

Обзор технологий для создания вакцин против бета-коронавирусов и вирус Сендай как возможный вакцинный вектор

Татьяна Зайчук^{1*}, Юрий Нечипуренко^{2*}, Алексей Аджубей^{2,3}, Сергей Оникиенко⁴, Валерий Черешнев⁵, Сергей Зайнутдинов⁶, Галина Кочнева⁶, Сергей Нетесов⁷ и Ольга Матвеева^{1,8}

1. Сендай Виралитикс, Актон, Массачусеттс, США
2. Институт Молекулярной Биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия
3. Университет Джорджа Вашингтона, Вашингтон, США
4. Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Петербург, Россия
5. Институт Иммунологии и Физиологии Уро РАН, Екатеринбург, Россия
6. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия
7. ФЕН, НГУ, Новосибирск, Россия
8. Биополимер Дизайн, Актон, Массачусеттс, США

**Первые два автора внесли одинаковый вклад, адреса для переписки
olga.matveeva@gmail.com, nech99@mail.ru*

Резюме

Статья посвящена анализу зарегистрированных на сайте Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) технологий, платформ и подходов к созданию протективной вакцины против бета-коронавирусов. Также в статье описаны проблемы, которые возникают при ее разработке. Кандидатные вакцинные препараты, получаемые на основании элементов вирусных белков или кодирующих их нуклеиновых кислот, обычно характеризуются низкой иммуногенностью, которая проявляется в низких титрах специфических нейтрализующих антител и слабом стимулировании Т-клеточного иммунитета. Подход к созданию вакцины на основании непатогенных вирусных векторов, которые бы прежде всего стимулировали Т-клеточный иммунитет в организме вакцинируемых, более перспективен. В обзоре описываются векторы, которыми воспользовались организации, перечисленные на сайте ВОЗ. В качестве одного из вариантов такого вектора авторы предлагают использовать непатогенный вирус Сендай. Разработка противокоронавирусных вакцин должна учитывать возможность антителизависимого усиления инфекции, которое наблюдалось при тестировании экспериментальных вакцин против бета-коронавирусов SARS-CoV-1 (SARS-CoV) и MERS-CoV на животных. Эти вакцины были сделаны на основании инактивированного вируса или векторных конструкций, экспрессирующих шиповидный S-белок. Вариабельность некоторых аминокислот в антигенных детерминантах этого белка, в частности рецептор-связывающего домена (RBD), может привести к такому же эффекту и при разработке вакцины против SARS-CoV-2. Необходим поиск антигенных детерминант

для конструирования такой эффективной вакцины против бета-коронавирусов, которая не будет вызывать антитело-зависимого усиления инфекции. В качестве дополнительных белков, несущих такие детерминанты, могут рассматриваться нуклеокапсидный белок N, белок, кодируемый девятой рамкой считывания ORF9b (ORF10), и протеаза NSP5, на которые, по предварительным данным, вырабатываются антитела у больных COVID-19.

Ключевые слова

SARS-CoV-2, COVID-19, антитело-зависимое усиление инфекции, АЗУИ, вакцина, вакцинный вектор, вирус Сендай, мышинный респировирус, консервативные антигенные детерминанты

Введение

Вирус SARS-CoV-2 является причиной заболевания под названием COVID-19, которое получило статус пандемии. Создание эффективной вакцины, направленной на консервативные антигены бета-коронавирусов, поможет ограничить распространение и предотвратить COVID-19 и другие заболевания, вызванные бета-коронавирусами или хотя бы ослабить их течение. В этой статье, как и в сходных статьях на ту же тему [1-4], мы анализируем подходы для создания такой вакцины, обсуждаем их достоинства и недостатки. В частности, мы представляем здесь обоснование для возможного применения в целях вакцинации векторной системы, основанной на вирусе Сендай.

Проблемы создания эффективной и безопасной вакцины

Доклинические и клинические исследования

Проверка безопасности, иммуногенности вакцины, а также ее способность предупреждать заражения патогеном должна проходить в два этапа. На первом этапе необходимо проводить проверку на животной модели, и только на втором - в человеческой популяции. В настоящее время животная модель для SARS-CoV-2 только разрабатывается и включают следующих экспериментальных животных: мышей, хомяков, хорьков и приматов [5-8]. Есть также данные, что вирус может вызывать болезнь у макак, и эти животные подходят для проверки эффективности вакцинации [9].

Клинические исследования вакцин на людях включают минимум три фазы. В первой фазе оценивается безопасность и иммуногенность вакцины на сравнительно небольшой выборке испытуемых.

Дизайн исследований фазы II обычно построен как рандомизированные контролируемые исследования, чтобы оценить безопасность и эффективность вакцины. Важная цель этих исследований — определить уровень дозирования и схему применения препарата для последующих исследований фазы III. Дозы препарата, которые получают добровольцы в исследованиях фазы II, обычно (хотя и не всегда) ниже, чем самые высокие дозы, которые вводились участникам в ходе фазы I. Исследования фазы II обычно проводятся на небольшой гомогенной (однородной) популяции добровольцев, отобранной по жестким критериям.

Исследования фазы III— рандомизированные контролируемые мультицентровые исследования с участием большой популяции добровольцев (300—3000 или больше, в зависимости от заболевания и страны). Эти исследования спланированы таким образом, чтобы получить надёжные статистические результаты о способности вакцины предотвращать инфекцию [10]. Желательно как можно раньше выяснить отсутствие у экспериментальной вакцины способности вызывать синдром антитело-зависимого усиления инфекции (см. ниже), хотя это может быть непростой задачей. Например, такой синдром удалось выявить только при массовой иммунизации детей на Филиппинах вакциной против вируса Денге (Dengvaxia) производства компании Санофи-Пастер [11].

Проблема антитело-зависимого усиления инфекции и ее возможное решение

Серьезной проблемой для разработки вакцин против коронавирусов может быть вторичный иммунный ответ, приводящий к антитело-зависимому усилению инфекции (АЗУИ) и развитию острого респираторного синдрома. Феномен АЗУИ [12-14] (antibody-dependent enhancement, ADE) описан для вирусов с геномом, несущим (+) цепь РНК и для коронавирусов в том числе [15-19].

Возможной причиной наличия этого феномена у бета-коронавирусов является антигенная изменчивость S-белка за счет высокой вариабельности многих аминокислот [20] и/или смены конформаций [21]. Антитела, выработанные на вакцинный вариант вируса с одними антигенными детерминантами S-белка, могут утратить свойство нейтрализовать вирус при реальной инфекции вирусами с видоизмененными детерминантами в этом белке (см. ниже). Такие антитела могут по-прежнему связываться с вирусом, но при этом иметь меньшую аффинность и образовывать менее стабильные комплексы по сравнению с комплексами, которые они образуют с «вакцинной» формой вируса. В результате комплекс антитело-вирус может выступать в качестве «троянского коня», помогая вирусу проникнуть в моноциты или макрофаги хозяина, и запустить в этих клетках инфекционный процесс. Такой же сценарий возможен, хотя и не обязателен, при вторичной инфекции вирусом после уже перенесенного заболевания или же при первичной инфекции в процессе ее развития в организме человека.

При заражении нового хозяина реально происходит инфекция не одним вариантом вируса, а целой популяцией генетически близкородственных вариантов, возникающих в результате мутаций в ходе репликации вируса в организме предыдущих хозяев [22]. Такая популяция получила название квази-вида. Концепция квази-видов по отношению к вирусным вариантам очень важна, поскольку она помогает понять, что для ускользания от иммунитета нового вирусного хозяина, вирусу вовсе не обязательно приобретать новые мутации, он может воспользоваться уже существующими, которые произошли при репликации у предыдущих хозяев. Некоторые варианты вирусных квази-видов могут нейтрализоваться антителами нового хозяина, а другие варианты вируса с худшей аффинностью к антителам могут получить эволюционное преимущество после неполноценной нейтрализации и размножиться. Именно эти варианты вируса с худшей аффинностью к антителам и могут вызвать АЗУИ.

На Рис. 1 представлена схема этого возможного процесса для SARS-CoV-1 (SARS-CoV) или SARS-CoV-2. Специфические антитела (IgG) при АЗУИ формируют несовершенные, непрочные комплексы с вирусом, помогая ему заражать лейкоциты хозяина, несущие рецептор Fcγ [13, 16, 23, 24]. Комплекс антитела с вирусом связывается с Fcγ рецептором лейкоцитов и поглощается этими клетками [25]. В норме этот процесс приводит к разрушению вируса внутри лейкоцита и выздоровлению, как показано в левой части рисунка. Однако при патологии, вирус, освободившись от антитела, начинает репликативный цикл внутри лейкоцита, как показано в правой части рисунка [15-19, 23, 24]. Коронавирус SARS-CoV-2, по предварительным данным, которые не прошли тщательной проверки, способен напрямую проникать в Т-лимфоциты за счет S-белка и, скорее всего, способен убивать эти клетки [26]. Однако, возможно, что кроме этого процесса, по аналогии с SARS-CoV-1 (SARS-CoV), вирус SARS-CoV-2 способен инфицировать несущие рецептор Fcγ лейкоциты (такие как моноциты и макрофаги) за счет комплексообразования с антителами, которые помогают вирусу проникнуть в эти клетки и начать реплицироваться. Этот процесс описан для разных бета-коронавирусов, включая SARS-CoV-1 (SARS-CoV) [15-19, 23, 24]. Он может приводить к массовой гибели иммунных клеток и, как следствие этой гибели, вызывать цитокиновый шторм. Специфические нейтрализующие антитела связывают вирус намного прочнее, и вирус полностью теряет способность инфицировать клетки. Более того, вирус, будучи внутри моноцита или макрофага, не может высвободиться после поглощения комплекса вирус-антитело и подвергается разрушению. Таким образом, комплекс вируса с специфическими нейтрализующими антителами приводит к элиминации вируса из организма, а комплекс с несовершенными антителами, у которых константа связывания ниже по сравнению с нейтрализующими антителами, – к репликации вируса в клетках иммунной системы, усилению инфекции и возможному цитокиновому шторму.

В работе [18] показано, что вирус SARS-CoV-1 (SARS-CoV) способен при помощи «несовершенных» антител проникать в макрофаги и начинать реплицироваться, однако вирус не способен производить в макрофагах инфекционные вирионы. Это может быть связано с тем, что макрофаги не экспрессируют в достаточном количестве сериновых протеаз, необходимых для активации вирионов. Однако, не исключено, что неактивные вирионы могут активироваться и становиться инфекционными при проникновении в клетки дыхательного эпителия, в мембранах которых (см. ниже) присутствуют нужные для активации протеазы.

Во многих лабораториях, изучающих животные модели инфекций, вызванных вирусами тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS), наблюдали значительные повреждения легких, связанные с АЗУИ [15-19, 27]. Кроме того, существует множество примеров того, что антитела класса IgG на антигены S-белка SARS-CoV-1 (SARS-CoV) вызывают тяжелое повреждение легких, опосредованное макрофагами, как у людей так и у человекообразных приматов [28]. АЗУИ может возникнуть и при повторном заражении после естественной инфекции. У кроликов, интраназально инфицированных MERS-CoV, развивалась легочная патология, характеризующаяся вирусемией и тяжелым воспалением легких. При

повторном заражении MERS-CoV, несмотря на наличие антител, кролики заболели снова и повреждения легких были более тяжелыми, чем во время первичной инфекции [28]. Инфекция вирусами SARS-CoV-1 (SARS-CoV) [29] или MERS-CoV [30] вызывала более тяжелую пневмонию у вакцинированных животных, несмотря на высокий уровень специфических нейтрализующих антител. Интересно, что изучение успешности вакцинации инактивированным вирусом на животных моделях приводит к сходным негативным результатам [31].

Следует отметить, что иногда разработчики оценивают успешность вакцины исключительно по ее способности вызывать производство антител, не вызывая серьезных патологий во внутренних органах животного через три дня после ре-инфекции вирусом [32]. Оценка безопасности вакцины по этим критериям недостаточна, поскольку она не позволяет анализировать синдром повреждения легких, который может возникнуть через 4-10 дней после реинфекции за счет АЗУИ [32]. Серьезным недостатком оценки безопасности вакцины на животных моделях является крайне маленький размер групп испытуемых животных. Иногда общий вывод о безопасности вакцины делали при изучении экспериментальной и контрольной групп всего с тремя животными в каждой [33].

Феномен АЗУИ, опосредованный антителами к полноразмерному S-белку вируса SARS-CoV-1 (SARS-CoV), наблюдали у человекообразных приматов. Несмотря на то, что вакцинация снижала вирусную нагрузку после заражения SARS-CoV-1, наличие IgG антител к S-белку у иммунизированных макак значительно усиливало воспалительное повреждение легких при реальной инфекции [28]. У людей иммунодоминантный эпитоп SARS-CoV-1 (SARS-CoV) S-белка индуцировал продукцию как специфических нейтрализующих антител, так и антител, усиливающих инфекцию [28].

