

МАТЮШЕНКО
Виктория Аркадьевна

**ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ
НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ**

1.5.10 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН
доктор биологических наук
И.Н. ИСАКОВА-СИВАК

Санкт-Петербург

2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	14
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Строение вируса гриппа	14
1.1.1. Структура вириона и геном вируса гриппа А	14
1.1.2. Гемагглютинин.....	15
1.1.3. Нейраминидаза	18
1.1.4. Антигенный шифт и антигенный дрейф.....	20
1.2. Гриппозные вакцины	21
1.2.1. Типы гриппозных вакцин и их производства в мире	22
1.2.2. Инаktivированные гриппозные вакцины.....	23
1.2.3. Живые аттенуированные гриппозные вакцины	25
1.2.5. Культуральные вакцины против гриппа.....	29
1.3. Адаптационные мутации вируса гриппа	33
1.3.1. Адаптация вируса гриппа к новому хозяину, причины возникновения пандемий гриппа.....	33
1.3.2. Адаптация потенциально пандемического вируса птичьего гриппа А(Н5N1) и А(Н7N9) к клеткам млекопитающих.....	35
1.3.3. Адаптационные изменения сезонных вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) к клеткам млекопитающих	40
1.4. Заключение к обзору литературы.....	48
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	50
2.1. Материалы исследования	50
2.1.1. Вирусы	50
2.1.2. Клеточные культуры.....	50
2.1.3. Куриные эмбрионы	50
2.1.4. Плазмидные ДНК.....	50
2.1.5. Лабораторные животные	51

2.2. Методы исследования.....	51
2.2.1. Вирусологические методы	51
2.2.2. Молекулярно-генетические методы.....	54
2.2.3. Методы работы с лабораторными животными	60
2.2.4. Иммунологические методы.....	61
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ	65
3.1. Адаптация пандемических штаммов вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) с различной рецепторной специфичностью к культуре клеток MDCK.....	65
3.1.1. Генетическая характеристика штаммов вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2).....	65
3.1.2. Ростовые характеристики штаммов вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) in vitro и in vivo	68
3.1.3. Оценка гуморального иммунного ответа к штаммам вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) на модели мышей	71
3.1.4. Оценка системного и локального клеточного иммунного ответа к штаммам вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) на модели мышей	75
3.1.5. Кросс-реактивность антител к исходным и MDCK-адаптированным штаммам вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2).....	78
3.2. Создание, изучение и адаптация к культуре клеток MDCK вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины против вирусов гриппа А(H2N2) с различной рецепторной специфичностью	80
3.3. Стабильность вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK.....	85
3.3.1. Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H5N1 к культуре клеток MDCK	86
3.3.2. Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H7N9 к культуре клеток MDCK	89
3.3.3. Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H3N2 к культуре клеток MDCK	94

3.3.4. Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H1N1 к культуре клеток MDCK	98
3.4. Исследование экспериментальных серий моновалентных ЖГВ, произведенных на культуре клеток MDCK.....	103
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ.....	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	119
Список литературы	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Грипп – тяжелое инфекционное заболевание, ежегодные эпидемии которого приводят к существенным социально-экономическим потерям во всех странах мира. Наиболее эффективным способом борьбы с гриппом является ежегодная вакцинация населения сезонными противогриппозными вакцинами. В настоящее время в практике здравоохранения применяются живые (ЖГВ) и инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ), которые индуцируют различные звенья иммунного ответа: ИГВ способствуют развитию в основном мощного системного гуморального иммунного ответа, тогда как ЖГВ вызывают образование секреторных IgA антител на слизистых оболочках верхних дыхательных путей (ВДП), а также системного и локального Т-клеточного иммунитета. Как следствие, ИГВ обеспечивают защиту только от антигенно близких вариантов вирусов гриппа, тогда как ЖГВ способны обеспечить перекрестную защиту от антигенно-удаленных вирусов, а также формировать коллективный иммунитет после вакцинации [1]; [2]. Помимо этого, в одних и тех же условиях производства можно наработать существенно большее количество доз ЖГВ по сравнению с ИГВ. Указанные преимущества ЖГВ явились основанием для того, чтобы Всемирная организация здравоохранения рекомендовала её в качестве приоритетного средства специфической профилактики в условиях пандемии [3], [4].

В настоящее время в мире ЖГВ производится только с использованием развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ). В последние десятилетия активно обсуждается вопрос о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, что позволит в короткие сроки нарабатывать большие объемы вирусной биомассы, а также сузит список противопоказаний, в частности, позволив применять вакцину лицам, страдающим аллергией на куриный белок. Кроме того, если пандемия гриппа будет вызвана высокопатогенным вирусом, высока вероятность того, что поголовье кур на птицефабриках будет полностью уничтожено, поэтому независимость вакцинного производства от поставки яиц с птицефабрик также крайне важна. В настоящее время 90% сезонных и 84% пандемических вакцин производится в развивающихся куриных эмбрионах и лишь 10% и 16% в культуре клеток, соответственно [5].

Поскольку штаммы для отечественной ЖГВ создаются методом классической реассортации на куриных эмбрионах, необходимо всесторонне изучить их свойства после культивирования в клетках млекопитающих, для обоснования сохранности их основных биологических свойств. Наиболее важными в данном случае являются адаптационные изменения в поверхностных гликопротеидах – гемагглютанине (НА) и нейраминидазе

(NA), поскольку они являются основными антигенами вируса гриппа, на которые вырабатывается защитный гуморальный иммунный ответ. Кроме того, они взаимодействуют с рецепторами на поверхности клеток-мишеней и, соответственно, могут влиять на ростовые характеристики, рецепторную специфичность, иммуногенность и антигенность вакцинных штаммов.

Известно, что пандемии гриппа могут возникать вследствие адаптации вирусов гриппа птиц, в том числе высокопатогенных, к клеткам млекопитающих. Установлено, что в начале пандемической волны в циркуляции могут встречаться как вирусы, имеющие сродство к рецепторам птичьего типа $\alpha 2,3$ (т.е. распознающие гликозидные связи $\alpha 2,3$ между остатками сиаловой кислоты и галактозы), так и адаптированные к человеку вирусы с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$ [6]. Поэтому представляется важным провести сравнительные исследования свойств вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на основе двух антигенно родственных вирусов, различающихся только рецепторной специфичностью, с целью обоснования выбора циркулирующего штамма для разработки пандемических гриппозных вакцин.

В последние годы эффективность сезонных вакцин против вируса гриппа А подтипа H3N2 значительно снизилась по сравнению с предыдущими эпидемическими сезонами [7]. Одной из причин недостаточной эффективности вакцин является возникновение РКЭ-адаптационных мутаций в молекуле НА вирусов А(H3N2) при их пассировании в куриных эмбрионах [8]. В ряде исследований показано, что в гемагглютанине эпидемического вируса А(H3N2) после 4-5 пассажей в РКЭ появляются мутации, отличные от клинического образца или вируса, выращенного на культуре клеток млекопитающих [8]. Однако остается открытым вопрос, возникают ли адаптационные мутации в данных вирусах при их культивировании в культурах клеток млекопитающих при производстве вакцины, и как такие мутации могут влиять на репродукцию и антигенность вакцинных штаммов ЖГВ.

Степень разработанности темы исследования. Адаптационные мутации, появляющиеся при смене хозяина или субстрата для культивирования вируса гриппа, были и остаются важной темой научных исследований. После открытия различной рецепторной специфичности вирусов гриппа птиц и человека было обнаружено, что во время пандемии «азиатского» гриппа А(H2N2) в 1957 году вирусы адаптировались к новому хозяину, сменив тип сиалового рецептора с $\alpha 2,3$ на $\alpha 2,6$, при этом в начале пандемической волны одновременно циркулировали вирусы гриппа с обоими типами рецепторной специфичности [9]. Исследования показали, что ключевыми для переключения рецепторной специфичности вируса гриппа с птичьего на человеческий тип сиалового

рецептора являются аминокислотные замены Q226L и G228S в субъединице HA1 молекулы гемагглютинаина [10], [11]. В 1968 году в Гонгконге появился вирус A(H3N2), гемагглютинин которого также адаптировался от птичьего типа сиалового рецептора к человеческому, и в начале пандемии обнаруживалась социркуляция вирусов с различной рецепторной специфичностью [6]. Следует отметить, что в мире регулярно происходят случаи заражения человека птичьими вирусами гриппа А различных подтипов при прямом контакте с инфицированными животными, и достаточно высока вероятность появления новых вариантов вирусов с измененной рецепторной специфичностью. Исследования вирусов гриппа зоонозного происхождения показали, что для подтипов H2N3, H7N9, H10N8 мутация в HA1 субъединице молекулы гемагглютинаина Q226L является необходимой для переключения рецепторной специфичности вируса гриппа [12], [13], [14], но недостаточной для эффективной передачи вируса среди людей. Несмотря на то, что к настоящему времени было подготовлено большое число вакцинных кандидатов против потенциально пандемических вирусов гриппа А, остается открытым вопрос, какой именно штамм вируса предпочтительнее использовать для подготовки пандемических вакцин в начале пандемии в случае социркуляции двух вариантов, кардинально различающихся своей рецепторной специфичностью.

Разработка гриппозных вакцин на клеточных культурах ведется более двух десятилетий. Первая трехвалентная инактивированная вакцина на культуре клеток MDCK была лицензирована в США в 2012 г., а в 2016 г. одобрена ее квадριвалентная форма [15], [16]. Ключевыми коммерческими производителями клеточных вакцин для профилактики сезонного гриппа являются CSL Seqirus (Flucelvax Quadrivalent/Tetra) и SK Bioscience (SKYCellflu) [17]. Начиная с сезона гриппа 2019/2020 гг. все штаммы четырехвалентного препарата «Flucelvax» были выделены и наработаны исключительно в линии клеток MDCK 33016-PF [18].

Работы по созданию живой гриппозной вакцины на клеточных культурах были начаты в тот же хронологический период. Важно подчеркнуть, что ввиду патентных ограничений на применение методов обратной генетики (компания MedImmune владеет патентами на данную технологию), подготовка вакцинных штаммов для отечественной ЖГВ возможна исключительно методом классической генетической реассортации. Однако процесс конструирования реассортантов в системе культуры клеток MDCK сопряжен со значительными технологическими сложностями, ключевой из которых являлась низкая эффективность селекции штаммов с целевым геномным составом 6:2, где 6 сегментов РНК происходят от донора аттенуации, а два – от актуального эпидемического вируса [Исакова,

2007]. В этой связи представляется возможным использовать реассортантные вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные классическим методом реассортации в РКЭ, для последующей наработки вакцины на клеточных культурах.

Технология производства культуральной ЖГВ была ранее разработана в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск), при этом в качестве исходного сырья использовались реассортантные вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные классическим методом в куриных эмбрионах. Так, вакцина на основе потенциально пандемического штамма вируса гриппа А/утка/Потсдам/1402-6/86 (H5N2), произведенная на культурах клеток MDCK и Vero методом роллерного культивирования, индуцировала высокие титры кросс-реактивных сывороточных и мукозальных антител у мышей [19]. Также на основе пандемического штамма ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) была подготовлена серия вакцины «Вектор-Флю» на культуре клеток MDCK. При адаптации к культуре клеток вакцинный штамм сохранял свои антигенные свойства и высокую репродуктивную активность. В доклинических исследованиях вакцина «ВекторФлю» была безвредна и вызывала образование мощного иммунного ответа у хорьков после однократной иммунизации [20], [21]. Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности использования реассортантов, подготовленных в РКЭ, для разработки клеточной ЖГВ. Однако, до настоящего времени не проводились систематические исследования по оценке спектра адаптационных мутаций, возникающих в геноме вакцинных штаммов в процессе пассажей на клеточных культурах, а также их потенциального влияния на ключевые свойства аттенуированного вируса: иммуногенность, антигенность и генетическую стабильность.

Цель работы. Обоснование целесообразности применения штаммов, подготовленных в развивающихся куриных эмбрионах, для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток MDCK..

Задачи исследования:

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

(1) Провести характеристику вирусов гриппа А(H2N2), циркулировавших в начале пандемической волны 1957 года и различающихся рецепторной специфичностью молекулы гемагглютинина, по их способности к репликации в РКЭ и культуре клеток MDCK, а также по спектру индуцируемых антител в экспериментах на животных;

(2) Изучить особенности адаптации к культуре клеток MDCK вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на основе антигенно родственных вирусов гриппа А(H2N2), имеющих различную рецепторную специфичность;

(3) Провести анализ мутационных изменений в молекулах HA и NA вакцинных штаммов ЖГВ против сезонных (H1N1 и H3N2) и потенциально пандемических (H5N2 и H7N9) вирусов гриппа А, возникающих после их серийного пассирования в культуре клеток MDCK; изучить влияние обнаруженных адаптационных мутаций на репродукцию *in vitro* и *in vivo*, иммуногенность и кросс-реактивность в экспериментах на животных;

(4) Провести анализ экспериментальных серий моновалентных ЖГВ подтипов А(H1N1), А(H3N2) и В, произведенных на культуре клеток MDCK, для идентификации потенциальных адаптационных аминокислотных замен в молекулах HA и NA; в случае обнаружения значимых мутаций, оценить их влияние на ключевые фенотипические характеристики вакцинных вирусов.

Научная новизна работы.

Впервые проведена всесторонняя характеристика антигенно схожих вирусов гриппа А(H2N2) начала пандемической волны, различающихся рецепторной специфичностью, при их адаптации к культуре клеток млекопитающих.

Впервые установлено, что аминокислотная замена P221S в HA1 субъединице гемагглютинаина вируса гриппа А(H2N2) носит характер ескаре-мутации, т.е. позволяет вирусу с аминокислотой 221S «ускользнуть» от антител, выработанных к вирусам с аминокислотой 221P в HA1.

Впервые установлено, что клеточно-адаптационные мутации различных вакцинных штаммов одного подтипа имеют стерически схожее расположение в молекуле гемагглютинаина.

Впервые показано, что подтип H3N2 вируса гриппа А наиболее сильно подвержен антигенному дрейфу при адаптации штаммов к культуре клеток MDCK.

Впервые установлено, что адаптационные аминокислотные замены в моновалентных препаратах культуральной ЖГВ не оказывают значимого влияния на репродуктивную активность *in vitro* и кросс-реактивные свойства вакцинных штаммов.

Показано, что все исследуемые вакцинные штаммы после адаптации к культуре клеток MDCK сохраняют полный спектр аттенуирующих мутаций, что свидетельствует о сохранении профиля безопасности, соответствующего требованиям к живым аттенуированным вакцинам.

Разработана экспериментальная модель адаптации классических вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных в РКЭ, к культуре клеток MDCK, воспроизводящая технологический процесс производства клеточной вакцины.

Получены комплексные экспериментальные данные, обосновывающие принципиальную возможность использования вакцинных штаммов, подготовленных на куриных эмбрионах, для производства ЖГВ на культуре клеток MDCK.

Теоретическая значимость работы

Стратегия подготовки к пандемии гриппа должна базироваться на ретроспективном анализе предыдущих пандемий. Ранее было установлено, что в начальной фазе всех известных пандемий циркулировали множественные антигенные варианты вируса, имеющие общее происхождение, но различающиеся по рецепторной специфичности молекулы гемагглютинина. Учитывая, что рецепторная специфичность гемагглютинина вируса гриппа является одним из ключевых факторов успешной адаптации зоонозных вирусов гриппа к человеку, в настоящем исследовании проанализировано ее влияние на репродукцию таких вирусов в различных системах культивирования, оценена генетическая стабильность вирусов с различной рецепторной специфичностью при многократном пассировании в клетках MDCK и даны рекомендации по выбору пандемических штаммов для производства ЖГВ на клеточных культурах.

Практическая значимость работы.

В связи с сохраняющейся в последние эпидсезоны недостаточно высокой эффективностью сезонных гриппозных вакцин против вирусов подтипа А(Н3N2) мировое научное сообщество активизировало исследования по выявлению причин данной проблемы и возможных путей ее решения. Одним из ключевых установленных факторов является появление адаптационных мутаций в антигенных сайтах гемагглютинина в процессе пассажей в куриных эмбрионах, чему способствует исходная гетерогенность популяции дикого вируса в клиническом материале. В данной работе предложено одно из решений этой проблемы, заключающееся в выделении одного варианта с оптимальной антигенностью и подготовка на его основе вакцинного штамма.

Кроме того, до настоящего времени не проводились систематические исследования, направленные на установление роли отдельных точечных мутаций, возникающих в молекулах НА и NA после адаптации к культуре клеток млекопитающих реассортантных штаммов ЖГВ, изначально подготовленных в РКЭ, на их фенотипические характеристики. Настоящее исследование призвано заполнить этот пробел знаний, что позволит в будущем получить новый вакцинный препарат с оптимальными свойствами, сочетающими в себе высокую урожайность, оптимальную кросс-реактивность и повышенную иммуногенность, при полном сохранении профиля безопасности для человека.

Научные данные, полученные в ходе диссертационного исследования, предоставляют необходимое экспериментальное обоснование возможности применения реассортантов, полученных в РКЭ, для производства ЖГВ на культуре клеток млекопитающих. Реализация данного подхода позволит расширить показания к применению культуральной ЖГВ, включив группы населения с аллергией на куриный белок, в частности детей младшего возраста, у которых данная аллергия проявляется наиболее часто. Результаты, полученные в данном исследовании, лягут в основу регуляторных документов для регистрации живых гриппозных вакцин, производимых на клеточных культурах.

Методология и методы исследования.

В настоящем исследовании были использованы современные вирусологические, иммунологические, генно-инженерные и статистические методы. Все работы были проведены на базе ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины» в соответствии с правилами работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-IV групп патогенности с соблюдением соответствующих санитарно-эпидемиологических норм.

Основные положения, выносимые на защиту

- I. Адаптация штаммов живой гриппозной вакцины и эпидемических/пандемических вирусов гриппа к культуре клеток MDCK не меняет их рецепторную специфичность. При этом вирусы A(H2N2) с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ индуцируют антитела с более широким антигенным охватом по сравнению с вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$.
- II. Адаптационные мутации, возникающие у различных подтипов вируса гриппа в лабораторных условиях и условиях промышленного производства, имеют сходное расположение в молекуле гемагглютинина, что позволяет использовать разработанную модель адаптации для предсказания свойств живой гриппозной вакцины, произведенной на клеточной культуре.
- III. Вакцинные реассортанты, подготовленные классическим скрещиванием в развивающихся куриных эмбрионах, могут быть успешно использованы для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток MDCK, поскольку возникающие адаптационные мутации не оказывают негативного влияния на основные биологические свойства вакцинных штаммов.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно провел анализ литературных данных по проблеме исследования, принял непосредственное участие в дизайне и выполнении всех экспериментальных работ, провел статистическую обработку полученных результатов и

представил результаты в научных публикациях и докладах на отечественных и международных конференциях. Автором лично выполнены исследования по адаптации к культуре клеток MDCK вакцинных штаммов ЖГВ подтипов H1N1pdm09, H3N2, H7N9, H5N2 с последующим всесторонним анализом обнаруженных адаптационных мутаций в поверхностных белках. Подготовлены генно-инженерные вакцинные штаммы на основе диких штаммов вируса гриппа A(H2N2) с различной рецепторной специфичностью и изучено влияние рецепторной специфичности диких и вакцинных штаммов A(H2N2) на биологические свойства вирусов в системах *in vitro* и *in vivo*. Эксперименты по оценке системного и местного клеточного иммунного ответа проводились совместно с к.б.н. Кореньковым Д.А. Автором были секвенированы изоляты, полученные к.б.н. Баженовой Е.А. в ходе проведения фазы I клинических испытаний потенциально пандемических вакцин A(H5N2) и A(H7N9). Автором лично было проведено секвенирование и клонирование на культуре клеток MDCK экспериментальных образцов производственной серии сезонных клеточных ЖГВ, предоставленных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Степень достоверности и апробация материалов диссертации

Достоверность результатов работы определена проведением всех исследований с применением стандартных методов исследования, воспроизводимостью результатов, репрезентативном объеме материала, корректной статистической обработке; в работе использовались качественные реактивы и современное оборудование. Все экспериментальные данные подвергались тщательному статистическому анализу с использованием различных статистических критериев. Основные результаты диссертационной работы доложены на 9 международных и отечественных конференциях: «Options for the Control of Influenza XII» (Brisbane, Australia, 2024); V Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (Санкт-Петербург, 2024), «2nd International Meetings on Respiratory Pathogens» (Singapore, 2018); «Options for the Control of Influenza IX» (Chicago, USA, 2016); «The Fourth European Influenza Conference. ESWI» (Riga, Latvia, 2014); «Options for the Control of Influenza VIII» (Cape Town, South Africa, 2013); Научно-практическая конференция «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций», (Санкт-Петербург, 2014); «VII ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием» (Москва, 2015); Международная конференция «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 14 печатных работ, из которых 7 научных статей, входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus, и 7 тезисов докладов на отечественных и международных научных конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста, включая 14 таблиц и 28 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, 4х глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 238 источников на русском и английском языках.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение вируса гриппа

Вирус гриппа относится к роду *Orthomixoviridae* и представляет собой оболочечный РНК-содержащий вирус с сегментированным геномом отрицательной направленности. Различают вирусы гриппа типа А, В, С и D. Вирус гриппа типа А вызывает острые респираторные заболевания у людей, свиней, кошек, морских млекопитающих, домашних и диких птиц, является причиной всех пандемий гриппа в XX и XXI веках, а также сезонных эпидемий среди людей (H1N1pdm09 и H3N2) и вспышек птичьего гриппа в природе и домашних хозяйствах (H5N1, H2N2, H5N6, H10N8 и др.). Всего выявлено 18 вариантов гемагглютинина и 11 разновидностей нейраминидазы, причем природным резервуаром H1-N16 и N1-N9 считаются птицы, тогда как подтипы H17N10 и H18N11 были обнаружены недавно только у летучих мышей [22]. Вирусы гриппа типа В вызывают острые респираторные заболевания среди людей, чаще всего детей, а также часто становятся причиной сезонных эпидемий гриппа. Разделяют две линии вируса гриппа В: В/Ямагата и В/Виктория, которые существенно отличаются друг от друга по своим антигенным свойствам [23]. Вирус гриппа типа С способен заражать только людей, в подавляющем большинстве – детей младшего возраста, при этом не вызывает значительных клинических проявлений, поэтому не представляет существенного интереса для практического здравоохранения. Вирус гриппа типа D был открыт в 2012 году и пока еще мало изучен, однако известно, что он способен инфицировать крупный рогатый скот, который является его основным резервуаром, а в 2019 году вирус гриппа типа D был обнаружен у одногорбых верблюдов в Эфиопии. География распространения этого типа вируса гриппа достаточно обширна – от Франции до Китая [24] [25].

1.1.1. Структура вириона и геном вируса гриппа А

Частица вируса гриппа представляет собой вирион круглой или продолговатой формы размером от 80 до 120 нм, на поверхности которого выступают «шипы» и «грибы» – поверхностные белки вируса гриппа гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), соответственно (рисунок 1) [26]. Эти белки являются основными антигенами вируса гриппа, причем их количественное соотношение в вирионе оценивается как 4:1, кроме этого HA и NA имеют сайты гликозилирования, следовательно, являются гликопротеинами.

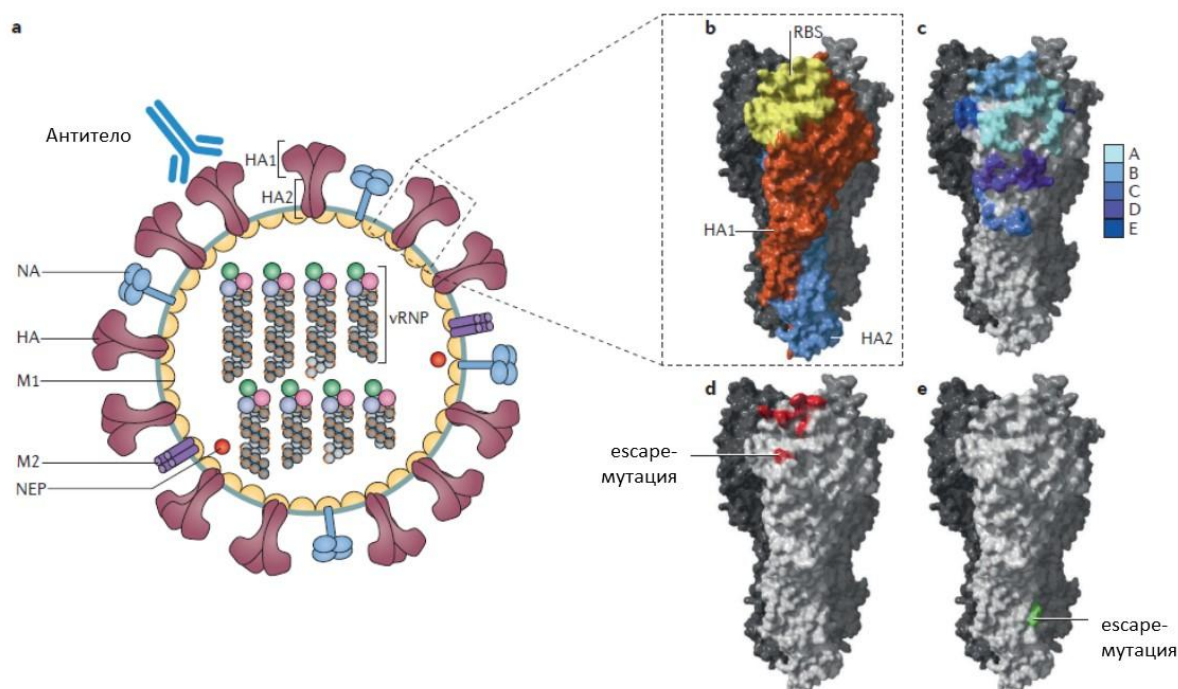


Рисунок 1. Структура вириона вируса гриппа А. Адаптировано из [26].

Геном вируса гриппа А сегментирован и состоит из 8 фрагментов различной длины, которые кодируют до 17 вирусных белков, по меньшей мере девять из которых являются структурными. В сердцевине вириона строго упорядочены РНК-фрагменты вирусного генома, упакованные в нуклеопротеидный белок (NP), также там находится вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза, состоящая из трех субъединиц (PB2, PB1 и PA), и белок, отвечающий за транспорт вирусного генома из ядра (NEP, nuclear export protein). Упакованный вирусный геном окружен толстым слоем матричного белка (M1) и оболочкой из плазматической мембраны, в которой находятся три трансмембранных белка – HA, NA и белок, формирующий ионный канал (M2). Вирус гриппа проникает в клетку путем эндоцитоза, начиная свой инфекционный цикл с прикрепления к сиаловому рецептору клетки-хозяина [27], попадая внутрь, ведет ее по литическому пути, при этом транскрипция и обратная транскрипция вирусных негативных РНК и мРНК проходит в ядре, в отличие от остальных РНК-содержащих вирусов. Завершается жизненный цикл вируса гриппа массовым выходом нового поколения вирусных частиц, клетка-хозяин в большинстве случаев при этом погибает.

1.1.2. Гемагглютинин

Гемагглютинин – трансмембранный гликопротеин, являющийся основным антигеном вируса гриппа, который представлен гомотримером шиповидной формы и кодируется в

четвертом сегменте вирусного генома. После транскрипции мРНК транспортируется из ядра в шероховатый эндоплазматический ретикулум, где происходит трансляция и синтез белка гемагглютинаина, который сначала синтезируется в виде предшественника HA0 – полипептидной цепи длиной 562-568 аминокислот, после чего сразу попадает в просвет транспортной везикулы, где подвергается процессингу – отщепляется сигнальный пептид, происходит гликозилирование, сульфатирование и ацилирование молекул [28]. После созревания нового поколения вирионов молекулы HA состоят из двух субъединиц (HA1 и HA2), соединенных дисульфидной связью, между ними встроен так называемый cleavage-сайт, после протеолиза которого молекула гемагглютинаина меняет свою конформацию, становится активной и способной связываться с сиаловыми рецепторами новой клетки-хозяина [29]. Кливедж-сайт представляет собой последовательность из 6 аминокислот, последняя из которых основная, чаще всего аргинин, эта последовательность служит сайтом узнавания чаще всего для трипсин-подобных протеаз, что характерно для низкопатогенных вирусов гриппа [30], [31]. В отличие от этого, высокопатогенные вирусы гриппа птиц несут полиосновный кливедж-сайт, что приводит к протеолитической активации фуриноподобных протеаз, которые находятся практически во всех органах [30], [31], [32]. Так полиосновный кливедж-сайт является главным молекулярным маркером высокопатогенных вирусов гриппа, он существенно повышает их эпидемический и пандемический потенциал.

Гемагглютинин – трансмембранный вирусный белок и имеет эктодомен, трансмембранный и цитоплазматический домены. Цитоплазматический домен (ЦД) представляет собой белковый хвост из 13 аминокислот на конце молекулы с тремя сайтами пальмитилирования, которые являются высоко консервативными и отвечают за латеральную сортировку и антероградный перенос гликопротеина [33]. Функции ЦД на данный момент охарактеризованы недостаточно, однако известно, что удаление внутриклеточного домена гемагглютинаина приводит к нарушению внутриклеточного транспорта белков [33]. В настоящее время известно, что трансмембранный домен (ТМД), длиной 27 аминокислот, выполняет не только роль якоря для эктодомена (ЭД) молекулы гемагглютинаина, но и напрямую влияет на формирование поры слияния [34], а также вместе с ЦД вовлечен в нацеливание гемагглютинаина на липидный рафт [35] [36]. Внеклеточный домен молекулы гемагглютинаина является самым большим – 518 аминокислот – и включает в себя стеблевой и глобулярный домены. Stalk-домен молекулы состоит из большой α -спирали и других вторичных структур, при этом она достаточно консервативна и в меньшей мере подвергается антигенному дрейфу, чем глобулярная часть. Кроме этого, к стеблевому

домену НА формируются антитела, обладающие защитной эффективностью против широкого спектра подтипов вируса гриппа А, что делает их привлекательными для разработки универсальной гриппозной вакцины [37], [38]. Глобулярный домен молекулы гемагглютинаина располагается между двумя цистеинами (позиции 52 и 277) и содержит наиболее важные участки НА, такие как рецептор-связывающий сайт, сайты гликозилирования и антигенные сайты молекулы гемагглютинаина, формирующие основные свойства вируса гриппа. Так рецептор-связывающий сайт (РСС) молекулы НА отвечает за прикрепление вирусной частицы к сиаловому рецептору клетки и состоит из петли-130, α -спирали-190, петли-220 и отдельных аминокислот [39]. У вирусов гриппа существует два типа РСС: птичий и человеческий. Рецептор птичьего типа – это остаток сиаловой кислоты, прикрепленный к остатку галактозы через связь $\alpha 2$ -3, а рецептор человеческого типа – через связь $\alpha 2$ -6. В силу различных внешних воздействий, а также эволюционного давления РСС способен менять тип рецепторной специфичности с одного на другой, а также иметь двойную специфичность, что часто бывает в переходном периоде при переключении рецепторной специфичности [6]. Также у молекулы гемагглютинаина был обнаружен вторичный сайт связывания сиаловых рецепторов (сиалил-лактозы), который находится на границе двух субъединиц НА, обладает аффинностью в 4 раза меньше, чем первичный сайт связывания, и, по всей видимости, не несет физиологической важности [40].

Гликозилирование молекулы НА – важный этап процессинга молекулы, а также фактор, влияющий на различные свойства вируса гриппа, такие как антигенность, вирулентность, активность слияния мембран, связывание с рецептором и уход от иммунного ответа [41]. Влияние гликозилирования на антигенность вируса гриппа происходит за счет прикрепленного олигосахарида, который «маскирует» поверхность белка от антител, делая антигенную детерминанту молекулы НА стерически недоступной. Появление новых сайтов гликозилирования, которое происходит под давлением антител, способствует уходу вируса гриппа от иммунного ответа. [42], [43], [44].

У молекулы гемагглютинаина Н3 различают пять антигенных сайтов (А, В, С, D, Е), а у молекулы гемагглютинаина Н1 – четыре антигенных сайта (Sa, Sb, Ca, Cb), которые являются основной мишенью для образования антител [45], [46]. Все антигенные сайты располагаются в глобулярном домене молекулы гемагглютинаина, причем некоторые совпадают с рецептор-связывающим сайтом, что является ожидаемым, т.к. нейтрализация инфекции наиболее эффективна при предотвращении связывания вируса с рецептором на поверхности клетки.

1.1.3. Нейраминидаза

Нейраминидаза является еще одним поверхностным гликопротеином вируса гриппа и представляет собой гомотетрамер, заякоренный в мембрану, грибовидной формы. Основная функция этого белка заключается в отщеплении остатков сиаловой кислоты от клеточного рецептора для высвобождения новых вирусных частиц из зараженной клетки [47], что означает, что молекула нейраминидазы обладает ферментативной активностью. Также предполагается, что нейраминидаза помогает вирусным частицам проникнуть к эпителиальным клеткам через секреты слизистых оболочек, богатыми сиаловой кислотой [48]. Нейраминидаза является гликопротеином 2-го типа, у нее нет отщепляемого сигнального пептида, а N-концевой гидрофобный участок, закрепляющий синтезируемый белок в мембране цитоплазматического ретикулума, т.е. работающий как сигнальный пептид, играет роль якорного трансмембранного участка.

Молекула нейраминидазы состоит из 4-х основных участков: цитоплазматический домен (6 аминокислот), гидрофобный трансмембранный домен (7-29 аминокислот), ножка (до 50 аминокислот, у некоторых штаммов наблюдаются делеции) и глобулярный домен нейраминидазы, содержащий активный центр фермента (19 аминокислот) [49]. Структура каждой субъединицы НА представляется собой 6 топологически одинаковых 4-цепочечных антипараллельных β -листов, сложенных как лопасти винта. Активный центр фермента находится в середине каждой субъединицы и представляет собой глубокий карман, причем составляющие его аминокислоты высококонсервативны среди всех штаммов вируса гриппа. Антигенные сайты нейраминидазы находятся на поверхностных петлях, окружающих активный центр фермента [50] [51].

Масштабное распространение устойчивости вирусов гриппа к препаратам адамантанового ряда (ремантадину) привело к увеличению интереса к ингибиторам нейраминидазы, которые в последствие стали новым классом эффективных противовирусных препаратов. Они блокируют активный центр белка, что предотвращает выход и распространение вирусных частиц [52]. В настоящее время в нашей стране зарегистрировано 2 препарата-ингибитора нейраминидазы: озельтамивир («Тамифлю») и занамивир («Реленза»), в США зарегистрирован также препарат перамивир («Рапиваб»), а в Японии с 2010 года применяется ланинамивир («Инавир»). Исследования показали, что аминокислотные остатки, влияющие на каталитическую функцию нейраминидазы, высоко консервативны среди всех вирусов гриппа А и В, что сделало их основными мишенями для противовирусных препаратов [53]. Однако, мутации в каталитической сайте и структурных остатках могут приводить к ингибитор-устойчивости. В соответствие с мировыми

данными восприимчивость вируса гриппа к ингибиторам NA в сезоне 2013-2014 годов составляла 98%, причем циркулировавшие в тот момент вирусы проявляли чувствительность ко всем 4-м ингибиторам, остальные 2% показывали устойчивость хотя бы к одному препарату, чаще всего к озельтамивиру. В течение того же сезона в Японии, а также в Китае и США, был выделен большой кластер вирусов гриппа подтипа A/H1N1-pdm09 с мутацией H275Y в гене NA, которая привела к устойчивости нейраминидазы к озельтамивиру и занамивиру. Такие штаммы выделялись в Японии в 2 раза чаще, чем во всем мире (4,1% циркулирующих вирусов гриппа с двойной устойчивостью), что нашло объяснение в активном использовании ингибиторов нейраминидазы для лечения гриппа в этой стране. Существует мнение, что количество устойчивых штаммов вируса гриппа к ингибиторам NA в будущем будет только увеличиваться из-за растущего использования этих препаратов [53]. Поэтому очевидна необходимость в разработке новых противовирусных препаратов, которые будут иметь более длительный и широкий спектр защиты против гриппа. Такие препараты разрабатываются в настоящее время и основаны на ингибировании вирусной РНК-полимеразы [54].

Рентгеноструктурный анализ нейраминидазы позволил установить четыре антигено-связывающих участка. Все эпитопы NA оказались структурными, однако исследования проводились лишь на трех подтипах нейраминидаз – N9, N1 и N2. Возможно, что при более масштабном рентгеноструктурном анализе нейраминидаз будут выявлены дополнительные антигенные сайты [53]. Хотя NA-специфические антитела могут быть неэффективны в предотвращении инфекции, они способны ингибировать распространение вируса, уменьшая тем самым тяжесть болезни. Эпидемиологические наблюдения свидетельствуют, что урон при пандемии Гонконгского гриппа A(H3N2) 1968 года был меньше, чем при пандемии Азиатского гриппа A(H2N2) 1957 года из-за предсуществующих антител к N2, которые смягчили воздействие нового пандемического вируса [55].

Прошлые исследования не показали различия в иммуногенности между гемагглютинином и нейраминидазой. Поэтому, если сбалансировать вакцинный состав или добавить к существующим инактивированным тривакцинам очищенные белки N1 и N2, это позволит индуцировать более сбалансированный иммунный ответ, который в классических используемых вакцинах имеет перекос к гемагглютину [56]. По той же причине было установлено, что антигенная конкуренция между HA и NA приводит к большему праймированию Т- и В-клеток в сторону HA, вызванного, скорее всего, из-за большего количества белка HA на поверхности вириона, и его усиленной презентации антиген-распознающими клетками иммунной системы [57]. Роль антинейраминидазных антител

была продемонстрирована рядом исследований, посвященных вакцинам на основе нейраминидазы, таким как NA-вакцине, очищенной аффинной хроматографией; ДНК-вакцине, кодирующей нейраминидазу; вакцине, полученную с помощью экспрессии в клетках млекопитающих; рекомбинантной нейраминидазе, произведенной в бакуловирусной системе, а также вакцине на основе вирусоподобных частиц с коэкспрессией NA и NA и/или М-белка. Для оценки антинейраминидазных антител наиболее точным считается метод фермент-связанного лектина (РИНА) [58].

1.1.4. Антигенный шифт и антигенный дрейф

Вирус гриппа считается самым изменчивым возбудителем инфекционных заболеваний, чему способствует структура и тип генома: одноцепочечная РНК легко мутирует, создавая новые антигенные варианты вируса, а сегментированный геном позволяет проходить такому явлению, как реассортация генов. Поэтому различаются два типа эволюционной изменчивости вируса гриппа – антигенный шифт и антигенный дрейф. Антигенный шифт основан на «пересортировке» генов в случае смешанной инфекции чувствительной клетки двумя и более штаммами вируса гриппа, в результате чего появляются варианты, унаследовавшие часть генов от одного вируса, часть – от другого. Так появляется совершенно новый вирус гриппа, который наследует свойства от родительских штаммов. При изучении эволюции генов различных штаммов вируса гриппа было показано, что пандемии 1957 и 1968 годов были вызваны реассортантными штаммами человеческого и птичьего вирусов гриппа [9] [6], а причиной пандемии 2009 года являлся тройной реассортант, унаследовавший различные гены от свиного, птичьего и человеческого вирусов гриппа [59].

