна, стажер-исследователь
Makarova Kristina Petrovna, intern researcher

Старостина Екатерина Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Starostina Ekaterina Vladimirovna, PhD in Biology, Senior Researcher

Вахитов Данил Игоревич, стажер-исследователь
Danil Igorevich Vakhitov, Intern researcher

Литвинова Виктория Руслановна, младший научный сотрудник
Litvinova Victoria Ruslanovna, Junior Researcher

Кисаков Денис Николаевич, младший научный сотрудник
Denis Nikolaevich Kisakov, Junior Researcher

Карпенко Лариса Ивановна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник
Larisa Ivanovna Karpenko, Grand PhD in Biology, Associate Professor, Leading Researcher

Ильичев Александр Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник
Ilyichev Alexander Alekseevich, Grand PhD in Biology, Professor, Chief Researcher

Рудометов Андрей Павлович, кандидат биологических наук, исполняющий обязанности заведующего отделом биоинженерии

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.46235/1028-7221-17539-DAI
Rudometov Andrey Pavlovich, PhD in Biology, Acting Head of the Department of Bioengineering

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.46235/1028-7221-17539-DAI

Блок 3. Метаданные статьи

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМОГО ВИРУСОМ ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА A/H9

DEVELOPMENT AND IMMUNOGENICITY EVALUATION OF A DNA VACCINE AGAINST A DISEASE CAUSED BY THE AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE A/H9

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:
ВАКЦИНА ПРОТИВ ГРИППА ПОДТИПА A/H9
INFLUENZA SUBTYPE A/H9 VACCINE

Ключевые слова: Вирус гриппа, подтип A/H9, ДНК-вакцина, гемагглютинин, иммуногенность, струйная инжекция, Т-клеточный иммунный ответ.
Keywords: Influenza virus, subtype A/H9, DNA vaccine, hemagglutinin, immunogenicity, jet injection, T-cell immune response.

Краткие сообщения.
Количество страниц текста – 4,
Количество таблиц – 0,
Количество рисунков – 2.
01.05.2026

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Carnaccini S., Perez D.R. H9 Influenza Viruses: An Emerging Challenge. Cold Spring Harb. Perspect. Med., 2020, Vol. 10., no. 6, a038588.	-	https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/10/6/a038588.long [https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038588]
2	Flores Malavet V., Dhume K., Satchmei A., Arvelo A.C., Beaird A.J., Annamalai S.N., Kimball L.A., McKinstry K.K., Strutt T.M. Preexisting vaccine-primed heterosubtypic T cell immunity protects the maternal-fetal unit from adverse influenza outcomes in mice. J. Clin. Invest., 2025, Vol. 135, no. 1, e179230.	-	https://www.jci.org/articles/view/179230 [https://doi.org/10.1172/jci179230]
3	Hao M., Wang Y., Yang W., Xu M., Guan Y., Zhang Y., Chen J. Epitope-Optimized Influenza	-	https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5c03199 [https://doi.org/10.1021/acsnano.5c03199]

	Hemagglutinin Nanoparticle Vaccine Provides Broad Cross-Reactive Immunity against H9N2 Influenza Virus. ACS nano, 2025, Vol. 19, no. 22, pp. 20824–20840.		
4	Homme P.J., Easterday B.C. Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus. Avian Dis., 1970, Vol. 14, no. 1, pp. 66-74.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4314007/
5	Jones J.E., Lakdawala S.S. Host origin is a determinant of coevolution between gene segments of avian H9 influenza viruses. J. Virol., 2025, Vol. 99, no. 7, e0151824.	-	https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.01518-24 [https://doi.org/10.1128/jvi.01518-24]
6	Knipe D., Howley P. Fields Virology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp. 374-414.	-	https://www.researchgate.net/publication/305162795_Fields_virology_Sixth_edition
7	Leonard R.A., Spurrier M.A., Skavicus S., Luo Z., Heaton B.E., Spreng R.L., Hong J., Yuan F., Heaton N.S.	-	https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.00795-25 [https://doi.org/10.1128/jvi.00795-25]