В пользу гипотезы о том, что антитела к S-белку могут вредить пациентам, вызывая АЗУИ, говорят и следующие наблюдения. Сравнительный анализ специфического гуморального ответа показал, что у пациентов, умерших от SARS-CoV-1 (SARS-CoV) инфекции, специфические нейтрализующие антитела к S-белку вырабатывались значительно быстрее, чем у выздоровевших людей, а антитела к N белку не вырабатывались совсем [34, 35].

Экспрессия двух видов рецепторов FcγRIIa и FcγRIIb, но не FcγRI или FcγRIIa, индуцировала АЗУИ вызванное SARS-CoV-1 инфекцией [36]. При этом было показано, что тяжесть заболевания SARS, зависит от аллельного полиморфизма FcγRIIa; у индивидуумов с изоформой FcγRIIa рецептора, который взаимодействует как с IgG1, так и с IgG2, развивается более тяжелое заболевание, чем у индивидуумов с изоформой FcγRIIa рецептора, который связывается только с IgG2 [37].

Патофизиология заболеваний SARS и COVID-19, по мнению авторов работы [20], связана АЗУИ, проявляющемся в инфекции макрофагов и моноцитов. Авторы работы [20], считают, что эта инфекция является ключевым шагом в развитии болезни и ее эволюции от легкой формы до тяжелой с критическими симптомами. АЗУИ может

объяснить наблюдаемое нарушение регуляции иммунитета, включая апоптоз иммунных клеток, способствующий развитию Т-клеточной лимфопении, воспалительный каскад с накоплением макрофагов и нейтрофилов в легких, а также цитокиновый шторм [20].

С феноменом АЗУИ связано несколько гипотез, объясняющих протекание заболевания в более тяжелой форме при COVID-19 у пожилых людей. У пожилых людей, в результате иммуностарения, выработка антител идет медленнее, чем у молодых, и к тому времени, когда антитела выработались в нужном для нейтрализации вируса титре, вирус мутирует и меняет антигенные детерминанты и/или конформацию S-белка. В этом случае антитела начинают образовывать нестабильные комплексы с вирусом и «затаскивать» живой вирус в моноциты или макрофаги, где тот способен реплицироваться. При этом может развиваться генерализованная инфекция и цитокиновый шторм [38, 39]. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что количество IgG антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, обнаруженных в сыворотке 29 госпитализированных и протестированных пациентов, линейно коррелировало с возрастом больных, и чем выше был титр таких антител, тем тяжелее протекала болезнь [40, 41]. Кроме того, обнаружена положительная и значимая корреляция между количеством антител в крови и концентрацией маркера воспаления цитореактивного белка С [41].

Другая гипотеза, объясняющая протекание заболевания в более тяжелой форме при COVID-19 у пожилых людей по сравнению с молодыми, заключается в том, что у пожилых людей клетки иммунной памяти способны производить антитела к другим коронавирусам, которыми эти люди переболели в течение жизни. При столкновении с новой инфекцией клетки иммунологической памяти у этих людей начинают производить антитела, которые не очень эффективно связывают новый вариант коронавируса и не являются специфическими нейтрализующими. Это может происходить в результате того, что вирус SARS-CoV-2, по сравнению с ранее известными инфекционными вариантами бета-коронавирусов, уже изменил свои антигенные детерминанты, и антитела стали их хуже узнавать [42]. Так известно, что иммунологическая кросс-реактивность наблюдается между антигенами SARS-CoV-1 (SARS-CoV) и SARS-CoV-2 [43]. Антитела, производимые на основании клеток иммунологической памяти, появляются в организме раньше всего, остальные, которые являются продуктом распознавания новых антигенных детерминант вируса, запаздывают. В результате гибель иммунных клеток может наступить очень резко на ранних этапах инфекции, еще до того, как организм начнет производить достаточное количество специфических нейтрализующих антител для инактивации вируса. Этой гипотезе противоречит наблюдение о кратковременной иммунологической памяти В-клеток на бета-коронавирусы. Так, у 21 из 23 пациентов, 6 лет ранее переболевших SARS, антител IgG к вирусу не обнаруживалось. Однако, Т-клеточные ответы обнаруживались у 14 из 23 пациентов [44].

Механизм АЗУИ был изучен на примере меняющихся иммунодоминантных антигенных детерминант рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка бета-коронавирусов [17, 19]. У вирусов SARS-CoV-1 (SARS-CoV) и SARS-CoV-2 этот домен

высоко гомологичен и отвечает за связывание одного и того же мембранного клеточного рецептора ACE2, который является “входной дверью” для обоих вирусов [45]. Конформационные изменения RBD, которые могут приводить к АЗУИ у вируса, вызывающего SARS, обнаружены также и у вируса, вызывающего COVID-19 [17].

S-белок вируса существует в виде тримера, он состоит из трёх цепей, каждая из которых, в свою очередь, образует две субъединицы S1 и S2 [46]. Цепь S1 несёт рецептор-связывающий домен (RBD). Между S1 и S2 находится сайт разрезания сериновыми протеазами. Вирус приобретает способность инфицировать клетки только после того, как происходит протеолитическое расщепление и каждая цепь белка разделяется на две части. S1 может находиться в двух конформациях – открытой и закрытой (Рис. 2). Биофизическое исследование структуры S-белка SARS-CoV-2 и анализ структуры с разрешением в 3.5 А показали, что наиболее часто встречается белок, у которого в одной из молекул тримера RBD находится в открытой конформации [46]. В случае, если все три цепи не имеют мутаций, то есть эквивалентны, возможны четыре разных конформации тримера в растворе (если хотя бы одна из цепей отличается от других, таких конформаций может быть восемь).

Можно предположить, что антигенные детерминанты S-белка будут меняться в результате смены одной его конформации на другую. Специфические нейтрализующие антитела хозяина могут в этом случае утрачивать аффинность к вирусу и начинать образовывать с ним несовершенные и нестабильные комплексы, что приведет к АЗУИ. Заметим, что АЗУИ может быть обусловлено не только наличием ряда конформаций S-белка, но и быстрой скоростью мутирования кодирующего его гена [47], так что вакцины, выработанные на один вариант белка, могут провоцировать выработку антител, которые слабее связывают вирус, подвергшийся мутации.

Интересно, что иммунодоминантные эпитопы в S-белке SARS-CoV-2 формируют аминокислоты в позициях с координатами от 441 до 700 [34]. Согласно Национальному Центру Биоинформатики Китая [48], кандидатом на функцию, которая переключает один тип антигенной детерминанты на другой в S-белке, может быть аминокислота в позиции 614. В разных изолятах SARS-CoV-2 часто наблюдаются замены в этой позиции с аспарагиновой кислоты на глицин и наоборот (D614G). На сайте Национального Центра Биоинформатики Китая [48] указано положение 614 аминокислоты в трехмерной модели S-белка. Следует заметить, что аспарагиновая кислота находится здесь на границе участков бета-структуры и спирали типа полипролин II (согласно классификации вторичных структур белков, построенной Натальей Есиповой, Алексеем Аджубеем и соавторами [49, 50]). Хотя эта аминокислота находится на некотором расстоянии от RBD, можно предположить, что ее замена приведет к изменению общей конформации S-белка и смене некоторых антигенных детерминант, как это наблюдается в аллостерических белках. Замены аминокислот в RBD домене S-белка могут приводить к значительным изменениям инфекционности вируса SARS-CoV-2 [51]. Тщательный анализ изменчивости аминокислот в разных белках вируса SARS-CoV-2 был проведен в работе [20]. На Рис. 3 мы приводим схему консервативности аминокислот S- и N-белков вируса.

Механизм АЗУИ описан в недавно опубликованной работе для RBD S-белка MERS-CoV [19]. В работе показано, что моноклональные нейтрализующие антитела, специфичные к RBD, опосредуют проникновение вируса в иммунные клетки, функционально имитируя вирус-специфические рецепторы. Авторы считают, что антитела, направленные против других участков S-белка и не связанные с его конформационными изменениями, с меньшей вероятностью будут приводить к АЗУИ. Также показан доза-зависимый эффект степени тяжести АЗУИ от концентрации антител. Эти данные важны для разработки методов лечения и вакцин.

В другой работе [20], на основании анализа литературы делается вывод о том, что для SARS-CoV-1, MERS-CoV и SARS-CoV-2 существуют универсальный механизм заражения иммунных клеток, который приводят к АЗУИ.

Возможность АЗУИ ставит под вопрос эффективность практики переливания плазмы от выздоровевших доноров критически больным пациентам. Ведь нейтрализующие антитела донора могут утратить способность нейтрализовать вирус для реципиента плазмы и вызвать АЗУИ за счет уменьшения константы связывания в комплексе антиген-антитело. Существует мнение о необходимости проводить исследования как эффективности так и отсутствия побочных эффектов в виде АЗУИ у этой процедуры с опытными и контрольными группами пациентов [52].

Анализ иммунного ответа переболевших COVID-19 показывает, что IgG и IgM антитела вырабатываются не только на S-белок вируса, но и на нуклеокапсидный белок N, кодируемый девятой рамкой считывания ORF9b (ORF10), и протеазу NSP5 [40, 53, 54]. В связи с тем, что антитела на переменные участки белков SARS-CoV-2, в частности на S1-RBD, могут вызывать АЗУИ, необходимо проводить поиск консервативных иммунодоминантных доменов для конструирования вакцины. Такими возможными доменами могут являться участки S2 субъединицы S-белка, которая отвечает за слияние клеточной и вирусной мембран [20]. Ранее было показано, что антитела к пептидам HR1 и HR2 (heptad repeat 1, 2), расположенным в S2 субъединице SARS-CoV-1, блокировали Fc-опосредованную инфекцию иммунных клеток и предотвращали инфекцию в животных моделях. На основании этих данных, а также данных о консервативности S2 субъединицы авторы работы [20] предположили, что антитела на область S2 SARS-CoV-2 будут обладать широкой вирус-нейтрализующей активностью и даже предотвращать АЗУИ, индуцированное антителами к S1-RBD, за счёт блокирования слияния вируса и клетки.

Кроме указания мишеней для В-клеточного ответа, авторы этой [20] и других работ [55, 56] предлагают набор эволюционно консервативных линейных антигенных детерминант вирусных белков для конструирования вакцины, индуцирующей Т-клеточный иммунный ответ.

Т-клеточный иммунный ответ чрезвычайно важен для эффективного разрешения инфекции. Сравнение встречаемости и характеристики CD4⁺ Т-клеток, реагирующих на S-белок SARS-CoV-2, в крови у пациентов с COVID-19 и у здоровых людей показало, что из 18 пациентов с COVID-19 у 12 обнаружались Т-клетки, реагирующие на пептиды из N-

конца S-белка, у 15- на пептиды из С-конца. У пациентов, в крови которых такие Т-клетки отсутствовали, болезнь, как правило, протекала тяжелее [57].

Интересно, что S-реактивные CD4+ Т-клетки обнаружались у 24 из 68 здоровых доноров кровь которых была получена в 2018 году. Этот факт иллюстрирует кросс-реактивность Т-клеточного иммунного ответа, который может узнавать разные сезонные простудные коронавирусы и SARS-CoV-2 в том числе. Кроме того, у 18 здоровых участников исследования, которых протестировали на присутствие антител к простудным коронавирусам, антитела были найдены у всех, независимо от наличия S-реактивных Т-клеток [57]. Эти данные указывают на то, что кросс-реактивность между простудными сезонными вирусами и SARS-CoV-2 может проявляться как при развитии гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Однако первый может приводить к АЗУИ, а второй нет. Следовательно вакцины, стимулирующие Т-клеточный ответ представляют особую ценность.

Авторы некоторых работ демонстрируют отсутствие спровоцированного вакцинацией эффекта АЗУИ на животных моделях и клеточных культурах (см. например [58]). Используя вирусоподобные частицы, сделанные на основании S-белка SARS-CoV-2 экспрессированного в ретровирусном конструкте, было показано, что сыворотка животных, после иммунизации рекомбинантным RBD фрагментом S-белка, не способствует проникновению вирусоподобных частиц в клетки, экспрессирующие антитело-связывающие рецепторы макрофагов и моноцитов FcγRII (CD32). Однако очевидно, что эта работа лишь частично моделирует естественный процесс вирусной инфекции, поскольку не воспроизводит всего разнообразия природных последовательностей и конформаций S-белка SARS-CoV-2.

Таким образом, можно заключить, что из за существования риска АЗУИ вакцина, формирующая прежде всего гуморальный ответ организма нуждается в очень тщательной проверке на безопасность в модельных системах максимально приближенных к воспроизведению реальных инфекций и в клинических исследованиях. В то же время, вакцина, формирующая клеточный иммунитет на консервативные антигенные детерминанты, не будет провоцировать АЗУИ. Такую вакцину можно сделать на основании векторной системы нескольких вирусов, в том числе вируса Сендай, о котором речь пойдет ниже.