Антигенному дрейфу – мутационной изменчивости – наиболее сильно подвержены основные антигены вируса гриппа: поверхностные гликопротеины HA и NA, хотя другие вирусные белки также приобретают точечные аминокислотные замены, но в значительно меньшей степени, самыми консервативными считаются матриксный белок и нуклеопротеид. Для гемагглютиниона и нейраминидазы антигенный дрейф является важным способом ухода от иммунного ответа [60]. В последние годы особенное внимание приковано к эффекту импринтинга или так называемого «первичного антигенного греха». Импринтинг – эффект запоминания антигенных сайтов штамма вируса гриппа, с которым организм столкнулся впервые, при этом развивается обычная иммунная реакция, В-клетки вырабатывают антитела, происходит нейтрализация вируса и постепенное выздоровление организма. При этом В-клетки, которые выработали противовирусные антитела, становятся

клетками памяти. Через некоторое время вирус гриппа, подвергаясь антигенному дрейфу, мутирует и в первую очередь для того, чтобы уйти от иммунного ответа организма, именно для этой цели был выработан механизм, который позволяет вирусу гриппа минимально изменять края антигенного сайта гемагглютиниона, при этом основная часть его остается идентичной предыдущему вирусу, что позволяет незначительно изменить форму антигенного сайта. Однако, этого становится достаточно для того, чтобы уже имеющиеся в организме антитела не могли эффективно связываться с вирусом и нейтрализовать его, то есть В-клетки памяти распознают новый вирус как предыдущий и продуцируют «старые» антитела, а наивные В-клетки не синтезируют антитела *de novo*. Иммунная система не распознает новую инфекцию и использует уже имеющиеся средства защиты. Все вышесказанное приводит к тому, что инфекция быстро распространяется в организме, не встречая адекватного сопротивления со стороны иммунной системы, что часто приводит к тяжелым осложнениям гриппа, а нередко и к летальным исходам.

Таким образом, эволюция вируса гриппа, а именно, его изменчивость, имеют колоссальное значение в эпидемиологии этой инфекции, поэтому антигенный шифт и антигенный дрейф всегда находятся под пристальным вниманием мирового научного сообщества, а глубокое понимание эволюционных процессов, возможно, позволит в будущем предсказывать эти события.

1.2. Гриппозные вакцины

Ежегодно вирус гриппа поражает 3-5 миллионов человек во всем мире, число смертельных случаев заболевания при этом варьируется от 290 до 650 тысяч [61]. Поскольку изменчивость вируса гриппа очень высока, что способствует преодолению иммунного барьера организма за счет отдельных мутаций и или реассортации генов, ликвидация этой инфекции среди людей не представляется возможной в ближайшем будущем. Самым эффективным способом защиты от гриппа считается специфическая вакцинация, способствующая предотвращению инфекции за счет заблаговременной выработки иммунитета к антигенно актуальным штаммам вируса гриппа А и В, и позволяющая защитить наиболее уязвимые группы населения от осложнений гриппозной инфекции, а также уменьшить заболеваемость трудоспособного населения, следовательно, и экономические потери [62]; [63]; [64].

Для эффективной подготовки к ежегодному эпидемическому сезону гриппа, ввиду его постоянной изменчивости, существует Глобальная система по эпиднадзору за гриппом и ответным мерам (Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)). GISRS –

партнерская сеть, объединяющая национальные центры гриппа (общим числом 141) в 111 странах, 6 сотрудничающих центров ВОЗ и 4 ведущие референс-лаборатории ВОЗ. GISRS на постоянной основе собирает и анализирует образцы вирусов гриппа по всему миру, а также дважды в год дает рекомендации по составу вакцинных штаммов для Южного и Северного полушарий [65].

1.2.1. Типы гриппозных вакцин и их производства в мире

Существует несколько типов гриппозных вакцин – живые, инаktivированные, белковые рекомбинантные, ДНК-вакцины и РНК-вакцины, однако, в практике здравоохранения сейчас присутствуют только два типа – живые и инаktivированные вакцины. В развитых странах живыми вакцинами рекомендуется прививать в первую очередь детей от 2 до 17 лет, взрослому населению рекомендованы как живые, так и инаktivированные вакцины, а людям старшего возраста – в основном инаktivированные вакцины с повышенным содержанием антигена [66].

С быстрым развитием молекулярных биотехнологий в последние десятилетия появились новые концепции гриппозных вакцин, заслуживающих внимания, например, РНК-вакцины, способные вызывать широкий гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также эффект самоусиления врожденного иммунитета, а доклинические и клинические испытания РНК-вакцины против птичьих вирусов гриппа А(Н7N9) и А(Н10N8) показали высокие уровни защитных антител [67]; [68]. Также нельзя не упомянуть и ДНК-вакцины против гриппа, которые основаны на подкожном введении без использования игл самореплецирующихся ДНК-копий 6 генов вируса гриппа, что позволяет обеспечить эффективную защиту животных от инфекции, поэтому такой тип вакцин активно используются в ветеринарии, а также преимущество генно-инженерных вакцин заключается в быстрой масштабируемости при экстренной необходимости увеличения производства, например, при наступлении пандемии [69]; [70]. Однако, на сегодняшний день все экспериментальные вакцины еще далеки от лицензирования и их использование среди людей не представляется возможным в последующие 10-20 лет.

Таким образом, в клинической практике используются два основных типа гриппозных вакцин – живые и инаktivированные. Изначально вакцины против гриппа были трехвалентными для защиты от двух циркулирующих подтипов вируса гриппа А (подтипов Н3N2 и Н1N1) и от вируса гриппа В, который в 1988 году разделился на две антигенно отличающиеся генетические линии [71], коциркуляция, привела к разработке и

лицензированию четырехвалентных вакцин, содержащих штаммы обеих линий вируса гриппа В [72]; [73]; [74].

1.2.2. Инактивированные гриппозные вакцины

Инактивированные гриппозные вакцины применяются с 1940-х годов и за всю историю их применения было лицензировано 26 вакцин, 13 из которых присутствуют на современном рынке. Первым поколением ИГВ были цельновирионные вакцины, которые представляли собой суспензию очищенных «убитых» неразрушенных вирионов вируса гриппа. Сравнительно большое количество побочных эффектов от таких вакцин, особенно у детей младшего возраста, привело к созданию второго и третьего поколения ИГВ – сплит-вакцин и субъединичных вакцин, соответственно. Сплит-вакцины состоят из разрушенных вирионов и содержат все структурные вирусные белки. Субъединичные вакцины, напротив, содержат только основные антигены вируса гриппа – гемагглютинин и нейраминидазу. Из всех инактивированных вакцин субъединичная ИГВ является наименее реактогенной, при этом иммуногенность цельновирионной и сплит-вакцины практически одинакова [75]. Все инактивированные вакцины вводятся в организм парентерально и стандартизированы по количеству основного белка – гемагглютинина – на каждый штамм. Чаще всего применяются ИГВ с количеством белка 15 мкг НА, хотя существуют и вакцины с повышенным содержанием антигена в 60 мкг НА. Для повышения иммуногенности в инактивированных гриппозных вакцинах зачастую используются адъюванты – вещества, способные в присутствии антигена усилить выработку на него иммунного ответа организма. В основном используются адъюванты типа MF59 и ASO3 для повышения иммуногенности, а также для уменьшения количества белка в пандемических вакцинах, хотя существует и множество других – алюмин, AF03, виросомы, полиоксидоний и другие [76]. Инактивированные гриппозные вакцины разрешены для применения у детей старше 6 месяцев, причем в последние годы появилась тенденция применения среди маленьких детей ИГВ без адъювантов, так как с некоторыми из них связывались такие побочные эффекты как нарcolepsia [77]. В России в настоящее время наиболее широко применяются полимер-субъединичные вакцины, содержащие пониженное количество белка (5 мкг НА для каждого вакцинного штамма), при этом обладают высокой степенью иммуногенности за счет иммуностимулятора полиоксидоний [78], а также субъединичные вакцины с новым адъювантом совидон, применение которых разрешено для детей с 6-месячного возраста [79]. А также с 2018 года широко применяется расщепленная субъединичная вакцина «Ультрикс» и «Ультрикс Квадри», уникальность которой заключается в создании виросом,

содержащих как поверхностные, так и внутренние белки вириона, а также липиды вирусной оболочки, при этом в данной вакцине отсутствуют адьюванты, что несомненно является ее преимуществом [74].

Основным недостатком инактивированных вакцин является необходимость вводить их парентерально, в результате чего отсутствует формирование секреторного иммунного ответа в верхних дыхательных путях – входных воротах инфекции. При введении ИГВ индуцируется преимущественно IgG-опосредованный штамм-специфичный гуморальный иммунный ответ, не способный защитить привитых от инфекции, вызванной дрейфовым вариантом вируса гриппа [80]. Кроме того, ИГВ не способны индуцировать длительный Т-клеточный иммунный ответ на вакцинацию [81]; [82]. Согласно опубликованному в 2016 году мета-анализу данных по эффективности вакцин с 2004 по 2015 гг, эффективность ИГВ составила 33% для вирусов A(H3N2) (и лишь 23% для дрейфовых вариантов вируса A(H3N2)), 61-67% для вирусов гриппа A(H1N1) и 54% для вирусов гриппа типа В [83]. Слабая способность ИГВ защищать от дрейфовых вариантов вируса гриппа A(H3N2) существенным образом сказывается на ее эффективности в эпидемические сезоны, вызванные циркуляцией антигенно отличающихся вариантов вируса подтипа H3N2 [84]; [85]; [86], [8]. Однако, было показано, что ИГВ может индуцировать кросс-реактивные НА-специфические антитела, участвующие в явлении антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) и обеспечивающие перекрестную защиту от антигенно отличающихся вирусов A(H3N2) [87].

Подавляющее большинство вакцинных штаммов для ИГВ готовится на основе высокорепродуктивного донора – штамма A/PR/8/34 (H1N1) (PR8) [88]. Данный вирус был выделен в 1934 году и с тех пор имеет большую пассажную историю, за которую прошел более 100 пассажей в тканях мышей, хорьков, а также в системе развивающихся куриных эмбрионов, в результате чего утратил способность реплицироваться в клетках человека, т.е. стал безвредным для людей [89]. Стоит отметить, что в ранних исследованиях количество генов донора PR8, включенных в вакцинный реассортантный штамм, значительно варьировала ввиду использования метода классической реассортации для подготовки высокорепродуктивных штаммов. При этом было показано, что степень аттенуации вакцинных штаммов для людей напрямую зависела от количества включенных в геном вакцинного вируса генов PR8 [90]; [91]. В настоящее время практически все реассортантные штаммы для ИГВ готовятся методами обратной генетики, поэтому всегда содержат шесть генов внутренних и неструктурных белков от донора PR8, исключая возможность усиления вирулентных свойств вируса [88]. Тем не менее, остается вопрос о

сохранении остаточной вирулентности для человека у реассортантных штаммов ИГВ, подготовленных из высокопатогенных потенциально-пандемических вирусов гриппа птиц, поскольку показано влияние поверхностных антигенов вакцинных штаммов как на вирулентные, так и на высокорепродуктивные свойства вакцинных штаммов [92]. Поэтому в последние годы обсуждается вопрос о возможности дополнительно модифицировать высокорепродуктивный донор PR8 с целью усиления аттенуирующих свойств вакцинных штаммов ИГВ, подготовленных на его основе, что является чрезвычайно важным в контексте безопасности вакцинного производства.

1.2.3. Живые аттенуированные гриппозные вакцины

История живых гриппозных вакцин началась в 30-х годах прошлого столетия, когда выдающимся советским вирусологом А.А.Смородинцевым впервые был предложен метод аттенуации вируса гриппа методом переадаптации возбудителя путем многократного пассирования в органах различных животных, а 1948 года – в куриных эмбрионах (изменение круга хозяев, *host-range*). Такие ЖГВ, приготовленные из *host-range* мутантных штаммов, были изучены в многочисленных эпидемиологических наблюдениях на взрослых и показали, в среднем, двукратное снижение заболеваемости гриппоподобными инфекциями среди привитых лиц, а при серологической коррекции снижение заболеваемости гриппом достигало 5-кратного значения [93].

В 1960-х годах был предложен новый метод аттенуации вируса гриппа – пассирование при пониженных температурах инкубации, которое должно было сделать ЖГВ более безопасными, в особенности, для детей. Предполагалось, что вирусы, адаптированные к пониженной температуре, будут размножаться преимущественно в верхних дыхательных путях, а не в легких, уменьшая таким образом клинические симптомы [94]; [95]. Этот подход широко использовался в СССР с 1958 по 1972 год для подготовки ЖГВ для детей. Крупномасштабные плацебо-контролируемые исследования эффективности на более чем 200 000 детей продемонстрировали в среднем двукратное снижение заболеваемости в вакцинированных группах по сравнению с контролем [93]; [96]. Одним из первых вакцинных штаммов, полученным методом холодовой адаптации, явился вирус А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен17), прошедший 17 дополнительных пассажей в РКЭ при 25- 26°C вакцинного штамма ЖГВ типа «*host-range*», который, в свою очередь, был получен из вируса дикого типа А/Ленинград/134/57 (H2N2) после 20 пассажей в РКЭ при оптимальной температуре 32°C [93].

После обнаружения сегментированности генома вируса гриппа и возможности реассортации двух штаммов вируса гриппа внутри одного типа, Г.И.Александровой в 1977 году был предложен новый способ получения ЖГВ путем реассортации дикого вируса с хорошо охарактеризованным лабораторным штаммом – донором аттенуации [97]; [98] [99]. Суть предложенного метода заключалась в том, чтобы вакцинный штамм наследовал от эпидемического вируса гены, кодирующие поверхностные белки НА и NA, чтобы сохранить антигенную актуальность, а остальные шесть генов – от донора аттенуации, отвечающего за безвредность для человека. Доноры аттенуации для современных лицензированных вакцин являются холодоадаптированными вирусами, которые отвечают в вакцинных штаммах ЖГВ за температурочувствительность (*ts* фенотип), холодоадаптированность (*ca* фенотип) и аттенуацию (*att* фенотип).

Для первой в мире реассортантной ЖГВ в качестве донора аттенуации был выбран штамм Лен17, так как результаты многочисленных исследований подтвердили его безопасность, высокую иммуногенность, а также высокий уровень репродукции в куриных эмбрионах. Кроме этого, для дополнительного обеспечения безопасности новых реассортантных штаммов ЖГВ для детей был разработан более аттенуированный донор, А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) (Лен47), полученный в результате 30 пассажей в РКЭ при пониженной температуре донора Лен/17 [100]; [101]. Для подготовки реассортантных штаммов ЖГВ против вирусов гриппа типа В был разработан холодоадаптированный донор аттенуации В/СССР/60/69 (В/60) путем 60-кратного пассирования эпидемического вируса в РКЭ при 25°C [93]; [102]. После проведения масштабных эпидемиологических наблюдений в различных возрастных группах в 1987 году были лицензированы трехвалентные вакцины для взрослых на основе доноров Лен/17 и В/60 и для детей 3-14 лет на основе доноров Лен/47 и В/60 [103]; [104]; [105]. Важное преимущество живой гриппозной вакцины над инактивированной было выявлено в ходе сравнительных эпидемиологических исследований сезонных вакцин на детях школьного возраста: ЖГВ способна вызывать образование коллективного иммунитета, в то время как у ИГВ таких возможностей нет [2]. Для живых гриппозных вакцин, подготовленных на основе доноров Лен/17 и Лен/47, последующие сравнительные эпидемиологические наблюдения, на детях в возрасте 3-14 лет продемонстрировали схожий уровень переносимости обеих типов ЖГВ, хотя иммуногенность вакцин существенно различалась: для достижения уровня сероконверсий и титров антител, индуцируемых одной дозой ЖГВ на основе донора Лен/17, требовалась двукратная вакцинация ЖГВ на основе донора Лен/47 [102]. На основании этих данных, использование ЖГВ на основе донора Лен/47 было прекращено в

2001 году. В настоящее время трехвалентная ЖГВ на основе доноров Лен/17 и В/60 применяется в России для иммунизации взрослого населения и детей в возрасте от 3 лет.

Российская технология производства живой гриппозной вакцины в 2009 году была передана ВОЗ для подготовки к пандемии гриппа в развивающихся странах по лицензионному договору, согласно которому штамм H1N1pdm09 пандемической вакцины на основе донора Лен/17 был передан в Индию, Таиланд и Китай для производства моновалентной пандемической вакцины. На сегодняшний день предприятия Индии и Китая лицензировали в своих странах трехвалентную сезонную ЖГВ на основе российских доноров аттенуации и осуществляют ее производство [106]; [107].

Противопоказания к применению ЖГВ является возраст до 3 лет в России и до 2 лет в остальных странах, беременность и аллергия на куриный белок. Сравнительные исследования эффективности ИГВ и ЖГВ на детском контингенте от 2 до 17 лет в Германии показали, что эффективность ЖГВ (84%) значительно превышает эффективность ИГВ (37%), при этом наибольшая защита наблюдается у детей младшего возраста от 2 до 6 лет и достигает 90% [108]. Важно отметить, что недавние исследования эффективности и безопасности живой гриппозной вакцины показали, что ЖГВ можно без опаски применять детям младшего возраста, страдающим астмой [109]; [110], а клинические испытания фазы II или III в Бангладеш показали отсутствие достоверных отличий в побочных эффектах ЖГВ у детей от 2 до 5 лет с астмой и их здоровых сверстников [111]. Более того, ретроспективное исследование на выборке почти 400 тысяч детей от 2 до 18 лет показало, что после применения ЖГВ снижается риск обострения астмы по сравнению с ИГВ [112].

В отделе вирусологии были подготовлены и всесторонне изучены вакцинные штаммы ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа A/H2N2, A/H5N1, A/H7N9, которые затем были исследованы в фазе I клинических испытаний, которые представляли собой двойные слепые рандомизированные плацебоконтролируемые исследования [113], [114], [115].

Клинические испытания штамма A/17/Калифорния/66/395 (H2N2) проводились на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ в 2013-2014 гг. на 38 взрослых здоровых добровольцах обоего пола в возрасте от 18 до 40 лет (28 в группе ЖГВ H2N2 и 10 в группе плацебо). Испытуемые вакцинировались последовательно двумя дозами с разницей в 28 дней, при этом в течение 6-7 дней после каждой вакцинации добровольцы находились в стационаре и выписывались только при условии отсутствия вирусной РНК в носовых смывах. Иммуногенность ЖГВ оценивалась по гуморальному, так и по клеточному ответу. Гуморальный иммунный ответ оценивался в реакции торможения гемагглютинации,

реакции микронеutralизации и иммуно-ферментном анализе (IgG и IgA в сыворотке, IgA в носовых секретах, IgA в слюне), клеточный иммунный ответ оценивался по индукции интерферона- γ Т-клетками памяти. ЖГВ H2N2 была безвредна и хорошо переносилась здоровыми добровольцами как при однократном, так и при двукратном введении. Иммуногенность данного штамма по числу сероконверсий составила 85%, а увеличение уровня вирус-специфических Т-клеток памяти достигало 56%. Суммарная иммуногенность штамма A/17/Калифорния/66/395 (H2N2) в фазе I клинических испытаний составила 93% [114].

Клинические испытания штамма ЖГВ A/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) проводились на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ в 2014 году на 40 взрослых здоровых добровольцах обоего пола в возрасте от 18 до 49 лет. Также, как и предыдущих исследованиях добровольцы иммунизировались последовательно двумя дозами с разницей в 28 дней, при этом в течение 6-7 дней после каждой вакцинации добровольцы находились в стационаре и выписывались только при условии отсутствия вирусной РНК в носовых смывах. Иммунный ответ оценивался по уже указанной схеме. В исследовании была показана безвредность и хорошая переносимость ЖГВ H5N2. Уровень сероконверсий среди вакцинированных добровольцев составил 79%, а увеличение уровня вирус-специфических Т-клеток памяти достигало 69%. При этом суммарный иммунный ответ составил 97% [115].

Клинические испытания штамма ЖГВ A/17/Ануи/2013/61 (H7N9), проводились на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ в 2014 году на 40 взрослых здоровых добровольцах обоего пола в возрасте от 19 до 49 лет. Также, как и предыдущих исследованиях добровольцы иммунизировались последовательно двумя дозами с разницей в 28 дней, при этом в течение 6-7 дней после каждой вакцинации добровольцы находились в стационаре и выписывались только при условии отсутствия вирусной РНК в носовых смывах. Иммунный ответ оценивался по уже указанной схеме. Исследования реактогенности ЖГВ H7N9 показали ее безопасность и хорошую переносимость здоровыми взрослыми испытуемыми. Иммуногенность штамма A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) по числу сероконверсий составила 93%, а увеличение уровня вирус-специфических Т-клеток памяти достигало 53%. При этом суммарная иммуногенность ЖГВ H7N9 совпала с количеством сероконверсий – 93% [113].

Таким образом, потенциально пандемические реассортантные аттенуированные живые гриппозные вакцины показали себя безвредными, хорошо переносимыми и высоко-иммуногенными (от 93% до 97%). Оценку защитной эффективности ЖГВ против потенциально пандемических штаммов вируса гриппа возможно проверить только в случае

пандемии, поэтому создание банка безопасных высокоиммуногенных вакцинных штаммов является основным пунктом глобального плана противодействия пандемии гриппа [3].

1.2.5. Культуральные вакцины против гриппа

Все живые гриппозные вакцины в мире сегодня производятся в развивающихся куриных эмбрионах. Но при наступлении пандемии птичьего гриппа, в особенности в случае высокопатогенного штамма, велика вероятность нарушения работы птицефабрик и нехватки куриных эмбрионов для срочного производства пандемической вакцины. Данная проблема имеет решение при переводе вакцинного производства с РКЭ на перевиваемую культуру клеток млекопитающих, что позволит сделать производство независимым от поставок развивающихся куриных эмбрионов. Кроме этого, производство ЖГВ на культуре клеток позволит в максимально короткие сроки нарабатывать большие объемы вакцины, что необходимо в случае наступления пандемии, а также позволит применять вакцину людям, страдающим аллергией на куриный белок.

Разработки клеточной вакцины начались около двух десятилетий назад. Способность реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ активно реплицироваться в культуре клеток MDCK была показана в многочисленных исследованиях, как на уровне лабораторий, так и в производственном масштабе [116]; [117]; [118]; [21]. В 2012 году Управление по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами в США одобрило использование первой трехвалентной инактивированной вакцины против гриппа на основе адьюванта MF-59, произведенной на культуре клеток млекопитающих для лиц старше 18 лет [15], а в 2016 году была лицензирована и квадριвалентная клеточная инактивированная гриппозная вакцина [16]. Так в эпидемическом сезоне 2013-2014 на рынок США вышла первая клеточная инактивированная гриппозная вакцина FluCellVax (КИГВ), а проведенные исследования применения этой вакцины не выявили каких-либо патологий, связанных с побочными эффектами применения вакцины в 2013-2015 годах [119]. В первые эпидемические сезоны КИГВ производилась на основе диких вирусов, изолированных в РКЭ, соответственно, мутации, РКЭ-адаптационные мутации также присутствовали и в вакцинном антигене, а эффективность КИГВ была сравнима с ее аналогом, выращенным в РКЭ [120]. Однако, в августе 2016 года, компания Seqirus (США) получила разрешение от управления по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами в США выделять вирусы гриппа на линии клеток 33016PF MDCK для производства клеточной инактивированной гриппозной вакцины. Это позволило получить полностью клеточную вакцину компонента А(Н3N2), начиная с выделения вируса и заканчивая конечным

вакцинным продуктом [7]. Так, осенью 2017 года вакцина, содержащая антигены культурального вируса гриппа А(Н3N2), была введена миллионам людей. Предварительные оценки относительной эффективности показывают, что у людей старше 65 лет четырехвалентная КИГВ с клеточным компонентом А(Н3N2) обеспечила улучшение эффективности на 10,7% по сравнению с четырехвалентными вакцинами, произведенными в РКЭ, однако вакцина, полученная в РКЭ, с повышенным содержанием антигена дала повышение эффективности на 8,4% по сравнению с четырехвалентными вакцинами, произведенными в РКЭ [121]; [7]. Серологические исследования на животных и людях показывают, что клеточный антиген может улучшать защитную эффективность в определенные сезоны, особенно, в отношении А(Н3N2) и В компонентов гриппозных вакцин [122]; [123]; [124]. По данным крупного исследования при применении четырехвалентной культуральной ИГВ в сезоне 2017-2018 в США FluCellVax Tetra подтвердила свою профилактическую эффективность с возможными преимуществами перед гриппозными вакцинами на основе РКЭ [125]. Интересно, что в исследовании среди детского населения от 4 до 20 лет, более высокие показатели приростов поствакцинальных титров наблюдались у ранее невакцинированных подростков против вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2), выращенных в клетках, по сравнению с вакциной, выращенной в РКЭ, при этом у детей с предшествующим титром антител перед вакцинацией различий между вакцинами выявлено не было [126]. Аналогичные результаты были получены и в отношении средних приростов титров антител против В/Victoria среди реципиентов ИГВ4 в 2018-2019 гг [126]. Клеточная инактивированная гриппозная вакцина вызывала более сильную активацию генов интерферон-стимулированного и врожденного иммунитета по сравнению с гриппозной вакциной, полученной в развивающихся куриных эмбрионах. Участники исследования, у которых произошла сероконверсия, имели более высокую активацию интерферон-сигнализации по сравнению с теми, кто не сероконвертировался [127]. Постмаркетинговое исследование побочных эффектов, вызванных введением КИГВ в трех сезонах с 2019 по 2022 года показало, что частота побочных эффектов варьировалась от 0,4% до 1,75% и была одинаково низка во всех группах [128], [129].

При производстве клеточных гриппозных вакцин используются клеточные линии, адаптированные и растущие на среде, не содержащей добавки животного происхождения (сыворотки, ростовые факторы и т.п.). При этом важны различные свойства субстрата, в том числе и профиль гликозилирования белков при производстве вакцины. Так установлено, что клетки млекопитающих в качестве вакцинного субстрата наиболее точно отражают профиль гликозилирования белков человеческих вирусов гриппа, тогда как

куриные эмбрионы могут значительно его менять вплоть до потери или приобретения новых. Для рекомбинантных вакцин, которые производятся в культуре клеток насекомых, где профиль гликозилирования вирусных белков кардинально отличается от человеческих клеток, это является самым большим недостатком. Но несмотря на это, преимущества рекомбинантной вакцины в правильной укладке гемагглютинаина делают ее конкурентноспособной [7]. Исследования показывают, что наиболее заметным изменениям при гликозилировании вирусных белков подвержены суспензионные культуры клеток при их адаптации к бессывороточной среде. При этом изменения происходят только в типе присоединенных олигосахаридов или в их наполнении, но что наиболее актуально для кЖГВ, сайты гликозилирования на вирусных молекулах сохраняются [130]. Компания MedImmune (США) вела разработки в области клеточной ЖГВ (кЖГВ) с использованием собственной сублинии клеток MDCK, в которой вакцинные штаммы ЖГВ на основе доноров А/Энн Арбор/6/60 и В/Энн Арбор/1/66 были способны реплицироваться до титров, сопоставимых с РКЭ, при этом антигенные свойства вирусов не нарушались [117]; [118]. Однако клинических испытания данной кЖГВ не проводилось, поэтому сведения об иммуногенности данной вакцины для людей отсутствуют.

В настоящее время в мире проводится множество исследований различных культуральных гриппозных вакцин. Так исследователи из Тайваня показали, что кИГВ подтипа H7N9, полученная в суспензионной культуре клеток MDCK более иммуногенна в доклинических исследованиях на мышах по сравнению с адгезивной культурой MDCK и с классической вакциной, выращенной в РКЭ [131].

В исследованиях, проведенных компанией MERK совместно с ФГБНУ «ИЭМ», было показано, что российские вакцинные штаммы для сезонной ЖГВ хорошо репродуцируются на культуре клеток MDCK, а уровни защитной эффективности и иммуногенности культуральной ЖГВ и классической ЖГВ, подготовленной в РКЭ, были сопоставимы на животных моделях [132]. Крупные разработки с российской ЖГВ велись компанией Nobilon (Нидерланды), где на культуре клеток MDCK была произведена трехвалентная сезонная ЖГВ, а также проведены слепые, плацебо-контролируемые клинические испытания на 117 взрослых здоровых добровольцах 18-50 лет с однократной вакцинацией различными дозами вакцины: 1×10^5 , 1×10^6 или 1×10^7 тканевой цитопатической 50% инфекционной дозы для каждого из трех штамма в соответствии с рекомендацией ВОЗ в 2008-2009 годах. Увеличение титров антител в реакции торможения гемагглютинации произошло только для вируса А/Н3N2 во всех дозах вакцины, но для вирусов А/Н1N1 и В увеличение титров не наблюдалось. Сходная картина прослеживалась и с увеличением

вирус-нейтрализующих антител. Ни для одного штамма не был выявлен дозозависимый эффект, вакцина хорошо переносилась, не вызывая серьезных побочных явлений, и по частоте ожидаемых реакций была сопоставима с группой плацебо [133]. Однако, в связи с закрытием компании, разработки были прекращены.

Технология производства культуральной ЖГВ была ранее разработана в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск), при этом в качестве исходного сырья используются реассортантные вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные в отделе вирусологии им.А.А.Смординцева ИЭМ классическим методом реассортации в РКЭ. Так, вакцина на основе потенциально пандемического штамма вируса гриппа А/утка/Потсдам/1402-6/86 (H5N2), произведенная на культурах клеток MDCK и Vero методом роллерного культивирования, индуцировала высокие титры кросс-реактивных сывороточных и мукозальных антител у мышей [19]. Также на основе пандемического штамма ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) была подготовлена серия вакцины «Вектор-Флю» на культуре клеток MDCK. При адаптации к культуре клеток вакцинный штамм сохранял свои антигенные свойства, и при этом высокие показатели роста. В доклинических исследованиях вакцина «ВекторФлю» была безвредна и вызывала образование мощного иммунного ответа у хорьков уже после однократной иммунизации [20]; [21]. Компания «Вектор» зарегистрировала систему для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток млекопитающих и успешно произвела экспериментальную серию клеточных моновакцин против сезонных вирусов гриппа в 2015 году, а затем провела клинические испытания фазы I. Дальнейшее усовершенствование отечественной культуральной ЖГВ заключается в разработке микрокапсулированной формы препарата, обеспечивающей более высокую иммуногенность при интраназальном применении за счет повышения адгезии микрокапсул к слизистой оболочке носа [134].

В то же время в Индии проводятся исследования культуральной ЖГВ: в частности, результаты свидетельствуют о том, что при интраназальном способе введения ЖГВ, полученного на основе клеточных культур, риск возникновения опухолей, связанных с клетками хозяина, минимален или отсутствует, а культура клеток MDCK является неонкогенной [135].

1.3. Адаптационные мутации вируса гриппа

1.3.1. Адаптация вируса гриппа к новому хозяину, причины возникновения пандемий гриппа

После открытия различной рецепторной специфичности вирусов гриппа птиц и человека было обнаружено, что во время пандемии «азиатского» гриппа A(H2N2) в 1957 году вирусы адаптировались к новому хозяину, сменив тип рецептора с $\alpha 2,3$ на $\alpha 2,6$, при этом в начале пандемической волны одновременно циркулировали вирусы гриппа с обоими типами рецепторной специфичности [9]. Исследования показали, что ключевыми для переключения рецепторной специфичности вируса гриппа с птичьего на человеческий тип сиалового рецептора являются аминокислотные замены Q226L и G228S в HA1 молекулы гемагглютинаина [10]; [11]. В 1968 году в Гонгконге появился вирус A/H3N2, который также смог успешно адаптироваться от птичьего рецептора к человеческому и также наблюдалась пара циркулирующих вирусов с различной рецепторной специфичностью в начале пандемии, однако в значительно меньшей степени, чем в 1957 году [6]. При этом было обнаружено, что переключение рецепторной специфичности произошло при аминокислотных заменах в тех же позициях, что и в 1957 году, Q226L и G228S в HA1 молекулы гемагглютинаина. Таким образом, рецепторная специфичность вируса гриппа является важной характеристикой для оценки его пандемического потенциала, так как преодоление вирусом гриппа межвидового барьера неизбежно вызывает антигенный сдвиг у нового хозяина, который в свою очередь часто является причиной возникновения как минимум эпидемии, а возможно и пандемии гриппа.

В 2006 году в США от молодых поросят с тяжелой бронхолегочной пневмонией было выделено два штамма вируса гриппа подтипа H2N3, которые приобрели уже упомянутую аминокислотную замену в молекуле гемагглютинаина Q226L [12]. При этом исследования трансмиссивности на свиньях не показали передачи вируса от зараженного животного к здоровому, однако, на модели хорьков оба исследуемых вируса H2N3 были способны к эффективной передаче, но при этом значительных клинических проявлений не наблюдалось [12]. Свиньи считаются переходным звеном в адаптации птичьих вирусов гриппа к человеческим клеткам, так как имеют в своих дыхательных путях оба типа сиаловых рецепторов. Как показали исследования пандемии свиного гриппа в 2009 году, двойной набор рецепторов способствует образованию двойных и тройных реассортантов между вирусами птичьего, свиного и человеческого гриппа, один из которых в последствие может вызвать эпидемию и пандемию гриппа [136].

В марте 2013 года в Китае были зарегистрированы десятки случаев заражения людей птичьим гриппом подтипа H7N9, при этом смертность составляла более 30% [137]. Вирусы этого подтипа, полученные от первых пациентов, были тщательно исследованы ведущими мировыми лабораториями, которые выяснили, что вирус одного из клинических образцов приобрел ключевую мутацию Q226L в HA1 молекулы гемагглютинина, получив при этом двойную рецепторную специфичность, т.е. получив сродство к человеческому типу рецепторов [13]. Нужно отметить, что до сегодняшнего дня вирусы A(H7N9) пока не приобрели аминокислотную замену G228S, что вероятно, не позволяет им стать трансмиссивным и эффективно передаваться от человека к человеку. Однако, вероятность появления второй ключевой мутации в рецептор-связывающем сайте H7 остается высокой, как показывает история пандемий гриппа, поэтому ВОЗ объявила подтип H7N9 вируса гриппа потенциально пандемическим.

По недавно опубликованным данным четыре изолята вируса гриппа А подтипа H10N7, выделенные от чаек в Исландии, оказались способны к эффективной передаче среди хорьков. При генетическом анализе выяснилось, что выделенные вирусы близкородственны к вирусам гриппа этого же подтипа морских млекопитающих (тюленей, морских котиков) и вызывали среди них вспышки гриппа в 2014 году в Европе, но что более важно секвенирование гена гемагглютинина показало наличие лейцина в позиции 226, однако также, как и в случае подтипа H7N9, в позиции 228 остался глицин (по H3 нумерации) [14]. Вирусы данного подтипа в последние годы вызывали единичные случаи инфицирования человека, однако эффективной передачи среди людей зафиксировано не было, возможно, это связано с тем, что плотность населения в Исландии небольшая, а погодные условия существенно отличаются от Юго-Восточной Азии, где были зафиксированы случаи передачи вируса H10N8 человеку от дикой птицы со смертельным исходом [138]; [139].

В 2014 году было зарегистрировано 6 случаев передачи людям высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N6, три из которых оказались смертельными [140]; [141]. Подробное изучение 4х изолятов от диких водоплавающих птиц показало, что несколько из них приобрели сродство к человеческому типу рецепторов $\alpha 2,6$ и стали способны инфицировать эпителиальные и альвеолярные клетки трахеи человека. Сравнение нуклеотидных последовательностей показало практически полную идентичность человеческим изолятам H5N6, а по сравнению с последовательностью гемагглютинина подтипа H5N1 клэйда 2.3.4 было обнаружено 6 аминокислотных замен в рецептор-связывающем сайте молекулы – S133L, S137A, D187N, K193N, Q196K и S227R [142]. Также была отмечена потеря сайта

гликозилирования в позиции 158, способствующему более эффективной передаче вируса у морских свинок [143]. Изоляты H5N6 были полностью инфекционными и эффективно передавались при прямом контакте среди хорьков, однако имели менее выраженную патогенность по сравнению с родительским вирусом A(H5N1) [142].

1.3.2. Адаптация потенциально пандемического вируса птичьего гриппа A(H5N1) и A(H7N9) к клеткам млекопитающих

1.3.2.1. Адаптационные мутации в вирусах гриппа подтипа H5N1

Мутация K193T улучшает связывание вируса гриппа A(H5N1) с эпителиальными клетками трахеи человека, а также с $\alpha 2,6$ сиаловыми рецепторами, поэтому эта мутация может использоваться в качестве маркера потенциального пандемического риска птичьих вирусов гриппа A(H5N1) [144]. У мышей, зараженных штаммом A/Вьетнам/1194/2004 (H5N1), из легких был выделен вирус, несущий мутацию E190G (нумерация H3) в молекуле HA1, которая увеличивала авидность связывания вируса с $\alpha 2,6$ сиаловыми рецепторами и уменьшала сродство к $\alpha 2,3$ рецепторам, а также ассоциировалась с аттенуирующим фенотипом вируса у мышей. Так как указанная мутация находилась в рецептор-связывающем сайте HA, при ее появлении, вероятно, нарушился баланс работы HA-HA, что и привело к аттенуации вируса [145]. После адаптации того же штамма вируса к культуре клеток MDCK, был выделен клон с морфологией крупных бляшек, нуклеотидный анализ которого показал наличие мутаций K193E и G225E в молекуле HA1, местоположение которых определялась в РСС гемагглютинина. Интересно, что мутации не усиливали сродство к $\alpha 2,6$ рецепторам, а исследования штаммов с одной K193E и двумя K193E+G225E мутациями в субъединице HA1 на мышах показали, что вариант с двумя мутациями был существенно более аттенуирован, чем вариант с одной мутацией, однако, пока механизмы этой аттенуации не ясны [146]. На том же штамме вируса гриппа A/Вьетнам/1194/2004 (H5N1) было обнаружено, что наборы мутации Q192R+S223N и G139R+N182K в молекуле HA1 приводят к двойной рецепторной специфичности, повышая сродство к $\alpha 2,6$ рецепторам [147].