	Development of DNA and mRNA-LNP vaccines against an H5N1 clade 2.3.4.4b influenza virus. J. Virol., 2025, Vol. 99, no. 8, e0079525.		
8	Li C., Yu K., Tian G., Yu D., Liu L., Jing B., Ping J., Chen H. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. Virology, 2005, Vol. 340, no. 1, pp. 70-83.	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682205003661?via%3Dihub [https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.025]
9	Li L., Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. Expert Rev. Vaccines, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 313-329.	-	https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14760584.2016.1124762 [https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124762]
10	Litvinova V.R., Rudometov A.P., Rudometova N.B., Kisakov D.N., Borgoyakova M.B., Kisakova L.A., Starostina E.V., Fando A.A., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Ivanova K.I., Gudymo A.S., Ilyicheva T.N., Marchenko V.Y., Sergeev A.A., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. DNA	-	https://www.mdpi.com/2076-393X/12/5/538 [https://doi.org/10.3390/vaccines12050538]

	Vaccine Encoding a Modified Hemagglutinin Trimer of Avian Influenza A Virus H5N8 Protects Mice from Viral Challenge. Vaccines, 2024, Vol. 12, no. 5, 538.		
11	Smithies L.K., Radloff D.B., Friedell R.W., Albright G.W., Misner V.E., Easterday B.C. Two different type A influenza virus infections in turkeys in Wisconsin. I. 1965-66 outbreak. Avian Dis., 1969, Vol. 13, no. 3, pp. 603-606.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5818060/
12	Sridhar S., Begom S., Bermingham A., Hoschler K., Adamson W., Carman W., Bean T., Barclay W., Deeks J.J., Lalvani A. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. Nat. Med., 2013, Vol. 19, no. 10, pp. 1305-1312.	-	https://www.nature.com/articles/nm.3350 [https://doi.org/10.1038/nm.3350]
13	Yakovlev V.A., Litvinova V.R., Rudometova N.B., Borgoyakova M.B., Tigeeva E.V., Starostina E.V., Ivanova	-	https://www.mdpi.com/2076-393X/13/8/883 [https://doi.org/10.3390/vaccines13080883]

	K.I., Gudymo A.S., Danilchenko N.V., Perfilyeva O.N., Makarova K.P., Vahitov D.I., Zaitsev B.N., Dmitrienko E.V., Sharabrin S.V., Krasnikova S.I., Kisakova L.A., Kisakov D.N., Ilyicheva T.N., Marchenko V.Y., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Ilyichev A.A. Immunogenic and Protective Properties of mRNA Vaccine Encoding Hemagglutinin of Avian Influenza A/H5N8 Virus, Delivered by Lipid Nanoparticles and Needle-Free Jet Injection. Vaccines, 2025, Vol. 13, no. 8, 883.		
14	Zhang J., Ma K., Li B., Chen Y., Qiu Z., Xing J., Huang J., Hu C., Huang Y., Li H., Liu D., Liao M., Qi W. A risk marker of tribasic hemagglutinin cleavage site in influenza A (H9N2) virus. Commun. Biol., 2021, Vol. 4, no. 1, 71.	-	https://www.nature.com/articles/s42003-020-01589-7 [https://doi.org/10.1038/s42003-020-01589-7]

15	Zhang N., Quan K., Chen Z., Hu Q., Nie M., Xu N., Gao R., Wang X., Qin T., Chen S., Peng D., Liu X. The emergence of new antigen branches of H9N2 avian influenza virus in China due to antigenic drift on hemagglutinin through antibody escape at immunodominant sites. Emerg. Microbes Infect., 2023, Vol. 12, no. 2, 2246582.	-	https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2023.2246582 [https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2246582]