Проблема локализации инфекции SARS-CoV-2 в бронхиальном эпителии

Предполагается, что SARS-CoV-2 лучше всего реплицируется в клетках, которые экспрессируют ген ACE2 (в качестве входного вирусного рецептора) и ген сериновой протеазы TMPRSS2, которая разрезает S-белок и таким образом активирует вирусную частицу. Клетками, экспрессирующими оба этих гена, являются гоблет клетки в полости носа, которые секретируют слизь, транзиторные секреторные клетки (transient secretory cell type), находящиеся между гоблет и реснитчатыми (ciliated) клетками, пневмоциты первого и второго типа, которые поддерживают альвеолы, и энтероциты в тонком кишечнике, отвечающие за адсорбцию питательных веществ [6, 59, 60]. Таким образом

вакцина должна стимулировать образование специфических нейтрализующих антител прежде всего, чтобы защитить эти клетки. Клетки бронхиального эпителия в верхних дыхательных путях являются барьером для проникновения вирусов и бактерий внутрь организма. Специфические нейтрализующие антитела, которые появятся в организме в результате вакцинации, должны будут укрепить этот барьер и не дать вирусу проникнуть в бронхиальный эпителий, нейтрализовав его в дыхательных путях. При этом присутствие таких антител в крови, даже с высоким титром, может быть недостаточно для инактивации вируса именно в легочном эпителии [61]. Создание такой вакцины – достаточно сложная задача.

Технологии для создания вакцин

Вакцины, вызывающие иммунную реакцию на патоген, можно разделить на три категории. К первой категории относятся вакцины, содержащие живые, но ослабленные патогены, ко второй категории относятся вакцины, содержащие инактивированные патогены и, наконец, третью категорию составляют вакцины, в которых присутствуют только части патогенов [62]. У каждого из перечисленных вариантов вакцин есть свои достоинства и недостатки.

Аттенуированный вирус

Огромным достоинством вакцин, содержащих ослабленные вирусы, является их высокая иммуногенность за счет способности вызывать в клетках патоген-ассоциированные молекулярные паттерны – небольшие и разнообразные молекулы, отличные от молекул хозяина. Эти существующие в вирусе или вновь образованные после вирусной инфекции в клетке молекулы связываются с рецепторами опознавания паттерна патогена на поверхности клеток хозяина и активируют врожденный иммунитет. Они также помогают формированию эффективного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на вирусные антигены [63-65].

Особенно сильный каскад иммуногенных сигналов возникает при реакции на ослабленный (аттенуированный) вирус, если тот, несмотря на аттенуацию, все-таки способен попадать в клетки человека и вступать в репликативный цикл. Это происходит потому, что у многих вирусов в процессе репликации возникает двухцепочечная РНК, которая тоже является одним из патоген-ассоциированных молекулярных паттернов [66].

Трудности, которые сопровождают создание такой вакцины, взяла на себя компания Codagenix/Serum в Индии. Компания приступила к созданию ослабленного варианта вируса, который будет называться CDX-CoV [67]. Большим достоинством подобной вакцины может быть ее высокая иммуногенность, хотя генетическая стабильность полученных вакцинных вариантов вируса может быть невысокой. Кроме того, такая вакцина не может быть застрахована от АЗУИ эффекта.

Инактивированный вирус

Создать инактивированный вариант коронавируса SARS-CoV-2 для вакцины тоже не просто. Проект трудоемкий и дорогостоящий. Однако в настоящее время уже создан

штамм вируса, адаптированный к репликации в клеточной культуре Vero E6, экспрессирующей протеазу TMPRSS2, необходимую для активации S-белка вируса [68]. Наличие такого штамма существенно упрощает задачу.

Биореакторы, где могли бы происходить репликация и производство вируса, несмотря на все средства возможной защиты, создают некоторую биоопасность как для персонала на предприятии, на котором ведутся соответствующие работы, так и для жителей населенного пункта, где такое предприятие находится. Утечки из биореакторов возможны, и они могут быть опасны [69]. В то же время, следует отметить, что в биореакторах уже десятилетиями делают инактивированные вирусные вакцины против клещевого энцефалита, гепатита А и гриппа.

Компания Sinovac в Китае пошла по пути создания инактивированной вакцины [70] и достигла ощутимых результатов [9]. В частности, показано, что наработанный в культуре клеток VeroE6/TMPRSS2 и инактивированный бета-пропиолактоном вирус (вакцина PiCoVacc) может стимулировать образование нейтрализующих антител у животных в высоком титре (2,048-4,096). Все лабораторные животные, включая мышей, крыс и макак, вырабатывали широкий спектр нейтрализующих антител к 10 вариантам вируса SARS-CoV-2. Однако работа имеет ряд недостатков в объективной оценке возможности АЗУИ. Прежде всего, выборка животных для проверки отсутствия эффекта АЗУИ была очень маленькой. Кроме того, для подготовки вакцины использовали один клон вируса, полученный на клетках Vero, в котором S-белок, возможно, находится в одной «замороженной» конформации. Очевидно, что при вакцинации клонированным вирусом с шиповидным белком в одной конформации и проверке защиты от инфекции вирусом с шиповидным белком в той же конформации АЗУИ не проявится [9]. Тем не менее, можно предположить, что АЗУИ у этой вакцины проявится при естественной инфекции, которая сопровождается большим разнообразием квазивидов вируса.

Рекомбинантные вакцины

В связи с описанными выше проблемами, наибольшей перспективностью, по мнению авторов, обладают вакцины, основанные на технологии рекомбинантной ДНК, которые могут включать в себя только части патогенов или программируют создание вирусного белка прямо в организме человека. Преимущество таких вакцин заключается в простоте создания при сравнительной безопасности, а их недостатком – меньшая изученность, а также вариабельная и часто плохо предсказуемая иммуногенность.

Иммунизация при помощи ДНК, кодирующей вирусные антигены

Многие международные компании разрабатывают вакцины на основе молекулы ДНК, кодирующей белок, содержащий антигенные детерминанты вируса SARS-CoV-2. Исследовательский Институт Уолтера Рида (WRAIR) пошел по этому пути дальше всех, [71]. В этом институте при широком международном участии был создан кандидат для вакцины против бета-коронавируса MERS-CoV, который прошел первую фазу клинических исследований. Вакцинацию проводили плазмидной ДНК, кодирующей S-белок вирусной оболочки. Исследования показали, что вакцина безопасна, но у нее

сравнительно слабая иммуногенность. Так, специфические нейтрализующие антитела появлялись после вакцинации только у половины испытуемых. В то же время у трети вакцинированных даже после трех вакцинаций не возникало Т-клеточного иммунного ответа [72].

Согласно информационному бюллетеню ВОЗ [71], похожий подход (вакцинацию молекулами ДНК) разрабатывают еще три организации. Одна из них – американская компания Inovio, другая – компания Zydus Cadila, находящаяся в Индии, и, третья – международный коллектив, состоящий из нескольких компаний: Takis, Evvivaх и Applied DNA Sciences, базирующихся в основном в Италии.

Иммунизация антигенным белком, полученным в экспрессионных системах

По пути создания вакцины, использующей S-белок или его антигенные детерминанты, пошло более десятка разработчиков (см. табл. 1). Среди них стоит отметить китайскую компанию Clover Biopharmaceuticals, европейскую компанию Sanofi-Pasteur, датскую компанию AJ Vaccines, американские компании NovoVax, Heat Biologics в сотрудничестве с университетом Майами, EpiVax в сотрудничестве с Университетом в Джорджии, международную компанию GlaxoSmithKline в сотрудничестве с Университетом Квинсленда и другие. В России, согласно информации, озвученной журналистами [73], подобную вакцину на основе S-белка SARS-CoV-2 и вируса табачной мозаики, разрабатывает коллектив лаборатории под руководством академика И. Атабекова биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Иммунизация при помощи матричной РНК

Около десятка компаний из разных стран [71], включая американскую компанию Moderna [74] и российскую компанию Биокад [75], разрабатывают вакцины на основе матричной РНК, которая содержит информацию об аминокислотной последовательности белков патогенного вируса и способна направлять синтез этих белков в организме вакцинированного. Техническими проблемами при производстве таких вакцин являются нестабильность матричной РНК и её неэффективная доставка. Частично эти проблемы решаются нуклеозидной модификацией РНК и инкапсуляцией препаратов РНК с использованием катионных липидов, а также полимерных материалов, таких как дендримеры и других [76-79]. Дополнительной иммуностимуляции можно достичь при помощи добавления к препаратам мРНК нуклеозидов и различных носителей [80-82].

Несмотря на изящность и сравнительную кажущуюся простоту подготовки материала для РНК-вакцин, их способность к формированию эффективного и стабильного иммунитета, как гуморального, так и клеточного, изучена недостаточно, особенно в клинических исследованиях.

Клинические исследования, проведенные компаниями Moderna, Valera (A Moderna Venture) и CureVac AG с использованием для иммунизации препаратов мРНК против вирусов гриппа и бешенства [83, 84] выявили, что у большей части вакцинированных развивается достаточно слабый гуморальный иммунитет, который длится всего несколько

месяцев. Примерно у трети испытуемых не развивается Т-клеточный иммунитет к антигенным детерминантам вирус [84].

Недавно в прессе появилась информация о том, что вакцинации, которые проводит компания Moderna, приводят к синтезу вирусного белка в клетках вакцинируемых и к сероконверсии (производству нейтрализующих антител) по отношению к SARS-CoV-2, но вопрос о том, является ли титр нейтрализующих антител достаточным для предотвращения вирусной инфекции у испытуемых остается открытым [85].

Векторные вакцины

Существует еще один экспериментальный подход к вакцинации, который включает в себя экспрессию белковых антигенных детерминант патогенного вируса в векторном конструкторе на основе непатогенного для человека вируса. Преимуществом этого подхода является большая иммуногенность и способность индуцировать как клеточный, так и гуморальный иммунитет, достаточный для предотвращения инфекций патогенами. Недостатком подхода является его трудоемкость и необходимость проведения множественных этапов генетического конструирования. Следует отметить, что вакцины, созданные на основании этого подхода, пока прошли только первую стадию клинических исследований на людях [86] и до сих пор нет ни одной зарегистрированной вакцины, прошедшей вторую стадию. Однако в доклинических исследованиях показано, что эти вакцины индуцируют формирование эффективного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на вирусные антигены [63-65].

Особенно сильный каскад иммуногенных сигналов возникает при реакции на непатогенный вирусный вектор, который способен попадать в клетки человека и вступать в репликационный цикл. Это происходит потому, что у многих вирусов в процессе репликации возникает двухцепочечная РНК, которая тоже является одним из патоген-ассоциированных молекулярных паттернов [66].

Векторный вирус должен удовлетворять нескольким требованиям. Он должен быть безопасен для человека, не вызывать заболевания, но в то же время желательно, чтобы при попадании в организм человека он мог проходить один цикл репликации без дальнейшего развития инфекции. Векторный конструктор должен также иметь способность к трансляции вирусной РНК трансгена в клетках человека.

Известно несколько таких возможных векторных вирусов, например, вакцинный вирус кори, вирус осповакцины, аденовирусы и некоторые другие [87, 88].

Вакцины, основанные на непатогенных вирусах, сравнительно безопасны, но у людей могут выявляться антитела к вирусному вектору, которые могут ослабить иммунную реакцию на продукт встроенного трансгена с антигенными детерминантами [89]. Сравнительно большой уровень антител к вирусу кори в человеческой популяции, являющийся результатом всеобщей вакцинации, может стать препятствием для формирования иммунитета к конструктору, сделанному на основе соответствующей векторной системы.

Такая же проблема есть и у осповакцины. Иммунизация осповакциной была прекращена в 1980 году, поэтому у существенной части человеческой популяции, рожденных до этого года, могут быть антитела к этому вирусу. К аденовирусу серотипа 5 у людей также часто обнаруживаются антитела вследствие перенесенной инфекции [90]. Тем не менее, все эти вирусные векторы используются для создания рекомбинантных вакцин. По такому пути пошла группа Southern Research (SR) в сотрудничестве с Tonix Pharmaceuticals Holding Corp, базирующиеся в США [71].

Некоторые компании используют векторную платформу на основании аденовируса. Так, компания CanSino Biological Inc в сотрудничестве с Институтом Биотехнологии Пекина (Beijing Institute of Biotechnology) разрабатывает вакцину на основании аденовируса серотипа 5 [89]. Разработки компании находятся в первой стадии клинических исследований.

По пути использования вирусного вектора на основе вакцинного вируса кори, который является парамиксовирусом, идет несколько организаций. Например, этот подход разрабатывает Институт Пастера (Institute Pasteur) во Франции в сотрудничестве с центром Питтсбурга по вакцинным исследованиям (Pittsburg Center for Vaccine Research) в США и Университетом Темиса в Австралии (Temis University), а также компания Zydus Cadila, которая находится в Индии [71]. Подобный подход выбрали и Российские ученые из Института общей генетики РАН [91]. Аттенуированный вирус кори как векторная основа уже успешно использовался учеными из Германии для создания экспериментальной вакцины против MERS [92].

Интересен подход ученых из Китая, в котором используется в качестве векторной основы вирус парагриппа 5 [93]. Этот вирус, как и вирус кори, является парамиксовирусом. Он также имеет название Simian virus 5 (SV5) и canine parainfluenza virus 2 (PI2), и вызывает у собак инфекционный трахеобронхит [94]. Вирус парагриппа 5 не вызывает заболевания у человека, поэтому, возможно, что в человеческой популяции к этому вирусу нет антител, и он представляет хорошую потенциальную векторную основу для вакцины. Теоретически эффективную вакцину против COVID-19 можно разработать и на основе другого парамиксовируса, а именно вируса болезни Ньюкасла, который вызывает тяжелое заболевание у птиц, но сравнительно легкий конъюнктивит и фарингит у человека [95-97].