Адаптация к хорькам высокопатогенного птичьего вируса гриппа A/Индонезия/5/2005 (H5N1) путем 10-кратного пассирования вируса в легких животных привела к появлению мутации в T156A в HA1, которая повлияла на гликозилирование гемагглютинина, в 99,6% случаев [148]. Также для определения возможной трансмиссивности, в молекулу HA в различных вариациях были введены мутации N182K, Q222L и G224S в молекулу HA1 и E627K в PB2, при этом мутации Q222L и G224S были

выбраны как причины пандемий гриппа A(H2N2) и A(H3N2), мутация N182K была определена у людей, заразившихся подтипом H5N1, а мутация E627K в PB2 как уже установленный маркер трансмиссивности A(H5N1) в хорьках [9]; [6]; [147]; [149]. После адаптации к хорькам у мутантных штаммов, также как у дикого вируса, появилась аминокислотная замена T156A в HA1 в 89% случаях, а в других 11% появилась замена N154K, которая вела к потере того же сайта гликозилирования. После исследования клонов, способных к трансмиссивности, у всех из них были обнаружены дополнительные мутации T156A и H103Y в молекуле HA1, которые кроме всего прочего повышали аффинность к $\alpha 2,3$ рецепторам [148]. У мутантных штаммов с заменами Q222L и G224S наблюдалось переключение рецепторов с $\alpha 2,3$ на $\alpha 2,6$, но передача воздушно-капельным путем не детектировалась. Данное исследование показало, что для передачи вируса среди млекопитающих требуется не только переключение рецептора, но и набор мутаций во внутренних генах, который позволит птичьему вирусу эффективно реплицироваться в новых клетках-хозяевах [148]. Оказалось, важно, что мутации N154K, Q222L и G224S не влияют на антигенность вакцинных штаммов A(H5N1) [150]. Также интересно отметить, что наличие сайта гликозилирования в 154 положении оказалось критически важным при проявлении двойственной специфичности вирусов не только вирусов подтипа H5N1, но и подтипов H5N2, H5N5, H5N8 [151].

При исследовании индуцированных моноклональных антител к гемагглютнину птичьего вируса A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), была обнаружена мутация в S145P в молекуле HA1 и установлено, что она является escape-мутацией, при этом значительно повышает репродукцию на ранней стадии инфекции, а также термостабильность вируса. Еще интереснее тот факт, что введение двух дополнительных мутаций L124F + N79D в молекулу HA2 полностью нивелирует этот отрицательный эффект [152].

В исследовании мутаций в гемагглютанине, обнаруженных в клинических образцах пациентов с лабораторно подтвержденным вирусом гриппа A(H5N1), было показано, что мутации H125Y, H125Y+N94D, N182K+T195I+N94K, S223N, S223N+ Δ 128+I151T вели к повышению репродукции в первичных человеческих клетках дыхательных путей (SAE cells) [153]. В таблице 1 собраны все описанные мутации и их роль в проявлении биологических свойств штаммов вируса гриппа подтипа H5N1.

Таблица 1. Роль мутаций, обнаруженных в вирусах гриппа подтипа H5N1, в проявлении биологических свойств штаммов.

Белок	Мутация	Влияние мутации	Источник
HA1	H125Y	↑ репродукции в SAE cells	[153]

	S145P	Escape-мутация	[152]
	N154K	Потеря сайта гликозилирования	[148]
	T156A	Потеря сайта гликозилирования	[148]
	E190G	связывание $\alpha 2,6$; ↓ связывание $\alpha 2,3$; <i>att</i> у мышей	[145]
	K193T	↑ связывание $\alpha 2,6$	[144]
	S223N	↑ репродукции в SAE cells	[153]
	K193E+G225E	<i>att</i> у мышей	[146]
	Q192R+S223N	↑ связывание $\alpha 2,6$; Двойная рецепторная специфичность	[147]
	G139R+N182K	↑ связывание $\alpha 2,6$; Двойная рецепторная специфичность	[147]
	T156A+H103Y	Потеря сайта гликозилирования; ↑ связывания $\alpha 2,3$	[148]
	H125Y+N94D	↑ репродукции в SAE cells	[153]
	Q222L+G224S	Переключение рецепторной специфичности с $\alpha 2,3$ на $\alpha 2,6$	[148]
	N182K+T195I+N94K	↑ репродукции в SAE cells	[153]
	S223N+Δ128+I151T	↑ репродукции в SAE cells	[153]
HA2	L124F + N79D	Нивелирование эффекта мутации S145P	[152]

1.3.2.2. Адаптационные мутации в вирусах гриппа подтипа H7N9 к клеткам млекопитающих

Первые выделенные от человека штаммы A(H7N9) появились весной 2013 года и как и при пандемии появились два варианта, отличающиеся ключевой мутацией в HA, штамм A/Шанхай/2/2013 (H7N9) в позиции 226 нес глутаминовую кислоту (Q), а штамм A/Ануи/1/2013 (H7N9) – лейцин (L), чем способствовало повышению связывания человеческого рецептора, однако отсутствие глицина в позиции 228 не позволило вирусу эффективно передаваться среди людей [154]; [155].

Сравнение свойств потенциально пандемического штамма A/Ануи/1/2013 (H7N9) и пандемического штамма A/Аичи/2/68 (H3N2) обозначило как много сходства, так и много важных расхождений. В первую очередь, много аминокислотных остатков в петле 130, 140 и 220 молекулы HA очень похожи между этими двумя штаммами, а это структурные единицы РСС (таблица 2). Основываясь на высоком уровне подобия, было установлено, что контакты между аминокислотными остатками также схожи. Однако, были определены и ключевые различия, включающие в себя в первую очередь спираль-190 и петлю-150, необходимых для контакта с человеческим рецептором. В молекуле H3-Аичи с

человеческим рецептором связывались аминокислоты Q189, S193, K156 и S159, тогда как в молекуле Н7-Ануи – K193, T158, D159 и N160. Более того, в случае Н7-Ануи остаток R131 позиционировался как возможный добавочный связывающий человеческий рецептор остаток. Помимо указанных различий, также следует отметить и различие между штаммами во взаимодействии с позицией 228, в которой у Н3-Аичи находится серин, а у Н7-Ануи – глицин. Для молекулы Н3-Аичи позиция S228 очень важна при взаимодействии с аминокислотными остатками S186, T187 и E190, последняя из которых является критичной для связывания как человеческого, так и птичьего рецепторов. С другой стороны, G228 в Н7-Ануи не вовлечена в подобные межаминокислотные взаимодействия в том числе и с E190. Наконец, с эволюционной точки зрения А(Н7N9) аминокислоты 174S и 226L в молекуле НА1 являются уникальными для этого подтипа, что свидетельствует о том, что вирус А(Н7N9) мутировал, что значительно отличаться от предшественников [156].

Внесение в штамм вируса гриппа А/Шанхай/2/2013 (Н7N9) V186K, K193T и G228S в НА1 переключило рецепторную специфичность молекулы с птичьего рецептора на человеческий, одна исследований по трансмиссивности из соображений безопасности не проводились [157]; [158]. Выделенные от человека высокопатогенные штаммы вируса гриппа подтипа Н7N9 как и низкопатогенные вирусы несли в НА аминокислоту 226L, а также мутация S31N в М2, ответственная за устойчивость к препаратам адамантанового ряда, также наблюдалась у всех высокопатогенных изолятов, кроме этого в 3 из 4 изолятов в НА была обнаружена мутация R292K, ответственная за устойчивость к нейраминидазным ингибиторам [159]; [160]. При изучении эволюции человеческих вирусов А(Н7N9) было обнаружено, что они разошлись на линии А, В и С, при этом были идентифицированы различные связки мутаций: связка A135V, L177I, M236I, и S489N в гемагглютинине закрепились в линиях В и С в первой волне, а три из них A135V, M236I и S489N были обнаружены в четвертой и пятой эпидемической волне [161]. В линии С также были обнаружена связка аминокислотных замен A122T/P и M236I, а также связка L177I, G386A, S489R и S128N, причем последняя мутация принадлежит петле 130 РСС. За 2016-2017 годы циркуляции были также идентифицированы мутации I48T, A122P, K173E, L226Q, M236I, I326V и E393K, при этом три из них K173E, L226Q и I326V лежат в функционально важных сайтах (антигенном сайте Е, рецептор-связывающем и кливедж-сайте, соответственно) [161].

Адаптация штаммов вируса гриппа, подобных А/Ануи/1/2013 (Н7N9), к куриным после 30-ти пассажей в РКЭ показала три реверсии N133D, N158D и L226Q в молекуле НА1

[162], две из которых ведут к потере сайтов гликозилирования, а последняя находится в рецептор-связывающем сайте.

Внесение мутации G218E в гемагглютинин вируса-кандидата в вакцинные штаммы подтипа H7N9 способствовало значительному повышению его репродукции и в культуре клеток MDCK, и в системе РКЭ, при этом такой вирус эффективно защищал хорьков при челлендже диким вирусом A(H7N9) [163]. Вероятно, замена G218E в HA1 относительно сбалансировала работу HA-NA, за счет ослабления связывания вируса с клеточной мембраной, что способствовало высвобождению вирусного потомства, опосредованного NA.

Обнаружена РКЭ-адаптационная мутация R220G/I улучшила репродукцию вакцинного штамма на основе высоко-патогенного вируса А/Гуандун/17SF003/2016 (H7N9) и, кроме того, изменила антигенность вакцинного кандидата [164]. Мутация S128N в купе с сайтом гликозилирования 133NGS меняет антигенные сайты А и В гемагглютинина H7, что не позволяет индуцированным антителам нейтрализовать референс-штамм [165]. Это говорит о том, что человеческие штаммы подтипа H7N9 уже подверглись антигенному давлению и эффективно адаптируются к нему.

При исследовании культуральной ИГВ против A(H7N9) при 5-кратном пассировании штамма NIBRG-268 в культуре клеток MDCK была обнаружена мутация в молекуле HA1 A169S, которая приводила к появлению дополнительного сайта гликозилирования и повышению репродукции вакцинного кандидата в культуре клеток [166].

Таблица 2. Роль мутаций, обнаруженных в вирусах гриппа подтипа H7N9, в проявлении биологических свойств штаммов.

Белок	Мутация	Влияние мутации	Источник
HA1	S128N	Изменение антигенного сайта А	[165]
	N133D	Потеря сайта гликозилирования, РКЭ-адаптационная мутация; Изменение антигенного сайта В	[162]; [165]
	N158D	Потеря сайта гликозилирования, РКЭ-адаптационная мутация	[162]
	A169S	Приобретение сайта гликозилирования, MDCK-адаптационная мутация. ↑ репродукции в культуре млекопитающих	[166]
	K173E	Изменение антигенности (сайт Е)	[161]

	G218E	↑ репродукции в культуре клеток млекопитающих без изменения антигенности	[163]
	R220G/I	↑ репродукции; изменение антигенности	[164]
	Q226L	↑ связывание $\alpha 2,6$	[154]; [155]; [161]
	L226Q	↓ связывание $\alpha 2,6$, РКЭ-адаптационная мутация	[162]
	G228S		
	Q226L+G228S	Переключение рецепторной специфичности	[154]; [155]
	V186K+K193T+G228S	Переключение рецепторной специфичности	[157]; [158]
	I326V	Изменение кливедж-сайта	[161]
NA	R292K	Устойчивость к ингибиторам нейраминидазы	[159]; [160]

1.3.3. Адаптационные изменения сезонных вирусов гриппа A(H1N1) и A(H3N2) к клеткам млекопитающих

Смена клетки хозяина при размножении вируса гриппа неизбежно ведет к появлению адаптационных мутаций. Такие мутации могут влиять на разные свойства вируса гриппа: репродукцию, термостабильность, зависимость от кислотности среды, иммуногенность, антигенность, рецепторную специфичность, трансмиссивность и т.д. Для производства гриппозных вакцин свойства репродукции, иммуногенности и антигенности являются самыми важными, поэтому в этом разделе будут рассмотрены основные адаптационные мутации вируса гриппа к культуре клеток и развивающимся куриным эмбрионам.

1.3.3.1. Адаптационные мутации в вирусах гриппа подтипа H1N1 к клеткам млекопитающих

Пандемия гриппа A(H1N1) 2009 года стала очередным свидетельством того, что вирус гриппа является самым непредсказуемым. Так, тройной реассортант человеческого, птичьего и свиного гриппа стал причиной смертей сотен тысяч людей, с чего началось подробное изучение нового подтипа вируса гриппа, в том числе и различных мутаций в поверхностных белках.

Еще на примере сезонных вирусов гриппа A(H1N1), циркулировавших до пандемии 2009 года, было продемонстрировано, что влияние гликозилирования молекулы

гемагглютини́на зависит как от клетки-хозяина, так и от рецепторной специфичности вируса [167]. В исследованиях российской группы ученых по влиянию различных мутаций на вирулентность пандемических вирусов A(H1N1pdm09), выделенных в различных системах культивирования, было продемонстрировано влияние адаптационных мутаций на свойства вируса гриппа. Так, штамм вируса гриппа А/Гамбург/5/09 (H1N1pdm) изначально был выделен в культуре клеток MDCK, несущих кДНК человеческой 2,6-сиалтрансферазы (MDCK-SIAT-1), а после всего двух пассажей в РКЭ приобрел мутацию D225E в молекуле гемагглютини́на, которая дала возможность ему связываться с птичьим рецептором [168] (Таблица 3). После проведения адаптации вируса А/Гамбург/5/09 (H1N1pdm) к мышам в течение 17 пассажей, он приобрел еще ряд мутаций во всем геноме, в частности, на 5м пассаже – мутацию K123N в HA1 и, соответственно, сайт гликозилирования, что повысило мышиную инфекционную дозу с 5 до 3,5 lg, а на 8-м пассаже добавилась мутация G158E также в молекуле HA1 [168]. Штамм вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1pdm) генетически очень похож на штамм А/Гамбург/5/09 (H1N1pdm), но был выделен в системе РКЭ и при пассировании получил адаптационную мутацию Q226R, а после адаптации мышам добавилось еще две мутации N159D и K212M. Причем, вирус с мутацией Q226R в HA1 потерял сродство к человеческим рецепторам и приобрел к птичьим [168]. В обоих вирусах мутации, находящиеся непосредственно в рецептор-связывающем сайте ожидаемо повлияли на рецепторную специфичность вируса, нарушив при этом баланс HA-NA, что повлекло за собой снижение репродукции в культуре клеток MDCK-SIAT-1. Появившиеся еще через несколько пассажей мутации в молекуле HA стали компенсаторными по поверхностному заряду молекулы и при этом внесли существенный вклад в усиление патогенности исследуемых вирусов. Интересно, что данные по вкладу мутаций D225E и Q226R в HA в вирулентность пандемического вируса гриппа A(H1N1pdm09) на мышах были также получены и корейскими учеными [169].

При подготовке вакцинного штамма X-181 A(H1N1pdm09) в куриных эмбрионах были обнаружены мутации N133D, K212T и Q226R в молекуле HA1 и привели к сильному изменению кросс-реактивности вакцинного штамма, в результате которого антитела, индуцированные вакцинным штаммом, связывались с диким типом вируса, но не нейтрализовали его [84].

Было определено, что для более стабильного размножения в куриных эмбрионах вакцинного штамма ЖГВ на основе вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1pdm09) необходимы аминокислотные замены K119E, A186D и D222G в HA, вакцинные штаммы ЖГВ на основе вируса гриппа A(H1N1pdm09) 2010 года показали новые мутации вблизи

PCC – N125D +D127E или D127E+K209E, а к вакцинным штаммам 2011 года добавилась мутация в N369K в NA. Указанная мутация в нейраминидазе имела критически важное значение для репликации вируса как в РКЭ, так и в культуре клеток млекопитающих, так как именно она существенно улучшила выход вирусных частиц из зараженной клетки, восстановив тем самым баланс работы HA-NA. Антигенность всех высокорепродуктивных мутантных вакцинных штаммов ЖГВ на основе вируса гриппа A(H1N1pdm) 2009, 2010 и 2011 годов была протестирована на хорьках, иммунные сыворотки которых показали высокие уровни нейтрализующих антител [170].

Для пандемического вируса гриппа подтипа H1N1 были получены данные о том, что мутация D222N в гемагглютанине связана с тяжелым течением заболевания [171], [172], после чего в исследованиях роли мутации D222N *in vitro* было выявлено снижение репродукции мутантного штамма в культуре клеток A549, но не в MDCK, а также увеличение сродства как к человеческим, так и к птичьим рецепторам; на мышах же было показано незначительное снижение веса, меньшие титры вируса в легких и провоспалительных цитокинов по сравнению с диким типом вируса [173]. В исследованиях на мышах наблюдения из клинической практики с тяжелыми исходами заболевания не нашли подтверждения, возможно, подобные исследования на другой животной модели, например, хорьков, были бы более показательны и применимы к людям [174].

Для вируса A/Калифорния/04/09 (H1N1pdm) было показано, что мутация Y161F улучшает ростовые характеристики штамма для ИГВ в культуре клеток MDCK, а также повышает его термостабильность, не меняя при этом антигенных свойств гемагглютинина. Кроме этого, внесение мутации Y161F в HA сезонного вируса A(H3N2) и птичьего гриппа A(H3N8) также показало повышение репродукции и термостабильности как в культуре клеток MDCK, так и в РКЭ. Таким образом, было показано, что мутация Y161F в HA играет важную роль в репликации и термостабильности вируса гриппа, что может использоваться для улучшения культуральной ЖГВ [175].

Сравнение штаммов подтипа H1N1pdm09 A/Калифорния/7/2009 и A/Брисбен/10/2010 показало наличие мутации E47K в молекуле HA2, которая влияла на стабильность тримера гемагглютинина, снижала пороговое значение pH слияния мембран с 5,4 до 5, также было установлено, что это происходит из-за наличия межмономерного солевого мостика между аминокислотами K47 в HA2 и E21 в HA1 [176]. Кроме этого, замена E47K повысила термостабильность вируса и его вирулентность у хорьков, что указывает на преимущество вируса с K47 в HA2 при адаптации к эволюционным изменениям у людей [177].

Доклинические исследования на хорьках вакцинных штаммов ЖГВ на основе сезонного вируса гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), полученных в культуре клеток MDCK и в куриных эмбрионах, продемонстрировали, что вакцинные кандидаты, полученные в культуре клеток MDCK, могут использоваться в качестве интраназальных вакцин с высокими защитными показателями [132]. Дикий вирус А/Новая Каледония/20/99 (H1N1) при выделении на культуре клеток MDCK и в системе РКЭ, показал аминокислотное отличие в молекуле гемагглютинина: в позиции 203: Asp у вируса, выращенного в РКЭ, Asn – у MDCK-варианта. В культуре клеток было подготовлено два вакцинных кандидата на основе обоих диких вирусов: 39E/2 – на основе РКЭ-штамма, 25M/2 – на основе штамма, выделенного в MDCK. После получения и пятикратного пассирования вакцинные кандидаты были изучены в отношении появления мутаций в поверхностных антигенах. Так было установлено, что нейраминидаза аминокислотно не изменилась, тогда как молекулы НА обоих вакцинных кандидатов адаптировались к культуре клеток MDCK за счет аминокислотных замен T144I в НА1 и T450I в НА0 у штамма 39E/2, а также G278E в НА1 и D455N в НА0. Примечательно, что эти штаммы сохранили аминокислоты в позиции 203 в соответствии с родительскими штаммами [132].

Таблица 3. Роль мутаций, обнаруженных в вирусах гриппа подтипа H1N1, в проявлении биологических свойств штаммов.

Белок	Мутация	Влияние мутации	Источник
НА1	K119E	Повышение стабильности	[170]
	K123N	Приобретение сайта гликозилирования; уменьшение ЛД ₅₀ ; мышино-адаптационная мутация	[168]
	N133D	Изменение антигенности	[84]
	T144I	Адаптационная мутация к культуре клеток млекопитающих	[132]
	G158E	уменьшение ЛД ₅₀ ; мышино-адаптационная мутация	[168]
	N159D	Мышино-адаптационная	[168]
	Y161F	↑ репродукции в культуре клеток млекопитающих, ↑ термостабильности	[175]
	A186D	Повышение стабильности	[170]
	D203N	Адаптационная мутация к культуре клеток	[132]
	K212M	Изменение антигенности; мышино-адаптационная	[168] [84]
	D222G	Повышение стабильности	[170]
	D222N	Тяжелое течение заболевания, ↓ титра вируса в легких мышах, ↓ провоспалительных цитокинов у мышей, ↑ титра вируса в легких мышах,	[171], [172]; [173]; [174]

	D225E	↑ связывание $\alpha 2,3$, РКЭ-адаптационная мутация	[168]
	Q226R	↑ связывание $\alpha 2,3$, ↓ связывание $\alpha 2,6$, изменение антигенности, РКЭ-адаптационная мутация	[168]; [84]
	G278E	Адаптационная мутация к культуре клеток млекопитающих	[132]
HA2	E47K	↑ стабильности, ↓ порогового значение pH слияния мембран	[176]; [177]
	N50K	↑ репродукции в культуре клеток млекопитающих, ↓ стабильности	[178]
	T450I	Адаптационная мутация к культуре клеток млекопитающих	[132]
	D455N	Адаптационная мутация к культуре клеток млекопитающих	[132]
NA	N369K	Улучшение репликации в РКЭ и культуре клеток млекопитающих	[170]

1.3.3.2. Адаптационные мутации в вирусах гриппа подтипа H3N2 к клеткам млекопитающих

Подтип гриппа A(H3N2) привлекает внимание ученых в первую очередь из-за своей быстрой мутационной изменчивости, которая позволяет ему уходить от предсуществующего иммунного ответа, что стало причиной крайне низкой эффективности компонента вакцин против A(H3N2) последние несколько сезонов. Несколько работ показали, что одна из причин низкой эффективности вакцины заключается в РКЭ-адаптационных мутациях, которые появляются при выделении новых вирусов в РКЭ и которые, естественно, переходят и в вакцинный штамм как для ИГВ, так и для ЖГВ. Поэтому изучение адаптационных мутаций к различным условиям культивирования вирусов гриппа A(H3N2) является фундаментальным исследованием, призванным решить вопросы о влиянии адаптационных мутаций на свойства вируса гриппа подтипа H3N2.

В исследованиях по репродукции и стабильности высокоурожайных штаммов вируса гриппа для ИГВ было продемонстрировано, что культивирование вирусов гриппа A(H1N1) и A(H3N2) в культуре клеток Vero или MDCK в подкисленных условиях сохраняют стабильность вируса, что успешно использовалось при производстве ИГВ против птичьего гриппа A(H5N1), пассирование вирусов без дополнительных условий способствовало появлению в молекуле HA2 адаптационных мутаций N50K (H1N1) и D160E (H3N2), которые улучшали рост вируса в культуре клеток, но при этом отрицательно сказывались на стабильности антигена [178] (таблица 4). Той же группой было показано, что вирусы A(H3N2), пассированные в РКЭ, запускают конформационные изменения в молекуле HA в

менее кислых условиях, чем их антигенно похожие первичные изоляты, этот фенотип связывали с наличием аминокислотных замен A138S, L194P в HA1 и D160N в HA2, пониженной устойчивостью к кислым условиям и повышенной температуре [178].

После одного пассажа в культуре клеток MDCK клинических образцов от людей, больных гриппом A/H3N2, были обнаружены единичные мутации в поверхностных антигенах: HA в 10% случаях (мутации A138S, N165K, G218R, P221L и V223I, нумерация по H3), а NA в 27% случаях была обнаружена мутация D151N/G [179], в других исследованиях мутация D151N/G обнаруживалась в более, чем 50% MDCK-изолятов [180]. Эта мутация является частью каталитического центра нейраминидазы и в купе с мутацией N275Y создает устойчивость нейраминидазы к ее ингибиторам [181]. Проблему появления мутации D151N/G возможно решить с использованием культуры клеток MDCK-SIAT-1, как показала группа японских ученых, клинические изоляты, выделенные на этой культуре клеток показывают хорошую генетическую стабильность обоих поверхностных антигенов [182]. Линия MDCK-SIAT-1 была разработана в начале 2000-х годов путем усиления экспрессии $\alpha 2,6$ типа рецепторов на поверхности клеток MDCK [183].

Интересно, что пять мутаций в гемагглютанине обнаружили только в молекуле HA1, в частности, четыре из них (A138S, G218R, P221L и V223I) – вблизи PСС [39]. Мутация N165K локализовалась в антигенном сайте HA [39]. Замена A138S может возникать *in vivo* у пациентов с ослабленным иммунитетом, в также *in vitro* в культуре клеток MDCK, и было обнаружено, что она вызывает полную потерю связывания $\alpha 2,3$ типа рецептора [184]; [185]. Анализ с использованием клеточной линии PAM 3D4/21 показал, что замена A138S в HA1 у вируса гриппа с HA и NA от штамма A/Victoria/361/2011 (H3N2), а внутренними генами от вируса, адаптированного к свиньям, улучшает репликацию и усиливает индукцию апоптоза в этом типе клеток, также было показано, что адаптация человеческих вирусов к свиному хозяину включает в себя повышенное сродство к нижним дыхательным путям и альвеолярным макрофагам [186]. Мутация в позиции 218 в молекуле HA1, которая находится вблизи PСС, была также ассоциирована со снижением аффинности к человеческому рецептору, а также с повышенной патогенностью, связанной с виремией, приводящей к тяжелому поражению легких, инфекции в селезенке, кишечнике, мозге и сердце на модели мышей [187]; [188]. Также было обнаружено, что мутация V223I в HA1 является РКЭ-адаптационной [189]. Аминокислота N165, которая локализуется на мембранно-дистальной поверхности молекулы гемагглютанина, была идентифицирована, как сайт гликозилирования, позволяющий вирусу уходить от иммунного ответа [179].

Аминокислотная замена L194P в HA1, превалирующая в РКЭ-адаптированных (пассированных в куриных эмбрионах 4-5 раз) вариантах вирусов A(H3N2), на три порядка снижает связывание и нейтрализацию антителами широкого спектра действия, распознающие рецептор-связывающий сайт, а также значительно меняет антигенность гемагглютинина. Антигенность вируса гриппа оценивается в связывании HA с антителами из человеческих сывороток. Указанный факт частично объясняет низкую эффективность сезонных гриппозных вакцин против вирусов A(H3N2). [8].

Интересные результаты были обнаружены в исследовании по влиянию наличия сайтов пальмитилирования в цитоплазматическом хвосте молекулы HA штамма A/Аичи/2/68 (H3N2), где находятся три цистеина, по которым и происходит пальмитилирование. После выращивания вирусов в культуре клеток MDCK, было обнаружено, что у всех мутантных вирусов увечился рН слияния мембран, однако в процессе секвенирования MDCK-адаптированных штаммов было показано, что в эктодоме молекулы HA появилось хотя бы по одной дополнительной аминокислотной замене [190]. Данные секвенирования показали, что присутствовали следующие мутации: N137D в HA1 и K82T в HA2, N116D в HA2, T41A и E85D в HA2, G135E в HA1 и G4S в HA2, D112G в HA2, F9L в HA2, K117R в HA2, при этом для их появления было достаточно всего двух пассажей в культуре клеток MDCK. Как было отмечено авторами, местоположения указанных аминокислотных замен находились либо в районе пептида слияния, либо на границах субъединиц [190]. В MDCK-адаптированных вариантах дикого типа вируса (без изменений сайтов пальмитилирования) также были обнаружены мутации в эктодоме гемагглютинина, а именно, V244I в HA1, K82T в HA2, G218E в HA1, I300F в HA1, однако на это потребовалось от 4 до 7 пассажей [190]. Также авторы указали, что схожие данные были получены для вирусов гриппа человека A(H2N2) и лошади A(H3N8), но представлены они не были. Таким образом, адаптационные мутации появлялись преимущественно в ножке гемагглютинина и повышали рН пептида слияния мембран. Этот факт может иметь значение при производстве гриппозной вакцины на культуре клеток.

Сравнительный анализ мутационных изменений в геноме вирусов гриппа подтипа H3N2 при их выращивании в культуре клеток MDCK и линии кишечного эпителия человека CACO-2 показал, что лишь один штамм показал различие в молекуле гемагглютинина – консервативная замена V226I, которая не принесла ощутимых различий. В то же время в молекуле нейраминидазы аминокислотные отличия были существеннее. Так MDCK-адаптированный вирус отличался от CACO-адаптированного вируса двумя мутациями T148I и D151E, благодаря которым теряется сайт N-гликозилирования NA в позиции 146, а

один из клинических изолятов показал аминокислотную замену N245S, в которой также происходит потеря сайта гликозилирования. Кроме этого, был обнаружен вид штамма с делецией в 22 аминокислоты в ножке нейраминидазы [191].

Сравнительный анализ мутация, приобретенными вирусами A(H3N2) 2011-2013 годов, которые были пассированы в РКЭ, показал, что РКЭ-адаптационные мутации R156Q, S219Y и I226N в молекуле HA1 повышали авидность связывания с $\alpha 2,3$ рецептором и понижали авидность связывания с $\alpha 2,6$ рецептором. Замены в позициях 156 и 190 оказались в первую очередь ответственны за низкую реактивность в двойном тесте реакции торможения ремагглютинации (РТГА). РКЭ-адаптационная мутация в позиции 186 показывала изменение в авидности связывания молекулы HA с рецептором, а также имела незначительное влияние на антигенность [192].

Таблица 4. Роль мутаций, обнаруженных в вирусах гриппа подтипа H3N2, в проявлении биологических свойств штаммов.

Белок	Мутация	Влияние мутации	Источник
HA1	A138S	↓ термостабильности, ↓ устойчивости к низкому pH, ↓ связывания $\alpha 2,3$, РКЭ-адаптационная мутация, обнаружена в первичных изолятах в 10% случаев, ↑ репликацию и индукцию апоптоза в РАМ 3D4/21	[178]; [179]; [184]; [185]; [39]; [186]
	N165K	Потеря сайта гликозилирования, обнаружена в первичных изолятах	[179]
	L194P	↓ термостабильности, ↓ устойчивости к низкому pH, изменение антигенности, РКЭ-адаптационная мутация,	[178]; [8]
	G218R	↑ связывание $\alpha 2,3$, ↑ вирулентности в мышцах, обнаружена в первичных изолятах	[179]; [39]; [187]; [188]
	G218E	MDCK-адаптационная мутация	[190]
	P221L	обнаружена в первичных изолятах	[179]; [39]
	V223I	РКЭ-адаптационная мутация, обнаружена в первичных изолятах	[179]; [39]; [189]
	V244I	MDCK-адаптационная мутация	[190]
HA2	I300F	MDCK-адаптационная мутация	[190]
	F9L	↑ pH слияния мембран, MDCK-адаптационная мутация	[190]
	K82T	MDCK-адаптационная мутация	[190]
	D112G	↑ pH слияния мембран, MDCK-адаптационная мутация	[190]
	N116D	↑ pH слияния мембран, MDCK-адаптационная мутация	[190]
	K117R	↑ pH слияния мембран, MDCK-адаптационная мутация	[190]

	D160E	↑ репродукции в культуре клеток, ↓ стабильности	[178]
	D160N	↓ термостабильности, ↓ устойчивости к низкому pH, РКЭ-адаптационная мутация	[178]
	T41A+E85D	↑ pH слияния мембран, MDCK- адаптационная мутация	[190]
HA1+HA2	N137D ₁ +K82T ₂	↑ pH слияния мембран, MDCK- адаптационная мутация	[190]
	G135E ₁ +G4S ₂	↑ pH слияния мембран, MDCK- адаптационная мутация	[190]
NA	T148I	Потеря сайта гликозилирования, MDCK-адаптационная мутация	[191]
	D151N/G	Устойчивость к ингибиторам нейраминидазы, MDCK- адаптационная мутация	[180]; [182]; [191]
	N245S	Потеря сайта гликозилирования, MDCK-адаптационная мутация	[191]
	H275Y	Устойчивость к ингибиторам нейраминидазы	[181]

1.4. Заключение к обзору литературы

Грипп тяжелое заболевание, которое наносит серьезный ущерб здоровью населения, а также экономический ущерб. Оптимальным средством борьбы с гриппом является его профилактика. В настоящий момент на рынке представлены множество вакцинных препаратов для всех категорий населения, включая младенцев от 6 месяцев, беременных женщин и пожилых людей старше 65 лет. Многочисленные исследования показывают, что живая гриппозная вакцина имеет существенные преимущества перед инактивированной, такие как формирование местного гуморального иммунного ответа, а также стимуляция клеточного звена иммунитета, при этом наиболее эффективной ЖГВ считается у детей младшего возраста.

Как известно, живая гриппозная вакцина производится на куриных эмбрионах, и люди, страдающие аллергией на куриный белок не могут ее применять. При этом частота аллергических заболеваний растет с каждым годом по всему миру, особенно, среди детского населения. Культура клеток млекопитающих – это оптимальный субстрат для производства гриппозных вакцин, в том числе и живых, а производство на культуре клеток позволит снять ограничение применения ЖГВ для миллионов людей.

Представленный обзор литературы обобщил имеющиеся данные по различным адаптационным мутациям как диких вирусов гриппа, так и вакцинных штаммов. Выявлено отсутствие современных данных об адаптации штаммов ЖГВ к культуре клеток MDCK,

полученных классическим путем реассортации в куриных эмбрионах. ввиду патентных ограничений, подготовка вакцинных штаммов для отечественной ЖГВ возможна исключительно методом классической генетической реассортации, особенно актуальной является цель данного исследования - обосновать возможность применения реассортантных вакцинных штаммов, полученных в РКЭ, для производства ЖГВ на культуре клеток MDCK.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Вирусы

В работе были использованы эпидемические, пандемические, потенциально пандемические и лабораторные штаммы вирусов гриппа типа А и В, включая: А/Сингапур/1/57 (H2N2), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), А/Техас/50/2012 (H3N2), А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09), А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09), А/17/Техас/2012/30 (H3N2), А/17/Ануи/2013/61 (H7N9), А/17/индюк/Турция/2005/133 (H5N2), А44/Вьетнам/1203/2004 (H5N1)-rg, А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2), А/17/Швейцария/2013/1 (H3N2), А/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm), В/60/Пхукет/13/26. Вирусы были получены из коллекции штаммов ФГБНУ «ИЭМ» и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» [193], [194].

2.1.2. Клеточные культуры

Исследование инфекционной активности и адаптация вакцинных штаммов к клеткам млекопитающих проводилось на культуре клеток MDCK, полученной из коллекции клеточных культур Института Цитологии РАН. Для сборки вирусов методами обратной генетики использовалась клеточная культура Vero, сертифицированная ВОЗ.

2.1.3. Куриные эмбрионы

Для накопления вирусных стоков и определения их инфекционной активности были использованы 10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы из ООО «Синявинская птицефабрика» (Россия, Синявино) с соответствующим ветеринарным свидетельством.

2.1.4. Плазмидные ДНК

Векторы для обратной генетики вирусов гриппа, pCIPolISapIT и pHW2000, были любезно предоставлены Dr. E. Fodor (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Великобритания) и Dr. R. Webster (St. Jude Children's Hospital, Memphis, TN, США), соответственно. Набор из восьми плазмидных ДНК с двунаправленным считыванием, кодирующих все сегменты донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), ранее был подготовлен в отделе вирусологии д.б.н. Исаковой-Сивак И.Н. [195].

2.1.5. Лабораторные животные

В работе использовались самки мышей линии СВА возрастом 6-8 недель и весом 17-20 грамм и самки крыс линии «Вистер» возрастом 2 месяца и весом 150-200 грамм, полученные из питомника лабораторных животных в Филиале НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ - ПЛЖ «Рапполово». Самки сирийских хомячков возрастом 2 месяца и весом 100-130 грамм были получены из Филиала "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства" России (Московская обл., Россия). Все исследования были выполнены в соответствии с приказом № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. и одобрены локальным этическим комитетом ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины» (протокол №1/20 от 27.02.2020 г).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Вирусологические методы

Реакция гемагглютинации и титрование вирусов по гемагглютинации. Реакция гемагглютинации (ГА) проводилась по стандартной методике с использованием 1% куриных эритроцитов. Так, к 50 мкл вирусодержащей жидкости добавлялось 50 мкл куриных эритроцитов, результат оценивался после инкубации 30 мин при комнатной температуре. Реакция ГА считалась положительной, если эритроциты образовывали зонтик, и отрицательной, если эритроциты осаждались в точку. Титрование вирусов гриппа по гемагглютинации проводилось последовательными двукратными разведениями на фосфатно-солевом буфере (ФСБ), после чего в каждую лунку добавляли равный объем эритроцитов. После 30 минут инкубации титр вируса в ГА оценивался по последнему разведению положительной ГА.

Культивирование вирусов гриппа. Для накопления вирусов гриппа в куриных эмбрионах 10-11дневные РКЭ заражались в аллантоисную полость через воздушный мешочек в объеме 0,2 мл вирусного материала, после чего место прокола герметизировали клеем. Затем зараженные РКЭ инкубировали в течение 48-72 часов при температуре 33°C-37°C в термостате. Накопление вирусов в культуре клеток MDCK проводилось на однодневном монослое с конфлюентностью 90-95%, выращенном в среде ДМЕМ с добавлением 100×антибиотика-антимикотика (Gibco, США) и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Биолот, Россия) при 37°C в термостате с содержанием 5% CO₂. Для

заражения культуры клеток MDCK готовый монослой дважды отмывался теплым раствором ФСБ, после чего добавлялась вирусная суспензия в объеме 1 мл, 2 мл, 3 мл во флаконы Т-25, Т-75 и Т-175, соответственно. Для прикрепления вируса к клеточной мембране флаконы с культурой клеток инкубировали 1 час при температуре 33°C для вакцинных штаммов и 37°C – для «диких» вирусов гриппа в термостате с содержанием 5% CO₂, затем вирусную жидкость отбирали и добавляли среду ДМЕМ с 100×антибиотиком-антимикотиком и 1 мкг/мл трипсина ТРСК (Sigma-Aldrich Co., США). Через 72 часа инкубации при температуре 33°C или 37°C с содержанием 5% CO₂ визуально оценивали цитопатическое действие вируса и определяли его титр по ГА.

Определение инфекционных титров вируса гриппа. Инфекционные титры вирусов рассчитывали по методу Рида и Мэнча [196], выражали в lg ИД₅₀/мл, которые рассчитывали по формуле:

$$\log_{10} \text{ИД}_{50} = \log_{10} B + \frac{b - 50}{b - a}$$

где ИД₅₀ = 50%-ная инфекционная доза;

В - доза, дающая эффект больше 50%;

А - доза, дающая эффект меньше 50%;

б - эффект дозы В в процентах;

а - эффект дозы А в процентах;

В куриных эмбрионах определяли 50% эмбриональную инфекционную дозу (ЭИД₅₀), для чего РКЭ заражали 10-кратными разведениями вируса гриппа в количестве 200 мкл/КЭ, культивировали в необходимых условиях, затем определяли наличие вируса в каждом РКЭ в реакции ГА и рассчитывали титр вируса в ЭИД₅₀/мл. В культуре клеток MDCK определяли 50% тканевую цитопатическую инфекционную дозу (ТЦИД₅₀), для чего 96-луночный планшет с однодневным монослоем MDCK заражали 10-кратными разведениями вируса гриппа в количестве 25 мкл/лунку по описанной методике, культивировали в требуемых условиях, определяли наличие вируса в каждой зараженной лунке визуально по цитопатическому действию (ЦПД) вируса и в реакции ГА, затем рассчитывали ТЦИД₅₀/мл по приведенной формуле.

Кроме этого, определяли инфекционный титр вируса по бляшкообразующим единицам (БОЕ), для чего отмытые от ФБС 6-луночные планшеты с однодневной культурой клеток MDCK заражали в количестве 500 мкл/лунку, затем проводили инкубацию 1 час для прикрепления вируса к клеточной мембране с периодическим покачиванием планшета во избежание пересыхания монослоя. Среда для реакции бляшкообразования состояла из равных объемов 1,6% легкоплавкой агарозы (Lonza, США) и двукратной среды ДМЕМ с 2×

антибиотиком-антимикотиком и 2 мкг/мл трипсина ТРСК. После окончания инкубации отбирали инокулят и добавляли заранее подготовленную среду в количестве 3 мл/лунку и инкубировали 3-5 дней, пока визуально не определялись бляшки. Для подсчета титра в БОЕ/мл среду с агарозой аккуратно вынимали из лунок и фиксировали оставшиеся живые клетки раствором бриллиантового фиолетового на 10% формалине в течение 30 минут при комнатной температуре, затем отмывали планшеты водой, подсушивали и проводили подсчет бляшек.

Определение температурочувствительного/температуроустойчивого (ts/non-ts) и холодоадаптированного/нехолодоадаптированного (ca/non-ca) фенотипов вируса гриппа. Оценку чувствительности вирусов к репродукции при различных температурах инкубации (ts/ca фенотип) оценивали путем их титрования в РКЭ при 33°C, 26°C, 38°C и/или 39°C. Длительность инкубации вирусов составляла 2-3 суток для температур 33-39°C и 6 суток – для 26°C. Вирус считали температурочувствительным (т.е. обладающим ts фенотипом), если разница в титрах была не менее 5,0 lg ЭИД₅₀/мл при оптимальной и повышенной температурах. Вирус считали холодоадаптированным (т.е. обладающим ca фенотипом), если разница инфекционных титров вируса при пониженной и оптимальной температуре составляла не более 3,0 lg ЭИД₅₀/мл.

Модель адаптации вакцинных штаммов к культуре клеток MDCK. Адаптацию вирусов гриппа к культуре клеток MDCK проводили при последовательном 5-кратном пассировании штаммов, за которым следовало клонирование вируса на культуре клеток методом бляшек. Для этого в 6-луночные планшеты вносили 10-кратные разведения адаптированных вирусов в двух повторах, затем инкубировали 72-96 часов под агарозовым покрытием, как описано выше. На 3-5 день инкубации визуально оценивали вирусные бляшки, выделяли 20-30 хорошо отделяемых друг от друга бляшек на предельных разведениях, из каждой выделенной бляшки изолировали отдельный клон вируса, который затем накапливали на культуре клеток MDCK и полностью секвенировали гены поверхностных белков.

Исследование рецепторной специфичности вирусов гриппа проводилось с использованием эритроцитов, несущих рецепторы типа $\alpha 2,3$ и/или $\alpha 2,6$. В качестве эритроцитов, экспрессирующих только рецепторы типа $\alpha 2,3$, использовали лошадиные эритроциты. Куриные необработанные эритроциты несут на своей поверхности оба типа рецепторов, и для получения эритроцитов, несущих только рецепторы типа $\alpha 2,6$, куриные эритроциты обрабатывали ферментом экзосиалидазой exo- α -Sialidase (Salmonella typhimurium) (Megazyme, США), в течение 1 часа при 37°C, отмывали фосфатно-солевым

буфером, затем использовали в реакции гемагглютинации с исследуемыми вирусами. Считалось, что вирус обладал рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$, если его титр в РГА с лошадиными и куриными эритроцитами совпадал и при этом титр в РГА с обработанными куриными эритроцитами был равен 0. В обратном случае считалось, что вирус обладал рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$. Если же во всех РГА титр был положительный, считалось, что вирус обладает двойственной рецепторной специфичностью с преимуществом того типа, где был больший титр в РГА.

Очистка вируса гриппа на ультрацентрифуге. Очищенный вирус гриппа необходим для некоторых иммунологических тестов. Для получения очищенного вируса гриппа вирусную жидкость (аллантоисную или клеточный супернатант) осветляли в течение 20 мин при 3500g и 4°C, затем супернатант ультрацентрифугировали при 19 000 rpm в течение 3 часов на ультрацентрифуге (Beckman Coulter, США). После первого этапа ультрацентрифугирования в емкостях для ротора Type19 в течение 3 часов при 19 000 rpm вирус выпадал в осадок, который ресуспендировали в ФСБ и далее проводили очистку на градиенте плотности сахарозы, для чего в пробирку для ротора SW-40 Ti сначала наслаивали 4 мл 60%-сахарозы, затем 4 мл 30%-сахарозы и в конце добавляли осажденный вирус в количестве 2 мл; после уравнивания пробирок проводилось ультрацентрифугирование при 23 000g в течение 2 часов. После очистки на градиенте нормальные вирусные частицы находились в интермедиальной фазе, которую аккуратно собирали и затем отмывали от сахарозы в ФСБ на ультрацентрифуге при 23 000 rpm в течение 1 часа. Очищенный вирус ресуспендировали в 1-1,5 мл ФСБ, аликвотили по 200 мкл и хранили при -70°C.

2.2.2. Молекулярно-генетические методы

Выделение вирусной РНК. вирусную РНК выделяли наборами «Viral RNA» (Qiagen, США) или «Набор для выделения РНК на колонках (модифицированный)» (Биолабмикс, Россия) согласно инструкции производителя, для чего 100 мкл вирусной жидкости добавляли к 300 мкл лизирующего буфера, перемешивали на вортексе и инкубировали не менее 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли сорбционный буфер, содержащий 96% этиловый спирт, в объеме 400 мкл, после чего инкубировали полученную смесь 1-5 мин, переносили на колонку и центрифугировали 1 мин при 10 000 rpm. После смены коллекторов последовательно промывали колонку двумя промывочными буферами с последующим центрифугированием в течение 30 сек при 10 000 rpm, финальное центрифугирование для удаления остатков спирта и буферов проводили в течение 3 мин

при 14 000 г_гм. Для снятия вирусной РНК с мембраны добавляли на колонку элюирующий буфер в объеме 60 мкл, инкубировали 1 мин и центрифугировали в чистый эппендорф в течение 1 мин при 10 000 г_гм. Готовую РНК хранили при -70°C.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция. Получение комплементарных вирусных ДНК, необходимых для реакции секвенирования, проводили в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием коммерческого набора «SuperScript III one-step RT-PCR» (Invitrogen, США), для этого в пробирку добавляли 12,5 мкл 2×Mix, 0,8 мкл фермента SuperScript III, 0,7 мкл прямого праймера, 0,7 мкл обратного праймера, 2,6 мкл вирусной РНК и 7,7 мкл воды, а затем проводили реакцию в термоциклере BIO-RAD по следующей программе:

Шаг	Температура	Время	Повторы
1	55°C	30 мин	1 цикл
2	94°C	2 мин	
3	94°C	15 сек	40 циклов
4	55°C	30 сек	
5	68°C	2 мин	
6	68°C	15 мин	1 цикл
7	4°C	∞	

Также ОТ-ПЦР проводили с использованием набора «БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум-Color (2×)» (Биомастер, Россия), для чего в реакционную пробирку добавляли 12,5 мкл 2×буфера для ОТ-ПЦР–Премиум-Color, 0,8 мкл смеси ферментов БиоМастер-Премиум-микс, по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 2 мкл РНК и 7,7 мкл воды. Реакцию проводили в термоциклере по следующей программе:

Шаг	Температура	Время	Повторы
1	45°C	30 мин	1 цикл
2	92°C	5 мин	
3	93°C	15 сек	40 циклов
4	55°C	20 сек	
5	68°C	1 мин	
6	68°C	15 мин	1 цикл
7	4°C	∞	

Электрофорез в агарозном геле. После окончания реакции ОТ-ПЦР проводили электрофоретическое разделение ПЦР-продукта в 1% агарозном геле (Lonza, США),

приготовленном на 1×ТАЕ буфере с добавлением 0,005% бромистого этидия как интеркалирующего красителя, в течение 30-50 минут в 1×ТАЕ буфере под напряжением 200 В. После чего результаты электрофореза оценивали в ультрафиолетовом свете 280 нм на трансиллюминаторе,

Выделение кДНК из геля. ПЦР-продукт нужной длины вырезали и выделяли из агарозного геля с использованием коммерческого набора «Cleanup St Gel для очистки ДНК из агарозного геля» (Евроген, Россия), для чего взвешивали гель, добавляли сорбирующий буфер в соотношении 1:10 и инкубировали при 60°C до полного растворения геля. Затем смесь наносили на колонку и центрифугировали в течение 1 мин при 10 000 rpm, а после замены коллекторов дважды промывали буфером в количестве 500 мкл и центрифугированием в течение 1 мин при 10 000 rpm. Финальное центрифугирование для удаления остатков промывочного буфера проводили в течение 3 мин при 14 000 rpm. Элюирующий буфер в колонку добавляли в количестве 20 мкл и после инкубации в течение 1 мин, центрифугировали в чистый эппендорф и очищенную из геля кДНК хранили при -20°C.

Реакция секвенирования. Для определения нуклеотидных последовательностей генов вируса гриппа очищенную вирусную кДНК использовали в реакции секвенирования с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1, в которую добавляли 2 мкл 5×буфера для секвенирования, 1 мкл смеси ферментов для секвенирования, 0,8 мкл праймера, 1,2 мкл вирусной кДНК и 5 мкл воды. Реакцию секвенирования проводили в термоциклере Applied Biosystem по следующей программе:

Шаг	Температура	время	Повторы
1	96°C	2 мин	1 цикл
2	96°C	10 сек	
3	50°C	20 сек	32 цикла
4	60°C	4 мин	
5	60°C	40 мин	1 цикл
6	4°C	∞	

Очистка и подготовка кДНК после реакции секвенирования проходила в 96-луночных планшетах для гель-фильтрации, заполненных заранее подготовленным 5% Sephadex G-100 (GE HealthCare, США) в количестве 450 мкл на пробу, которые центрифугировали в течение 2 минут при 2000g, затем промывали 250 мкл дистиллированной воды и центрифугировали снова. После чего вносили пробу после реакции секвенирования в фильтрационную

колонку в объеме 10 мкл и центрифугировали в тех же условиях, к очищенной пробе добавляли 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, США) и в планшете для секвенирования проводили реакцию денатурации ДНК в течение 5 минут при 94°C с последующим охлаждением до 4°C не менее 1 минуты. Полные нуклеотидные последовательности генов гемагглютинаина и нейраминидазы определяли с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США) и программного обеспечения LaserGene 7.1.

Клонирование генов вируса гриппа в вектор. Клонирование генов гемагглютинаина и нейраминидазы в векторы для обратной генетики проводили с использованием универсальных пар праймеров, специфичных для каждого гена, в реакции ОТ-ПЦР [197]. Очищенную кДНК в количестве 15 мкл обрабатывали 0,5 мкл рестриктазы SapI (Thermo, США) с добавлением 2 мкл 10×буфера для рестрикции и 2,5 мкл воды в течение 1 часа при 37°C, останавливали реакцию в течение 15 минут при 65°C. Вектор также обрабатывали рестриктазой SapI. Рестрикционную смесь после окончания реакции очищали набором «Cleanup St Gel для очистки ДНК из агарозного геля» (Евроген, Россия) и добавляли в реакцию лигирования в соответствии с протоколом: 2 мкл 10×буфера для лигирования, 1 мкл Т4-лигазы, 15 мкл ДНК вставки, 1,5 мкл ДНК вектора и 0,5 мкл воды, после чего проводили инкубацию в течение 1 часа при 22°C, а затем не менее 16 часов при 4°C.

Трансформация бактерий E.coli XL-Gold. Лигирующую смесь использовали для трансформации бактерий E.coli XL-gold с использованием подготовленных компетентных клеток. Для этого смешивали на льду 100 мкл клеток и 10 мкл лигирующей смеси и инкубировали в течение 30 мин на льду, затем 1 мин при 42°C для создания теплового шока. Затем добавляли в пробирку 1 мл LB-среды без антибиотиков и инкубировали в орбитальном термощейкере в течение 1 часа при 37°C и 250 rpm, после чего центрифугировали пробирку в течение 30 сек при 6000 rpm, отбирали 900 мкл надосадка, а в остатке жидкости ресуспендировали осадок. Трансформированные бактерии выращивали на LB-агаре (AppliChem, Германия) в присутствии ампициллина как селективного антибиотика в течение 18-20 часов при 37°C.

ПЦР-скрининг бактериальных колоний. Выросшие через 18-20 часов после трансформации колонии отбирали в отдельные пробирки со стерильной дистиллированной водой в объеме 20 мкл и тщательно перемешивали. После чего их использовали в качестве матрицы в скрининговой ПЦР, которую проводили с использованием набора «БиоМастер ОТ-ПЦР–Премиум-Color (2×)» (Биомастер, Россия). Для этого в реакционную пробирку добавляли 12,5 мкл 2×буфера БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×), по 1 мкл прямого и

обратного праймеров, 2,5 мкл ДНК и 8 мкл воды. Реакцию проводили в термоциклере по следующей программе:

Шаг	Температура	Время	Повторы
1	95°C	5 мин	1 цикл
2	95°C	15 сек	40 циклов
3	55°C	20 сек	
4	72°C	2,5 мин	
5	72°C	15 мин	1 цикл
6	4°C	∞	

Выделение плазмидной ДНК. колонии выращивали в 5 мл LB-среды (AppliChem, Германия) с ампициллином в течение 16-20 часов, после чего из полученной культуры выделяли плазмидную ДНК коммерческим набором «Plasmid Miniprep 2.0» (Евроген, Россия). Для этого ночную культуру центрифугировали 2 мин при 1500 rpm, супернатант сливали, а к осадку добавляли 250 мкл ресуспендирующего раствора с РНКазой А и тщательно перемешивали на вортексе. Затем добавляли 250 мкл лизирующего буфера, аккуратно переворачивали пробирки 4-6 раз до появления прозрачного раствора и инкубировали 1 мин при комнатной температуре, после чего останавливали лизис добавлением 350 мкл нейтрализующего раствора, также аккуратно переворачивали пробирки 4-6 раз до получения «творожного» раствора и инкубировали 1 мин с дальнейшим центрифугированием в течение 10 минут при 13 000 rpm. Поскольку плазмидная ДНК в дальнейшем использовалась для трансфекции клеток млекопитающих, на спин-колонку наносили 20 мкл раствора для удаления эндотоксинов, переносили супернатант, в котором содержалась плазмидная ДНК, в колонку и центрифугировали в течение 30 сек при 13 000 rpm, далее в колонку вносили еще 200 мкл раствора для удаления эндотоксинов с последующим центрифугированием с теми же параметрами. После этого промывали колонку в объеме 700 мкл промывочным раствором и центрифугировали, финальное центрифугирование проводили в течение 1 мин при максимальных оборотах, затем подсушивали на воздухе в течение 5 мин. Смывали ДНК с мембраны элюирующим раствором в объеме 50 мкл и центрифугирование в течение 1 мин на максимальных оборотах. Выделенную плазмидную ДНК хранили при -20°C.

Реакция рестрикции. Для определения наличия вставки вирусной ДНК в вектор проводили рестрикцию 5 мкл плазмидной ДНК 1 мкл рестриктазы XbaI в присутствии 2 мкл 10×буфера для рестрикции и 12 мкл воды в течение 20 минут при 37°C, останавливали

реакцию в течение 10 минут при 65°C. Затем рестрикционную смесь загружали в 1% агарозный гель и проводили электрофоретическое разделение белков, как уже было описано выше. Наличие вставки в векторе определяли визуально под ультрафиолетовым светом. Если видели полосу необходимого размера, плазмидные ДНК со вставкой полностью секвенировали по описанной выше схеме с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 3130xl (Applied Biosystems, США) и набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1.

Методы обратной генетики. Подготовку обратно-генетических вакцинных штаммов ЖГВ осуществляли согласно методикам, описанным Е. Hoffmann с соавт. [197]. Жизнеспособные вирусы гриппа получали при помощи электропорации клеток Vero с использованием электропоратора Neon® (Invitrogen, США) и прилагающегося к нему набора Neon® Kit 100 мкл. Для этого культуру клеток Vero выращивали на бессывороточной среде OptiPRO (Gibco, США) с добавлением 1% антибиотика-антимикотика и 1% Glutamax (Gibco, США) во флаконах T-80 или T-175 (Thermo Scientific, США), пересев данных клеток проводился с использованием фермента аккутазы (Gibco, США). За день до трансфекции культуру клеток Vero пересевали без антибиотика-антимикотика, но с 5% ФБС и инкубировали в течение ночи при 37°C в термостате с содержанием 5% CO₂. Плазмидные ДНК подготавливали также за день до трансфекции, собирая в пробирку по 2 мкг каждой плазмидной ДНК, куда затем добавляли 120 мкл NA-Ас буфера на этиловом спирте, перемешивали на вортексе 10-15 секунд и инкубировали ночь при температуре -20°C. На следующий день плазмиды центрифугировали 15 минут при 14 000g при температуре 2-4°C, отбирали надосадок и отмывали осадок ДНК 70% этанолом, затем еще раз центрифугировали 5 минут при тех же условиях, отбирали надосадок и подсушивали осадок на воздухе в течение 10-15 минут, после чего высохшую ДНК растворяли в 8 мкл ТЕ-буфера. В то же время клетки Vero дважды отмывали раствором Дульбекко-ФСБ (ДФСБ) и снимали 1-2,5 мл аккутазы в течение 1 минуты, затем добавляли среду OptiPRO, 1% Glutamax и 5% ФБС. Снятые клетки Vero центрифугировали в течение 10 минут при 1000g, после чего отбирали супернатант, а клетки ресуспендировали в R-буфере из расчета 110 мкл на каждые 5×10^6 клеток. После 110 мкл ресуспендированных клеток смешивали с 8 мкл плазмидной ДНК и проводили трансфекцию в 2 импульса по 1150 В в течение 20 мсек в электролитическом буфере, затем равномерно вносили клетки в подготовленный 6-луночный планшет «Nuncclone» в среду OptiPRO, 1% Glutamax и 5% ФБС, инкубировали 6 часов при температуре 37°C в термостате с содержанием 5% CO₂, после чего дважды отмывали теплым ДФСБ и вносили в каждую лунку по 3-3,5 мл среды

OptiPRO с добавлением 1% антибиотика-антимикотика, 1% Glutamax и 4 мкл/мл трипсина (Sigma, США). После инкубации в течение 3 дней при температуре 33°C в термостате с содержанием 5% CO₂, собирали клеточную суспензию и заражали ею РКЭ по 0,2 мл, еще через 2-3 дня проверяли наличие вируса в аллантоисной жидкости стандартной методикой РГА.

3D-моделирование белковых структур. Для отображения трехмерных структур белков использовалось программное обеспечение Chimera 1.13.1 и программы RasMol 2.7.5.

2.2.3. Методы работы с лабораторными животными

Интраназальная иммунизация лабораторных животных. Для интраназального заражения животных усыпляли с использованием ингаляционного наркоза – диэтилового эфира, после чего вводили в носовые ходы вируссодержащую жидкость в необходимом титром вируса мышам – в объеме 50 мкл, хомячкам – в объеме 100 мкл.

Забор крови у лабораторных животных. У введенных в наркоз мышей и сирийских хомячков забор крови в необходимом объеме осуществляли путем введения капилляра, обработанного гепарином, в ретроорбитальный синус. У крыс кровь собирали totally путем надрезания подключичной вены. Цельную кровь собирали в пробирки, которые затем инкубировали не менее 30 мин при комнатной температуре для образования сгустка, затем центрифугировали 15 мин при 3000 rpm, полученную сыворотку отбирали в чистую пробирку и хранили при -20°C.

Забор смывов верхних и нижних дыхательных путей. Для получения смывов ВДП и БАЛ животное эвтаназировали, после чего освобождали трахею от прилегающих тканей и перевязывали ее тонкой ниткой посередине. Для получения смывов верхних дыхательных путей тонкую инсулиновую иглу вводили в верхнюю часть трахеи и промывали 1 мл стерильного ФСБ, собирали смыв в отдельную пробирку и повторяли процедуру еще 2 раза. Для получения бронхоальвеолярного лаважа вводили такую же иглу в нижнюю часть трахеи и промывали легкие 1 мл стерильного ФСБ трижды. Собранные смывы центрифугировали в течение 15 мин при 3000 rpm, полученную сыворотку аликвотили по 200 мкл в чистые пробирки и хранили при -20°C.

Для оценки иммуногенности как диких вирусов гриппа, так и вакцинных штаммов были использованы мыши линии СВА, которых заражали интраназально в количестве 10⁵ или 10⁶ lg ЭИД₅₀/мышь. На третий день у мышей забирали носовые ходы и легкие для определения инфекционного титра вируса в тканях, а на седьмой день забирали селезенки и назо-ассоциированную лимфоидную ткань (НАЛТ) для определения системного и

локального Т-клеточного ответа. На 21^й день после инфекции у мышей тотально собирали сыворотки крови и смывы верхних дыхательных путей для определения уровня гуморального иммунного ответа.

Получение гипериммунных сывороток животных. Для получения гипериммунных сывороток против вирусов гриппа был использован одинаковый протокол иммунизации крыс породы Вистер и мышей линии СВА. Все иммунизации проводились с интервалом 5-7 дней. Первая, третья и пятая иммунизации проводились внутрибрюшинно в объеме 200 мкл/мышь или 5 мл/крысу. Вторая и четвертая иммунизации проводились с использованием полного адьюванта Френда подкожно в холку в объеме 100 мкл/мышь или 1 мл/крысу, соотношение вируса и адьюванта 1:1. Через неделю после последней иммунизации проводили тотальный забор крови у всех иммунизированных животных, которую центрифугировали в течение 15 минут при 3000g, супернатант (сыворотка) отбирался из пробирки и хранился при -20°C.

2.2.4. Иммунологические методы

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Крысиные сыворотки обрабатывали Рецептор-разрушающим ферментом Receptor Destroying Enzyme (RDE) Denka Seiken (Hardy Diagnostics, США) в пропорции 1:3 в течение 16-18 часов при 37°C, затем доводили сыворотку до десятикратного разведения ФСБ, прогревали на водяной бане в течение 1 часа при 56°C. Мышиные сыворотки подготавливали для РТГА с использованием 4% куриных эритроцитов. Сначала разведенные в 2 раза сыворотки прогревали при 56°C в течение 1 часа, добавляли равный объем 4% куриных эритроцитов и инкубировали 10 минут при 37°C, затем сыворотки центрифугировали в течение 1 минуты при 14 000g. Супернатант отбирали в отдельную пробирку, добавляли 2,5 объема ФСБ, получая таким образом десятикратное разведение сыворотки, которое и использовали непосредственно в РТГА. Затем подбирали разведение вируса, дающее 4 АЕ в 25 мкл с 0,5% куриными эритроцитами. При проведении самой реакции торможения гемагглютинации 50 мкл каждой исследуемой сыворотки вносили в 96-луночный круглодонный планшет для иммунологических реакций, которую затем титровали двукратными разведениями на ФСБ, после чего по все лунки добавляли 25 мкл вируса с 4 АЕ и инкубировали 1 час при комнатной температуре. По окончании контакта вируса с сывороткой добавляли 50 мкл 0,5% куриных эритроцитов, после осаждения которых считывали результаты РТГА. Титр сыворотки определяли по последнему разведению, в котором прошло полной торможение гемагглютинации эритроцитов.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В качестве антигена для определения антител методом ИФА использовали очищенный вирус гриппа, который вносили в плоскодонные планшеты в количестве 16 АЕ в 50 мкл, для прикрепления антигена планшеты помещали под пленку и инкубировали не менее 16-18 часов при температуре 4°C. Подготовленные таким образом планшеты с антигенами могли храниться до 1 месяца при 4°C без потери качества антигена. Для проведения ИФА сыворотки и смывы верхних дыхательных путей не требовали дополнительной обработки, поэтому в отдельный круглодонный планшет вносили 50 мкл нужного разведения сыворотки, которую затем титровали двукратными разведениями на ФСБ. Планшет с антигеном промывали 3 раза отмывочным буфером (ФСБ + 0,05% Twin-20 (Биолот, Россия)) в количестве 200 мкл/лунку, куда после подсушивания вносили 1% бычий сывороточный альбумин (БСА), необходимый для блокировки возможных пустых мест в лунках, в количестве 50 мкл/лунку и инкубировали 30 минут при 37°C. Промывали планшет 3 раза по 200 мкл отмывочного буфера на лунку, подсушивали и вносили разведения сывороток в количестве 50 мкл/лунку, оставляя при этом 6-12 лунок с ФСБ для контроля фона. Инкубировали 1 час при 37°C, после чего планшет снова промывали 3 раза отмывочным буфером, подсушивали и вносили вторичные мышиные анти-IgG или анти IgA антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000 и 1:2000 соответственно в количестве 50 мкл/лунку. Инкубировали 1 час при 37°C, после чего промывали планшет 5 раз отмывочным буфером, подсушивали и добавляли 50 мкл/лунку субстрата ТМВ (BD, США), который инкубировали в темноте до 20 минут при комнатной температуре; реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 1М H₂SO₄. Первичные результаты ИФА учитывали на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. Титры антител считали по последнему разведению, где оптическая плотность превышала двукратный средний уровень фоновых лунок.

Методы проточной цитометрии, внутриклеточное окрашивание цитокинов. Определение уровней вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток проводили методом внутриклеточного окрашивания цитокинов на гамма-интерферон (ИФН-γ) (intracellular cytokine staining assay - ICS) после стимуляции Т-лимфоцитов соответствующим вирусом по ранее разработанной методике [198], [199]. Через 7 дней после инфекции мышей забивали, асептически забирали селезенки и НАЛТ, которое гомогенизировали с помощью плунжера и клеточного фильтра Cell Strainer на 70 мкм (BD Falcon, США). Гомогенаты центрифугировали в 10 мл раствора Хенкса в течение 7 минут 300g, после чего отбирали супернатант и ресуспендировали осадок в 3 мл гипотонического раствора хлорида аммония, необходимого для лизиса эритроцитов, затем не более чем через 5 минут

останавливали лизис добавлением 10 мл раствора Хенкса и центрифугировали в течение 7 минут 300g, после чего отбирали надосадок, ресуспендировали спленоциты в 3 мл среды CR-0 (RPMI-1640, 1% антибиотик-антимикотик, 2,5 мМ HEPES) и подсчитывали их концентрацию в камере Горяева. После определения концентраций спленоцитов в образцах доводили их той же средой до концентрации 10^6 кл/50 мкл и вносили в круглодонный планшет по 50 мкл/лунку. Затем в лунки добавляли вирус в количестве 3 MOI, т.е. 3×10^6 IgЭИД₅₀/50 мкл. Планшет со спленоцитами и вирусом инкубировали 1 час в термостате при 37°C с содержанием 5% CO₂, после чего добавляли 50 мкл среды CR-30 (CR-0, 30% ФБС) в каждую лунку и инкубировали планшет 18 часов в тех же условиях.

После окончания ночной инкубации добавляли 50 мкл брефельдина А, содержащегося в коммерческом наборе Golgi Plug (Becton Dickinson, США), в разведении 1:250 на среде CR-10. Затем инкубировали 5 часов в термостате при 37°C с содержанием 5% CO₂. После окончания инкубации планшет центрифугировали в течение 7 минут при 300g, после чего отбирали супернатант и окрашивали образцы на живые и мертвые клетки конъюгированными антителами Zombie Aqua (BioLegend, США) в разведении 1:300 в объеме 100 мкл/лунку, инкубировали в темноте 20 минут при 4°C. Затем центрифугировали в тех же условиях и отмывали SB-буфером (PBS, 0,5% БСА, азид натрия) в количестве 200 мкл/лунку. После центрифугирования проводили окрашивание клеток антителами к поверхностным маркерам анти-CD3, анти-CD4 и анти-CD8 конъюгированными антителами по 0,25 мкл каждого антитела на пробу в 50 мкл SB-буфера, инкубировали в темноте 20 минут при 4°C, после чего добавляли 150 мкл/лунку SB-буфера и центрифугировали при тех же условиях. Отмывали пробы 1 раз SB-буфером в количестве 200 мкл/лунку и после центрифугирования добавляли 100 мкл/лунку фиксирующего раствора из коммерческого набора Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson, США), инкубировали в темноте 20 минут при 4°C и отмывали 1 раз wash-буфером из того же набора в количестве 200 мкл/лунку, после чего центрифугировали в тех же условиях. Затем проводили внутриклеточное окрашивание анти-ИФН- γ конъюгированными антителами по 0,4 мкл/пробу в 50 мкл отмывочного буфера, инкубировали в темноте 20 минут при 4°C и отмывали 1 раз отмывочным буфером в количестве 200 мкл/лунку. Образцы фиксировали в 1% параформальдегиде и хранили при 4°C перед анализом. Цитометрию проводили с использованием проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США), где измеряли не менее 300 000 событий для спленоцитов и не менее 50 000 событий для НАЛТ. Процент вирус-специфических Т-клеток определялся как доля ИФН- γ ⁺ клеток среди CD8⁺ Т-клеток.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prizm 8. Для попарного сравнения титров вирусов использовали непараметрический Mann-Whitney U-test; сравнение уровней антител между группами иммунизированных мышей проводили методом непараметрическим однофакторного ANOVA с поправкой Крускала-Уоллиса. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Адаптация пандемических штаммов вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) с различной рецепторной специфичностью к культуре клеток MDCK

3.1.1. Генетическая характеристика штаммов вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2)

Как отмечалось выше, пандемии гриппа могут возникать вследствие адаптации вирусов гриппа птиц к клеткам млекопитающих. Причиной возникновения пандемий 1957 (азиатский грипп А(H2N2)) и 1968 (Гонконгский грипп А(H3N2)) годов явилась адаптация молекулы гемагглютинаина вирусов гриппа птиц к рецептору человеческого типа $\alpha 2,6$ и приобретение гена полимеразы PB1, следствием чего явилось преодоление межвидового барьера, при этом было показано, что в начале пандемической волны в циркуляции могут встречаться как вирусы, имеющие сродство к рецепторам птичьего типа $\alpha 2,3$, так и адаптированные к человеку вирусы с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$ [6], [200]. Из коллекции отдела вирусологии им. А.А.Смординцева ФГБНУ «ИЭМ» были проанализированы штаммы пандемического вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2), которые сильно отличались по взаимодействию с неспецифическими ингибиторами нормальной сыворотки крови морской свинки. Полногеномное секвенирование показало, что у двух штаммов в поверхностных белках имеются аминокислотные различия: три в НА1 субъединице молекулы гемагглютинаина (E156K, Q226L, G228S по H3-нумерации) и одна в нейраминидазе (K19T); вирусы были обозначены как Sing- $\alpha 2,3$ (156E, 226Q, 228G) и Sing- $\alpha 2,6$ (156K, 226L, 228S). Полученные данные говорили о том, что исследуемые вирусы имеют одно происхождение, но при этом могут иметь различную рецепторную специфичность к гликановым рецепторам клетки-хозяина. Для проверки этой гипотезы было проведено исследование рецепторной специфичности вирусов с использованием куриных эритроцитов, несущих на своей поверхности $\alpha 2,3$ и $\alpha 2,6$ сиаловые рецепторы, лошадиных эритроцитов, которые несут на поверхности только $\alpha 2,3$ сиаловые рецепторы, а также куриных эритроцитов, обработанных ферментом экзосиалидазой, который отщепляет с их поверхности $\alpha 2,3$ рецепторы, оставляя только $\alpha 2,6$ сиаловые рецепторы. Результаты исследования рецепторной специфичности обоих вирусов представлены на рисунке 2, где видно, что титр вируса Sing- $\alpha 2,3$ с необработанными куриными эритроцитами составил 512 АЕ, с лошадиными эритроцитами – 512 АЕ, а с обработанными куриными эритроцитами – 1 АЕ, что свидетельствует о том, что вирус Sing- $\alpha 2,3$ обладает $\alpha 2,3$ рецепторной специфичностью. Титр вируса Sing- $\alpha 2,6$ с необработанными куриными

эритроцитами был сравним с титром вируса Sing- α 2,3 и составил 256 АЕ, тогда как с лошадиными эритроцитами – 0 АЕ, а с обработанными куриными эритроцитами – 256 АЕ, что подтверждает тот факт, что вирус Sing- α 2,6 обладает α 2,6 рецепторной специфичностью.

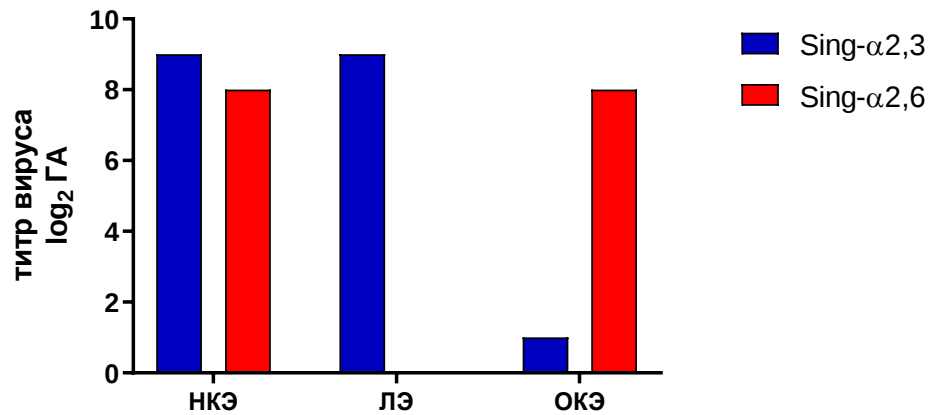


Рисунок 2. Результаты исследования рецепторной специфичности вирусов А/Сингапур/1/57 (H2N2). НКЭ - необработанные куриные эритроциты, ЛЭ - лошадиные эритроциты, ОКЭ - куриные эритроциты, обработанные экзосиалидазой.

Адаптация к культуре клеток MDCK пандемических вирусов Sing- α 2,3 и Sing- α 2,6 проводилась путем пятикратного пассирования в данной культуре при оптимальных условиях для диких вирусов гриппа, после чего было проведено клонирование обоих вирусов методом бляшкообразования и выделены по 24 клон с каждого адаптируемого вируса. У всех клонов были секвенированы и проанализированы гены гемагглютинина и нейраминидазы, были выявлены два клеточных клон вируса Sing- α 2,3 и один клеточный клон вируса Sing-2,6, у которых были обнаружены различные адаптационные мутации в молекуле гемагглютинина. Так, вирус Sing- α 2,6 приобрел две дополнительные мутации G158E и L321P в молекуле HA1 (клеточный клон Sing- α 2,6-EP), тогда как у варианта Sing- α 2,3 было выделено два различных MDCK-адаптированных клон, один из которых приобрел мутацию P221S в субъединице HA1 (клеточный клон Sing- α 2,3-S), а второй – A96V в субъединице HA2 (клеточный клон Sing- α 2,3-V). Мутаций в молекуле нейраминидазы обнаружено не было. Аминокислотные различия, обнаруженные у исследуемых вирусов, представлены в таблице 5.

Таблица 5. Аминокислотные различия в поверхностных белках исследуемых вариантов вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2).

Вирус	HA							NA
	HA1						HA2	
	156	158	221	226	228	321	96	
Исходные штаммы, накопленные в РКЭ								
Sing- α 2,6	Lys	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr
Sing- α 2,3	Glu	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Ala	Lys
MDCK-адаптированные штаммы								
Sing- α 2,6-EP	Lys	Glu	Pro	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr
Sing- α 2,3-S	Glu	Gly	Ser	Gln	Gly	Leu	Ala	Lys
Sing- α 2,3-V	Glu	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Val	Lys

У клеточных клонов также была исследована рецепторная специфичность, результаты представлены на рисунке 3. Титры вирусов Sing- α 2,3-V и Sing- α 2,3-S по гемагглютинации с необработанными куриными эритроцитами составили 1024 и 512 АЕ, с лошадиными эритроцитами – 1024 и 512 АЕ, а с обработанными куриными эритроцитами – 2 и 2 АЕ, соответственно. У клеточного клона Sing- α 2,6-EP наблюдали титр по гемагглютинации с необработанными куриными эритроцитами 256 АЕ, с лошадиными эритроцитами – 1 АЕ, с обработанными куриными эритроцитами – 256 АЕ.

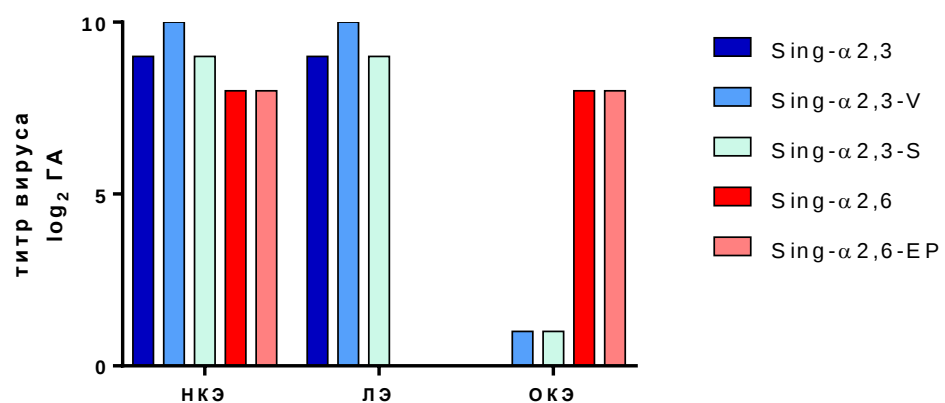


Рисунок 3. Результаты исследования рецепторной специфичности исходных и MDCK-адаптированных вариантов вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2). НКЭ - необработанные куриные эритроциты, ЛЭ - лошадиные эритроциты, ОКЭ - куриные эритроциты, обработанные экзосиалидазой.

Таким образом, можно отметить, что MDCK-адаптированные варианты вирусов Sing- α 2,3 и Sing- α 2,6 не поменяли свою рецепторную специфичность, при этом у вариантов Sing- α 2,3-V и Sing- α 2,3-S наблюдался двукратный прирост в связывании с гликановыми рецепторами типа α 2,6 (обработанные куриные эритроциты), что говорит о том, что адаптация к культуре клеток MDCK влияет на рецепторную специфичность вирусов, увеличивая сродство вируса Sing- α 2,3 к рецепторам типа α 2,6, но не меняет ее кардинально.