Вирус Сендай как векторная основа вакцины

Вирус Сендай (мышинный респировирус) является перспективным кандидатом векторной основы для создания вакцины против SARS-CoV-2. Его основным преимуществом по сравнению с другими векторными кандидатами является способность, не вызывая заболевания, проходить один репликационный цикл в клетках бронхиального эпителия человека [98], а также в дендритных клетках [99]. Вирус также способен размножаться в клетках бронхов приматов, не вызывая у приматов заболевания [100]. Таким образом, вирус Сендай способен доставить и в клетки бронхиального эпителия человека, и в его дендритные клетки как вирусные антигены коронавируса, так и продукт

своего репликационного цикла, а именно двухцепочечную РНК, которая является мощным патоген-ассоциированным паттерном, индуцирующим интерферон.

Вирус Сендай вызывает инфекционное заболевание только у грызунов и известен научному сообществу почти 70 лет. Все это время он активно использовался как модельный парамиксовирус в молекулярно-биологических исследованиях. Несмотря на длительное лабораторное использование, не было зарегистрировано ни одного случая заболеваний у человека или домашних животных. Более того, безопасность вируса была доказана непосредственно в клинических исследованиях. Живой вирус Сендай использовали в виде капель в нос взрослым и детям для исследования его иммуногенности по отношению к вирусу человеческого парагриппа 1-го типа. Исследования показали, что вирус Сендай не вызывал существенных побочных эффектов ни у взрослых, ни у детей, однако он хорошо иммунизировал испытуемых к человеческому вирусу [101, 102]. Этот эффект связан с тем, что вирус Сендай и вирус человеческого парагриппа 1 вызывают образование перекрестных антител [101, 102]. Результаты этих исследований являются доказательством безопасности вируса Сендай для людей, а также его способности быть эффективным респираторным иммуногеном.

Дополнительное преимущество вируса Сендай как вектора для вакцины к коронавирусу состоит в том, что его можно применять в форме капель для носа [101, 102]. Этот тип доставки вирусных антигенов также обеспечивает долговременную защиту слизистой оболочки именно дыхательных путей от вирусных патогенов, вызывающих ОРВИ, к которым относится SARS-CoV-2. Интересно, что интраназальная вакцинация парамиксовирусным вектором вируса парагриппа 5, экспрессирующим иммуногенные белки MERS-CoV, оказалась гораздо эффективнее внутримышечной в предотвращении инфекции у экспериментальных животных [93].

Более того, интраназальное введение, по сравнению с внутримышечными инъекциями, более эффективно в преодолении потенциально предсуществующего иммунитета к вирусу Сендай [103].

Этот предсуществующий иммунитет выражается в присутствии у многих людей антител к вирусу парагриппа первого типа (HPIV-1), которые перекрестно реагируют с вирусом Сендай. Исследование, опубликованное в 2011 году, продемонстрировало, что специфические нейтрализующие вирус Сендай IgG антитела (образовавшиеся вследствие перенесенной инфекции HPIV-1), могут быть обнаружены у 92,5% пациентов во всем мире со средним титром EC50 60,6 ME / мл [104]. Считается, что этот низкий титр не является препятствием для эффективной вакцинации векторами на основе вируса Сендай, поскольку не блокирует способность вакцины стимулировать гуморальный и антиген-специфический Т-клеточный иммунитет [105].

В доклинических исследованиях [106] и в клинических исследованиях [86] было показано, что вирус Сендай способен вызывать высокий уровень антиген-специфичных Т-клеточных ответов CD8+. Разработка вакцины против ВИЧ-инфекции с вектором, сконструированным на основе вируса Сендай, находится на втором этапе клинических

исследований. Эта вакцина включает в себя gag-белок ВИЧ-1. У людей она вызывает мощную индукцию Т-клеточного ответа и продукцию специфических нейтрализующих антител к белку gag в режиме прайм-буст [86, 106]. Вирус Сендай также использовался в качестве основы для разработки вакцин против туберкулеза [107, 108] и респираторно-синцитиального вируса (RSV) [109, 110]. Разработка вакцины против RSV находится в первой фазе клинических исследований [109].

Дополнительным достоинством вируса Сендай является его генетическая стабильность, он эволюционирует очень медленно, как и другие представители семейства *Paramyxoviridae* [111]. Этот вирус принадлежит к категории вирусов, которые регулируются «правилом шести» [112-114]. Как и геномы других парамиксовирусов, геном вируса Сендай обычно включает шесть генов, которые кодируют шесть основных белков. Низкий уровень гомологичной рекомбинации РНК в геномах парамиксовирусов, вероятно, является результатом необычного требования генома к полигексамерной длине ($6n + 0$) [114]. Такая эволюционная консервативность приводит к тому, что вирусный вектор на основе вируса Сендай является очень стабильной системой для экспрессии чужеродных генов.

Геном вируса Сендай представляет собой несегментированную РНК длиной 15384 нуклеотида и содержит некодирующие 3-штрих и 5-штрих области длиной около 50 нуклеотидов (Рис. 4). Они являются цис-элементами, необходимыми для репликации (как и у других респировирусов из семейства *Paramyxoviridae*). Последовательность генов вируса Сендай выглядит следующим образом: 3'-N-P-M-F-HN-L-5'. Эти гены кодируют соответственно белок нуклеокапсида (N), малую субъединицу РНК-полимеразы или фосфопротеин (P), матриксный белок (M), белок слияния (F), гемагглютинин-нейраминидазу (HN) и большую субъединицу РНК-полимеразы (L) [115-117].

Сравнительно простая структура генома вируса Сендай за последние два десятилетия вдохновляла многих исследователей на создание разнообразных генетических конструкций с использованием этого вируса в качестве векторной основы. За счет того, что репликация вируса происходит исключительно в цитоплазме, риск генетической интеграции вирусного генома в геном хозяина отсутствует. Конструкции на основе вектора Сендай создавались путем добавления чужеродных трансгенов или замены вирусных генов F, HN и M [102, 106, 107, 109, 110, 118-121]. Было показано, что ген размером более 3 тысяч пар нуклеотидов может быть встроен и экспрессирован в геноме вируса Сендай [120]

Чужеродные гены могут быть включены в геном вируса Сендай в нескольких местах, в том числе в некодирующую 3-штрих лидерную область перед NP геном [122], область между генами F и M [123], область между генами F и HN [124] и 3-штрих некодирующую область P гена [125]. Таким образом, создание генетического конструкта вируса Сендай, который бы экспрессировал иммуногенные гены коронавируса SARS-CoV-2, представляется возможным и обоснованным.

Дополнительным достоинством вируса Сендай в качестве вакцинного вектора является его способность эффективно реплицироваться в свободных от патогенов куриных яйцах с эмбрионами [126]. Кроме того, вирус Сендай можно адаптировать для

роста в клеточных линиях млекопитающих. Множественные циклы направленного отбора увеличивают титр вируса Сендай в различных клеточных культурах [127-129].

Наличие надежной животной модели является важным фактором для разработки успешной вакцины. Одной из потенциальных проблем при использовании вируса Сендай в качестве вакцинного вектора на модели грызунов является чувствительность мышей к инфекции, вызванной вирусом. Однако некоторые штаммы мышей, такие как C57Bl/6J, сравнительно устойчивы к вирусу и выздоравливают после инфекции. Эти мыши могут переносить высокую инфекционную дозу (10^5 EID₅₀) вируса Сендай [119, 130]. Крысы линии F344 также являются устойчивыми к этому вирусу [131].

Показано, что SARS-CoV-1 (SARS-CoV), который является близким родственником SARS-CoV-2, может реплицироваться в дыхательных путях мыши, кроме того, уже создана трансгенная мышь, чувствительная к SARS-CoV-2 инфекции [132]. Интересно, что у молодых мышей, в отличие от старых, несмотря на детектируемую вирусную репликацию в легких, клинические признаки заболевания при заражении SARS-CoV-1 (SARS-CoV) не развиваются [8]. Однако степень репликации вируса в дыхательных путях молодых мышей, даже без каких-либо признаков заболевания, может быть достаточной для оценки эффективности вакцины против SARS-CoV-1 (SARS-CoV) [133]. Эти наблюдения позволяют предположить наличие сходной восприимчивости дыхательных путей мышей или крыс к репликации вируса SARS-CoV-2 после циклов адаптации. Таким образом, гуморальные и клеточные иммунные ответы на кандидатную вакцину можно было бы оценить на мышинных или на крысиных животных моделях.

Сотрудники университета Фудан в г. Шанхай (Китай) вместе с коммерческими партнерами занимаются разработкой вакцины для профилактики COVID-19, используя репликативно-дефектный вариант вируса Сендай [134, 135]. Репликативно-компетентный векторный конструкт этого вируса также может быть использован для конструирования вакцины [86, 101, 102]. Оба типа векторов, способные к репликации и не способные, имеют свои плюсы и минусы. Авторы этой статьи, на основании анализа опыта других исследований в описанных выше работах, считают, что способный к репликации вектор имеет преимущества по сравнению с неспособным, поскольку репликативно-компетентный конструкт легче и дешевле производить, в результате он требует меньше этапов подготовки.

Мы полагаем, что векторная основа вируса Сендай является перспективным кандидатом для создания эффективной вакцины против COVID-19 и других бета-коронавирусов.

Заключение

Разработаны эффективные вакцины против полиомиелита и против краснухи, но до сих пор не созданы иммуногенные и безопасные вакцины против вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатита С и лихорадки Денге. Отсутствие вакцин к этим вирусам демонстрирует, что задача создания иммуногенных и безопасных вакцин к такого рода патогенам очень сложна. Особую проблему в создании таких вакцин представляет возможная индукция синдрома АЗУИ при столкновении организма с инфекцией после

вакцинации. Для преодоления этой проблемы вакцина должна быть, во-первых, направлена на стимулирование не только гуморального, но и клеточного иммунитета, а во-вторых, не должна быть направлена на переменные элементы последовательности вируса. К сожалению, S-белок вируса SARS-CoV-2 имеет переменные аминокислоты в своей последовательности, которые могут приводить к изменению его иммуногенных детерминант, в частности, за счёт смены конформации RBD. Следовательно, вакцины, направленные на этот белок и на этот домен, потенциально могут провоцировать АЗУИ. Именно эта проблема выявилась при тестировании экспериментальных вакцин против бета-коронавирусов SARS-CoV-1 (SARS-CoV) и MERS-CoV у животных.

Механизм вирусного заражения иммунных клеток (АЗУИ) может реализоваться как в ряде случаев тяжелого протекания болезни после первичного заражения вирусом, так и при повторном заражении. Иммунизация SARS-CoV-2 или сходными вирусами (играющими роль «плохих» вакцин) может усугубить заболевание у людей. Этот факт необходимо учитывать при исследовании заболевания и прогнозировании следующих волн эпидемии. Кроме того, возможный эффект АЗУИ нужно учитывать и при принятии решения о переливании крови доноров-реконвалесцентов больным пациентам. Специфические нейтрализующие антитела доноров могут помочь выздоровлению после такого переливания, но и, в отдельных случаях, частота которых нам неизвестна, усугубить протекание болезни за счет АЗУИ.

Авторы работы надеются, что в ближайшее время в литературе появятся публикации, которые позволят определиться с оптимальными участком генома вируса SARS-CoV-2, подходящим для использования в качестве иммуногена для вакцины. Можно ожидать, что достоинства вируса Сендай в качестве векторной платформы, а именно его безопасность, геномная стабильность и сравнительная простота генетического конструирования найдут применение при создании эффективной вакцины против COVID-19.

Беспрецедентный уровень сотрудничества специалистов разных областей биологии и медицины из разных стран, несомненно, закончится успехом в этом проекте. Не исключено, что в состав успешной международной иммуногенной вакцины войдут продукты разработок разных рекомбинантных технологий. По мнению авторов этой статьи, вирус Сендай, как векторная система, является кандидатом для такой успешной вакцинной разработки.

Благодарности

Авторы работы благодарны за конструктивное обсуждение работы и большую помощь в написании статьи М. Князевой (Massachusetts General Hospital, MA, USA), А. Сениной (Huntsman Cancer Institute, University of Utah, SLC UT, USA) П. Рабиновичу (Yale School of Medicine, New Haven, CT USA), У. Баштановой (University of Cambridge, Cambridge, UK), Д. Купрашу и Н. Есиповой (Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Москва) и С. Глаголеву (Гимназия 1543, Москва). Авторы также благодарны за проведение сравнительного биоинформатического анализа

последовательностей S-белка Е. Базыкину и К. Сафиной (Сколтех, Институт Проблем Передачи Информации им. Харкевича, Москва). Авторы работы благодарны за конструктивное обсуждение механизма антитело-зависимого усиления вирусной инфекции, которое помогло в написании этого манускрипта, П. Чумакову (ИМБ им. Энгельгардта РАН, Москва) и за помощь в оформлении рисунков О. Золотухиной (Издательство Арт Волхонка, Москва).