3.1.2. Ростковые характеристики штаммов вируса гриппа A/Сингапур/1/57 (H2N2) *in vitro* и *in vivo*

Репродукция *in vitro* исходных и MDCK-адаптированных вариантов вируса гриппа A/Сингапур/1/57 (H2N2) исследовалась в различных системах культивирования – развивающихся куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK. Инфекционные титры вирусов в обеих системах культивирования представлены на рисунке 4. Титры вирусов Sing- α 2,6 и Sing- α 2,3 в РКЭ составили 6,8 lg ЭИД₅₀/мл и 8,7 lg ЭИД₅₀/мл, т.е. вирус Sing- α 2,3 размножался в системе куриных эмбрионов в 80 раз лучше вируса Sing- α 2,6, и титры достоверно различались с уровнем значимости $p < 0,0001$. Титры этих же вирусов в культуре клеток MDCK составили 7,1 lg ТЦИД₅₀/мл и 7,4 lg ТЦИД₅₀/мл, соответственно, и статистически не различались. Однако, инфекционный титр вируса Sing- α 2,3 в культуре клеток MDCK составил 7,4 lg ТЦИД₅₀/мл, а в РКЭ 8,7 lg ЭИД₅₀/мл, что отличалось достоверно с уровнем значимости $p < 0,0001$, указывая на более выраженное сродство вируса к куриным эмбрионам, чем к культуре клеток MDCK.

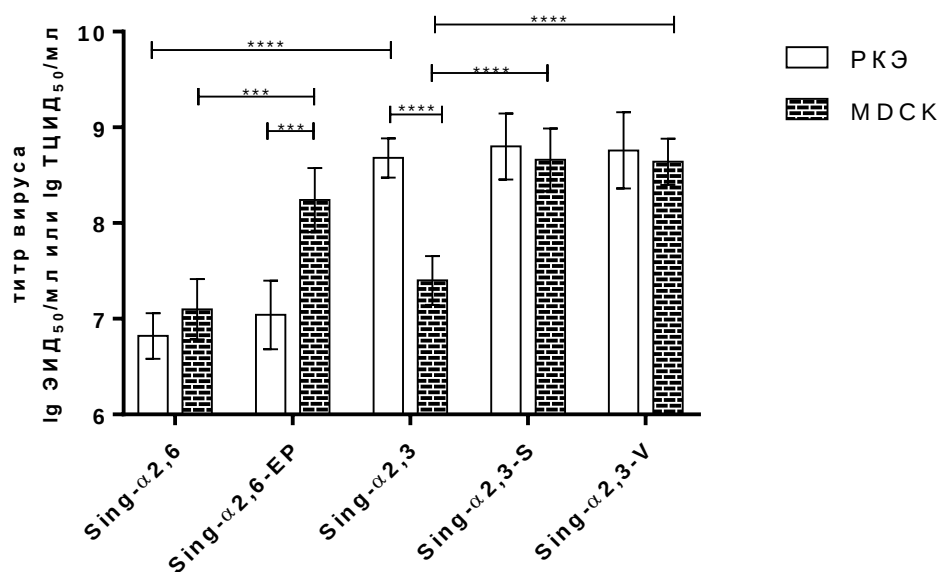


Рисунок 4. Репродукция вариантов вируса A/Сингапур/1/57 (H2N2) *in vitro*.

Инфекционные титры в РКЭ и культуре клеток MDCK представлены в lg ЭИД₅₀/мл и lg ТЦИД₅₀/мл, соответственно. *** $p < 0,001$, **** $p < 0.0001$.

В свою очередь инфекционные титры MDCK-адаптированных клонов Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V в РКЭ составили по 8,8 lg ЭИД₅₀/мл и не отличались от титра в РКЭ их предшественника Sing- α 2,3. При этом инфекционные титры вирусов Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V в культуре клеток MDCK составили 8,7 lg ТЦИД₅₀/мл и 8,6 lg ТЦИД₅₀/мл, соответственно, и при этом достоверно превосходили вирус Sing- α 2,3 в 16-20 раз ($p < 0,0001$). В то же время инфекционный титр MDCK-адаптированного варианта Sing- α 2,6-EP в РКЭ был сопоставим с соответствующим титром исходного варианта Sing- α 2,6 (7,0 lg ЭИД₅₀/мл и 6,8 lg ЭИД₅₀/мл, соответственно), тогда как инфекционная активность штамма Sing- α 2,6-EP в культуре клеток MDCK составила 8,2 lg ТЦИД₅₀/мл. Сравнение инфекционных титров вирусов Sing- α 2,6 и Sing- α 2,6-EP в культуре клеток MDCK (7,1 lg ТЦИД₅₀/мл и 8,2 lg ТЦИД₅₀/мл, соответственно) показало 13-кратное превосходство титра вируса Sing- α 2,6-EP над вирусом Sing- α 2,6 ($p = 0,0006$, рисунок 4).

Результаты исследования инфекционной активности вирусов в различных системах культивирования показали, что адаптация диких вирусов A(H2N2) к культуре клеток MDCK ведет к достоверному увеличению репродукции вирусов в 13-20 раз в этой системе культивирования, не снижая при этом их инфекционной активности в РКЭ, что согласуется с ранее обнаруженным увеличением сродства MDCK-адаптированных вирусов к рецепторам типа α 2,6.

Исследование репродукции вирусов *in vivo* проводилось на мышах линии СВА, зараженных вирусами Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V в количестве 10^5 lg ЭИД₅₀/мышь. На третий день после заражения у животных забирали носовые ходы и легкие, которые после гомогенизации титровали на культуре клеток MDCK. Результаты эксперимента по репродукции исследуемых вирусов *in vivo* представлены на рисунке 5. Нужно отметить, что как исходные, так и MDCK-адаптированные вирусы достоверно лучше размножались в нижних дыхательных путях, чем в носовых ходах ($p = 0,0286$, пунктирные линии на рисунке 4, критерий Манна-Уитни), однако только вирусы с рецепторной специфичностью α 2,6 – Sing- α 2,6 и Sing- α 2,6-EP – репродуцировались в верхних дыхательных путях до уровней 3,1 lg ТЦИД₅₀/мл и 2,2 lg ТЦИД₅₀/мл соответственно, тогда как вирусы с рецепторной специфичностью α 2,3 – Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V – не размножались в верхних дыхательных путях и были ниже уровня детекции 2,1 lg ТЦИД₅₀/мл. Изучение репродукции вирусов в нижних

дыхательных путях мышей показало, что исходный вирус Sing- α 2,3 размножался в легких только до титра 4,4 lg ТЦИД₅₀/мл, тогда как титры его MDCK-адаптированные варианты Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V достигали значений 6,3-6,5 lg ТЦИД₅₀/мл, что согласуется с более высокой активностью репликации этих вариантов в культуре клеток (рисунок 4). Оба вируса с рецепторной специфичностью α 2,6 размножались в тканях легких до сопоставимых титров 5,9 и 6,3 lg ТЦИД₅₀/мл, что указывает на отсутствие влияния адаптационных мутаций G158E и L321P на активность репликации в респираторном тракте мышей (рисунок 5).

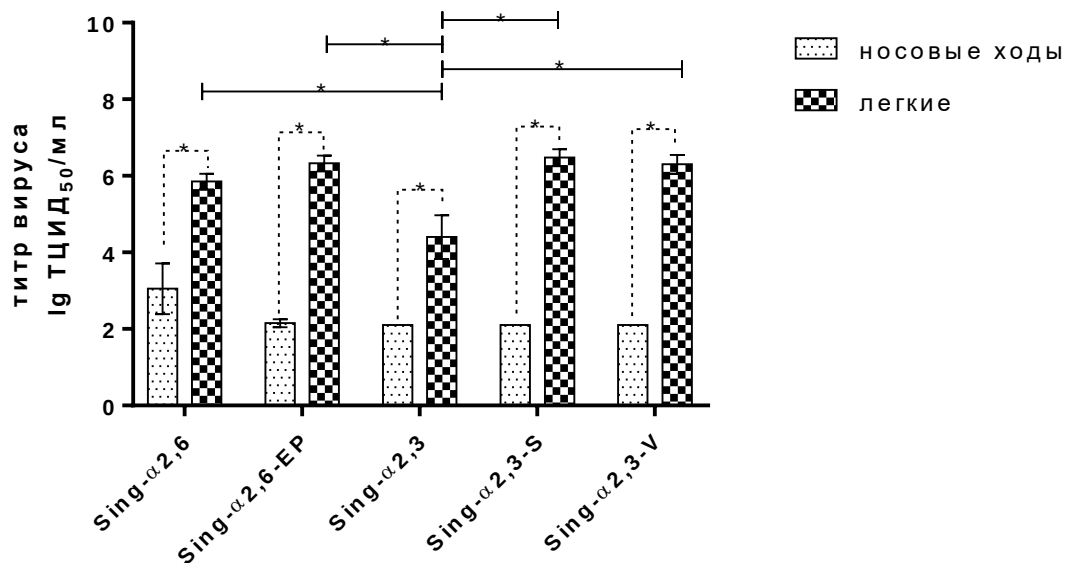


Рисунок 5. Репродукция исследуемых вариантов вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2) в верхних и нижних дыхательных путях мышей линии СВА. * $p < 0,05$.

Как исходные вирусы, так и их MDCK-адаптированные варианты были способны размножаться в нижних дыхательных путях мышей, однако вариант Sing- α 2,3 реплицировался в 32-125 раз хуже, чем вирусы Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V. Кроме этого, только варианты Sing- α 2,6 и Sing- α 2,6-EP размножались в верхних дыхательных путях мышей, что может объясняться их рецепторной специфичностью α 2-6, так как верхние дыхательные пути богаты сиаловыми рецепторами типа α 2-6, тогда как в нижних преобладают рецепторы типа α 2,3. Таким образом, адаптационные мутации P221S в субъединице HA1 и A96V в субъединице HA2 улучшили репродукцию вирусов с рецепторной специфичностью α 2,3 в нижних дыхательных путях мышей.

3.1.3. Оценка гуморального иммунного ответа к штаммам вируса гриппа A/Сингапур/1/57 (H2N2) на модели мышей

Изучение гуморального иммунного ответа к вирусам Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V проводилось на мышах линии СВА, которые были заражены вирусами в количестве 10^5 Ig ЭИД₅₀/мышь. На 21-й день после инфекции у 7 мышей из каждой группы проводили забор крови для дальнейшего получения сыворотки и исследования системного гуморального ответа с помощью реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментного анализа (антитела IgG). Также у мышей собирали смывы верхних дыхательных путей для изучения местного гуморального ответа методом ИФА (антитела IgA).

Иммуногенность вирусов оценивалась по среднегеометрическим титрам сывороток или смывов в РТГА и ИФА, где для каждой иммунной группы в качестве антигена использовался вирус, которым животные были заражены 3 недели назад. Сыворотки контрольных животных (группа PBS) были проанализированы против каждого из антигенов. Так, по результатам РТГА вирусы Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP и Sing- α 2,3 оказались иммуногенными, и среднегеометрические титры антител достигли показателей 39,9, 22,1 и 7,4 соответственно, что достоверно отличалось от контрольной группы с титром антител ниже 5, с уровнем значимости $p < 0,0001$, $p = 0,0012$ и $p = 0,0152$ соответственно. При этом в группе, иммунизированной вирусом Sing- α 2,3-S, титр антител достигал значения 7,4 – как и у группы, иммунизированной вирусом Sing- α 2,3 – однако, уровень значимости $p = 0,0787$, что позволило считать отличие группы Sing- α 2,3-S от группы PBS недостоверным. У группы, иммунизированной вирусом Sing- α 2,3-V, титр антител составил 5,5, что статистически не отличалось от контрольной группы ($p = 0,337$). Сравнение иммуногенности исходных вирусов Sing- α 2,6 и Sing- α 2,3 показало достоверное превосходство вируса Sing- α 2,6 в индукции антигемагглютинирующих антител более чем в 5 раз с уровнем значимости $p < 0,0001$ (сплошная линия на рисунке 6). Также сравнение иммуногенности MDCK-адаптированных вариантов Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V показало более выраженную индукцию антител при заражении мышей вирусом Sing- α 2,6-EP, где титр антител была выше в 3 и 4 раза по сравнению с вирусами Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V с уровнями значимости $p = 0,0205$ и $p = 0,0026$, соответственно (пунктирная линия на рисунке 6).

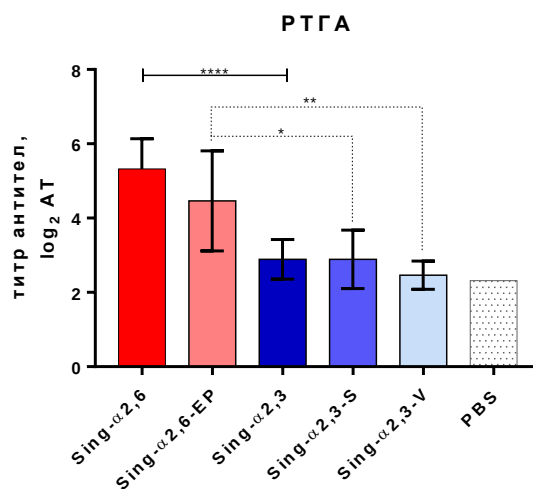


Рисунок 6. Гуморальный иммунный ответ на исследуемые варианты вируса A/Сингапур/1/57 (H2N2) в РТГА (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ для t-критерия, $N=7$).

Таким образом, в РТГА в группах, иммунизированных вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$, была определена более высокая иммуногенность по сравнению с группами, иммунизированными вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$. Кроме этого адаптация к культуре клеток MDCK привела к уменьшению иммуногенности вирусов Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V по сравнению с контрольной группой.

При определении титров сывороточных IgG антител методом ИФА, как и в РТГА было обнаружено, что вирусы Sing- $\alpha 2,6$, Sing- $\alpha 2,6$ -EP и Sing- $\alpha 2,3$ были иммуногенными, и их среднегеометрические титры IgG антител достоверно отличались от титров контрольной группы и составили 3444, 3126 и 780, соответственно, при уровне значимости $p < 0.0001$. Средний геометрический титр (СГТ) IgG антител группы Sing- $\alpha 2,3$ -S, который был равен 24, также не отличался от титра IgG антител группы PBS, который был равен 5, с уровнем значимости $p = 0.0612$, что согласуется с данными РТГА. Однако, среднегеометрический титр IgG антител группы Sing- $\alpha 2,3$ -V составил 97 и достоверно отличался от СГТ контрольной группы с уровнем значимости $p = 0.0029$, что отличается от данных этой группы по РТГА и объясняется более высокой чувствительностью метода ИФА. Сравнение иммуногенности групп Sing- $\alpha 2,6$ и Sing- $\alpha 2,3$ показало превосходство группы Sing- $\alpha 2,6$ в 4,5 раза при индукции противовирусных IgG антител с уровнем значимости $p = 0.0039$, что идет в согласии с данными по титрам в РТГА. Кроме того, сравнение иммуногенности в группах, инфицированных MDCK-адаптированными вариантами Sing- $\alpha 2,6$ -EP, Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V, показало достоверно более высокие титры IgG антител, индуцированных вирусом Sing- $\alpha 2,6$ -EP, по сравнению с вирусами Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V, с уровнями значимости

$p < 0,0001$ и $p = 0,0012$, соответственно (сплошные линии на рисунке 7), что также согласуется с данными, полученными в РТГА. Кроме этого, при сравнении титров IgG антител среди групп, зараженных вирусами с $\alpha 2,3$ рецепторной специфичностью, были обнаружены дополнительные достоверные отличия. Так, оказалось, что исходный вирус Sing- $\alpha 2,3$ вызывал в 33 и 8 раз более высокую иммуногенность по сравнению с MDCK-адаптированными вирусами Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V, с уровнями значимости $p = 0,0009$ и $p = 0,0261$, соответственно (пунктирные линии на рисунке 7). Титры IgG антител, индуцированные вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$, отличий между собой не имели.

Таким образом, данные ИФА по титрам IgG антител имеют много сходства с данными, полученными в РТГА, а также выявили сниженную иммуногенность MDCK-адаптированных вирусов Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V по сравнению с исходным вирусом Sing- $\alpha 2,3$, несмотря на более эффективную репликацию в нижних дыхательных путях. Это может являться свидетельством, что адаптационные аминокислотные замены P221S в молекуле HA1 и A96V в молекуле HA2 носят характер escape-мутаций.

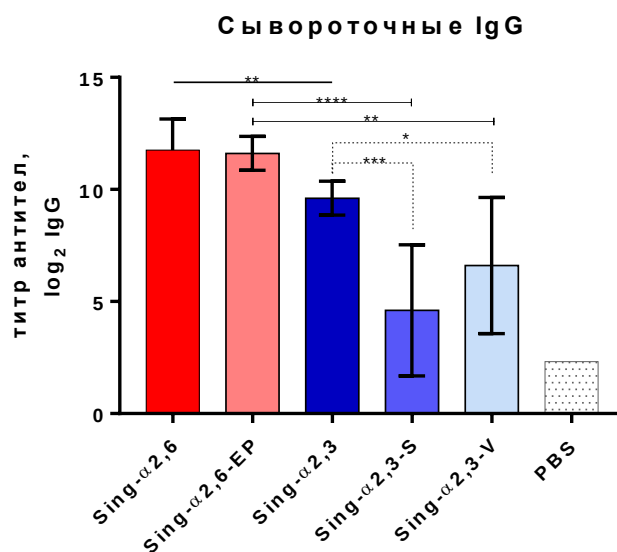


Рисунок 7. Системный гуморальный иммунный ответ (сывороточные IgG антитела) на исследуемые варианты вируса A/Сингапур/1/57 (H2N2) в ИФА (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0.0001$ для t-критерия, N=7).

Для исследования местного гуморального иммунного ответа смывы верхних дыхательных путей были проанализированы в ИФА для определения уровня секреторных IgA антител. Как и при изучении системного гуморального ответа, в качестве антигенов

были использованы те же вирусы, которыми проводилось заражение группы животных. Так было обнаружено, что все пять исследуемых вирусов Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V индуцируют секреторный антителный ответ: несмотря на почти полное отсутствие репродукции в верхних дыхательных путях, IgA антитела были обнаружены в титрах 14, 16, 29, 5 и 4 соответственно (рисунок 8). Фон секреторных IgA антител в носовых смывах контрольной группы был ниже уровня детекции, т.е. меньше 1. Таким образом, титры IgA антител, индуцируемых вирусами Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V, достоверно отличался от титра в контрольной группе животных с уровнем значимости $p=0,0001$, $p>0,0001$, $p>0,0001$, $p=0,0011$ и $p=0,0003$, соответственно. Сравнение уровней IgA антител в группах исходных вирусов Sing- α 2,6 и Sing- α 2,3 различий не выявило ($p=0,3355$), что отличается от данных по системному гуморальному ответу. Хотя сравнительный анализ уровней секреторных IgA антител между группами, зараженными MDCK-адаптированными вариантами Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V, как и в системном ответе, выявил превосходство вируса Sing- α 2,6-EP в 3 и 4 раза над вирусами Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V с уровнями значимости $p=0,0479$ и $p=0,0134$, соответственно (сплошные линии, рисунок 8). Кроме этого, в согласии с данными ИФА по уровням IgG антител, сравнение индукции секреторных IgA антител среди групп, инфицированных вирусами Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V, также показало превосходство исходного вируса Sing- α 2,3 в 6 и 7 раз над его клеточными аналогами Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V с уровнями значимости $p=0,0147$ и $p=0,0048$, соответственно (пунктирные линии, рисунок 8).

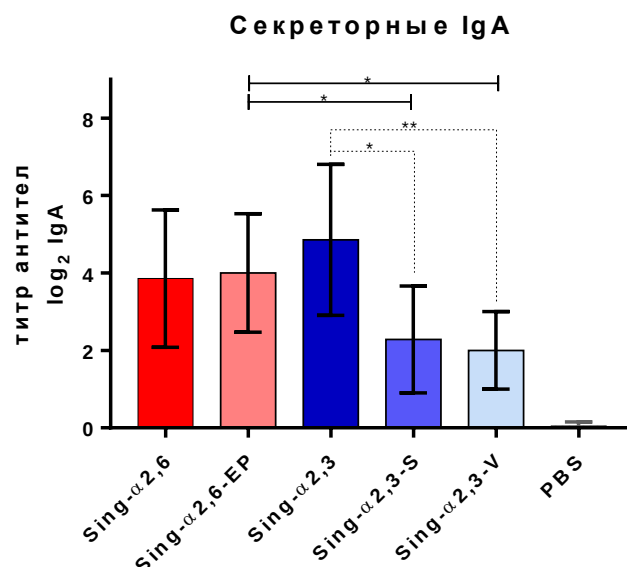


Рисунок 8. Местный гуморальный иммунный ответ (секреторные IgA антитела) на исследуемые варианты вируса A/Сингапур/1/57 (H2N2) в ИФА (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, для t-критерия, $N=7$).

Суммируя данные об индукции системного и локального иммунного ответа вирусами Sing- $\alpha 2,6$, Sing- $\alpha 2,6$ -EP, Sing- $\alpha 2,3$, Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V, можно заключить, что все указанные вирусы индуцируют гуморальный ответ, однако наименее иммуногенны оказались MDCK-адаптированные варианты с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V как на уровне системного, так и на уровне локального антительного иммунитета. Наоборот, вирусы Sing- $\alpha 2,6$, Sing- $\alpha 2,6$ -EP с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$ не отличались по иммуногенности ни в одном тесте. Таким образом, иммуногенность MDCK-адаптированных вариантов зависит от их рецепторной специфичности.

3.1.4. Оценка системного и локального клеточного иммунного ответа к штаммам вируса гриппа A/Сингапур/1/57 (H2N2) на модели мышей

Одним из важнейших показателей клеточного противовирусного иммунитета является оценка содержания Т-клеток, реагирующих на введение патогена продукцией интерферона-гамма (ИФН γ). Вирус-специфическими популяциями ИФН γ^+ CD4 $^+$ и CD8 $^+$ Т-клеток обеспечивается клеточная цитотоксичность инфицированных клеток организма хозяина. В качестве показателей системной иммунной реакции нами были оценены уровни вирус-специфических ИФН γ^+ Т-клеток в селезенках и НАЛТ (назально-ассоциированной лимфоидной ткани) инфицированных исследуемыми вирусами мышей (рисунок 9).

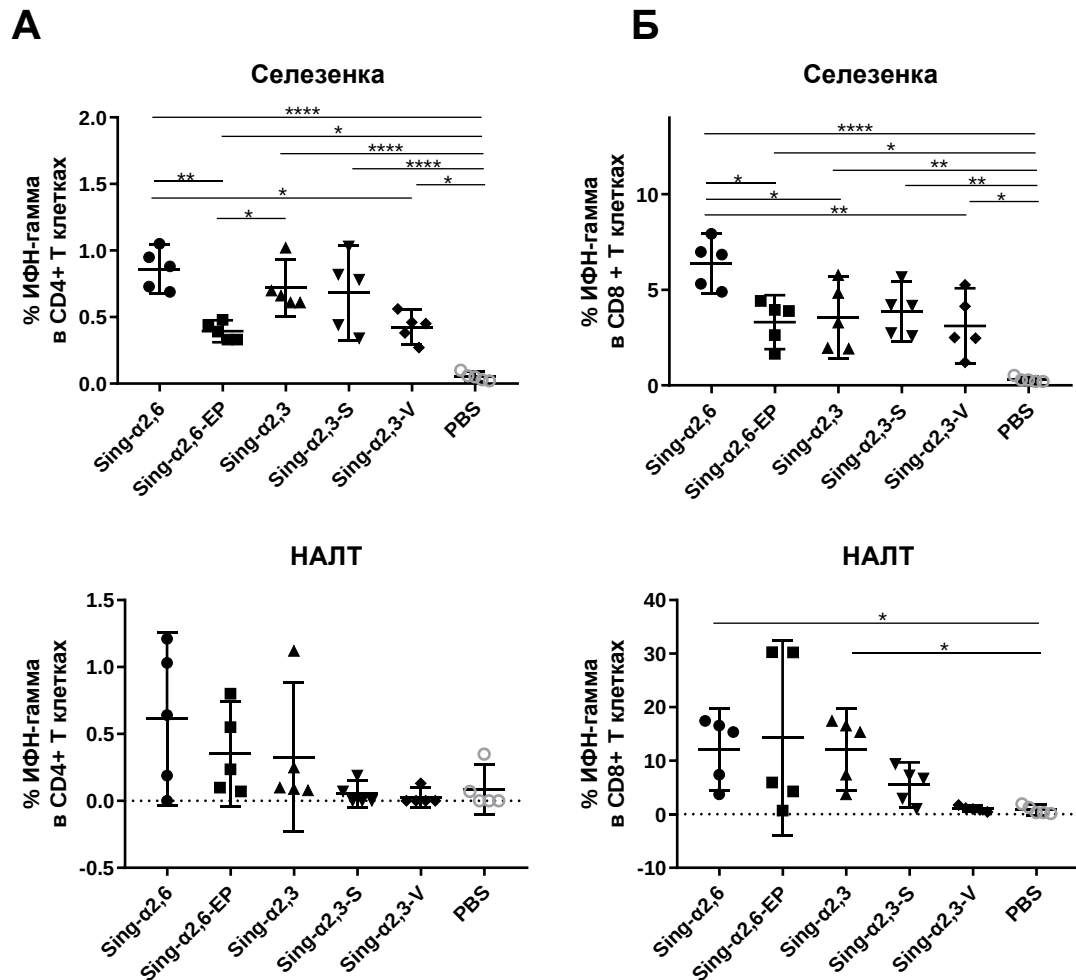


Рисунок 9. Системный и локальный Т-клеточный иммунный ответ мышей линии СВА на 7 день после введения вирусов. Средние уровни вирус-специфических CD4⁺ (А) и CD8⁺ (Б) Т-клеток в селезенках мышей определены методом внутриклеточного окрашивания ИФН-γ после стимуляции гомологичным вирусом *in vitro* (m+95%CI). Данные представлены после вычитания фоновых уровней ИФН-γ. Звездочками указаны достоверные различия уровней Т-клеток между группами опытных и интактных животных, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ для ANOVA.

Как видно из рисунка 9, введение каждого вируса вызывало достоверное увеличение уровней вирус-специфических CD4⁺ (0,86; 0,39; 0,72; 0,68; 0,42 и 0,05 % ИФНγ⁺ CD4⁺ в группах Sing-α2,6, Sing-α2,6-EP, Sing-α2,3, Sing-α2,3-S, Sing-α2,3-V и PBS, соответственно) и CD8⁺ Т-клеток в селезенках (6,39; 3,31; 3,55; 3,87; 3,11 и 0,30 % ИФНγ⁺ CD8⁺ в группах Sing-α2,6, Sing-α2,6-EP, Sing-α2,3, Sing-α2,3-S, Sing-α2,3-V и PBS, соответственно). При сравнении родительских штаммов, наибольшей способностью индуцировать экспансию вирус-специфических CD8⁺ Т-клеток в селезенках обладал вирус Sing-α2,6 ($p=0,0104$,

$p=0,0208$, $p=0,0500$, $p=0,0059$ и $p<0,0001$ для групп Sing- $\alpha 2,6$ -EP, Sing- $\alpha 2,3$, Sing- $\alpha 2,3$ -S, Sing- $\alpha 2,3$ -V и PBS, соответственно). MDCK-адаптированные варианты Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V не отличались по способности индуцировать экспансию CD8⁺ Т-клеток от их родительского варианта Sing- $\alpha 2,3$. Однако активация вирус-специфических CD4⁺ Т-клеток на воздействие вируса Sing- $\alpha 2,3$ -V была снижена. MDCK-адаптированный вариант Sing- $\alpha 2,6$ -EP обладал сниженной способностью индуцировать экспансию CD4⁺ и CD8⁺ вирус-специфических Т-клеток в селезенке в сравнении с его РКЭ-вариантом Sing- $\alpha 2,6$ ($p=0,0013$ и $p=0,0104$, соответственно).

Верхние дыхательные пути являются «входными воротами» для гриппозной инфекции. Латеральные назальные железы содержат диффузные лимфоидные ткани, являющиеся частью локального представительства иммунной системы в верхних дыхательных путях.

В латеральных назальных железах у интактных и инфицированных вирусами гриппа животных средние уровни CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток у интактных мышей составляли 13,9% и 1,7% соответственно от общего числа железистых клеток. Уровни вирус-специфических CD4⁺ Т-клеток составили 0,61; 0,35; 0,33; 0,05; 0,03 и 0,08 % ИФН γ ⁺ CD4⁺ в группах Sing- $\alpha 2,6$, Sing- $\alpha 2,6$ -EP, Sing- $\alpha 2,3$, Sing- $\alpha 2,3$ -S, Sing- $\alpha 2,3$ -V и PBS, соответственно, а CD8⁺ Т-клеток, соответственно 12,10; 14,27; 12,11; 5,46; 1,02 и 0,80 % ИФН γ ⁺ CD8⁺. Введение эмбриональных вирусов Sing- $\alpha 2,3$ и Sing- $\alpha 2,6$ не приводило к статистически значимым изменениям содержания пулов CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. На 7 сутки после введения адаптированных к культуре клеток MDCK вирусов Sing- $\alpha 2,3$ -S и Sing- $\alpha 2,3$ -V происходило двукратное повышение уровней CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Увеличение уровней пулов CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток после введения варианта Sing- $\alpha 2,6$ -EP было не достоверным. На этом фоне уровни вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, секретирующих ИФН- γ в латеральных назальных железах изменялись в различной степени. Уровни вирус-специфических CD8⁺ Т-клеток достоверно увеличивались только в группах накопленных в РКЭ вирусов Sing- $\alpha 2,6$ и Sing- $\alpha 2,3$ по сравнению со своими клеточными аналогами ($p=0,0404$). Уровни вирус-специфических CD4⁺ Т-клеток не показали достоверного отличия зараженных животных от интактных.

Таким образом, все вирусы индуцировали Т-клеточный иммунитет, а наиболее сильный клеточный ответ стимулировал вирус Sing- $\alpha 2,6$.

3.1.5. Кросс-реактивность антител к исходным и MDCK-адаптированным штаммам вируса гриппа A/Сингапур/1/57 (H2N2)

Исследование кросс-реактивности антител, индуцируемых вирусами Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V, проводилось с использованием тех же сывороток крови животных, которые были использованы в экспериментах по оценке иммуногенности данных вирусов на мышах линии СВА. Кросс-реактивность антител из всех экспериментальных групп исследовали в отношении каждого вируса (Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S или Sing- α 2,3-V) в РТГА и ИФА. Таким образом, после определения титров антител и суммирования данных для каждого метода была использована матрица 5×6 (рисунок 10). Для наглядности данные представлены в виде «тепловой карты», принцип которой формируется из соответствия более бледного цвета меньшему значению, а более яркого цвета – большему значению титра антител, шкала соответствия цвет-число указана рядом с графиком.

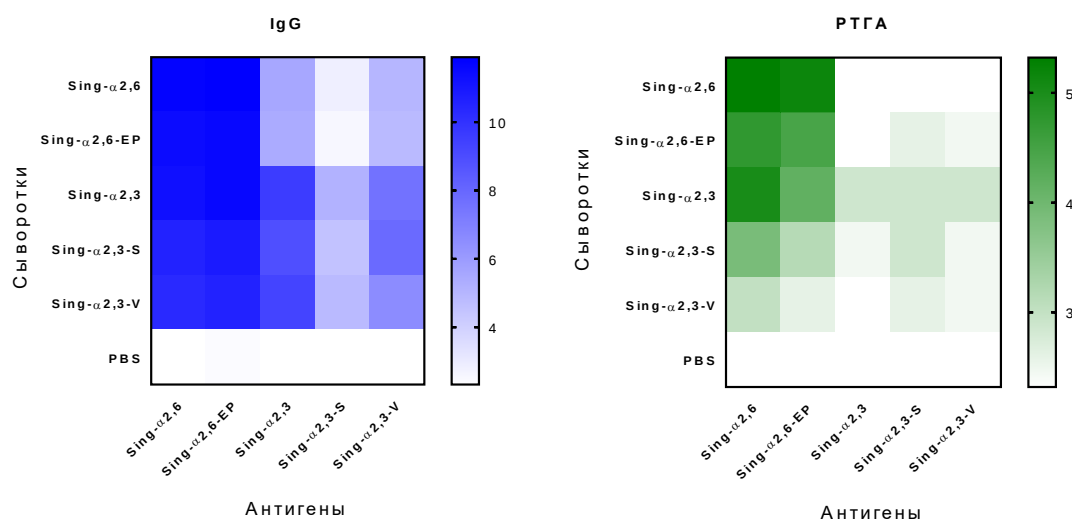


Рисунок 10. Антигенность исследуемых вариантов вируса A/Сингапур/1/57 (H2N2) IgG по методу ИФА (слева) и по методу РТГА (справа) в сыворотках мышей, собранных на 21й день после заражения вирусами Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S, Sing- α 2,3-V и группа контроля PBS, представлена на тепловой карте с титрами сывороток, шкала приведена в $\log_2$.

Из «тепловой карты» РТГА можно увидеть, что вирусы с рецепторной специфичностью α 2-6 в качестве антигенов выявляли наиболее высокие значения титров антител (для антигена Sing- α 2,6 титры антител 40; 26; 32; 15; 8 и 5 для сывороток групп Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S, Sing- α 2,3-V и PBS, соответственно; для

антигена Sing- α 2,6-EP титры антител в сыворотках тех же исследуемых групп составили 38; 23; 18; 9; 6 и 5, соответственно). Обратная зависимость наблюдалась для вирусов с рецепторной специфичностью α 2-3, использованных в качестве антигена. Антитела в сыворотках группы Sing- α 2,6 не уловили ни один из трех вариантов вирусов с рецепторной специфичностью α 2-3 (титры антител 5; 5; 5 для антигенов Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S, Sing- α 2,3-V, соответственно), несмотря на то, что в группах, иммунизированных MDCK-адаптированным вариантом Sing- α 2,6-EP, выявлялись титры антител выше уровня детекции (5; 6; 6 для антигенов Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S, Sing- α 2,3-V, соответственно), статистически значимых отличий обнаружено не было.

Исследование кросс-реактивности антител в ИФА показало сходие с РТГА результаты. Также как отмечено выше, для вирусов с рецепторной специфичностью α 2-6 в качестве антигенов были продемонстрированы наиболее высокие значения титров антител (для антигена Sing- α 2,6 уровни антител IgG составили 3327; 2896; 2521; 1552; 1260 и 5 для сывороток групп Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S, Sing- α 2,3-V и PBS, соответственно; для антигена Sing- α 2,6-EP титры антител IgG в сыворотках тех же исследуемых групп составили 3822; 3104; 3104; 1911; 1552 и 5, соответственно). К вирусам с рецепторной специфичностью α 2,3, используемых в качестве антигенов, было показано значительно меньшие уровни антител, детектируемых в сыворотках всех групп (для антигена Sing- α 2,3 уровни антител IgG составили 50; 42; 776; 478; 630 и 5 $\log_2$ IgG для сывороток групп Sing- α 2,6, Sing- α 2,6-EP, Sing- α 2,3, Sing- α 2,3-S, Sing- α 2,3-V и PBS, соответственно; для антигена Sing- α 2,3-S – 7; 6; 37; 24; 30 и 5 $\log_2$ IgG для сывороток тех же групп, соответственно; для антигена Sing- α 2,3-V – 32; 30; 194; 239; 97 и 5 $\log_2$ IgG для сывороток тех же групп, соответственно). Статистически значимыми были отличия уровней IgG антител между антигенами с различной рецепторной специфичностью в каждой исследуемой группе, а также были выявлены значимые различия уровней IgG между группами Sing- α 2,3 и Sing- α 2,3-S в тестах со всеми исследуемыми антигенами ($p < 0.05$).

Важно отметить, что вирусы с рецепторной специфичностью α 2,6 в качестве антигена одинаково хорошо связывали антитела из всех экспериментальных групп, кроме группы животных, иммунизированных вирусом Sing- α 2,3-V, в которой титры антител к вирусам Sing- α 2,6 и Sing- α 2,6-EP достоверно отличались от титров антител в других группах к этим же вирусам. В группах животных, иммунизированных MDCK-адаптированными вариантами с рецепторной специфичностью α 2,3, наблюдалась обратная ситуация, когда титры антител во всех группах к этим вирусам были минимальны, что говорит о вкладе

обнаруженных мутаций в «ускользание» от иммунного ответа, т.е. об их характере escape-мутаций. Надо заметить, что по антигенным свойствам для производства клеточной пандемической вакцины наиболее подходят вирусы гриппа с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$, адаптированные к культуре клеток MDCK или выделенные на ней. Такой выбор штамма для производства пандемической клеточной ЖГВ позволит максимально увеличить репродукцию вакцинного штамма в культуре клеток MDCK, а также обеспечит высокую эффективность вакцины, благодаря полноценному антигенному охвату циркулирующих вирусов гриппа в начале пандемической волны, где могут социркулировать вирусы с обоими типами рецепторной специфичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего этапа исследования было изучено влияние адаптации к культуре клеток MDCK пандемических вирусов гриппа A(H2N2) с различной рецепторной специфичностью на их рецепторную специфичность, репродукцию *in vivo* и *in vitro*, а также различные параметры гуморального и клеточного иммунного ответа. Было определено, что адаптация к культуре клеток MDCK не изменяет рецепторную специфичность вируса. Также был обнаружен феномен антигенности вариантов с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$ Sing- $\alpha 2,6$ и Sing- $\alpha 2,6$ -EP, которые оказались способны к более высокому связыванию перекрестно-реагирующих антител, выработанных на введение других исследуемых вариантов вирусов. Эти данные указывают на то, что вирусы A(H2N2) с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ индуцируют антитела с более широким антигенным охватом по сравнению с вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$. Данный феномен необходимо учитывать при выборе штамма для получения вакцины в случае наступления новой пандемии гриппа A(H2N2).

3.2. Создание, изучение и адаптация к культуре клеток MDCK вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины против вирусов гриппа A(H2N2) с различной рецепторной специфичностью

Начиная с 1977 года, вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины готовятся методом генетической реассортации эпидемического вируса с холодаадаптированным донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17) последующей селекцией вакцинного реассортанта при пониженной до 26°C температуре инкубации в присутствии антисыворотки к донору аттенуации. Однако, при получении вакцинных штаммов того же

подтипа, что и донор аттенуации, могут возникнуть сложности при отборе реассортанта с вакцинной формулой генома. Поэтому для исследовательских целей вакцинные штаммы для ЖГВ против пандемического вируса гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) были получены современными методами обратной генетики. Для этого в плазмиды с двунаправленным считыванием были клонированы гены гемагглютинирина и нейраминидазы вирусов Sing- α 2,3 и Sing- α 2,6, которые затем добавлялись к 6 плазмидам с генами донора аттенуации Лен/17, кодирующими внутренние и неструктурные белки вируса, и после электропорации клеток Vero были получены жизнеспособные вирусы с вакцинной формулой генома 6:2 – А/17/Сингапур/57/1 (H2N2) (17/Sing- α 2,3) и А/17/Сингапур/57/2 (H2N2) (17/Sing- α 2,6). На рисунке 11 представлены фенотипические характеристики пар пандемических и вакцинных штаммов.