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013 - 2020 годы (тема № 01201363818).

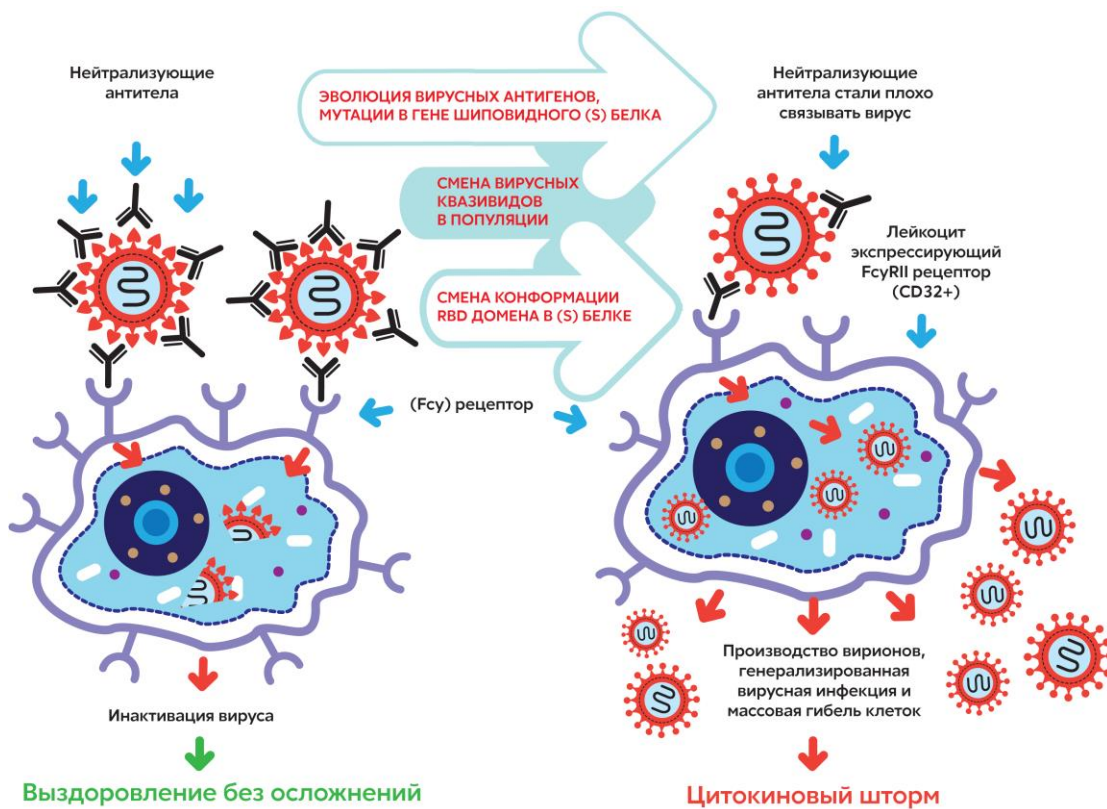


Рисунок 1. Схема антитело-зависимого усиления инфекции для SARS-CoV

Слева показан сценарий правильного иммунного ответа на бета-коронавирус, когда специфические нейтрализующие антитела способствуют элиминации вируса из организма. Справа представлен сценарий иммунопатологии, которая возникает при изменении антигена коронавирусов. Антитело-зависимое усиление инфекции (АЗУИ) наблюдается, когда специфические антитела (IgG) формируют несовершенные комплексы с вирусом. Комплекс антитела с вирусом связывается с Fcγ рецептором лейкоцитов и поглощается этими клетками. Далее, внутри клетки, вирус выходит из эндосомы, уже без антитела и начинает репликативный цикл [16, 23, 36]. Можно предположить, что SARS-CoV-2 тоже вызывает АЗУИ и делает это по сходному

механизму. Не исключено, что смена аминокислоты в 614 позиции S-белка отвечает за смену конформации этого белка и в конечном счете за АЗУИ.

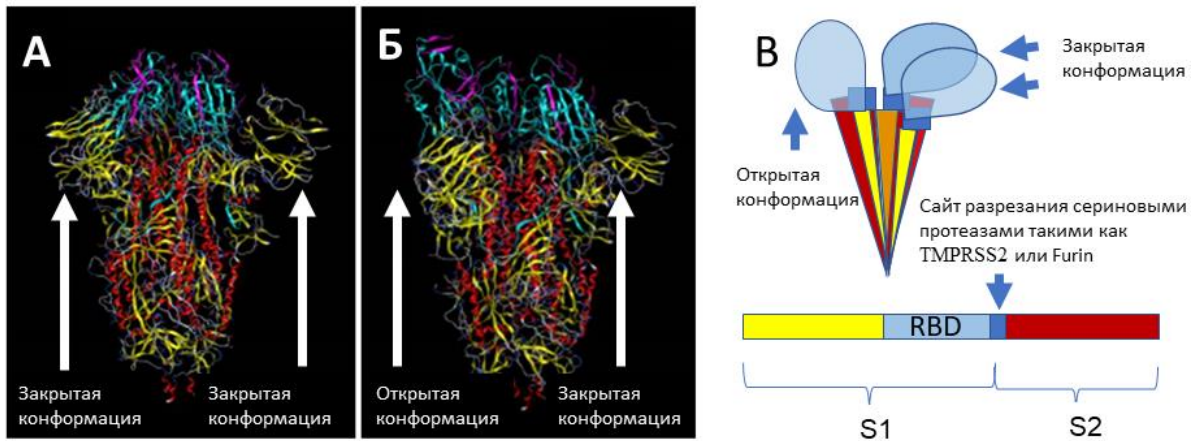


Рисунок 2. Две конформации S-белка. А - все три субъединицы S-белка в тримере находятся в закрытой конформации; Б - одна из них находится в открытой, две – в закрытой; В - схематично показаны разные конформации тримера, составленного из трех молекул S-белка. Голубым показан рецептор-связывающий домен (RBD) белка, который вместе с N-концевым доменом (показан желтым) составляют S1 субъединицу S-белка, красно-коричневым показана S2 субъединица белка. Синим показан сайт разрезания сериновыми протеазами такими как *Furin*, *TMPRSS2*. Слева – открытая конформация, справа – две закрытых. Внизу – структура белка в последовательности одной молекулы. Изображения взяты из PDB банка, источник – работа [17].

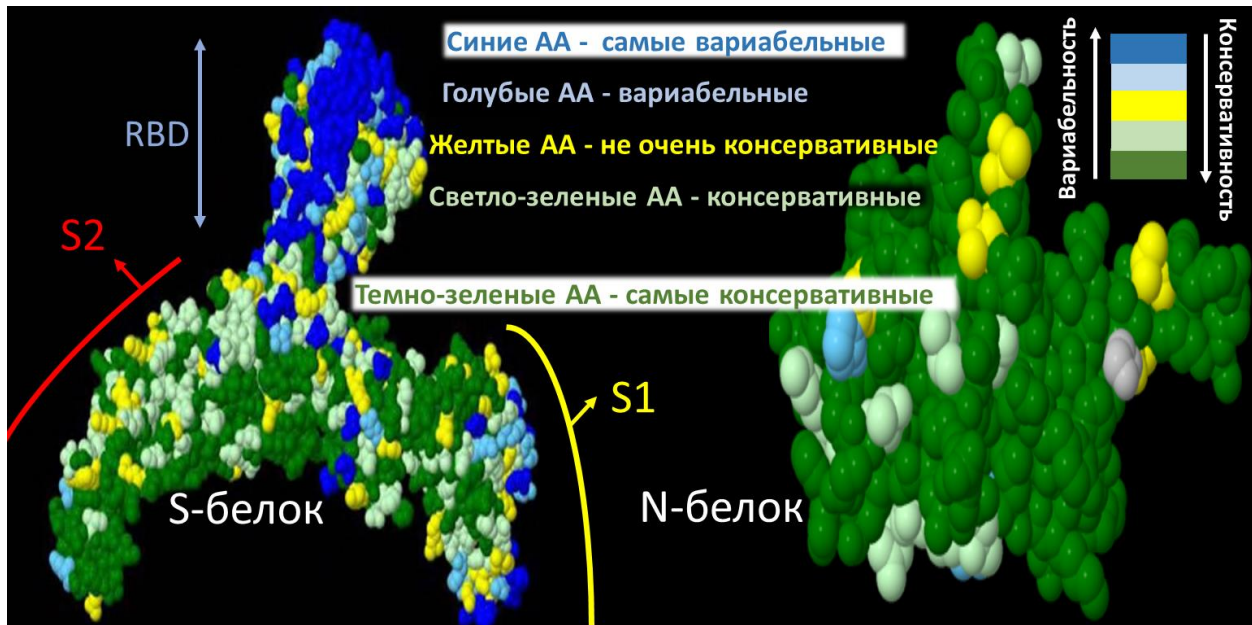
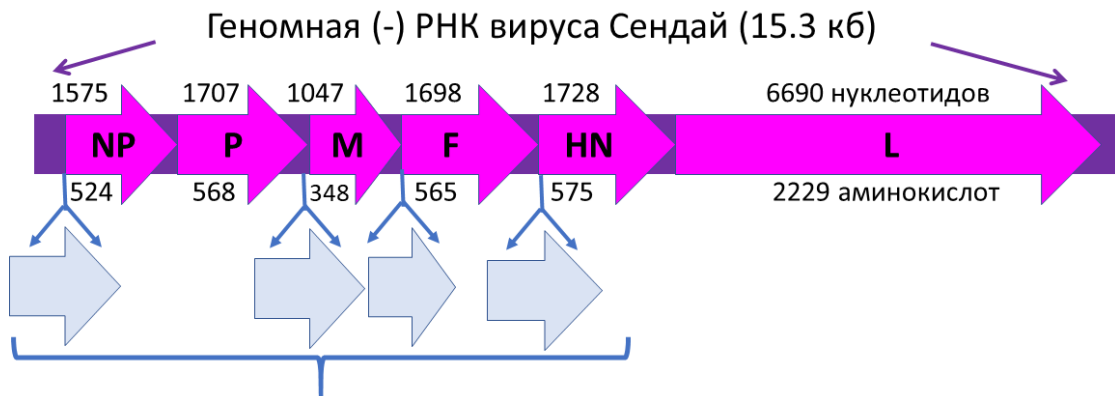
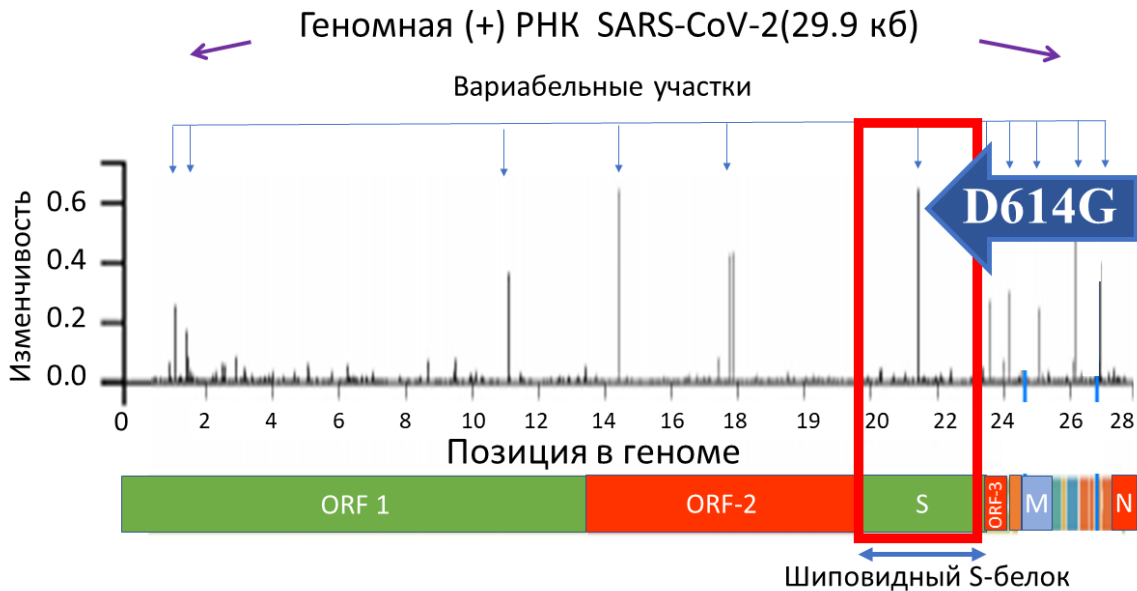


Рисунок 3. Модели S-белка и N-белка вируса SARS-CoV-2. Консервативные и переменные аминокислоты показаны разным цветом. Модели белков воспроизведены с модификациями из работы [20]. Предполагается, что аминокислотная изменчивость S-белка вируса связана с его большей экспонированностью в вирусной оболочке и как результат этого - антигенным дрейфом под давлением иммунного отбора антител хозяина [20].