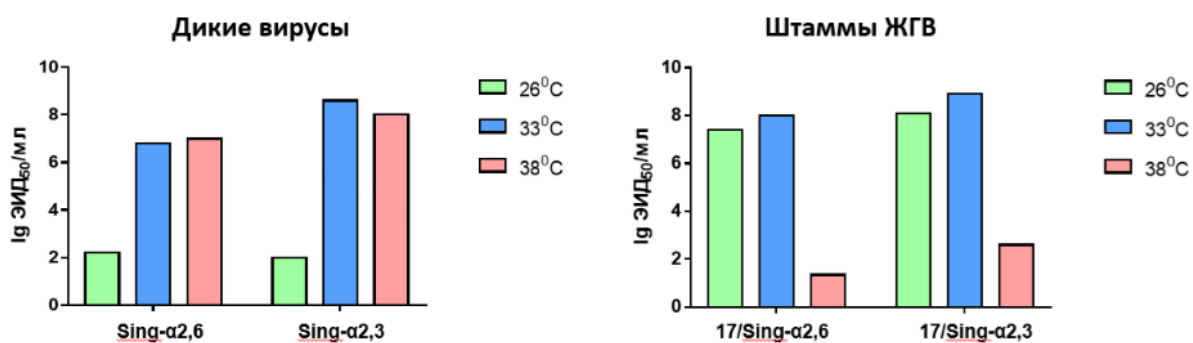


Рисунок 11. Фенотипическая характеристика пар диких и вакцинных штаммов при различных температурах инкубации.

Изучение фенотипических характеристик исследуемых штаммов вируса гриппа показало классическое распределение фенотипов. Дикие штаммы одинаково хорошо размножались при оптимальной и повышенной температуре, т.е. обладали выраженным *non-ts* фенотипом, титр вируса Sing- α 2,6 при температуре 33°C составил 6,9 lg ЭИД₅₀/мл, при 38°C – 7,2 lg ЭИД₅₀/мл, титр вируса Sing- α 2,3 при температуре 33°C составил 8,5 lg ЭИД₅₀/мл, при 38°C – 8,0 lg ЭИД₅₀/мл. При этом вирусы практически не размножались при пониженной температуре, т.е. обладали *non-ca* фенотипом: титр вируса Sing- α 2,6 при температуре 26°C составил 2,2 lg ЭИД₅₀/мл, титр вируса Sing- α 2,3 – 1,8 lg ЭИД₅₀/мл. Вакцинные штаммы, наоборот, практически не размножались при повышенной температуре 38°C: титр вируса 17/Sing- α 2,6 составил 1,2 lg ЭИД₅₀/мл, а вируса 17/Sing- α 2,3 – 2,2 lg ЭИД₅₀/мл; при этом оба вакцинных вируса хорошо росли на оптимальной и

пониженной температурах, унаследовав *ts/ca* фенотип от донора аттенуации: титр вируса 17/Sing- α 2,6 при температуре 33°C составил 8,0 lg ЭИД₅₀/мл, при 26°C – 7,3 lg ЭИД₅₀/мл, титр вируса 17/Sing- α 2,3 при температуре 33°C составил 8,7 lg ЭИД₅₀/мл, при 26°C – 8,0 lg ЭИД₅₀/мл. Необходимо отметить, что наличие температурочувствительности у вакцинного штамма является важным лабораторным маркером его аттенуирующего (*att*) фенотипа.

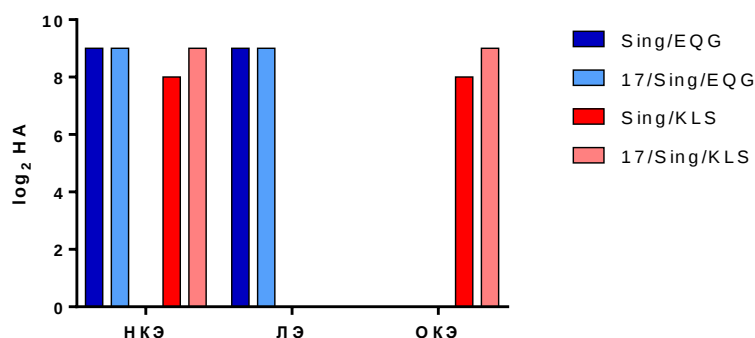


Рисунок 12. Результаты исследования рецепторной специфичности исходных и MDCK-адаптированных вариантов вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2). НКЭ - необработанные куриные эритроциты, ЛЭ - лошадиные эритроциты, ОКЭ - куриные эритроциты, обработанные экзосиалидазой.

Определение рецепторной специфичности вакцинных штаммов (рисунок 12) показало, что рецепторная специфичность каждого из них совпадает с соответствующим диким вирусом, что еще раз подтверждает ключевую роль молекулы гемагглютинина в связывании с гликановыми рецепторами клетки-хозяина.

Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ А(H2N2) проводилась в соответствии с разработанной методикой. После клонирования в культуре клеток MDCK из предельных разведений были получены клоны обоих вирусов, секвенирование которых показало отсутствие адаптационных мутаций в молекулах поверхностных антигенов. Это говорит о стабильности вакцинных вирусов, полученных генно-инженерным путем, а также что при пассировании вакцинных штаммов в развивающихся куриных эмбрионах накапливаются минорные популяции, которые могут получить преимущество в другой системе культивирования, в том числе и при адаптации к культуре клеток MDCK, а, следовательно, и возможность влиять на свойства вакцинных штаммов.

Сравнение инфекционной активности сконструированных вирусов в двух системах культивирования показало, что вакцинные штаммы 17/Sing- α 2,3 и 17/Sing- α 2,6 одинаково хорошо размножались в культуре клеток MDCK, титры вирусов составили 8,2 lg ТЦИД₅₀/мл и 8,1 lg ТЦИД₅₀/мл, соответственно, тогда как в РКЭ вирус 17/Sing- α 2,3 имел

инфекционный титр $8,8 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, что в 60 раз выше, чем у вируса 17/Sing- $\alpha 2,6$ – $7,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ (Рисунок 13).

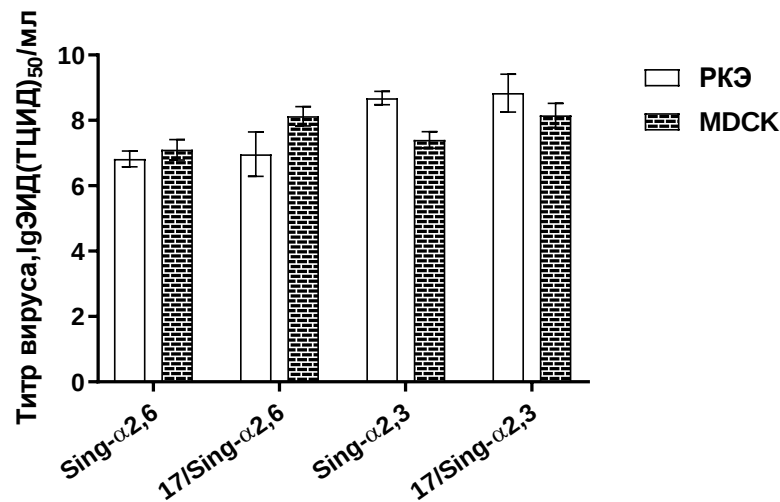


Рисунок 13. Инфекционная активность исследуемых вакцинных штаммов ЖГВ A(H2N2) *in vitro* в системе ПКЭ и культуре клеток MDCK.

Для исследования иммуногенности и кросс-реактивности полученных вакцинных штаммов A(H2N2) были иммунизированы группы сирийских хомячков, для чего животным дважды вводились исследуемые вирусы в количестве 10^6 ТЦИД₅₀/100мкл интраназально с интервалом в 21 день, после чего на 42 день эксперимента отбирали образцы сывороток крови, смывы верхних дыхательных путей и бронхоальвеолярный лаваж для оценки титров антител к двум антигенам – Sing- $\alpha 2,3$ и Sing- $\alpha 2,6$ для оценки влияния рецепторной специфичности гемагглютинина на иммуногенность и антигенность вакцинного штамма.

Уровни IgG антител в сыворотках крови и секреторных IgA антител в ВДП и БАЛ выявляли в ИФА в отношении обоих антигенов, при этом данные представляли как в виде кривых оптической плотности, так и в виде площадей под кривой ОП₄₅₀ (AUC, area under the curve) (рисунок 14). Иммуногенность обоих вакцинных штаммов 17/Sing- $\alpha 2,3$ и 17/Sing- $\alpha 2,6$ при оценке системного антительного ответа оказалось схожей: значения AUC составили 7009 и 7161, соответственно. Интересно, что формирование локального иммунного ответа к гомологичному антигену в верхних дыхательных путях при иммунизации вирусом 17/Sing- $\alpha 2,6$ происходило более интенсивно (AUC 213) по сравнению с вирусом 17/Sing- $\alpha 2,3$ (AUC 112). Такая же картина наблюдалась и в бронхоальвеолярном лаваже (AUC 245 и 131, соответственно).

Статистическая обработка полученных данных по кросс-реактивности антител показала, что иммунизация вакцинными штаммами 17/Sing- $\alpha 2,3$ и 17/Sing- $\alpha 2,6$ приводила

к формированию у животных схожих уровней сывороточных IgG антител, связывающихся с антигеном Sing- α 2,3 (AUC 6562 и 7009, соответственно). Однако, вакцинный вирус 17/Sing- α 2,3 индуцировал достоверно больше уровни антител к антигену Sing- α 2,6 (AUC 9241), чем к собственному антигену Sing- α 2,3 (AUC 7009), при этом для вакцинного вируса 17/Sing- α 2,6 такого эффекта не наблюдалось, и уровни антител для антигенов Sing- α 2,6 и Sing- α 2,3 не отличались достоверно (AUC 7160 и 6562, соответственно) (Рисунок 14). Полученные результаты полностью согласуются с результатами изучения антигенности пандемических вариантов A/Сингапур/1/57 в эксперименте на мышах (Рисунок 10).

Также было проведено исследование кросс-реактивности локальных IgA антител в смывах верхних и нижних дыхательных путей в ИФА с теми же вирусными антигенами 17/Sing- α 2,6 и 17/Sing- α 2,3. Было показано, что использование вируса Sing- α 2,6 в качестве антигена позволяет выявлять существенно более высокие уровни секреторных вирусспецифических антител (AUC 213 и 234 для ВДП, 245 и 256 для БАЛ, соответственно) по сравнению с использованием в качестве антигена вируса Sing- α 2,3 (AUC 91 и 112 для ВДП, 109 и 131 для БАЛ, соответственно) (Рисунок 14).

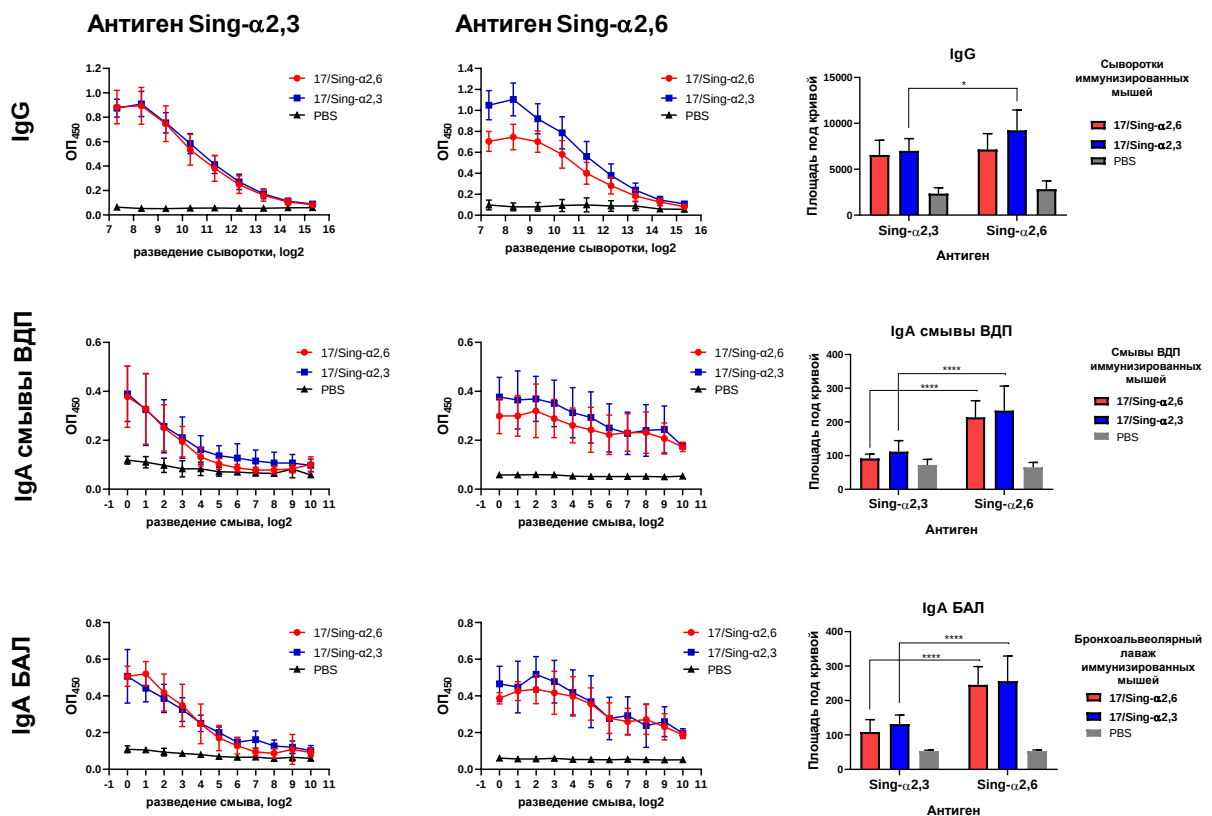


Рисунок 14. Оценка гуморального иммунного ответа на двукратное введение исследуемых вакцинных штаммов ЖГВ сирийским хомячкам. Слева представлены значения ОП₄₅₀ при различных разведениях сывороток или смывов ВДП и БАЛ к вирусу

Sing- $\alpha 2,3$ в ИФА. Посередине представлены значения ОП₄₅₀ при различных разведениях сывороток или смывов ВДП и БАЛ к вирусу Sing- $\alpha 2,6$ в ИФА. Справа приведены значения площади под кривой ОП₄₅₀ в ИФА с соответствующим антигеном.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины против вирусов Sing- $\alpha 2,6$ и Sing- $\alpha 2,3$, полученные методами обратной генетики, имеют классический для ЖГВ температурочувствительный и холодоадаптированный фенотип. Рецепторная специфичность вакцинных штаммов совпадает с родительскими вирусами, что подтверждает известный факт о зависимости рецепторной специфичности от поверхностных антигенов вируса гриппа. Кроме того, полученные вакцинные штаммы продемонстрировали высокую степень генетической стабильности при их адаптации к культуре клеток MDCK.

Таким образом, из представленных результатов следует, что вирусы гриппа подтипа H2N2 с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ индуцируют антитела, обладающие более широкой кросс-реактивностью в отношении вирусов гриппа с различной рецепторной специфичностью, по сравнению с антителами, образованными при введении вирусов, имеющих сродство к рецепторам типа $\alpha 2,6$, что было показано не только на пандемических вирусах, но и на соответствующих вакцинных штаммах. Данный феномен необходимо учитывать при выборе штамма для подготовки вакцины в случае наступления пандемии гриппа A(H2N2).

3.3. Стабильность вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK

Ежегодно в мире выделяют сотни новых штаммов эпидемических вирусов гриппа от больных людей и затем накапливают как в развивающихся куриных эмбрионах, так и в различных культурах клеток. Развивающиеся куриные эмбрионы являются классическим субстратом для выделения, культивирования и накопления вирусов гриппа, однако многократное пассирование вирусов гриппа человека в РКЭ способствует накоплению адаптационных мутаций, которые в большинстве случаев появляются при смене системы культивирования и могут влиять на основные свойства вируса гриппа, такие как репродуктивная активность, иммуногенность и антигенность. Наиболее распространенной клеточной культурой для выращивания вирусов гриппа является линия клеток почек собаки

MDCK, она высокочувствительна к вирусам гриппа и обеспечивает высокие уровни репродукции большинства подтипов вируса гриппа А. На культуре клеток млекопитающих при выделении вирусов гриппа от больных людей адаптационные мутации появляются значительно реже. При этом большинство выделяемых вирусов гриппа имеют гетерогенную популяцию и несут в себе несколько минорных компонентов с различными аминокислотными заменами в вирусных белках. Наиболее часто встречаются мутации в вариабельных участках молекулы гемагглютинина, которые могут оказывать существенное влияние на антигенность вируса гриппа.

3.3.1. Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H5N1 к культуре клеток MDCK

Для адаптации к культуре клеток MDCK было использовано два вакцинных штамма ЖГВ против подтипа H5N1: А44/Вьетнам/1204/2003 (H5N1), полученный методами обратной генетики, и штамм А/17/индюк/Турция/2005/133 (H5N2) (Тур17), полученный методами классической реассортации в куриных эмбрионах.

Адаптация генно-инженерного штамма ЖГВ А44/Вьетнам/1204/2003 (H5N1) к клеткам с последующим клонированием методом бляшек не привела к появлению аминокислотных замен в поверхностных белках вакцинного штамма. При повторном клонировании также не было обнаружено дополнительных мутаций. Таким образом, было исследовано 30 клеточных клонов штамма ЖГВ А44/Вьетнам/1204/2003 (H5N1) и не обнаружено адаптационных мутаций, что говорит о высокой стабильности генома обратного генетического вакцинного штамма при адаптации к культуре клеток MDCK.

Штамм ЖГВ А/17/индюк/Турция/2005/133 (H5N2), полученный методами классической реассортации и содержащий ген гемагглютинина от высокопатогенного потенциально-пандемического вируса гриппа А/индюк/Турция/1/2005 (H5N1), из кливедж-сайта которого методами генной инженерии были удалены основные аминокислоты для уменьшения патогенности вируса [201], а остальные 7 генов – от донора аттенуации Лен17. Указанный штамм прошел полный комплекс доклинических исследований, а также I фазу клинических испытаний на 40 добровольцах [202], [115]. После адаптации по вышеописанной методике штамма Тур17 к культуре клеток MDCK было накоплено и проанализировано 12 клонов из разных бляшек, в каждом из них были обнаружены одинаковые мутации в молекуле гемагглютинина (таблица 6). Мутаций в молекуле нейраминидазы обнаружено не было.

Таблица 6. Мутации, обнаруженные в молекуле гемагглютинина MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Typ17.

Субъединица гемагглютинина	Аминокислотная позиция	Исходный вирус Typ17	Клоны, адаптированные к клеткам MDCK
			Typ17-1 – Typ17-12
HA1	145	Arg	Lys
HA2	68	Arg	Lys

Во всех исследованных клонах, адаптированных к клеткам MDCK, были обнаружена одинаковая сцепка мутаций R145K в HA1 и R68K в HA2.

В исследовании репродукции MDCK-адаптированных вакцинных штаммов было показано, что инфекционные титры клеточного варианта вакцинного штамма Typ17-1 составили 6,8 lg ЭИД₅₀/мл в куриных эмбрионах и 6,6 lg ТЦИД₅₀/мл в культуре клеток MDCK, тогда как неадаптированный РКЭ-вариант Typ17 размножался на два порядка лучше своего MDCK-адаптированного аналога – титр вируса в куриных эмбрионах составил 9,2 lg ЭИД₅₀/мл и 9,0 lg ТЦИД₅₀/мл в культуре клеток MDCK, $p=0.0159$ и $p=0.0286$, соответственно (Рисунок 15). После трех последовательных пассажей с оптимальной множественностью заражения (MOI) инфекционный титр вируса не изменился, что свидетельствует о том, что аминокислотные замены R145K в HA1 и R68K в HA2 повлияли на репродукцию вакцинного штамма Typ17-1.

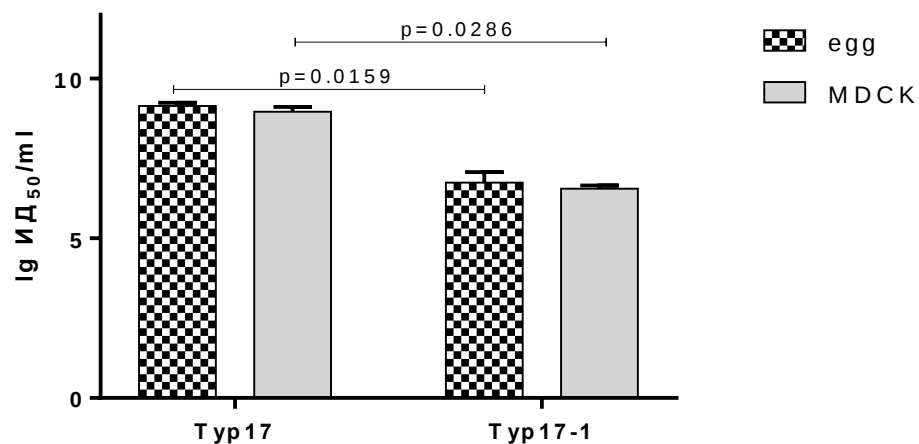


Рисунок 15. Репродукция вакцинных штаммов Typ17 и Typ17-1 в различных системах культивирования.

Антигенность MDCK-адаптированного клона H5N2 исследовали в РТГА с мышинной гипериммунной сывороткой. Результаты представлены в таблице 7, откуда видно, что

данные мутации не повлияли на кросс-реактивность вирусов, что позволило клону успешно пройти двунаправленный тест РТГА. В сыворотках крови, полученных после иммунизации мышей вирусом Тур17, определялся титр антител 1:640 как с антигеном Тур17, так и с антигеном Тур17-1, тогда как сыворотки, полученные после иммунизации мышей вирусом Тур17-1, имели титр 1:160 также с обоими антигенами. Меньший титр в РТГА сыворотки, полученной к МДСК-адаптированному штамму, вероятно, связан с его более низким инфекционным титром и, соответственно, меньшим содержанием белка при иммунизации.

Таблица 7. Результаты двунаправленного теста РТГА гипериммунных мышинных сывороток с использованием в качестве антигенов вакцинных штаммов Тур17 и Тур17-1.

Антигены	Титр антител в РТГА с указанными гипериммунными сыворотками	
	Тур17	Тур17-1
Тур17	640	160
Тур17-1	640	160

Изучение иммуногенности вирусов Тур17 и Тур17-1 проводили на мышах линии СВА: 8 животных в каждой группе дважды иммунизировали интраназально дозой 10^5 ТЦИД₅₀/мышь с разницей в 21 день. Сыворотки собирали на 42й день после первой иммунизации и исследовали в РТГА. Результаты данного эксперимента представлены на рисунке 16, откуда видно отсутствие значимых отличий в титрах антител между двумя вакцинными группами Тур17 и Тур17-1 (48,5 и 36,8, соответственно, $p=0,4193$), тогда как в группе PBS специфических антител обнаружено не было (уровень антител <2) и, соответственно, иммунизированные вакцинными штаммами группы статистически достоверно отличались от группы контроля ($p<0.0001$).

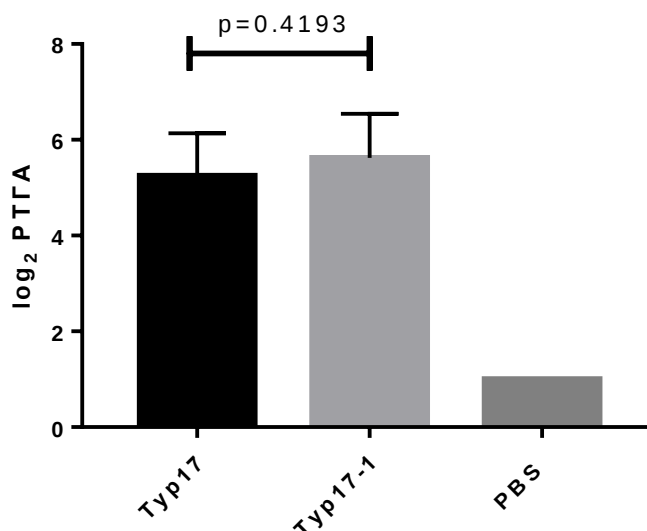


Рисунок 16. Гуморальный иммунный ответ для вакцинных штаммов A(H5N2) Typ17 и Typ17-1, результаты РТГА. Мыши СВА, N=8, Т-критерий Стьюдента.

Таким образом, было показано, что, несмотря на значительную разницу в инфекционной активности *in vitro*, иммуногенность и антигенность как исходного вакцинного штамма Typ17, накопленного в РКЭ, так и его MDCK-адаптированного аналога Typ17-1 не отличаются в эксперименте на мышах.

Исходя из результатов исследований адаптации вакцинного штамма Typ17 (H5N2), невозможно утверждать, что для других штаммов H5 адаптации к культуре клеток MDCK также приведет к снижению инфекционной активности вируса. Данный вопрос требует более широкого и детального исследования, что будет являться продолжением настоящей работы.

3.3.2. Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H7N9 к культуре клеток MDCK

В работе был использован штамм ЖГВ A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) (Ануи17), с классической формулой генома 6:2, содержащий гены гемагглютиниона и нейраминидазы от потенциально-пандемического штамма вируса гриппа A/Ануи/1/2013 (H7N9), который был выделен от человека в самом начале первой волны A(H7N9) в Китае в марте 2013 года. По данным литературы дикий штамм приобрел рецепторную специфичность $\alpha 2,6$, тогда как у штамма вируса гриппа того же подтипа, выделенного немногим ранее в другой провинции Китая A/Шанхай/1/2013 (H7N9), определялась рецепторная специфичность $\alpha 2,3$. Обнаруженная при исследовании генома этих вирусов мутация, ведущая к ключевой замене Q226L в молекуле гемагглютиниона, обусловила выбор штамма A/Ануи/1/2013 (H7N9) для

подготовки потенциально-пандемической вакцины, которая прошла полный комплекс доклинических исследований, а также фазу I клинических испытаний [113]. После адаптации штамма Ануи17 к культуре клеток MDCK по описанной выше методике было проанализировано 20 клонов, накопленных из отдельных бляшек. У всех выделенных клонов были секвенированы гены поверхностных белков, после чего были выявлены два клон, имеющие аминокислотные отличия в гемагглютинине по сравнению с исходным вирусом, полученным в РКЭ (таблица 8). Клон Ануи17-3 имел мутации в S278N субъединице HA1 и F69L в субъединице HA2, в свою очередь у клона Ануи17-5 была обнаружена только одна мутация N285K в субъединице HA1. В клинических испытаниях фазы I у двух волонтеров была выявлена одинаковая мутация в HA2 L98F [113].

Таблица 8. Мутации, обнаруженные в молекуле гемагглютинина MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Ануи17.

Субъединица гемагглютинина	Аминокислотная позиция	Исходный вирус	Клоны, адаптированные к MDCK	
		Ануи17	Ануи17-3	Ануи17-5
HA1	278	Ser	Asn	Ser
	285	Asn	Asn	Lys
HA2	69	Phe	Leu	Phe

Исследование репродукции MDCK-адаптированных штаммов не выявило значимой разницы между инфекционными титрами вирусов в обеих системах культивирования: инфекционные титры в системе куриных эмбрионов составили 9,5; 9,3 и 9,3 lg ЭИД₅₀/мл для штаммов Ануи17, Ануи17-3 и Ануи17-5, соответственно, и в культуре клеток MDCK – 9,0; 8,6; 9,0 lg ТЦИД₅₀/мл, соответственно. Таким образом, адаптация вакцинного штамма Ануи17 к культуре клеток MDCK не повлияла на его ростовые характеристики (Рисунок 17).

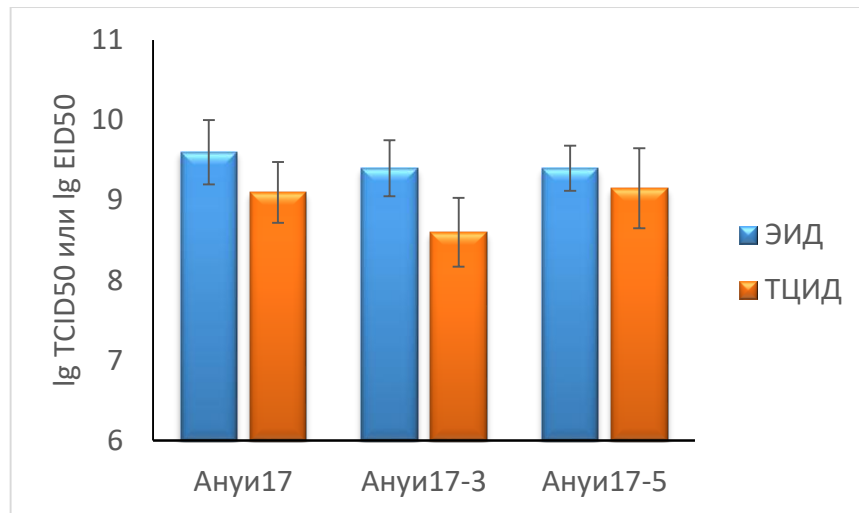


Рисунок 17. Репродукция вакцинных штаммов Ануи17, Ануи17-3 и Ануи17-5 в различных системах культивирования.

Оценка рецепторной специфичности представлена на рисунке 18. Титры вирусов Ануи17, Ануи17-3 и Ануи17-5 по гемагглютинации с необработанными куриными эритроцитами составили 1024, 512 и 256 АЕ, соответственно, с лошадиными эритроцитами – 1, 1 и 1 АЕ, а с обработанными куриными эритроцитами – 512, 512 и 128 АЕ, соответственно. Видно, что MDCK-адаптированные варианты вируса Ануи17, как и исходный вариант не изменили своей рецепторной специфичности. Хотя для клона Ануи17-5 было показано незначительное снижение сродства к рецепторам $\alpha 2,6$, при этом он не увеличил сродства к рецепторам $\alpha 2,3$. Все вышесказанное позволяет сделать вывод о том, что адаптация к культуре клеток MDCK не меняет рецепторной специфичности вакцинных штаммов подтипа H7N9.

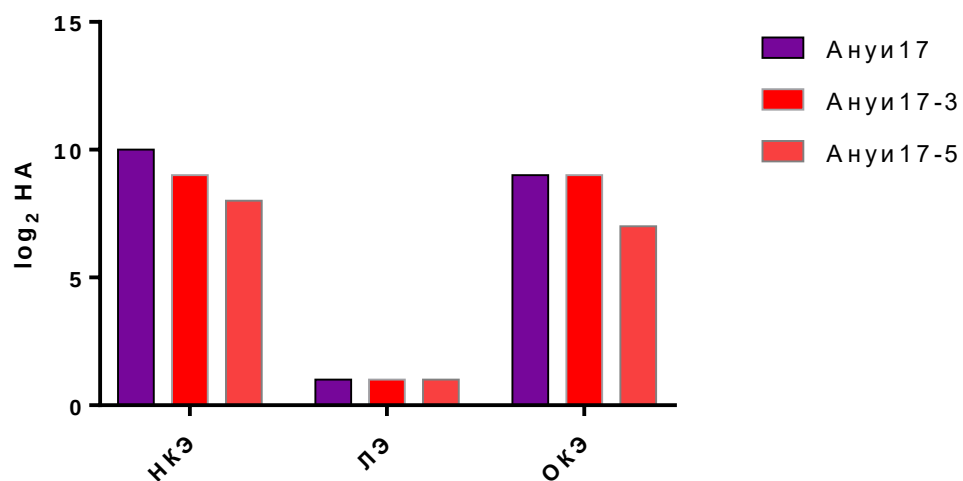


Рисунок 18. Результаты исследования рецепторной специфичности исходного и MDCK-адаптированных вариантов вируса Ануи17. НКЭ - необработанные куриные

эритроциты, ЛЭ - лошадиные эритроциты, ОКЭ - куриные эритроциты, обработанные экзосиалидазой.

На рисунке 19 представлены структуры молекул гемагглютинаина Н7 с выделением аминокислот, обнаруженных в MDCK-адаптированных вариантах. Интересно отметить, что все обнаруженные замены находятся в ножке молекулы НА и не принадлежат ни одному известному функциональному домену, что объясняет отсутствие их влияния на основные свойства вакцинных штаммов.

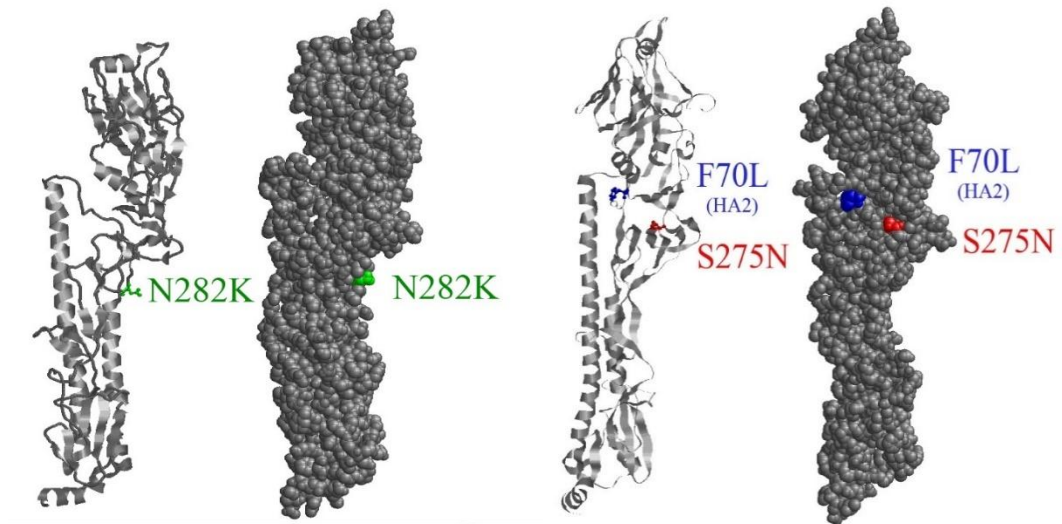


Рисунок 19. Структуры молекул НА MDCK-адаптированным клонов Ануи17-3 (справа) и Ануи17-5 (слева)

Изучение иммуногенности вирусов Ануи17, Ануи17-3 и Ануи17-5 проводили на мышах линии СВА: 8 животных в каждой группе дважды иммунизировали интраназально дозой 10^5 ТЦИД₅₀/мышь с интервалом в 21 день. Сыворотки собирали на 42й день после первой иммунизации и исследовали в РТГА. Результаты данного эксперимента показали отсутствие значимых отличий в титрах антител между группами, иммунизированными вакцинными штаммами Ануи17, Ануи17-3 и Ануи17-5 (139,6; 128 и 128, соответственно, $p=0,9853$), тогда как в группе контроля (PBS) специфических антител не обнаружено (уровень антител <2) и, соответственно, иммунизированные вакцинными штаммами группы статистически достоверно отличались от группы контроля ($p<0.0001$) (Рисунок 20).

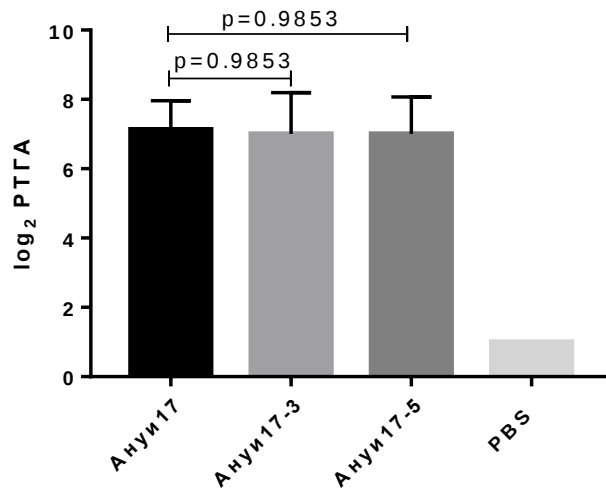


Рисунок 20. Гуморальный иммунный ответ для вакцинных штаммов подтипа H7N9 Ануи17, Ануи17-3 и Ануи17-5, результаты РТГА. Мыши СВА, N=8, Т-критерий Стьюдента.

Таким образом, адаптация вакцинного штамма Ануи17 к культуре клеток MDCK привела к появлению мутаций S278N и N285K субъединице HA1, F69L в субъединице HA2, при этом указанные мутации не повлияли на инфекционную активность вакцинного штамма как в куриных эмбрионах, так и в культуре клеток MDCK, не изменили его рецепторной специфичности, а также не повлияли на иммуногенность вирусов на модели мышей, что свидетельствует о том, что вакцинный штамм Ануи17 (H7N9), полученный в РКЭ, подходит для производства культуральной живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа A(H7N9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В разделах 3.3.1 и 3.3.2 были исследованы особенности адаптации к культуре клеток MDCK вакцинных штаммов против потенциально пандемических вирусов гриппа птиц A(H5N1) и A(H7N9). У обоих подтипов были обнаружены адаптационные мутации в стеблевом домене молекулы гемагглютинина, и для подтипа H5N1 была продемонстрирована 100% адаптация к культуре клеток MDCK, т.к. были обнаружены одинаковые мутации R145K в HA1 и R68K в HA2 у всех исследованных клонов. Данные мутации не повлияли на антигенность вакцинных штаммов, однако существенно ухудшили репродукцию как в развивающихся куриных эмбрионах, так и в культуре клеток MDCK. Адаптация вакцинных штаммов против вируса гриппа подтипа H7N9 привела к обнаружению мутаций S278N и N285K субъединице HA1, F69L в субъединице HA2 в 2 из

[illegible]

HA2	79	Asp	Asp	Asp	Asp	Gly	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asn
	83	Tyr	His	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
	85	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
	92	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp/ Gly	Trp	Trp
	124	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
	154	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Lys	Asn	Asn	Asn
	160	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	His	Asp	Asp
	169	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Lys	Asn	Asn	Asn	Asn

Репродукция исходного вакцинного вируса Tex17 была в 50 раз лучше в системе куриных эмбрионов, чем в культуре клеток MDCK: 9,6 lg ЭИД₅₀/мл против 7,9 lg ТЦИД₅₀/мл. Для производства вакцины на культуре клеток важно иметь высокую репродуктивную активность вакцинного штамма на соответствующем субстрате. Очевидно, что для достижения этой цели необходимо адаптировать вирус к культуре клеток и выделить наиболее перспективные клоны с повышенной репродукцией в данном субстрате. В результате исследования инфекционной активности MDCK-адаптированных вакцинных штаммов был выделен штамм Tex17-16, у которого был обнаружен наибольший статистически значимый рост титра в культуре клеток MDCK по сравнению с исходным вакцинным штаммом Tex17: 8,6 и 7,9 lg ТЦИД₅₀/мл (Рисунок 21).