Консервативные и протективно-значимые фрагменты генома SARS-CoV-2 для вставок в векторную последовательность

Рисунок 4. Схемы геномов вирусов Сендай и SARS-CoV-2

Вверху - геном вируса SARS-CoV-2, расположение кодируемых белков и изменчивость некоторых аминокислот этих белков в виде гистограммы. Шкала изменчивости по ординате показывает пропорцию аминокислот в каждой позиции в общем пуле штаммов (гистограмма построена в марте 2020 г. Центром Nextstrain [136])

Внизу - потенциальные сайты в геноме вируса Сендай, куда могли бы быть вставлены трансгены из генома SARS-CoV-2 [55, 56]. Трансгены могут кодировать консервативные детерминанты нуклеокапсидного белка N, белка ORF9b (ORF10) и протеазы NSP5, на которые вырабатываются антитела у больных COVID-19 [40, 53, 54].

Таблица 1. Список разрабатываемых вакцин против COVID-19, зарегистрированных ВОЗ на 20 марта 2020.

<i>Стадия клинических исследований (фаза I)</i>				
Платформа для создания потенциальной вакцины	Вектор и/или тип вакцинирующей молекулы	Разработчик	Стадия разработки/ регистрационный номер клинических исследований	Опыт использования технологии
Нереплицирующий вирусный вектор	аденовирус серотипа 5 Ad5-nCoV	CanSino Biological Inc. и Beijing Institute of Biotechnology [89]	ChiCTR2000030906	Инфекция вирусом Эбола
РНКовая субъединичная вакцина	мРНК инкапсулированная в липидных наночастицах	Moderna/NIAID	NCT04283461	Многочисленные инфекции
<i>Стадия доклинических исследований</i>				
Платформа	Вектор или тип вакцинирующей молекулы	Разработчик	Опыт использования технологии	
ДНК-вакцины	Плазмидная ДНК, электропорация	Inovio Pharmaceuticals [137]	Инфекции вирусами Ласса, Нипах, ВИЧ, Эбола, ВПЧ, Зика, гепатита В; онкологические заболевания	
	Линейная ДНК	Takis/Applied DNA Sciences/Evvivax [138]		
	Плазмидная ДНК	Zydus Cadila		
Инактивированный вирус	Инактивация формальдегидом плюс адъювант на основе алюминия	Sinovac	Острый респираторный синдром	

	(для Th2 иммунного ответа)		
Живой аттенуированный вирус	Живая аттенуированная вакцина	Codagenix/Serum Institute of India	Инфекции вирусами гепатита А, гриппа А, Зика, респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), Денге Производство вакцин для животноводства
Нереплицирующийся вирусный вектор	Репликативно-дефектный штамм вируса осповакцины MVA	GeoVax/BravoVax	Инфекции вирусами Марбурга, Ласса, Эболы и ВИЧ
	аденовирус 26 серотипа Ad26 (+/- MVA)	Janssen Pharmaceutical Companies	Инфекции вирусами Эболы, РСВ и ВИЧ
	аденовирус шимпанзе Оксфорд 1 (ChAdOx1)	University of Oxford	Инфекции вирусами гриппа, Зика, Чикунгунья; туберкулез, менингит, чума
	Аденовирусный вектор NasoVAX, экспрессирующий SARS2-CoV S белок в назальных эпителиальных клетках	Altimune	Инфекция вирусом гриппа
	Аденовирусный вектор, серотип 5	Greffex	Ближневосточный респираторный синдром
	Оральная вакцина на основании аденовирусного с вектора, серотип 5	Vaxart	Инфекции вирусами гриппа А, Зика, Чикунгунья, Ласса, Эбола, ВПЧ, лихорадки долины Рифт, Норуолк, энцефаломиелита
Реплицирующийся вирусный вектор	Вектор на основании вакцинного вируса кори	Zydus Cadila	
		Institute Pasteur/Themis/Univ of Pittsburg Center for Vaccine Research	Инфекции вирусами Западного Нила, Чикунгунья, Эбола, Зика, Ласса
	Вектор на основании осповакцины	Tonix Pharma/Southern Research	Инфекция вирусом оспы обезьян
Белковые субъединицы	Вирусоподобные	ExpreS2ion	

	частицы, экспрессируемые клетками дрозифилы		
	S-белок	WRAIR/USAMRIID	
	S-тример	Clover Biopharmaceuticals Inc./GSK	Инфекции вирусом ретикулоэндотелиоза, ВИЧ и гриппа
	Синтетические пептиды	Vaxil Bio	
	S-белок	AJ Vaccines	
	Вирусный пептид, химически связанный с Ii-Key пептидом, усиливающим активацию CD4+ T	Generex/EpiVax	Инфекции вирусами ВИЧ, гриппа, острый респираторный синдром
	S-белок	EpiVax/Univ. of Georgia	Птичий грипп, вызванный вирусным штаммом H7N9
	S-белок в бакуловирусном векторе	Sanofi Pasteur	Грипп, острый респираторный синдром
	Наночастицы с полноразмерными S-тримерами с добавленным адьювантом	Novavax [139]	Инфекции вирусами ветряной оспы, Эболы, ВПЧ
	Gr-96 основа	Heat Biologics/Univ. Of Miami	Инфекции вирусами Зика, ВИЧ; малярия; онкологические заболевания
	S-белок стабилизированный с помощью технологии «молекулярного зажима»	University of Queensland/GSK [140]	Инфекции вирусами Ласса, Нипах и Эбола
	Рекомбинантный S-белок или его пептид, соответствующий	Baylor College of Medicine	Острый респираторный синдром

	рецептор-связывающему домену		
	Вакцина на основе трансгенных растений	iBio/CC-Pharming	Инфекции вирусами жёлтой лихорадки, гриппа, ВПЧ, ВИЧ, острый респираторный синдром и ближневосточный респираторный синдром
Белковая субъединичная вакцина	Субъединица S1 S-белка	VIDO-InterVac, University of Saskatchewan	
	Пептид с микросферной системой доставки с добавленным адьювантом	University of Saskatchewan	

Список литературы

1. Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity*. 2020. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.007. PubMed PMID: 32259480; PubMed Central PMCID: PMC7136867.
2. Zhang J, Zeng H, Gu J, Li H, Zheng L, Zou Q. Progress and Prospects on Vaccine Development against SARS-CoV-2. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(2). doi: 10.3390/vaccines8020153. PubMed PMID: 32235387.
3. Chen WH, Strych U, Hotez PJ, Bottazzi ME. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *Curr Trop Med Rep*. 2020:1-4. doi: 10.1007/s40475-020-00201-6. PubMed PMID: 32219057; PubMed Central PMCID: PMC7094941.
4. Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature* 2020.
5. Koen J. Mice, hamsters, ferrets, monkeys. Which lab animals can help defeat the new coronavirus? 2020. Available from: <https://www.sciencemag.org/news/2020/04/mice-hamsters-ferrets-monkeys-which-lab-animals-can-help-defeat-new-coronavirus>.
6. Rockx B, Kuiken T, Herfst S, Bestebroer T, Lamers MM, Oude Munnink BB, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*. 2020. doi: 10.1126/science.abb7314. PubMed PMID: 32303590.
7. Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis*. 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa325. PubMed PMID: 32215622.
8. Gretebeck LM, Subbarao K. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Curr Opin Virol*. 2015;13:123-9. doi: 10.1016/j.coviro.2015.06.009. PubMed PMID: 26184451; PubMed Central PMCID: PMC4550498.
9. Qiang Gao, Linlin Bao, all HMa. Rapid development of an inactivated vaccine for SARS-CoV-2 BioRxivs. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046375>.

10. Baicus A. History of polio vaccination. *World J Virol.* 2012;1(4):108-14. doi: 10.5501/wjv.v1.i4.108. PubMed PMID: 24175215; PubMed Central PMCID: PMC3782271.
11. Soucheray S. Sanofi restricts dengue vaccine but downplays antibody enhancement 2017. Available from: <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/12/sanofi-restricts-dengue-vaccine-downplays-antibody-enhancement>.
12. Миронов А.Н., Супотницкий М.В., Е.В. Л. Феномен антитело-зависимого усиления инфекции у вакцинированных и переболевших БиоПрепараты, профилактика, диагностика, лечение. 2013.
13. Tirado SM, Yoon KJ. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol.* 2003;16(1):69-86. doi: 10.1089/088282403763635465. PubMed PMID: 12725690.
14. Супотницкий МВ. Неудобная иммунология. Актуальная инфектология. 2016;2(11).
15. Jaume M, Yip MS, Kam YW, Cheung CY, Kien F, Roberts A, et al. SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralisation and enhancement. *Hong Kong Med J.* 2012;18 Suppl 2:31-6. PubMed PMID: 22311359.
16. Yip MS, Leung NH, Cheung CY, Li PH, Lee HH, Daeron M, et al. Antibody-dependent infection of human macrophages by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virol J.* 2014;11:82. doi: 10.1186/1743-422X-11-82. PubMed PMID: 24885320; PubMed Central PMCID: PMC4018502.
17. Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T, et al. Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS Infect Dis.* 2016;2(5):361-76. doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00006. PubMed PMID: 27627203; PubMed Central PMCID: PMC47075522.
18. Yip MS, Leung HL, Li PH, Cheung CY, Dutry I, Li D, et al. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong Kong Med J.* 2016;22(3 Suppl 4):25-31. PubMed PMID: 27390007.
19. Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol.* 2020;94(5). doi: 10.1128/JVI.02015-19. PubMed PMID: 31826992; PubMed Central PMCID: PMC7022351.
20. Darrell O. Ricke, Malone RW. Medical Countermeasures Analysis of 2019-nCoV and Vaccine Risks for AntibodyDependent Enhancement (ADE). *The Lancet* (preprint). 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3546070>.
21. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281-92 e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058. PubMed PMID: 32155444; PubMed Central PMCID: PMC7102599.
22. Lu IN, Muller CP, He FQ. Applying next-generation sequencing to unravel the mutational landscape in viral quasispecies: A mini-review. *Virus Res.* 2020:197963. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197963. PubMed PMID: 32278821; PubMed Central PMCID: PMC7144618.
23. Li L, Wo J, Shao J, Zhu H, Wu N, Li M, et al. SARS-coronavirus replicates in mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) from SARS patients. *J Clin Virol.* 2003;28(3):239-44. doi: 10.1016/s1386-6532(03)00195-1. PubMed PMID: 14522061; PubMed Central PMCID: PMC7128964.
24. Yilla M, Harcourt BH, Hickman CJ, McGrew M, Tamin A, Goldsmith CS, et al. SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. *Virus Res.* 2005;107(1):93-101. doi: 10.1016/j.virusres.2004.09.004. PubMed PMID: 15567038; PubMed Central PMCID: PMC7114182.
25. Iwasaki A, Yang Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020. doi: 10.1038/s41577-020-0321-6. PubMed PMID: 32317716.
26. Wang X, Xu W, Hu G, Xia S, Sun Z, Liu Z, et al. SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion. *Cell Mol Immunol.* 2020. doi: 10.1038/s41423-020-0424-9. PubMed PMID: 32265513.

27. Perlman S, Dandekar AA. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):917-27. doi: 10.1038/nri1732. PubMed PMID: 16322745; PubMed Central PMCID: PMCPMC7097326.
28. Liu L, Wei Q, Lin Q, Fang J, Wang H, Kwok H, et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight.* 2019;4(4). doi: 10.1172/jci.insight.123158. PubMed PMID: 30830861; PubMed Central PMCID: PMCPMC6478436.
29. Tseng CT, Sbrana E, Iwata-Yoshikawa N, Newman PC, Garron T, Atmar RL, et al. Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS One.* 2012;7(4):e35421. doi: 10.1371/journal.pone.0035421. PubMed PMID: 22536382; PubMed Central PMCID: PMCPMC3335060.
30. Agrawal AS, Tao X, Algaissi A, Garron T, Narayanan K, Peng BH, et al. Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(9):2351-6. doi: 10.1080/21645515.2016.1177688. PubMed PMID: 27269431; PubMed Central PMCID: PMCPMC5027702.
31. Bolles M, Deming D, Long K, Agnihotram S, Whitmore A, Ferris M, et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J Virol.* 2011;85(23):12201-15. doi: 10.1128/JVI.06048-11. PubMed PMID: 21937658; PubMed Central PMCID: PMCPMC3209347.
32. Roberts A, Lamirande EW, Vogel L, Baras B, Goossens G, Knott I, et al. Immunogenicity and protective efficacy in mice and hamsters of a beta-propiolactone inactivated whole virus SARS-CoV vaccine. *Viral Immunol.* 2010;23(5):509-19. doi: 10.1089/vim.2010.0028. PubMed PMID: 20883165; PubMed Central PMCID: PMCPMC2967819.
33. Kam YW, Kien F, Roberts A, Cheung YC, Lamirande EW, Vogel L, et al. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate Fcγ₂RII-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine.* 2007;25(4):729-40. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.08.011. PubMed PMID: 17049691; PubMed Central PMCID: PMCPMC7115629.
34. Lu L, Manopo I, Leung BP, Chng HH, Ling AE, Chee LL, et al. Immunological characterization of the spike protein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol.* 2004;42(4):1570-6. doi: 10.1128/jcm.42.4.1570-1576.2004. PubMed PMID: 15071006; PubMed Central PMCID: PMCPMC387621.
35. Zhang L, Zhang F, Yu W, He T, Yu J, Yi CE, et al. Antibody responses against SARS coronavirus are correlated with disease outcome of infected individuals. *J Med Virol.* 2006;78(1):1-8. doi: 10.1002/jmv.20499. PubMed PMID: 16299724.
36. Jaume M, Yip MS, Cheung CY, Leung HL, Li PH, Kien F, et al. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease-independent Fcγ₂R pathway. *J Virol.* 2011;85(20):10582-97. doi: 10.1128/JVI.00671-11. PubMed PMID: 21775467; PubMed Central PMCID: PMCPMC3187504.
37. Yuan FF, Tanner J, Chan PK, Biffin S, Dyer WB, Geczy AF, et al. Influence of Fcγ₂RIIA and MBL polymorphisms on severe acute respiratory syndrome. *Tissue Antigens.* 2005;66(4):291-6. doi: 10.1111/j.1399-0039.2005.00476.x. PubMed PMID: 16185324.
38. Gu J, Taylor CR. Acute immunodeficiency, multiple organ injury, and the pathogenesis of SARS. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003;11(4):281-2. doi: 10.1097/00129039-200312000-00001. PubMed PMID: 14663354.
39. Gu J, Gong E, Zhang B, Zheng J, Gao Z, Zhong Y, et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med.* 2005;202(3):415-24. doi: 10.1084/jem.20050828. PubMed PMID: 16043521; PubMed Central PMCID: PMCPMC2213088.

40. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa344. PubMed PMID: 32221519.
41. Fan Wu, Aojie Wang, al. MLe. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *MeRxiv*. 2020. doi: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>.
42. Tetro JA. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? *Microbes Infect*. 2020;22(2):72-3. doi: 10.1016/j.micinf.2020.02.006. PubMed PMID: 32092539.
43. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;11(1):1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9. PubMed PMID: 32221306; PubMed Central PMCID: PMCPMC7100515.
44. Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrammert J, Ma MJ, Lv H, et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J Immunol*. 2011;186(12):7264-8. doi: 10.4049/jimmunol.0903490. PubMed PMID: 21576510.
45. Yuan M, Wu NC, Zhu X, Lee CD, So RTY, Lv H, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor-binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science*. 2020. doi: 10.1126/science.abb7269. PubMed PMID: 32245784.
46. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020;367(6483):1260-3. doi: 10.1126/science.abb2507. PubMed PMID: 32075877; PubMed Central PMCID: PMCPMC7164637.
47. Hangping Yao, Xiangyun Lu, al. QCe. Patient-derived mutations impact pathogenicity of SARS-CoV-2. *medRxiv*. 2020. doi: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20060160>.
48. Mutation sites in the Spike (S) protein. China National Center of Bioinformation 2020. Available from: <https://bigd.big.ac.cn/ncov/protein?lang=en&fbclid=IwAR21Gq8ZjlozW1TCfkXHYv8f4-7uM56GnzVOABYPzvZe3rd0gCDpyJeDPkA>.
49. Adzhubei AA, Eisenmenger F, Tumanyan VG, Zinke M, Brodzinski S, Esipova NG. Third type of secondary structure: noncooperative mobile conformation. *Protein Data Bank analysis. Biochem Biophys Res Commun*. 1987;146(3):934-8. doi: 10.1016/0006-291x(87)90736-4. PubMed PMID: 3619942.
50. Adzhubei AA, Sternberg MJ. Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J Mol Biol*. 1993;229(2):472-93. doi: 10.1006/jmbi.1993.1047. PubMed PMID: 8429558.
51. Yong JIA, Gangxu Shen, Yujuan Zhang, Keng-Shiang Huang, Hsing-Ying Ho, Wei-Shio Hor, et al. Analysis of the mutation dynamics of SARS-CoV-2 reveals the spread history and emergence of RBD mutant with lower ACE2 binding affinity. *BioRxiv*. 2020. doi: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.034942>.
52. Ruklanthi de Alwis, Chen S, al ESGe. Impact of immune enhancement on Covid-19 polyclonal hyperimmune globulin therapy and vaccine development. *EBioMedicine*. 2020. doi: doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102768.
53. He-wei Jiang, Yang Li, Hai-nan Zhang, Wei Wang, Dong Men, Xiao Yang, et al. Global profiling of SARS-CoV-2 specific IgG/ IgM responses of convalescents using a proteome microarray. *MedRxiv*. 2020. doi: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.20.20039495>.
54. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1. PubMed PMID: 32213337.
55. Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MR. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses*. 2020;12(3). doi: 10.3390/v12030254. PubMed PMID: 32106567.

56. Muhammad Tahir ul Qamar, Abdur Rehman, Usman Ali Ashfaq, Muhammad Qasim Awan, Israr Fatima, Farah Shahid, et al. Designing of a next generation multiepitope based vaccine (MEV) against SARS-CoV-2: Immunoinformatics and in silico approaches. *BioRxivs*. 2020.
57. Julian Braun et al. Presence of SARS-CoV-2 reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. *medRxiv*. 2020. doi: DOI: 10.1101/2020.04.17.20061440.
58. Brian D. Quinlan, Huihui Mou, et al. LZe. The SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits a potent neutralizing response without antibody-dependent enhancement. *BioRxiv*. 2020. doi: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.10.036418>.
59. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J*. 2020:e105114. doi: 10.15252/embj.20105114. PubMed PMID: 32246845.
60. Carly G. K. Ziegler, Allison SJ, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell*. 2020;Journal pre-proof. doi: DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
61. Khan J. We've never made a successful vaccine for a coronavirus before. This is why it's so difficult 2020. Available from: https://www.abc.net.au/news/health/2020-04-17/coronavirus-vaccine-ian-frazer/12146616?fbclid=IwAR3-700wfXvXKNEv0EdLTUGP5NOepBaD_74p6Dbp9jjhyQaO62f8781qTFO.
62. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Ann Med*. 2018;50(2):110-20. doi: 10.1080/07853890.2017.1407035. PubMed PMID: 29172780.
63. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(1):114-9. Epub 2001/01/13. doi: S0952-7915(00)00191-6 [pii]. PubMed PMID: 11154927.
64. Ramadan A, Land WG, Paczesny S. Editorial: Danger Signals Triggering Immune Response and Inflammation. *Front Immunol*. 2017;8:979. doi: 10.3389/fimmu.2017.00979. PubMed PMID: 28848564; PubMed Central PMCID: PMC5554486.
65. Fischer S. Pattern Recognition Receptors and Control of Innate Immunity: Role of Nucleic Acids. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(15):1203-9. doi: 10.2174/138920112804583087. PubMed PMID: 30636600.
66. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 2008;205(7):1601-10. doi: 10.1084/jem.20080091. PubMed PMID: 18591409; PubMed Central PMCID: PMC2442638.
67. Вакцина против SARS-CoV-2 в Индии 2020. Available from: <https://codagenix.com/vaccine-programs/pipeline/>.
68. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(13):7001-3. doi: 10.1073/pnas.2002589117. PubMed PMID: 32165541; PubMed Central PMCID: PMC7132130.
69. Alibek KaSH. *Biohazard: The Chilling True Story of the Largest Covert Biological Weapons Program in the World – Told from Inside by the Man Who Ran It*, Random House 1999.
70. Baragona S. New Tech Could Make Coronavirus Vaccine in Record Time. 2020.
71. WHO. DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines –
20 March 2020 2020. Available from: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/novel-coronavirus-landscape-ncov.pdf?ua=1>.
72. Modjarrad K, Roberts CC, Mills KT, Castellano AR, Paolino K, Muthumani K, et al. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-

label, single-arm, dose-escalation trial. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(9):1013-22. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30266-X. PubMed PMID: 31351922.

73. В МГУ допустили создание вакцины от коронавируса за три месяца

2020. Available from: <https://www.rbc.ru/rbcfreenews/5e7170179a794760ffcaa08a>.

74. Moderna jockeys into Harvard. *Nat Biotechnol.* 2019;37(11):1248. doi: 10.1038/s41587-019-0314-9. PubMed PMID: 31690882.

75. BIOCAD П-с. BIOCAD разрабатывает мРНК-вакцину против коронавируса 2020. Available from: <https://pcr.news/novosti/biocad-razrabatyvaet-mrnk-vaktsinu-protiv-koronavirusa/>.

76. Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines.* 2014;2(6):159-82. doi: 10.1177/2051013614541440. PubMed PMID: 25364509; PubMed Central PMCID: PMC4212474.

77. Kauffman KJ, Webber MJ, Anderson DG. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J Control Release.* 2016;240:227-34. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.032. PubMed PMID: 26718856.

78. Capasso Palmiero U, Kaczmarek JC, Fenton OS, Anderson DG. Poly(beta-amino ester)-co-poly(caprolactone) Terpolymers as Nonviral Vectors for mRNA Delivery In Vitro and In Vivo. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(14):e1800249. doi: 10.1002/adhm.201800249. PubMed PMID: 29761648.

79. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol Ther.* 2019;27(4):710-28. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.02.012. PubMed PMID: 30846391; PubMed Central PMCID: PMC6453548.

80. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-79. doi: 10.1038/nrd.2017.243. PubMed PMID: 29326426; PubMed Central PMCID: PMC5906799.

81. Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, Parkhouse K, Cain DW, Jones L, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med.* 2018;215(6):1571-88. doi: 10.1084/jem.20171450. PubMed PMID: 29739835; PubMed Central PMCID: PMC5987916.

82. Pardi N, LaBranche CC, Ferrari G, Cain DW, Tombacz I, Parks RJ, et al. Characterization of HIV-1 Nucleoside-Modified mRNA Vaccines in Rabbits and Rhesus Macaques. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;15:36-47. doi: 10.1016/j.omtn.2019.03.003. PubMed PMID: 30974332; PubMed Central PMCID: PMC6454128.

83. Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychev A, Brito LA, Hassett KJ, et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol Ther.* 2017;25(6):1316-27. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.035. PubMed PMID: 28457665; PubMed Central PMCID: PMC5475249.

84. Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet.* 2017;390(10101):1511-20. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3. PubMed PMID: 28754494.

85. Orelli B. Moderna Releases mRNA Vaccine Data, but Few Details About Its Coronavirus Candidate 2020. Available from: <https://www.fool.com/investing/2020/04/14/moderna-releases-mrna-vaccine-data-but-few-details.aspx>.

86. Nyombayire J, Anzala O, Gazzard B, Karita E, Bergin P, Hayes P, et al. First-in-Human Evaluation of the Safety and Immunogenicity of an Intranasally Administered Replication-Competent Sendai Virus-Vectored HIV Type 1 Gag Vaccine: Induction of Potent T-Cell or Antibody Responses in Prime-Boost Regimens. *J Infect Dis.* 2017;215(1):95-104. doi: 10.1093/infdis/jiw500. PubMed PMID: 28077588; PubMed Central PMCID: PMC5225252.