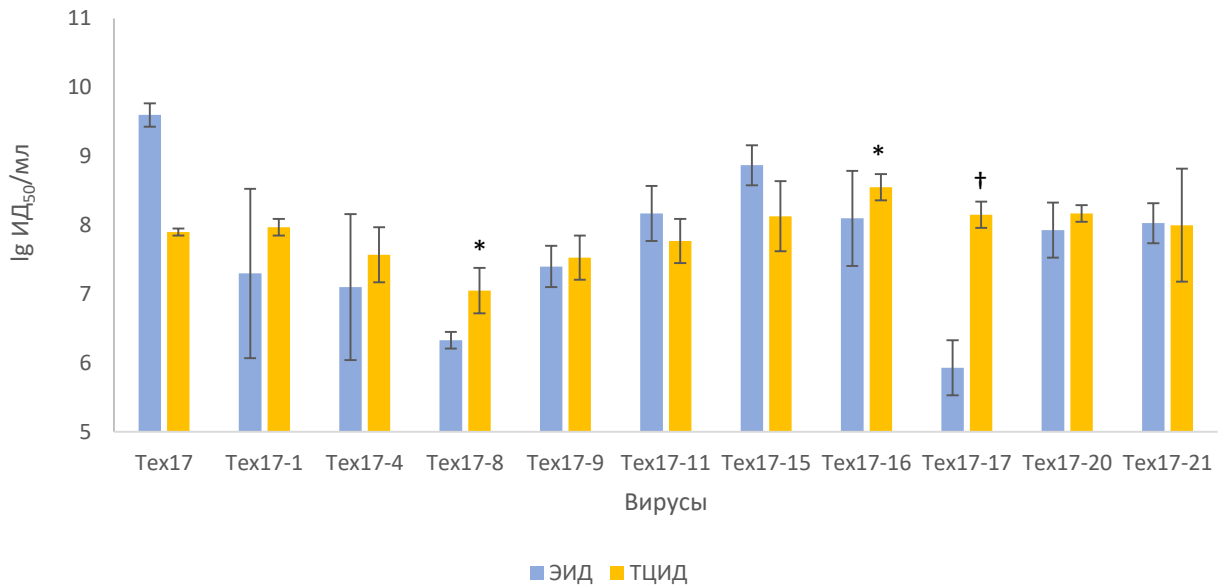


Рисунок 21. Репродукция вакцинных вирусов гриппа A/17/Техас/12/30 (H3N2).

* $p < 0,05$ по сравнению с ТЦИД₅₀/мл Tex17; † $p < 0,05$ по сравнению с ЭИД₅₀/мл Tex17-17.

Таким образом, набор мутаций V176I, P221S, D265E в HA1 и N154K в HA2 ассоциируется с повышением репродукции вакцинного штамма в культуре клеток MDCK. Кроме этого, следует отметить, что был выявлен вариант Tex17-8, который статистически значительно снизил репродукцию в культуре клеток (7,1 lg ЭИД₅₀/мл и 6,3 lg ТЦИД₅₀/мл), на что повлияли аминокислотные замены P221S, D265E в HA1 и Y85E в HA2. Из вышесказанного следует, что мутации N154K и Y85E в HA2 являются критическими для размножения вируса в культуре клеток и требуют дальнейшего исследования. Также оказался интересен штамм Tex17-17, который в 200 раз лучше размножался в культуре клеток MDCK, чем в системе куриных эмбрионов – инфекционный титры Tex17-17 5,9 lg ЭИД₅₀/мл и 8,2 lg ТЦИД₅₀/мл. Таким образом, адаптационные мутации P215T в HA1 и W92G, D160N в HA2 дали вакцинному штамму существенное преимущество в культуре клеток MDCK, что может быть эффективно использовано в производстве культуральной ЖГВ. Однако надо отметить, что набор указанных мутаций значительно снизил инфекционную активность вируса в развивающихся куриных эмбрионах, и если обратить внимание на вирусы Tex17-11 и Tex17-15, можно заметить, что эти вирусы отличаются только мутациями в субъединице HA2 молекулы гемагглютинина, и именно аминокислотные различия в стеблевом домене HA являются ключевыми в адаптации вакцинных штаммов A(H3N2) к культуре клеток MDCK.

Также на рисунке 22 представлены трехмерные структуры молекул HA вакцинных штаммов Tex17-8 и Tex17-16, на которых отмечены обнаруженные адаптационные

мутации, где видно, что мутации, критическим образом повлиявшие на уровень репликации вакцинных штаммов в культуре клеток MDCK, находятся в ножке молекулы гемагглютинаина. Также представляет интерес исследование иммуногенности и антигенности данных вирусов, однако, как упоминалось выше, современные вирусы гриппа подтипа H3N2 не способны инфицировать мышей, поэтому в рамках данной работы исследование иммуногенности не предполагается.

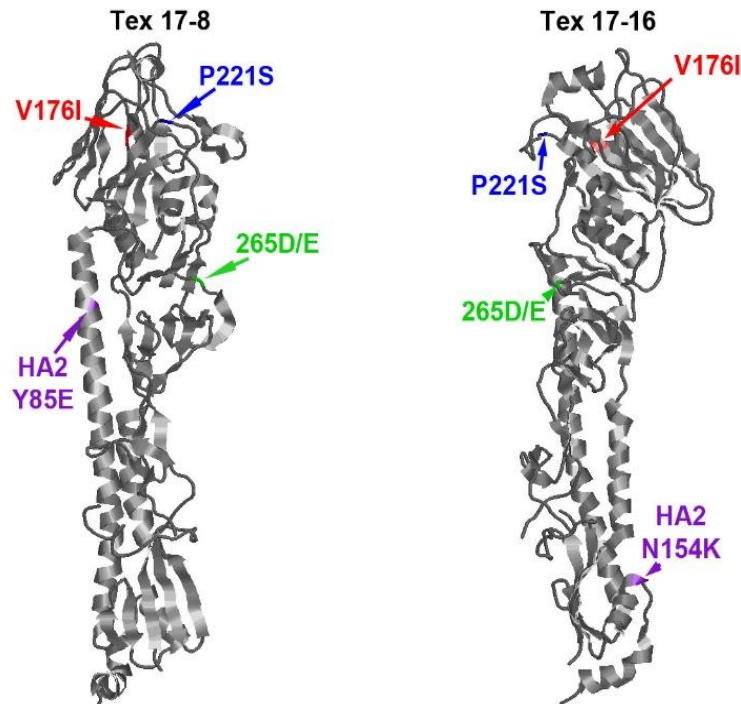


Рисунок 22. Трехмерная структура молекулы гемагглютинаина A/Texas/50/2012 (H3N2) с выделением исследуемых аминокислот. Расположение аминокислот показано на мономере гемагглютинаина A/Singapore/H2011.447/2011 (H3N2) (PDBID 4WEA). Иллюстрации получены с использованием программы RasMol 2.7.5.

Поскольку современные человеческие штаммы A(H3N2) утратили способность заражать мышей, для исследования кросс-реактивности MDCK-адаптированных клонов Tex17-8, Тез17-16 и Tex17-17 была проведена РТГА с использованием гипериммунных крысиных сывороток, полученных по разработанной схеме иммунизации, и тех же вирусов в качестве антигена, а также соответствующего вакцинного и дикого вируса Tex17 и Tex-wt. Результаты данного эксперимента приведены в таблице 10, где можно видеть, что ни одна из исследуемых мутаций не повлияла на антигенность клеточных клонов штамма Tex17.

Таблица 10. Кросс-реактивность антител в гипериммунных сыворотках крыс, полученных к различным вариантам вакцинного штамма ЖГВ А(Н3N2)

Антигены	Титр антигемагглютинирующих антител в гипериммунных сыворотках крыс, полученных к указанным вариантам вакцинного вируса			
	Tex17	Tex17-8	Tex17-16	Tex17-17
Tex-wt	1280	320	640	640
Tex17	1280	320	320	1280
Tex17-8	2560	320	320	1280
Tex17-16	640	640	640	640
Tex17-17	1280	320	640	640

Исходя из полученных данных, можно отметить, что адаптация вакцинного вируса гриппа А(Н3N2) к культуре клеток MDCK привела к возникновению множественных аминокислотных замен в молекуле гемагглютинина. Было показано, что мутации N154K и Y85E, обнаруженные в субъединице HA2 молекулы HA вакцинного штамма, являются критическими для размножения вируса в культуре клеток MDCK. Кроме того, адаптационные мутации W92G, D160H в субъединице HA2 дают существенное преимущество репликации вакцинного вируса в культуре клеток MDCK над его репликацией в развивающихся куриных эмбрионах.

3.3.4. Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H1N1 к культуре клеток MDCK

В работе был использован вакцинный штамм A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) (Калиф17), содержащий гены гемагглютинина и нейраминидазы от эпидемического вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09), рекомендованного ВОЗ для подготовки противогриппозных вакцин в нескольких сезонах, начиная с 2009-2010 годов. После адаптации Калиф17 к культуре клеток MDCK был выделен и проанализирован 21 клон, три из которых по результатам секвенирования генов HA и NA имели аминокислотные отличия в молекуле гемагглютинина (Таблица 11).

Таблица 11. Мутации, обнаруженные в гемагглютанине MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Калиф17.

Субъединица гемагглютенина	Аминокислотная позиция	Исходный вирус Калиф17	Клоны, адаптированные к MDCK		
			Калиф17-1	Калиф17-4	Калиф17-8
HA1	156	Asn	Asp	Asn	Asp
HA2	44	Ala	Ala	Val	Val

Интересно отметить, что вакцинные штаммы Калиф17-1 (N156D в HA1), Калиф17-4 (A44V в HA2) и Калиф17-8 (N156D в HA1 и A44V в HA2) приобрели всего две различные мутации в молекуле гемагглютенина в различных вариациях, при этом через 2 накопительных пассажа штаммы Калиф17-1 и Калиф17-4 стали идентичны штамму Калиф17-8, т.е. приобрели каждый «недостающую» мутацию. Этот феномен говорит о том, что вакцинному штамму Калиф17 не хватило пяти пассажей для адаптации, и процесс продолжился при накоплении вирусов в культуре клеток MDCK. Этот же факт подтверждают данные по исследованию репродукции вакцинных штаммов Калиф17, представленные на рисунке 23. В системе куриных эмбрионов инфекционные титры вирусов Калиф17, Калиф17-1, Калиф17-4 и Калиф17-8 составляли 8,0; 6,6; 7,1 и 8,2 lg ЭИД₅₀/мл, соответственно. При этом клоны Калиф17-1 и Калиф17-4 размножались в 8-40 раз хуже исходного варианта Калиф17, полученного в РКЭ, и клон Калиф17-8 ($p=0,0136$ и $p=0,0121$). Тогда как в культуре клеток MDCK инфекционные титры тех же вирусов составляли 6,3; 6,2; 7,3 и 7,6 lg ТЦИД₅₀/мл, соответственно, откуда видно, что в культуре клеток получили преимущество клоны Калиф17-4 и Калиф17-8 и стали размножаться лучше в 10-20 раз лучше исходного вируса Калиф17 ($p=0,0469$ и $p=0,0257$).

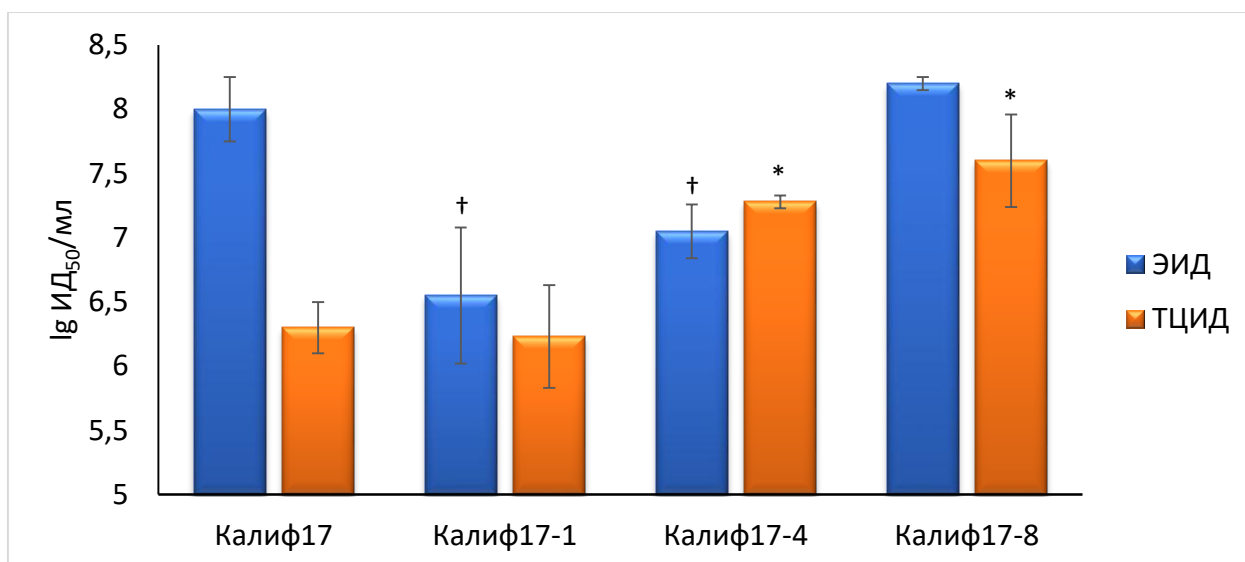


Рисунок 23. Репродукция вакцинных вирусов гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm) * $p < 0,05$ по сравнению с ТЦИД₅₀/мл Калиф17; † $p < 0,05$ по сравнению с ЭИД₅₀/мл Калиф17.

Расположение аминокислотных замен в молекуле гемагглютинина показано на рисунке 24, где можно отметить сходную локализацию адаптационных мутаций в штаммах A(H1N1) и A(H3N2).

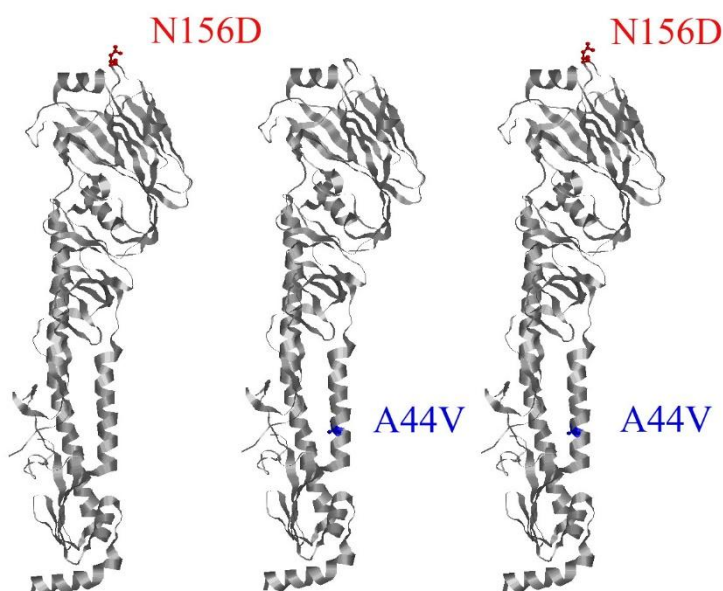


Рисунок 24. Трехмерная структура молекулы гемагглютинина A/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09) с выделением исследуемых аминокислот. Расположение аминокислот показано на мономере гемагглютинина A/California/04/2009 (H1N1) (PDBID 3UYX).

Иллюстрации получены с использованием программы RasMol 2.7.5.

Также была изучена иммуногенность вирусов Калиф17 и Калиф17-8, исследование которой проводилось на мышах линии СВА: 8 животных в каждой группе двукратно интраназально иммунизировали в объеме 50 мкл дозой 10^6 ТЦИД₅₀ с интервалом в 21 день. Сыворотки крови собирали на 42й день после начала эксперимента и исследовали в ИФА, где определяли уровни сывороточных IgG антител. Результаты данного эксперимента представлены на рисунке 25. Было показано отсутствие значимых отличий в уровнях антител между группами, иммунизированными вакцинными штаммами Калиф17 и Калиф17-8, при этом в группе контроля специфических антител обнаружено не было и, соответственно, иммунизированные вакцинными штаммами группы статистически достоверно отличались от группы контроля ($p=0.0024$ и $p=0.0157$).

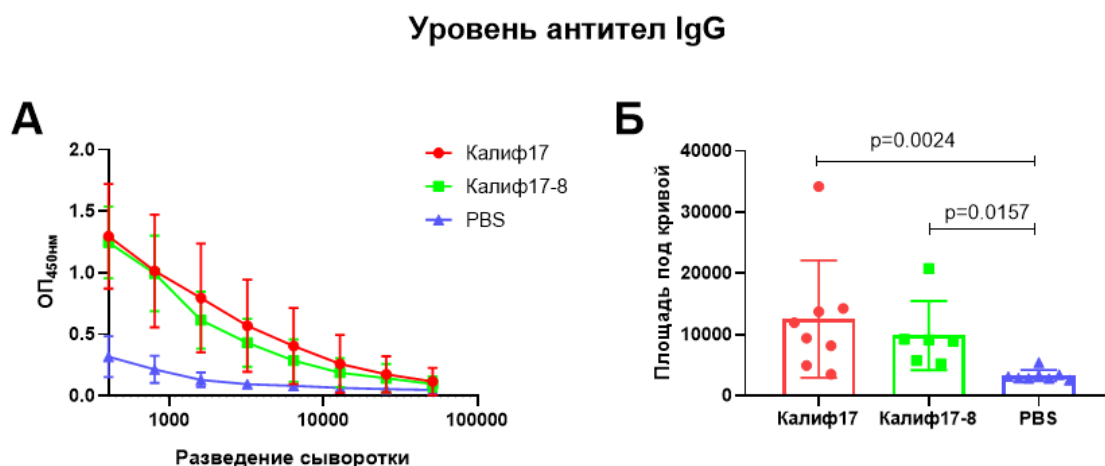


Рисунок 25. Иммуногенность вакцинного штамма Калиф17, полученного в РКЭ, и его аналога Калиф17-8, адаптированного к культуре клеток MDCK, в эксперименте на мышах линии СВА. (А) Зависимость оптической плотности от разведения сывороток в иммуноферментном анализе. (Б) Расчет площади под кривой по данным графика А.

Защитная эффективность вакцинного штамма Калиф17 и его клеточного варианта Калиф17-8 была исследована на мышах линии СВА, которые были иммунизированы по той же схеме, что и для изучения иммуногенности, с последующим заражением диким вирусом А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09), адаптированным к мышам, на день 45 после начала эксперимента. Челлендж-вирус вводили в дозе 10^5 lgЭИД₅₀, после чего проводили ежедневный мониторинг выживаемости животных в течение 14 дней. Результаты выживаемости иммунизированных мышей после челленджа показаны на рисунке 26. Как можно видеть на графике, оба вакцинных штамма защитили животных от дикого вируса, и

летальность в группах Калиф17 и Калиф17-8 составила 0%, тогда как в контрольной группе летальность составила 100% к 8 дню эксперимента.

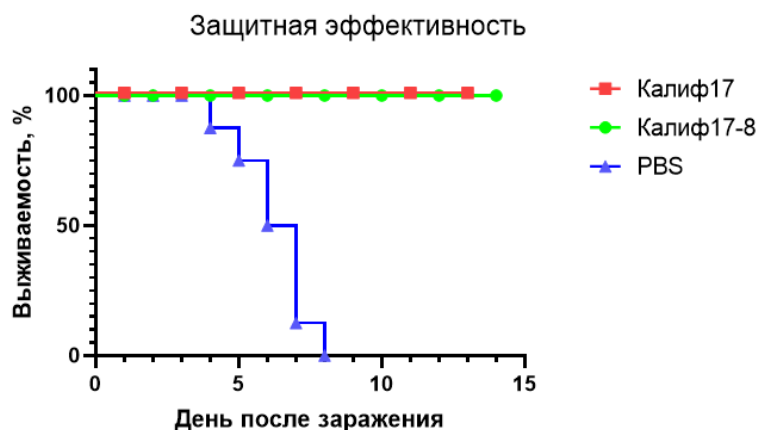


Рисунок 26. Уровень выживаемости иммунизированных и контрольных мышей после экспериментального заражения летальным вирусом А/Калифорния/09/07-та (H1N1pdm09). Статистическая обработка произведена методом непараметрическим однофакторного ANOVA с поправкой Крускала-Уоллиса.

Таким образом, мутации N156D в HA1 и A44V в HA2 не повлияли на иммуногенность вакцинного штамма Калиф17 после его адаптации к культуре клеток MDCK.

Кросс-реактивность антител, индуцируемых MDCK-адаптированным вариантом Калиф17-8 и вакцинным штаммом Калиф17, оценивалась в реакции торможения гемагглютинации по классической методике, результаты которой представлены в таблице 12. Так, титр сывороток группы Калиф17 против вирусов Калиф-wt, Калиф17 и Калиф17-8 составил 640, 640 и 320 АЕ, соответственно, а титр сывороток группы Калиф17-8 против тех же вирусов составил 320, 320 и 320 АЕ. Таким образом, было показано, что адаптационные мутации не повлияли на способность продуцируемых антител связывать исходный вариант гемагглютинирина штамма А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09), что полностью согласуется с данными по иммуногенности, представленными выше.

Таблица 12. Кросс-реактивность антител, вырабатываемых в ответ на иммунизацию мышей различными вариантами ЖГВ А(H1N1pdm09).

Антигены	Титр антигемагглютинирующих антител в сыворотках крови мышей, привитых вариантом вакцинного штамма	
	Калиф17	Калиф17-8

Калиф-wt	640	320
Калиф17	640	320
Калиф17-8	320	320

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего раздела исследования было показано, что вакцинные штаммы для ЖГВ подтипа H3N2 имеют высокую способность к мутированию в новых условиях культивирования. Так, после адаптации к культуре клеток MDCK вакцинного штамма A(H3N2) из предельных разведений было выделено 10 различных клонов с 11-ю различными мутациями, локализующимися как в субъединице HA1, так и в субъединице HA2. Изучение репродукции *in vitro* выделенных клонов показало, что мутации N154K и Y85E, обнаруженные в субъединице HA2 молекулы гемагглютинина вакцинного штамма, являются критическими для размножения вируса в культуре клеток MDCK. Кроме того, адаптационные мутации W92G, D160H в HA2 дают существенное преимущество репликации вакцинного вируса в культуре клеток MDCK над его репликацией в развивающихся куриных эмбрионах. Антигенность штаммов, имеющих повышенный уровень репродукции в культуре клеток MDCK, не менялась по сравнению с исходным вариантом, полученным в РКЭ.

Для штаммов ЖГВ подтипа H1N1 была обнаружена сцепка мутаций N156D в HA1 и A44V в HA2, которая дала вирусу 20-кратное преимущество при его накоплении в культуре клеток MDCK, и при этом эти мутации не влияют на иммуногенность и кросс-реактивность MDCK-адаптированных вариантов. Таким образом, показано, что штаммы для сезонной живой гриппозной вакцины способны адаптироваться к культуре клеток MDCK без утраты основных биологических свойств вакцинных штаммов.

3.4. Исследование экспериментальных серий моновалентных ЖГВ, произведенных на культуре клеток MDCK

Технология производства культуральной ЖГВ была ранее разработана в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск), при этом в качестве исходного сырья используются реассортантные вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные классическим методом реассортации в РКЭ. Компания зарегистрировала систему для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток млекопитающих и успешно произвела

экспериментальную серию клеточных моновакцин против сезонных вирусов гриппа в 2015 году, а затем было получено разрешение Министерства Здравоохранения РФ на клинические испытания фазы I данного препарата [21], [134]. Однако, не было проведено исследования, отвечающего на вопрос, как повлиял процесс производства на свойства культуральной ЖГВ. Сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» нам были любезно предоставлены серии сезонных моновакцин для изучения возможных адаптационных мутаций в поверхностных антигенах вакцинных штаммов и их влияния на свойства вакцины. Результаты секвенирования полученных моновакцин представлены в таблице 13.

Таблица 13. Аминокислотные замены в поверхностных антигенах экспериментальных клеточных моновалентных живых гриппозных вакцин.

Вакцина	Ген	Белок	Аминокислота	Исходный вакцинный штамм	Вакцинный штамм после производствен- ных пассажей
A/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm09)	HA	HA2	116	Lys	Glu
	NA	NA	Мутаций не обнаружено		
A/17/Швейцария/2013/1 (H3N2)	HA	HA1	219	Ser	Tyr
			246	Asn	Lys
	NA	NA	Мутаций не обнаружено		
B/60/Пхукет/2013/26	HA	HA	Мутаций не обнаружено		
	NA	NA	Мутаций не обнаружено		

Из таблицы 13 видно, что адаптационные мутации появились только в молекулах гемагглютиниона вакцинных штаммов вирусов гриппа подтипов H1N1pdm09 и H3N2. В молекуле нейраминидазы мутаций обнаружено не было, что говорит о том, что этот белок менее подвержен антигенному дрейфу и, в частности, MDCK-адаптационным мутациям. На рисунке 27 показаны трехмерные структуры молекул гемагглютиниона вирусов гриппа A/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm) и A/17/Швейцария/2013/1 (H3N2), также на молекулах отмечены аминокислотные позиции адаптационных мутаций, описанных в главах 3.3.3. и 3.3.4.

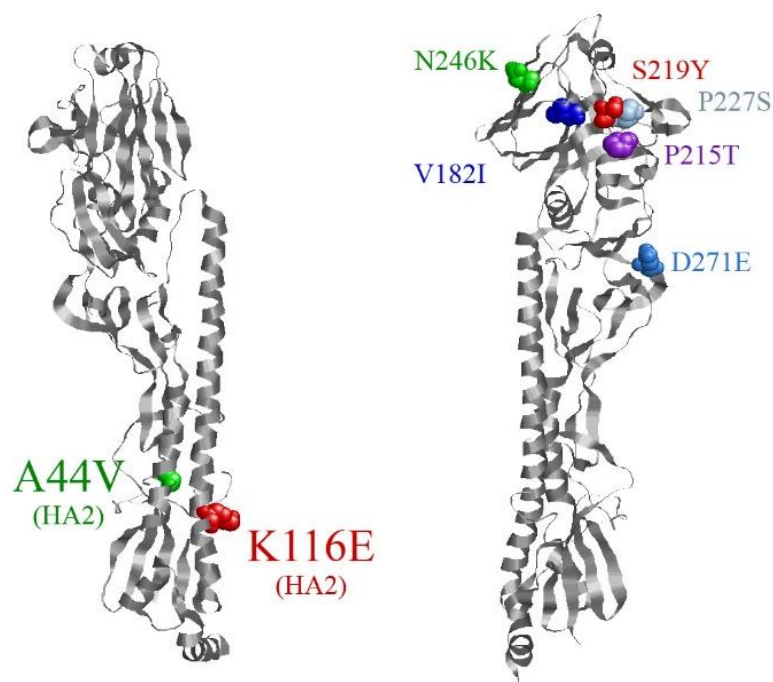


Рисунок 27. Трехмерная структура молекул гемагглютинирина вируса гриппа подтипов H1N1pdm (слева) и H3N2 (справа), отмечены адаптационные мутации, обнаруженные при адаптации штаммов ЖГВ в лабораторном и производственном масштабах.

Сравнение стерического расположения клеточно-адаптационных мутаций выявило их схожесть среди каждого подтипа. Так, в подтипе H1N1 аминокислотные замены A44V (Калиф17-4) и K116E (Боливия17) находятся в непосредственной близости друг от друга в субъединице HA2 в ножке молекулы гемагглютинирина, а большинство обнаруженных адаптационных замен штаммов A(H3N2) – в глобулярной части молекулы. Таким образом можно отметить, что при адаптации вакцинных штаммов ЖГВ к культуре клеток MDCK существует закономерность внутри подтипа вируса гриппа, выражающаяся в схожем стерическом расположении адаптационных мутаций при их адаптации в лабораторных условиях и при наработке в производственных масштабах.

Моновалентные вакцины ЖГВ против вируса гриппа типа А в дополнение ко всему были клонированы на монослое MDCK методом бляшкообразования, а у полученных клонов был секвенирован ген гемагглютинирина для поиска адаптационных мутаций в минорных популяциях культуральной ЖГВ. В результате в подтипе H1N1 дополнительных аминокислотных замен обнаружено не было, в то время как в подтипе H3N2 удалось выделить клон Switz17-4, несущий дополнительную адаптационную мутацию L135I в субъединице HA2. При исследовании репродукции вакцинных штаммов клеточной ЖГВ различий в инфекционной активности в культуре клеток MDCK выявлено не было.

(Рисунок 28). Также для обоих вирусов были проведены исследования кросс-реактивности, которые также не показали антигенных различий между штаммами (Таблица 14).

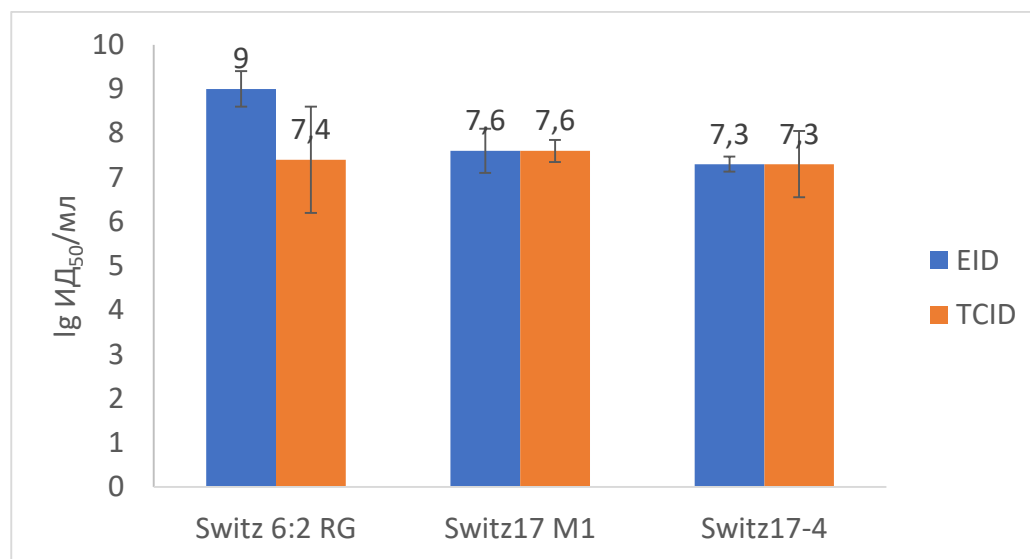


Рисунок 28. Репродукция штаммов моновалентной экспериментальной клеточной ЖГВ

Таблица 14. Значения титров антител в РТГА к исследуемым вакцинным штаммам и дикому штамму вируса гриппа А/Швейцария/1/2013 (H3N2).

		Антитела в гипериммунной сыворотке		
		Швейцария17	Швейцария17-4	Швейцария-wt
Антиген	Швейцария17	1280	640	1280
	Швейцария17-4	1280	640	1280
	Швейцария-wt	1280	640	1280

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из всех вышесказанного можно заключить, что локализация мутаций, обнаруженных в производственных сериях культуральной ЖГВ, схожа с локализацией мутаций, описанных в пункте 3.3, что свидетельствует об адекватности нашей модели адаптации вакцинных штаммов к культуре клеток MDCK. Также мутации, полученные в ходе производственного процесса, не влияют на репродукцию вакцинных штаммов в тканевой культуре, а вакцинные штаммы, полученные классическим путем на развивающихся куриных эмбрионах, могут выращиваться на культуре клеток MDCK в производственных масштабах с сохранением их основных биологических характеристик.

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ

В последние десятилетия активно обсуждается вопрос о переводе производства гриппозных вакцин с развивающихся куриных эмбрионов на перевиваемые клеточные линии, что позволит в короткие сроки нарабатывать большие объемы вирусной биомассы, а также сузит список противопоказаний, в частности, позволив применять вакцину лицам, страдающим аллергией на куриный белок. Кроме того, если пандемия гриппа будет вызвана высокопатогенным вирусом гриппа птиц, высока вероятность того, что поголовье кур на птицефабриках будет полностью уничтожено, поэтому независимость вакцинного производства от поставки яиц с птицефабрик также крайне важна. Соответственно, было необходимо провести всестороннюю характеристику вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных либо методом классической реассортации в РКЭ, либо методами обратной генетики, после их накопления в культуре клеток млекопитающих, для обоснования сохранности их основных биологических свойств. Наиболее интересными в данном случае являются адаптационные изменения в поверхностных гликопротеингликозах – гемагглютанине (НА) и нейраминидазе (НА), поскольку они являются основными антигенами вируса гриппа, на которые вырабатывается гуморальный иммунный ответ. Кроме того, они взаимодействуют с рецепторами на поверхности клеток-мишеней и, соответственно, могут влиять на ростовые характеристики, рецепторную специфичность, иммуногенность и антигенность вакцинных штаммов.

Известно, что пандемии гриппа могут возникать вследствие адаптации вирусов гриппа птиц к клеткам млекопитающих. Например, причиной возникновения пандемии «азиатского» гриппа А(Н2N2) в 1957 году явилась адаптация молекулы гемагглютинина вируса гриппа птиц к рецептору человеческого типа $\alpha 2,6$, что послужило возможностью для преодоления межвидового барьера. Вирусы гриппа А(Н2N2) циркулировали в человеческой популяции с 1957 по 1968 гг., после чего они были вытеснены вирусами А(Н3N2), вызвавшими пандемию «гонконгского» гриппа [203]. Поскольку вирусы А(Н2N2) не инфицируют людей уже более 50 лет, можно говорить о чрезвычайно низком уровне популяционного иммунитета к данным вирусам, и люди, рожденные после 1968 года, являются наиболее уязвимой группой в случае возвращения вирусов подтипа Н2N2 в циркуляцию [204]. Учитывая сохранность вирусов гриппа с гемагглютинином Н2 в природном резервуаре [12], [205], [206], вероятность наступления новой пандемии гриппа А(Н2N2) оценивается как высокая [207]. В этой связи исследования, направленные на разработку и детальное изучение потенциально пандемических вакцин против вирусов данного подтипа, являются чрезвычайно важными и актуальными.

Ранее в Отделе вирусологии им. А.А.Смординцева ФГБНУ «ИЭМ» была разработана и изучена в доклинических и клинических исследованиях живая гриппозная вакцина против вируса подтипа H2N2, циркулировавшего в конце пандемической волны – А/Калифорния/1/66 (H2N2) [208], [114], и данная вакцина может быть использована для иммунизации наиболее уязвимых групп населения в случае возвращения в циркуляцию антигенно схожих вирусов А(H2N2). Однако результаты мониторинга за вирусами гриппа птиц показывают, что большинство изолятов подтипа H2N2 остаются антигенно сходными с пандемическим вирусом А/Сингапур/1/57 и сохраняют предпочтение к сиаловым рецепторам птичьего типа $\alpha 2,3$ [207]. И при этом детальные исследования влияния рецепторной специфичности вирусов на их трасмиссивность в экспериментах на хорьках показали, что при переключении рецепторной специфичности с $\alpha 2,3$ на $\alpha 2,6$ тип существенно повышается способность вируса передаваться воздушно-капельным путем, что может сыграть решающую роль в пандемическом распространении вирусов А(H2N2) [10]. Тем не менее, в литературе отсутствуют четкие данные о том, какие именно вирусы лучше использовать для подготовки вакцин в начале пандемии, вызванной вирусами гриппа птиц и обладающих сродством к обоим типам клеточных рецепторов.

В настоящей работе был проведен модельный эксперимент с пандемическими вариантами вируса А/Сингапур/1/57, социркулировавшими в 1957 г. и отличающимися рецепторной специфичностью молекулы НА, которая определялась тремя аминокислотными отличиями в субъединице НА1: E156, Q226, G228 у варианта Sing- $\alpha 2,3$ и K156, L226, S228 у варианта Sing- $\alpha 2,6$. Поскольку пандемические вакцины целесообразно производить на перевиваемых клеточных линиях для повышения качества продукта и возможности ускоренного масштабирования производства [209], [210], было проведено серийное пассирование как исходных пандемических вирусов Sing- $\alpha 2,3$ и Sing- $\alpha 2,6$, так и реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на их основе, в культуре клеток MDCK с последующей идентификацией новых замен в молекуле НА. Интересно, что адаптационные мутации возникали только при пассировании в клетках пандемических вирусов, но не вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных методами обратной генетики. Это может быть связано с тем, что пандемические варианты представляли собой гетерогенную популяцию вирусов с неизвестной пассажной историей, тогда как вакцинные вирусы прошли только два пассажа в РКЭ после сборки из плазмид и представляли собой более гомогенную популяцию. Важно отметить, что обнаруженные нами мутации не повлияли на рецепторную специфичность вирусов, но оказывали влияние на их антигенность. В частности, мутация P221S в субъединице НА1 носила характер escape-

мутации, поскольку позволяла избегать распознавание антителами в сыворотках животных, иммунизированных всеми исследованными вариантами A/Сингапур/1/57. Интересно, что аналогичная мутация была описана для вирусов гриппа птиц подтипа H9N2, при этом она снижала сродство вируса к аналогу птичьего рецептора $\alpha 2,3$, но в комбинации с мутацией L226Q сродство к данному типу рецептора восстанавливалось, что полностью совпадает с нашими результатами [211]. Кроме того, мутация P221S обнаруживалась у вируса A/Wyoming/3/2003 (H3N2) при его серийном пассировании в клетках MDCK, что также подтверждает адаптационный характер данной замены [212].

Наиболее важным результатом исследования является демонстрация более широкой кросс-реактивности антител, вырабатываемых при интраназальной иммунизации животных вирусами A(H2N2) с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$. Причем это было показано как для пандемических вирусов A/Сингапур/1/57, так и для вакцинных реассортантных штаммов ЖГВ, полученных методами обратной генетики. Тут важно отметить, что вакцинный штамм ЖГВ 17/Sing- $\alpha 2,3$ подходит для производства на культуре клеток, поскольку достигает высокого инфекционного титра в культуре клеток MDCK, а гомогенная природа штамма за счет его подготовки генно-инженерными методами обеспечит генетическую стабильность вакцины при серийных пассажах на клетках MDCK, что говорит в пользу массовой наработки вакцины на данном субстрате в первую волну пандемии. Такой выбор штамма для производства пандемической клеточной ЖГВ позволит набирать большие объемы вакцины в культуре клеток MDCK, а также обеспечит высокую эффективность препарата благодаря полноценному антигенному охвату циркулирующих вирусов гриппа в начале пандемической волны – т.е. при одновременной циркуляции вирусов с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ и $\alpha 2,6$.