87. Rollier CS, Reyes-Sandoval A, Cottingham MG, Ewer K, Hill AV. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(3):377-82. doi: 10.1016/j.coi.2011.03.006. PubMed PMID: 21514130.
88. Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, Spencer AJ, Hill AV, Dorrell L. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. *Curr Opin Immunol.* 2016;41:47-54. doi: 10.1016/j.coi.2016.05.014. PubMed PMID: 27286566.
89. CanSino, Synairgen get regulatory approval for Covid-19 trials 2020. Available from: <https://www.clinicaltrialsarena.com/news/cansino-synairgen-covid-19-trials/>.
90. Bradley RR, Lynch DM, Iampietro MJ, Borducchi EN, Barouch DH. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. *J Virol.* 2012;86(1):625-9. doi: 10.1128/JVI.06254-11. PubMed PMID: 22072776; PubMed Central PMCID: PMC3255879.
91. Вакцину от коронавируса в России сделают из вируса кори 2020. Available from: <https://www.mk.ru/science/2020/04/13/vakcinu-ot-koronavirusa-v-rossii-delayut-iz-vakciny-ot-kori.html>.
92. Malczyk AH, Kupke A, Pruffer S, Scheuplein VA, Hutzler S, Kreuz D, et al. A Highly Immunogenic and Protective Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Vaccine Based on a Recombinant Measles Virus Vaccine Platform. *J Virol.* 2015;89(22):11654-67. doi: 10.1128/JVI.01815-15. PubMed PMID: 26355094; PubMed Central PMCID: PMC34645655.
93. Li K, Li Z, Wohlford-Lenane C, Meyerholz DK, Channappanavar R, An D, et al. Single-Dose, Intranasal Immunization with Recombinant Parainfluenza Virus 5 Expressing Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Spike Protein Protects Mice from Fatal MERS-CoV Infection. *mBio.* 2020;11(2). doi: 10.1128/mBio.00554-20. PubMed PMID: 32265331; PubMed Central PMCID: PMC7157776.
94. Lin GY, Lamb RA. The paramyxovirus simian virus 5 V protein slows progression of the cell cycle. *J Virol.* 2000;74(19):9152-66. doi: 10.1128/jvi.74.19.9152-9166.2000. PubMed PMID: 10982362; PubMed Central PMCID: PMC102114.
95. Yoshida A, Kim SH, Manoharan VK, Varghese BP, Paldurai A, Samal SK. Novel avian paramyxovirus-based vaccine vectors expressing the Ebola virus glycoprotein elicit mucosal and humoral immune responses in guinea pigs. *Sci Rep.* 2019;9(1):5520. doi: 10.1038/s41598-019-42004-4. PubMed PMID: 30940854; PubMed Central PMCID: PMC6445115.
96. Mohamed Amin Z, Che Ani MA, Tan SW, Yeap SK, Alitheen NB, Syed Najmuddin SUF, et al. Evaluation of a Recombinant Newcastle Disease Virus Expressing Human IL12 against Human Breast Cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):13999. doi: 10.1038/s41598-019-50222-z. PubMed PMID: 31570732; PubMed Central PMCID: PMC6768883.
97. Vijayakumar G, McCroskery S, Palese P. Engineering Newcastle Disease Virus as an Oncolytic Vector for Intratumoral Delivery of Immune Checkpoint Inhibitors and Immunocytokines. *J Virol.* 2020;94(3). doi: 10.1128/JVI.01677-19. PubMed PMID: 31694938; PubMed Central PMCID: PMC7000961.
98. Villenave R, Touzelet O, Thavagnanam S, Sarlang S, Parker J, Skibinski G, et al. Cytopathogenesis of Sendai virus in well-differentiated primary pediatric bronchial epithelial cells. *J Virol.* 2010;84(22):11718-28. doi: 10.1128/JVI.00798-10. PubMed PMID: 20810726; PubMed Central PMCID: PMC2977906.
99. Lubber CA, Cox J, Lauterbach H, Fancke B, Selbach M, Tschopp J, et al. Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity.* 2010;32(2):279-89. doi: 10.1016/j.immuni.2010.01.013. PubMed PMID: 20171123.
100. Skiadopoulou MH, Surman SR, Riggs JM, Elkins WR, St Claire M, Nishio M, et al. Sendai virus, a murine parainfluenza virus type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower

respiratory tract of African green monkeys and chimpanzees. *Virology*. 2002;297(1):153-60. doi: 10.1006/viro.2002.1416. PubMed PMID: 12083845.

101. Slobod KS, Shenep JL, Lujan-Zilbermann J, Allison K, Brown B, Scroggs RA, et al. Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine*. 2004;22(23-24):3182-6. Epub 2004/08/07. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.01.053 [doi] S0264410X04001392 [pii]. PubMed PMID: 15297072.

102. Adderson E, Branum K, Sealy RE, Jones BG, Surman SL, Penkert R, et al. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based human parainfluenza virus type 1 vaccine in 3- to 6-year-old children. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(3):298-303. doi: 10.1128/CVI.00618-14. PubMed PMID: 25552633; PubMed Central PMCID: PMC4340902.

103. Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, et al. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine*. 2011;29(47):8557-63. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.028. PubMed PMID: 21939708.

104. Hara H, Hara H, Hironaka T, Inoue M, Iida A, Shu T, et al. Prevalence of specific neutralizing antibodies against Sendai virus in populations from different geographic areas: implications for AIDS vaccine development using Sendai virus vectors. *Hum Vaccin*. 2011;7(6):639-45. doi: 10.4161/hv.7.6.15408. PubMed PMID: 21508675.

105. Moriya C, Horiba S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, et al. Antigen-specific T-cell induction by vaccination with a recombinant Sendai virus vector even in the presence of vector-specific neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371(4):850-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.156. PubMed PMID: 18466766.

106. Seki S, Matano T. Development of a Sendai virus vector-based AIDS vaccine inducing T cell responses. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(1):119-27. doi: 10.1586/14760584.2016.1105747. PubMed PMID: 26512881.

107. Hu Z, Gu L, Li CL, Shu T, Lowrie DB, Fan XY. The Profile of T Cell Responses in Bacille Calmette-Guerin-Primed Mice Boosted by a Novel Sendai Virus Vectored Anti-Tuberculosis Vaccine. *Front Immunol*. 2018;9:1796. doi: 10.3389/fimmu.2018.01796. PubMed PMID: 30123219; PubMed Central PMCID: PMC6085409.

108. Hu Z, Jiang W, Gu L, Qiao D, Shu T, Lowrie DB, et al. Heterologous prime-boost vaccination against tuberculosis with recombinant Sendai virus and DNA vaccines. *J Mol Med (Berl)*. 2019;97(12):1685-94. doi: 10.1007/s00109-019-01844-3. PubMed PMID: 31786669.

109. Russell CJ, Hurwitz JL. Sendai virus as a backbone for vaccines against RSV and other human paramyxoviruses. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(2):189-200. doi: 10.1586/14760584.2016.1114418. PubMed PMID: 26648515; PubMed Central PMCID: PMC4957581.

110. Wiegand MA, Gori-Savellini G, Gandolfo C, Papa G, Kaufmann C, Felder E, et al. A Respiratory Syncytial Virus Vaccine Vectored by a Stable Chimeric and Replication-Deficient Sendai Virus Protects Mice without Inducing Enhanced Disease. *J Virol*. 2017;91(10). doi: 10.1128/JVI.02298-16. PubMed PMID: 28250126; PubMed Central PMCID: PMC5411584.

111. Han GZ, Worobey M. Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses*. 2011;3(8):1358-73. Epub 2011/10/14. doi: 10.3390/v3081358 viruses-03-01358 [pii]. PubMed PMID: 21994784; PubMed Central PMCID: PMC3185808.

112. Kolakofsky D, Roux L, Garcin D, Ruigrok RW. Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 7):1869-77.

113. Kolakofsky D. Paramyxovirus RNA synthesis, mRNA editing, and genome hexamer phase: A review. *Virology*. 2016;498:94-8. doi: 10.1016/j.virol.2016.08.018. PubMed PMID: 27567257.

114. Matsumoto Y, Ohta K, Kolakofsky D, Nishio M. The control of paramyxovirus genome hexamer length and mRNA editing. *RNA*. 2018;24(4):461-7. doi: 10.1261/rna.065243.117. PubMed PMID: 29358233; PubMed Central PMCID: PMC5855947.
115. Garcin D, Marq JB, Strahle L, le Mercier P, Kolakofsky D. All four Sendai Virus C proteins bind Stat1, but only the larger forms also induce its mono-ubiquitination and degradation. *Virology*. 2002;295(2):256-65. Epub 2002/05/30. doi: 10.1006/viro.2001.1342
- S004268220191342X [pii]. PubMed PMID: 12033784.
116. Matveeva OV, Kochneva GV, Netesov SV, Onikienko SB, Chumakov PM. Mechanisms of Oncolysis by Paramyxovirus Sendai. *Acta Naturae*. 2015;7(2):6-16. Epub 2015/06/19. PubMed PMID: 26085940; PubMed Central PMCID: PMC4463408.
117. Матвеева О.В., Кочнева Г.В., Нетесов С.В., Оникиенко С.Б., Чумаков ПМ. Механизмы онколитического действия парамиксовируса Сендай *Acta Naturae* (русскаяязычная версия) 2015;7(2 (25)).
118. Nakanishi M, Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Curr Gene Ther*. 2012;12(5):410-6. doi: 10.2174/156652312802762518. PubMed PMID: 22920683; PubMed Central PMCID: PMC3504922.
119. Burke CW, Mason JN, Surman SL, Jones BG, Dalloneau E, Hurwitz JL, et al. Illumination of parainfluenza virus infection and transmission in living animals reveals a tissue-specific dichotomy. *PLoS Pathog*. 2011;7(7):e1002134. doi: 10.1371/journal.ppat.1002134. PubMed PMID: 21750677; PubMed Central PMCID: PMC3131265.
120. Sakai Y, Kiyotani K, Fukumura M, Asakawa M, Kato A, Shioda T, et al. Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication. *FEBS Lett*. 1999;456(2):221-6. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00960-6. PubMed PMID: 10456313.
121. Faisca P, Desmecht D. Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date. *Res Vet Sci*. 2007;82(1):115-25. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.03.009. PubMed PMID: 16759680.
122. Hasan MK, Kato A, Shioda T, Sakai Y, Yu D, Nagai Y. Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. *J Gen Virol*. 1997;78 (Pt 11):2813-20. doi: 10.1099/0022-1317-78-11-2813. PubMed PMID: 9367367.
123. JL. H, Takimoto T, Russell CJ, Portner A, K S, inventors; St Jude Childrens Research Hospital, assignee. Modified Sendai virus vaccine and imaging vector. USA patent US9637758B2. 2018.
124. Zhan X, Slobod KS, Jones BG, Sealy RE, Takimoto T, Boyd K, et al. Sendai virus recombinant vaccine expressing a secreted, unconstrained respiratory syncytial virus fusion protein protects against RSV in cotton rats. *Int Immunol*. 2015;27(5):229-36. doi: 10.1093/intimm/dxu107. PubMed PMID: 25477211; PubMed Central PMCID: PMC4406265.
125. Bitzer M, Armeanu S, Lauer UM, Neubert WJ. Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J Gene Med*. 2003;5(7):543-53.
126. Tatsumoto N, Arditi M, Yamashita M. Sendai Virus Propagation Using Chicken Eggs. *Bio Protoc*. 2018;8(18). doi: 10.21769/BioProtoc.3009. PubMed PMID: 30370318; PubMed Central PMCID: PMC6200407.
127. Itoh M, Wang XL, Suzuki Y, Homma M. Mutation of the HANA protein of Sendai virus by passage in eggs. *Virology*. 1992;190(1):356-64. doi: 10.1016/0042-6822(92)91222-g. PubMed PMID: 1326808.
128. Zainutdinov SS, Grazhdantseva AA, Kochetkov DV, Chumakov PM, Netesov SV, Matveeva OV, et al. Change in Oncolytic Activity of Sendai Virus during Adaptation to Cell Cultures. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017;32(4):212-7. doi: 10.3103/S0891416817040115.

129. Zainutdinov SS, Kochneva GV, Netesov SV, Chumakov PM, Matveeva OV. Directed evolution as a tool for the selection of oncolytic RNA viruses with desired phenotypes. *Oncolytic Virother.* 2019;8:9-26. doi: 10.2147/OV.S176523. PubMed PMID: 31372363; PubMed Central PMCID: PMC6636189.
130. Simon AY, Moritoh K, Torigoe D, Asano A, Sasaki N, Agui T. Multigenic control of resistance to Sendai virus infection in mice. *Infect Genet Evol.* 2009;9(6):1253-9. doi: 10.1016/j.meegid.2009.08.011. PubMed PMID: 19733691.
131. Stone AE, Giguere S, Castleman WL. IL-12 reduces the severity of Sendai virus-induced bronchiolar inflammation and remodeling. *Cytokine.* 2003;24(3):103-13. doi: 10.1016/j.cyto.2003.07.005. PubMed PMID: 14581004.
132. Linlin Bao, Wei Deng, all. BHe. The Pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 Transgenic Mice. *BioArxiv.* 2020.
133. Sui J, Li W, Roberts A, Matthews LJ, Murakami A, Vogel L, et al. Evaluation of human monoclonal antibody 80R for immunoprophylaxis of severe acute respiratory syndrome by an animal study, epitope mapping, and analysis of spike variants. *J Virol.* 2005;79(10):5900-6. doi: 10.1128/JVI.79.10.5900-5906.2005. PubMed PMID: 15857975; PubMed Central PMCID: PMC1091676.
134. Carey K. Increasing number of biopharma drugs target COVID-19 as virus spreads [BioWorld]. 2020 [cited 2020 February 27].
135. Zainutdinov SS, Tikunov AY, Matveeva OV, Netesov SV, Kochneva GV. Complete Genome Sequence of the Oncolytic Sendai virus Strain Moscow. *Genome Announc.* 2016;4(4). doi: 10.1128/genomeA.00818-16. PubMed PMID: 27516510; PubMed Central PMCID: PMC64982289.
136. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics.* 2018;34(23):4121-3. doi: 10.1093/bioinformatics/bty407. PubMed PMID: 29790939; PubMed Central PMCID: PMC6247931.
137. Reichert J. Coronavirus in the crosshairs, Part 2: Vaccines in development 2020. Available from: <https://www.antibodysociety.org/tag/vaccine/>.
138. Applied DNA Sciences (NASDAQ: APDN) Updates on COVID-19 Collaboration with Takis Biotech, 4 Preclinical LinearDNA™ Vaccine Candidates Designed 2020. Available from: <https://adnas.com/applied-dna-sciences-updates-on-covid-19-collaboration-with-takis-biotech-4-preclinical-linear-dna-vaccine-candidates-designed/>.
139. A surprising player in the race for a SARS-CoV-2 vaccine 2020. Available from: <https://www.nature.com/articles/d42473-020-00032-z>.
140. Molecular Clamp: a Novel Protein Vaccine for Influenza, RSV, Ebola and Other Human and Veterinary Viruses. 2020.