Несмотря на то, что выдвинутая нами гипотеза нашла экспериментальное подтверждение на различных животных моделях, для потенциального широкого применения штамма ЖГВ 17/Sing- $\alpha 2,3$ среди людей требуется изучение его иммуногенности и кросс-реактивности в клинических испытаниях. Одним из препятствий к использованию штамма ЖГВ 17/Sing- $\alpha 2,3$ в клинической практике может служить потенциально сниженная репликативная активность вируса в верхних дыхательных путях людей, поскольку у людей рецепторы типа $\alpha 2,3$ слабо представлены в ВДП и преимущественно экспрессируются в нижних отделах респираторного тракта [213], где вакцинный вирус не размножается в силу своего температурочувствительного фенотипа, что может привести к низкой иммуногенности ЖГВ. Однако опыт иммунизации людей ЖГВ против птичьего гриппа H5N1, возбудитель которого также имеет рецепторную

специфичность $\alpha 2,3$, показал, что даже в отсутствии репликации в ВДП и при низких уровнях сывороточных антител к вирусу после интраназальной иммунизации, ЖГВ формирует долгоживущий иммунный ответ, который может быть демаскирован путем введения инактивированной гриппозной вакцины несколько месяцев и даже лет спустя [214], [215], [216]. Соответственно, стратегия гетерологичной прайм-буст иммунизации в начале пандемии гриппа A(H2N2) также может рассматриваться как наиболее перспективная для формирования мощного долгоживущего гуморального иммунитета с широким спектром защиты.

Как упоминалось ранее, адаптация вируса к новому кругу хозяев неизбежно ведет за собой появление адаптационных мутаций, которые могут приводить к изменению свойств исходного вируса. При этом адаптационные мутации могут носить драматический характер, как, например, произошло при адаптации вирусов гриппа от клеток птичьего происхождения к клеткам млекопитающих, что привело к пандемиям гриппа A(H2N2) (1957) и A(H3N2) (1968) [10], [217], [218], [219]. Субстрат для наработки биомассы для получения гриппозной вакцины, как живой, так и инактивированной, также может оказывать влияние на ее свойства. Данные секвенирования, полученные после адаптации вакцинных штаммов ЖГВ 17/Sing- $\alpha 2,3$ и 17/Sing- $\alpha 2,6$ к культуре клеток MDCK, говорят о том, что оба вируса не приобрели адаптационных мутаций в течение 5 пассажей на культуре клеток MDCK и оказались генетически идентичными соответствующему исходному штамму ЖГВ. Можно предположить, что стабильность генома штаммов подтипа H2N2 связана с их обратно-генетическим происхождением, т.е. исходные штаммы хорошо размножаются в культуре клеток MDCK, и отсутствие изначальных минорных популяций снижает скорость антигенного дрейфа. Интересно, что результаты адаптации обратно-генетического штамма ЖГВ к культуре клеток MDCK повторились с подтипом H5N1. Так, вакцинный штамм A44/Вьетнам/1203/2004 (H5N1)-rg, полученный на основе высокопатогенного вируса гриппа A/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) с помощью методов обратной генетики, также, как и штаммы ЖГВ подтипа H2N2, был генетически стабилен, и аминокислотных замен в поверхностных белках после его адаптации к клеткам MDCK обнаружено не было. Таким образом, обратно-генетические штаммы демонстрируют генетическую стабильность и отсутствие адаптационных изменений в течение пяти пассажей на культуре клеток MDCK, необходимых для получения клеточной гриппозной вакцины в производственном масштабе.

Следует отметить, что из-за патентных ограничений подготовка штаммов для отечественной ЖГВ в настоящее время возможна только с использованием метода

классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах, при этом известны случаи появления РКЭ-адаптационных мутаций, которые влияли на антигенность вакцинного штамма, что приводило к снижению эффективности вакцины при ее массовом применении [218], [220], [221], [222]. Одно из общепризнанных преимуществ культуральной гриппозной вакцины является возможность ее производства в условиях пандемии высокопатогенного птичьего гриппа, когда поставки сертифицированных развивающихся куриных эмбрионов могут быть нестабильны или под угрозой срыва – в коммерческих хозяйствах приходится уничтожать миллионы домашней птицы, как, например, во время вспышки высокопатогенного птичьего гриппа в 2014-2015 годах пришлось уничтожить 48 миллионов голов кур и индеек [223]; [224]. В настоящее время ряд подтипов вируса гриппа А признаны потенциально пандемическими, однако, на протяжении последних двух десятилетий наиболее опасными считаются подтипы H5N1 и H7N9 [225]; [13]. По данным ВОЗ в период с января 2003 по 12 декабря 2024 года в мире зарегистрировано 954 случая заражения людей гриппом А(H5N1), из которых было зафиксировано 454 смертельных исхода [226]. Ряд исследований по адаптации к хорькам вирусов гриппа А(H5N1) показали возможность постепенной смены рецепторной специфичности таких вирусов с птичьего рецептора на человеческий, либо увеличения сродства к человеческому типу рецепторов $\alpha 2,6$, однако в природе до сих пор таких изменений не произошло [148], [147], [144], [146].

Предложенная стратегия ВОЗ для борьбы с вероятной пандемией птичьих вирусов гриппа заключается в подготовке вакцинных штаммов против наиболее вероятных возбудителей будущей пандемии. Так, в Китае была разработана культуральная цельновиральная инактивированная вакцина против гриппа А(H5N1) и успешно прошла доклинические испытания [227]. В отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» был получен вакцинный штамм для живой гриппозной вакцины на основе штамма NIBRG-23 для инактивированной гриппозной вакцины, гемагглютинин и нейраминидаза которого соответствовали дикому вирусу гриппа А/индюк/Турция/1/2005 (H5N1): методом классической реассортации был получен штамм ЖГВ А/17/индюк/Турция/2005/133 (H5N2) с вакцинной формулой генома 7:1, поскольку ген нейраминидазы N1 не наследовался с гемагглютинином H5, при этом геном вакцинного штамма был стабилен и не приобрел РКЭ-адаптационных мутаций [228], [202]. При адаптации штамма Тур17 к культуре клеток MDCK во всех выделенных клонах данного вируса был обнаружен одинаковый набор мутаций R145K в HA1 и R68K в HA2. Те же мутации были идентифицированы в двух изолятах (B1) от волонтеров из фазы I клинических испытаний вакцинного штамма ЖГВ, а

также был обнаружен изолят (A5) с дополнительной мутацией E147K в HA2 [229]; [115]. Поскольку известно, что аргинин и лизин являются структурно похожими аминокислотами, то предполагалось, что данные замены не должны иметь значительного влияния на свойства вакцинного штамма. Это было подтверждено в исследованиях антигенности и иммуногенности MDCK-адаптированного варианта Тур17-1: иммуногенность и антигенность сохранялись на уровне исходного штамма Тур17. Также в клинических испытаниях не было выявлено отличий в иммунных ответах волонтеров, у которых были выделены данные мутации [115]. Хотя замена глутаминовой кислоты на лизин (E147K в HA2) считается значительным явлением, эта мутация находится в стеблевом домене HA и не должна влиять на антигенные и иммуногенные свойства вакцины [228].

Вакцинный штамм Тур17 был использован для производства культуральной ЖГВ на культуре клеток MDCK в Сывороточном Институте Индии (Индия, Пуна), где также были проведены доклинические исследования иммуногенности и защитной эффективности данной вакцины на хорьках, причем как варианта, полученного в РКЭ, так и культурального [230]. Результаты экспериментов на хорьках показали высокий уровень иммуногенности и защиты для штамма культуральной ЖГВ Тур17 в одно- и двукратной иммунизации, а также высокий уровень защиты в отношении гетерологичного штамма A/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) [230]. Интересно отметить, что в эксперименте по протективной активности при челлендже гомологичным вирусом A/индюк/Турция/1/2005 (H5N1) в группах животных, иммунизированных культуральной ЖГВ, не было обнаружено живого вируса, тогда как в группе, иммунизированной вариантом ЖГВ, накопленным в РКЭ, его детектировали на 3й день после заражения [230], что также свидетельствует в пользу ЖГВ, произведенной на культуре клеток MDCK.

Заражение человека вирусами гриппа подтипа H7N9 впервые было зафиксировано в марте 2013 года, и за это время было лабораторно подтверждено 1 568 случаев заражения людей, включая 616 смертельных, таким образом официальная статистика смертности от гриппа A(H7N9) составляет 39%, а последний известный случай инфицирования произошел в 2019 году [231]. Несмотря на это, пандемический потенциал вируса гриппа A(H7N9) считается высоким, поскольку рецепторная специфичность штаммов начала меняться в естественных условиях циркуляции вируса – штаммы, выделенные в начале волны 2013 года, имели различия в рецепторной специфичности: штамм A/Шанхай/1/2013 (H7N9) имел остаток глутамина в позиции 226 HA1 и характеризовался сродством к рецепторам птичьего типа $\alpha 2,3$, а штамм A/Ануи/1/2013 (H7N9) имел лейцин в позиции 226 HA1 и обладал сродством к человеческим рецепторам $\alpha 2,6$ [13]. Ситуация, когда происходит

социркуляция штаммов с различной рецепторной специфичностью в начале пандемической волны, крайне схожа с началом пандемии 1957 года, когда некоторое время социркулировали штаммы Sing- α 2,3 и Sing- α 2,6. Однако, благодаря противоэпидемическим мерам китайского правительства и тому факту, что вирус не приобрел полное сродство к человеческому рецептору α 2,6, в том числе, за счет отсутствия замены G228S в HA1, пандемии гриппа A(H7N9) удалось избежать. Однако, такая вероятность существовала, и эксперименты по изучению трансмиссивности данных вирусов продолжались, где было показано, что на модели хорьков штамм A/Ануи/1/2013 способен передаваться воздушно-капельным путем, в отличие от штамма A/Шанхай/1/2013, что значительно увеличило предпосылки к началу пандемии [153]. Для подготовки к пандемии гриппа A(H7N9) ВОЗ рекомендовала готовить вакцинные штаммы для ИГВ и ЖГВ на основе штамма A/Ануи/1/2013. Соответственно, в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» в июне 2013 года методом классической реассортации был получен штамм для живой гриппозной вакцины Ануи17, после чего была проведена серия доклинических исследований, а в 2014 году и фаза I клинических испытаний [113]. В ходе этих испытаний было показано, что ЖГВ безопасна и высокоиммуногенна, при этом вакцинный штамм активно выделялся у волонтеров в первые дни после иммунизации, и при этом у двух волонтеров была обнаружена мутация L68F в HA2 на 2й и 3й дни после иммунизации [113]. Следует отметить, что мутации, идентифицированные при адаптации штамма Ануи17 к культуре клеток MDCK, также были немногочисленны: обнаружены всего в двух вариантах из 24, вариант Ануи17-3 имел мутации в S278N субъединице HA1 и F69L в субъединице HA2, у варианта же Ануи17-5 была обнаружена только одна мутация N285K в субъединице HA1. Как видно, MDCK-адаптационная мутация F69L и мутация, обнаруженная в клинических испытаниях, L68F в HA2 находятся на соседних позициях, что может свидетельствовать о схожем характере адаптации вируса A(H7N9) к эпителиальным клеткам человека и перевиваемой линии клеток MDCK.

Вакцинный штамм Ануи17, как и штамм Тур17, был использован для производства культуральной ЖГВ на клетках MDCK в Сывороточном Институте Индии (Индия, Пуна), где также были проведены сравнительные доклинические исследования иммуногенности и защитной эффективности полученного и культурального вариантов данной вакцины на хорьках [230]. В результате экспериментов было определено, что в группе культуральной ЖГВ с однократной иммунизацией у одного из шести животных на первый и второй дни после челленджа обнаруживался живой вирус, при этом методом ПЦР-РВ было определено наличие вирусной РНК у четырех из шести животных, тогда как в группе с

двукратной иммунизацией культуральной ЖГВ живого вируса не обнаруживалось ни в один из дней после заражения, а вирусная РНК методом ПЦР-РВ была обнаружена всего у двух животных из шести. В группе, однократно иммунизированной вариантом вакцины, накопленной в РКЭ, живого вируса обнаружено не было, при этом вирусную РНК методом ПЦР-РВ удалось детектировать у 100% животных из группы. Следует отметить, что авторы не исследовали культуральные накопленные в РКЭ ЖГВ на предмет появления адаптационных мутаций в молекулах гемагглютинаина [230].

Поскольку штаммы подтипа H3N2 являются наиболее изменчивыми и больше остальных подвержены антигенному дрейфу, это обстоятельство необходимо учитывать при наработке вакцинных вирусов в различных субстратах культивирования [218]. Так, с 2013 по 2018 годы был обнаружен ряд мутаций, критически повлиявших на антигенность циркулирующих вирусов: замены F159Y и K160T в антигенном сайте В, вместе с остатком N в сайте 158, способствуют приобретению дополнительного сайта гликозилирования, что активно помогало вирусу ускользать от иммунного ответа [232], [233], [179]. Затем в процессе эволюции произошла характерная аминокислотная замена N171K, расположенная на антигенном сайте D молекулы гемагглютинаина, а также замены D122N и T135K в антигенном сайте А, каждая из которых вызывает потерю N-связанных сайтов гликозилирования [234]. Следующий сезон выявил наличие замены S144K в молекуле HA1, которая находится в антигенном сайте, фланкирующем рецептор-связывающий сайт. Два кластера вируса гриппа А(H3N2) показали, что антигенно важны и замены I58V и S219Y, а также – замены I22D и S262N, которые также приводят к потере сайта гликозилирования [218]. Интересно отметить, что в настоящем исследовании при адаптации к культуре клеток MDCK были обнаружены мутации, тоже, вероятно, находящиеся в антигенных сайтах – V176I, P215T, P221S и S219Y, однако, было показано, что они не влияют на антигенность вакцинного штамма (таблица 6), но влияют его способность к росту в клетках млекопитающих.

В исследованиях инфекционной активности и стабильности высокоурожайных штаммов вируса гриппа для ИГВ было продемонстрировано, что культивирование вирусов гриппа А(H1N1) и А(H3N2) в культуре клеток Vero или MDCK в подкисленных условиях сохраняет стабильность вируса, что успешно использовалось при производстве ИГВ против птичьего гриппа А(H5N1). Пассирование вирусов в культуре клеток Vero без дополнительных условий способствовало появлению в молекуле HA2 адаптационных мутаций N50K (H1N1) и D160E (H3N2), которые улучшали рост вируса в культуре клеток, но при этом отрицательно сказывались на стабильности антигена [178]. Вирусы А(H3N2),

накопленные в РКЭ, запускают конформационные изменения в молекуле НА в менее кислых условиях, чем их антигенно схожие первичные изоляты, и этот фенотип связывали с наличием аминокислотных замен A138S, L194P в НА1 и D160N в НА2, пониженной устойчивостью к кислым условиям и повышенной температуре [178]. Вероятно, отличие уровней pH при размножении в куриных эмбрионах и культуре клеток обусловило появление мутаций в районе пептида слияния в НА2 у MDCK-адаптированных вариантов вакцинных штаммов A(H3N2) Tex17-8, Tex17-16, Tex17-17 и A(H1N1) Калиф17-8.

Интересно, что пять мутаций в молекуле гемагглютиниона обнаружались только в молекуле НА1, в частности, четыре из них (A138S, G218R, P221L и V223I) находятся вблизи рецептор-связывающего сайта [39]. Мутация N165K локализовалась в антигенном сайте НА [39]. Замена A138S может возникать *in vivo* у пациентов с ослабленным иммунитетом, в также *in vitro* в культуре клеток MDCK, и было обнаружено, что она вызывает полную потерю связывания $\alpha 2,3$ типа рецептора [185]. Мутация в позиции 218 в молекуле НА1, которая находится вблизи рецептор-связывающего сайта, была также ассоциирована со снижением аффинности к человеческому рецептору и с повышенной патогенностью на модели мышей [187], [188]. Аминокислотная замена L194P в НА1, превалирующая в РКЭ-адаптированных (пассированных в куриных эмбрионах 4-5 раз) вариантах вирусов подтипа H3N2, на три порядка снижает связывание и нейтрализацию антителами широкого спектра действия, распознающими рецептор-связывающий сайт, а также значительно меняет антигенность молекулы гемагглютиниона [8]. Несмотря на то, что часть обнаруженных в нашем исследовании адаптационных мутаций находится в значимых местах молекулы гемагглютиниона, таких как рецептор-связывающий сайт или антигенные сайты, описанные мутации не влияют на ключевые для вакцинного штамма ЖГВ показатели – не меняется антигенность MDCK-адаптированного штамма, его иммуногенность, но при этом увеличивается репликативная активность вакцинного вируса в культуре клеток, т.е. приобретает полезное свойство в контексте производства культуральной ЖГВ.

Штамм вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1pdm09) генетически очень похож на штамм А/Калифорния/4/2009 (H1N1pdm09), но был выделен в системе РКЭ и при пассировании получил адаптационную мутацию Q226R, а после адаптации к мышам добавилось еще две мутации N159D и K212M. При этом вирус с мутацией Q226R в НА1 потерял сродство к рецепторам человеческого типа и приобрел сродство к птичьим рецепторам [168]. В обоих вирусах мутации, находящиеся непосредственно в рецептор-связывающем сайте, ожидаемо повлияли на рецепторную специфичность вируса, нарушив при этом баланс НА-НА, что повлекло за собой снижение репродуктивной активности

вируса в культуре клеток MDCK-SIAT-1. Появившиеся еще через несколько пассажей в мышцах мутации в молекуле НА стали компенсаторными по поверхностному заряду молекулы и при этом внесли существенный вклад в усиление патогенности исследуемых вирусов. Интересно, что данные по вкладу мутаций D225E и Q226R в НА в вирулентность пандемического вируса гриппа A(H1N1pdm09) на мышцах были также получены и корейскими учеными [169]. Также в других исследованиях мутацию N159D ассоциируют с escape-мутациями, которые позволяют вирусу ускользать от иммунного ответа [235].

При подготовке вакцинного штамма X-181 A(H1N1pdm09) в куриных эмбрионах были обнаружены мутации N133D, K212T и Q226R в молекуле НА1, которые привели к сильному изменению кросс-реактивности вакцинного штамма, в результате которого антитела, индуцированные вакцинным штаммом, связывались с диким типом вируса, но не нейтрализовали его [84]. Эволюционные исследования молекулы гемагглютинина Н1 показали важное значение аминокислот в позициях 156, 190 и 225 для адаптации к человеческим рецепторам и антигенному дрейфу циркулирующих вирусов A(H1N1pdm09) [236]. Сравнение культуральных и штаммов, накопленных в РКЭ, для инактивированной вакцины X-181 (Калифорния H1N1), X-187 (Виктория H3N2) и B/Brisbane/60/2008, мутация была обнаружена только в гемагглютинине штамма В – N212S [237].

Сравнение штаммов A(H1N1pdm09) А/Калифорния/9/2007 и А/Брисбен/10/2010 показало наличие мутации E47K в молекуле НА2, которая влияла на стабильность тримера гемагглютинина, снижала пороговое значение рН слияния мембран с 5,4 до 5,0, а также было установлено, что это происходит из-за наличия межмономерного солевого мостика между аминокислотами K47 в НА2 и E21 в НА1 [176]. Кроме того, замена E47K повысила термостабильность вируса и его вирулентность у хорьков, что указывает на преимущество вируса с K47 в НА2 при адаптации к эволюционным изменениям у людей [177]. Мутация V66H в НА2 в месте контакта двух субъединиц молекулы гемагглютинина вируса гриппа A/WSN/33 (H1N1) влияет на максимум рН слияния в сторону более низких значений (с 5,6 до 5,1) и при этом снижалась способность к репликации вируса в клетках MDCK, но сопровождалось более долгим клиренсом вируса в мышцах [238]. Можно заметить, что адаптационные мутации, обнаруженные к данному исследованию (A44V в Калиф17-8 и K116E в Боливия17-М) имеют сходную локацию с уже описанными мутациями K47 в НА2 и E21 в НА1. Вероятно, они могут оказывать влияние на пороговое значение рН при слиянии мембран, что является ожидаемым результатом адаптации вирусов к новому субстрату.

Исходя из полученных данных, адаптация вакцинного вируса гриппа А(Н3N2) к культуре клеток MDCK привела к возникновению множественных аминокислотных замен в гемагглютанине. Было показано, мутации N154K и Y85E, обнаруженные в субъединице HA2 молекулы гемагглютинаина вакцинного штамма, являются критическими для размножения вируса в культуре клеток. Кроме того, адаптационные мутации W92G, D160N в HA2 увеличивают репликацию вакцинного вируса в культуре клеток MDCK по сравнению с репликацией в развивающихся куриных эмбрионах.

Сравнение стерического расположения адаптационных мутаций между штаммами, адаптированными к клеткам MDCK в лабораторных и производственных условиях, выявило схожесть этих позиций. Так, в молекуле гемагглютинаина подтипа H1N1 аминокислотные замены A44V (Калиф17-4) и K116E (Боливия17) находятся в непосредственной близости друг от друга в субъединице HA2 в ножке гемагглютинаина, а большинство обнаруженных адаптационных замен у штаммов А(Н3N2) – в глобулярном домене молекулы HA1 (Рисунок 27). Таким образом можно отметить, что адаптация вакцинных штаммов ЖГВ к культуре клеток MDCK в условиях лаборатории и в производственном масштабе приводит к появлению схожих адаптационных замен у штаммов одного подтипа, при этом вирусы гриппа типа В являются максимально стабильными, а вирусы А/Н1N1 приобретают адаптационные замены, необходимые для усиленной репликации вируса в данном субстрате. Штаммы А/Н3N2 являются наименее стабильными, а адаптационные мутации могут захватывать и рецептор-связывающие области, что указывает на необходимость тщательного отслеживания антигенных свойств штаммов данного подтипа при их производстве на клеточном субстрате.

Исходя из полученных данных, можно утверждать, что в условиях патентных ограничений вакцинные штаммы ЖГВ, полученные путем классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах могут успешно использоваться для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток MDCK с сохранением репликативной активности, антигенности, иммуногенности и защитной эффективности. Также следует отметить, что при получении штаммов ЖГВ генно-инженерными методами, появится возможность использовать эпидемические вирусы, рекомендованные для получения культуральной вакцины, а генетическая стабильность вакцинных штаммов, полученных методами обратной генетики, даст дополнительное преимущество культуральной ЖГВ.

ВЫВОДЫ

(1) Адаптация к клеткам MDCK пандемических вирусов гриппа A(H2N2), различающихся рецепторной специфичностью молекулы гемагглютинаина, а также вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на их основе, не приводит к изменению рецепторной специфичности вирусов.

(2) Вирусы гриппа A(H2N2) с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ индуцируют антитела с более широким антигенным охватом по сравнению с вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$, что необходимо учитывать при выборе штамма для получения вакцины в случае наступления новой пандемии гриппа A(H2N2).

(3) Адаптация вакцинных реассортантных штаммов сезонной и пандемической живой гриппозной вакцины, подготовленных классическим скрещиванием на куриных эмбрионах, приводит к появлению адаптационных мутаций, которые не оказывают негативного влияния на основные биологические свойства вакцинных штаммов.

(4) Вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины, подготовленные методами обратной генетики, характеризуются высоким уровнем генетической стабильности при их серийном пассировании в культуре клеток MDCK.

(5) Адаптационные мутации в молекуле гемагглютинаина, обнаруживаемые при пассировании вакцинных штаммов ЖГВ в лабораторных условиях, имеют сходное расположение с аминокислотными заменами, возникающими в процессе промышленной наработки культуральной вакцины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Боливия17	Вакцинный штамм ЖГВ А/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm)
БСА	Бычий сывороточный альбумин
ВДП	Верхние дыхательные пути
ГА	Гемагглютинация
ДМЕМ	Модифицированная среда Дульбекко для роста клеточных культур (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДФСБ	Фосфатно-солевой буфер, модифицированный Дульбекко
ЖГВ	живая гриппозная вакцины
ИГВ	инактивированная гриппозная вакцина
ИД ₅₀	50%-ная инфекционная доза
ИФА	Иммуноферментный анализ
ИФН-γ	Интерферон-гамма
ИЭМ	Институт Экспериментальной Медицины
Калиф-17	Вакцинный штамм ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09)
Калиф-wt	Эпидемический штамм вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09)
кДНК	комплементарная ДНК
кЖГВ	культуральная живая гриппозная вакцина
кИГВ	культуральная инактивированная гриппозная вакцина
КЭ	куриные эритроциты
Лен17	Холодоадаптированный донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)
ЛЭ	Лошадиные эритроциты
мРНК	матричная РНК
НАЛТ	Назо-ассоциированную лимфоидную ткань
НИЦ	Научно-исследовательский Центр
НКЭ	Необработанные куриные эритроциты
НПО	Научно-производственное объединение
ОКЭ	Обработанные куриные эритроциты
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени

РАН	Российская Академия Наук
РГА	Реакция гемагглютинации
РИНА	Реакция ингибирования нейраминидазной активности
РКЭ	Развивающиеся куриные эмбрионы
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РСС	Рецептор-связывающий сайт
РТГА	Реакция торможения гемагглютинации
СГТ	Средне-геометрический титр
Tex17	Вакцинный штамм ЖГВ А/17/Техас/2012/30 (H3N2)
Tex-wt	Эпидемический штамм вируса гриппа А/Техас/50/2012 (H3N2)
ТМД	Трансмембранный домен
Тур17	Вакцинный штамм ЖГВ А/17/индюк/Турция/2005/133 (H5N2)
ТЦИД ₅₀	50% тканевая цитопатическая инфекционная доза
ФБС	Фетальная бычья сыворотка
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
ЦД	Цитоплазматический домен
ЦПД	Цитопатическое действие
Швейцария17	Вакцинный штамм ЖГВ А/17/Швейцария/2013/1 (H3N2)
Швейцария-wt	Эпидемический штамм вируса гриппа А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2)
ЭД	Эктодомен
ЭИД ₅₀	50% эмбриональная инфекционная доза
MDCK	культура клеток почки собаки Мадин-Дарби
MDCK-SIAT-1	культуре клеток MDCK, несущая кДНК человеческой 2,6-сиалтрансферазы

Список литературы

1. Bardiya N., Bae. Influenza vaccines: recent advances in production technologies // *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 67, No. 3, 2005. pp. 299-305.
2. Rudenko L.G., Slepushkin A.N., Monto A.S., Kendal A.P., Grigorieva E.P., Burtseva E.P., Rekstin A.R., Beljaev A.L., Bragina V.E., Cox N. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia // *J Infect Dis*, Vol. 168, No. 4, 1993. pp. 881-887.
3. WHO. WHO global influenza preparedness plan. WHO/CDS/CSR/GIP/2005.5, 2005.
4. WHO. Global pandemic influenza action plan to increase vaccine supply. Geneva: WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, 2006. 1-24 pp.
5. Taaffe, Goldin S., Lambach, Sparrow E. Global production capacity of seasonal and pandemic influenza vaccines in 2023 // *Vaccine*, Vol. 51, Apr 2025. pp. 1-11.
6. MATROSOVICH M., TUZIKOV A., BOVIN N., GAMBARYAN A., KLIMOV A., CASTRUCCI M.R., DONATELLI I., KAWAOKA Y. Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals // *JOURNAL OF VIROLOGY*, Vol. 74, No. 18, September 2000. pp. 8502–8512.
7. Barr I.G., Donis R.O., Katz J.M., McCauley J.W., Odagiri T., Trusheim H., Tsai T.F., Wentworth D.E. Cell culture-derived influenza vaccines in the severe 2017-2018 epidemic season: a step towards improved influenza vaccine effectiveness // *NPJ Vaccines*, Vol. 44, Oct 2018. pp. 1-5.
8. Wu N.C., Zost S.J., Thompson A.J., Oyen D., Nycholat C.M., McBride R., Paulson J.C., Hensley S.E., Wilson I.A. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine // *PLoS Pathog*, Vol. 13, No. 10, Oct 2017. pp. 1-17.
9. Connor R.J., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates // *Virology*, Vol. 205, No. 1, Nov 1994. pp. 17-23.
10. Pappas C., Viswanathan K., Chandrasekaran A., Raman R., Katz J.M., Sasisekharan R., Tumpey T.M. Receptor specificity and transmission of H2N2

- subtype viruses isolated from the pandemic of 1957 // PLoS One, Vol. 5, No. 6, Jun 2010. pp. 1-10.
11. Xu R., McBride R., Paulson J.C., Basler C.F., Wilson I.A. Structure, receptor binding, and antigenicity of influenza virus hemagglutinins from the 1957 H2N2 pandemic // J Virol, Vol. 84, No. 4, Feb 2010. pp. 1715-1721.
 12. Ma W., Vincent A.L., Gramer M.R., Brockwell C.B., Lager K.M., Janke B.H., Gauger P.C., Patnayak D.P., Webby R.J., Richt J.A. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States // Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 104, No. 52, Dec 2007. pp. 20949-54.
 13. Kageyama T., Fujisaki S., Takashita E., Xu H., Yamada S., Uchida Y., Neumann G., Saito T., Kawaoka Y., Tashiro M. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013 // Euro Surveill, Vol. 18, No. 15, Apr 2013. pp. 1-21.
 14. Guan M., Hall J.S., Zhang X., Dusek R.J., Olivier A.K., Liu L., Li L., Krauss S., Danner A., Li T., et al. Aerosol Transmission of Gull-Origin Iceland Subtype H10N7 Influenza A Virus in Ferrets // J Virol, Vol. 93, No. 13, Jun 2019. pp. 1-16.
 15. Manini I., Domnich A., Amicizia D., Rossi S., Pozzi T., Gasparini R., Panatto D., Montomoli E. Flucelvax (Optaflu) for seasonal influenza // Emanuele Montomoli, Vol. 14, No. 6, Jun 2015. pp. 789-804.
 16. Bühler S., Ramharter M. Flucelvax Tetra: a surface antigen, inactivated, influenza vaccine prepared in cell cultures // Michael Ramharter, Vol. 4, No. 1, Jan 2019. pp. 1-2.
 17. Hamamoto I. Developments and current challenges in the process of cell culture-based seasonal influenza vaccine manufacture in Japan // Glob Health Med, Vol. 6, No. 2, Apr 2024. pp. 93-100.
 18. Peck H., Laurie K.L., Rockman S., Leung V., Lau H., Soppe S., Rynehart C., Baas C., Trusheim H., Barr I.G. Enhanced isolation of influenza viruses in qualified cells improves the probability of well-matched vaccines // NPJ Vaccines, Vol. 6, No. 1, Dec 2021. pp. 1-9.
 19. Мазуркова Н.А., Дешева Ю.А., Шишкина Л.Н., Ставский Е.А., Руденко Л.Г. Иммуногенность образцов вакцинного штамма вируса гриппа H5N2, полученных при роллерном культивировании в средах с растительными компонентами // ЖМЭИ, Т. 65, № 3, 2011. С. 48-52.

20. Нечаева Е.А., Радаева И.Ф., Сенькина Т.Ю., Герасименко Н.Б., Богрянцева М.П., Костылева Р.Н., Жилина Н.В., Свириденко Н.М., Зубарева К.Э., Вараксин Н.А. и др. Разработка опытнопромышленной технологии производства живой культуральной вакцины против пандемического гриппа // Биотехнология, № 6, 2013. С. 23-34.
21. Nechaeva E.A., Radaeva I.F., Sen'kina T.Y., Sviridenko T.M., Drozdov I.G. The comparative study of influenza vaccine virus strain reproduction as a function of different methods for MDCK cell cultivation // Biotechnology in Russia, Vol. 3, 2011. pp. 38-44.
22. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses // PLOS Pathogens, Vol. 9, No. 11, October 2013. pp. 1-12.
23. Rota P.A., WALLIS T.R.W., HARMON M.W., ROTA J.S., KENDAL A.P., NEROME K.N. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 // Virology, Vol. 175, No. 1, Mart 1990. pp. 59-68.
24. Murakami S., Endoh M., Kobayashi T., Takenaka-Uema A., Chambers J.K., Uchida K., Nishihara M., Hause B., Horimoto T. Influenza D Virus Infection in Herd of Cattle, Japan // Emerging Infectious Diseases, Vol. 22, No. 8, August 2016. pp. 1517-1519.
25. Murakami S., Odagiri T., Melaku S.K., Bazartseren B., Ishida H., Takenaka-Uema A., Muraki Y., Sentsui H., Horimoto T. Influenza D Virus Infection in Dromedary Camels, Ethiopia // Emerging Infectious Diseases, Vol. 25, No. 6, June 2019. pp. 1224-1226.
26. Petrova V.N., Russell C.A. The evolution of seasonal influenza viruses // NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY, Vol. 16, No. 1, Jan 2018. pp. 47-60.
27. Wiley D.C., Skehel J.J. THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE HEMAGGLUTININ MEMBRANE GLYCOPROTEIN OF INFLUENZA VIRUS // Ann. Rev. Biochem., Vol. 56, No. 94, 1987. pp. 365-394.
28. Львов Д.К. Медицинская вирусология: руководство. Москва: Мед. информ. агентство (МИА), 2008. 655 pp.
29. Bentz J., Mittal A. Architecture of the influenza hemagglutinin membrane fusion site // Biochim Biophys Acta, Vol. 1614, No. 1, Jul 2003. pp. 24-35.

30. França M.S., Brown J.D. Influenza Pathobiology and Pathogenesis in Avian Species // *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 82, No. 385, 2014. pp. 221-243.
31. Klenk H.D., Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity // *Trends Microbiol*, Vol. 2, No. 2, Feb 1994. pp. 39-43.
32. Stech O., Veits J., Weber S., Deckers D., Schröer D., Vahlenkamp T.W., Breithaupt A., Teifke J., Mettenleiter T.C., Stech J. Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain // *J Virol*, Vol. 83, No. 11, Jun 2009. pp. 5864-8.
33. Scolari S., Imkeller K., Jolmes F., Veit M., Herrmann A., Schwarzer R. Modulation of cell surface transport and lipid raft localization by the cytoplasmic tail of the influenza virus hemagglutinin // *Cellular Microbiology*, Vol. 18, No. 1, 2016. pp. 125-136.
34. Armstrong R.T., Kushnir A.S., White J.M. The Transmembrane Domain of Influenza Hemagglutinin Exhibits a Stringent Length Requirement to Support the Hemifusion to Fusion Transition // *The Journal of Cell Biology*, Vol. 151, No. 2, October 2000. pp. 425-437.
35. Scolari S., Engel S., Krebs N., Plazzo A.P., De Almeida R.F.M., Prieto M., Veit M., Herrmann A. Lateral Distribution of the Transmembrane Domain of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by Time-resolved Fluorescence Imaging // *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 284, No. 23, June 2009. pp. 15708–15716.
36. ENGEL S., SCOLARI S., THAA B., KREBS N., KORTE T., HERRMANN A., VEIT M. FLIM-FRET and FRAP reveal association of influenza virus haemagglutinin with membrane rafts // *Biochem. J.*, Vol. 425, November 2009. pp. 567–573.
37. Krammer F., Pica N., Hai R., Margine I., Palese P. Chimeric Hemagglutinin Influenza Virus Vaccine Constructs Elicit Broadly Protective Stalk-Specific Antibodies // *Journal of Virology*, Vol. 87, No. 12, June 2013. pp. 6542– 6550.
38. Isakova-Sivak I., Korenkov D., Smolonogina T., Kotomina T., Donina S., Matyushenko V., Mezhenkaya D., Krammer F., Rudenko L. Broadly protective anti-hemagglutinin stalk antibodies induced by live attenuated influenza vaccine

- expressing chimeric hemagglutinin // *Virology*, Vol. 518, No. 1, March 2018. pp. 313–323.
39. Skehel J.J., Wiley D.C. RECEPTOR BINDING AND MEMBRANE FUSION IN VIRUS ENTRY: The Influenza Hemagglutinin // *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 69, 2000. pp. 531-570.
 40. SAUTER N.K., GLICK G.D., CROWTHER R.L., PARK S.J., EISEN M.B., SKEHEL J.J., KNOWLES J.R., WILEY D.C. Crystallographic detection of a second ligand binding site in influenza virus hemagglutinin // *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 89, January 1992. pp. 324-328.
 41. Kim J.I., Park M.S. N-Linked Glycosylation in the Hemagglutinin of Influenza A Viruses // *Yonsei Med J*, Vol. 53, No. 5, September 2012. pp. 886-893.
 42. Kosik I., Ince W.L., Gentles L.E., Oler A.J., Kosikova M., Angel M., Magadán J.G., Xie H., Brooke C.B., Yewdell J.W. Influenza A virus hemagglutinin glycosylation compensates for antibody escape fitness costs // *PLoS Pathog*, Vol. 14, No. 1, Jan 2018. pp. 1-19.
 43. Alymova I.V., Cipollo J.F., Parsons L.M., Music N., Kamal R.P., Tzeng W.P., Goldsmith C.S., Contessa J.N., Hartshorn K.L., Wilson J.R., et al. Aberrant Cellular Glycosylation May Increase the Ability of Influenza Viruses to Escape Host Immune Responses through Modification of the Viral Glycome // *mBio*, Vol. 13, No. 2, Apr 2022. pp. 1-19.
 44. Das S.R., Hensley S.E., David A., Schmidt L., Gibbs J.S., Puigbò P., Ince W.L., Bennink J.R., Yewdell J.W. Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy // *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 108, No. 51, Dec 2011. pp. E1417-22.
 45. Stray S.J., Pittman L.B. Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin // *Virol J*, Vol. 9, No. 91, May 2012. pp. 1-16.
 46. Wilson I.A., Cox N.J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin // *Annu Rev Immunol*, Vol. 8, 1990. pp. 737-771.
 47. Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M.L., Treanor J., Webster R.G., García-Sastre A. Influenza // *Nat Rev Dis Primers*, Vol. 4, No. 1, Jun 2018. pp. 1-21.

48. Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.D. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium // *J Virol.*, Vol. 78, No. 22, Nov 2004. pp. 12665–12667.
49. Air G.M. Influenza neuraminidase // *Influenza Other Respir Viruses*, Vol. 6, No. 4, Jul 2012. pp. 245-256.
50. Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution // *Nature*, Vol. 303, No. 5912, May 1983. pp. 35-40.
51. Colman P.M. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors // *Protein Sci*, Vol. 3, No. 10, Oct 1994. pp. 1687-1696.
52. McKimm-Breschkin J.L. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance // *Influenza Other Respir Viruses*, Vol. 7, No. 1, Jan 2013. pp. 25-36.
53. Jagadesh A., Salam A.A.A., Mudgal P.P., Arunkumar G. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines // *Arch Virol*, Vol. 161, No. 8, Aug 2016. pp. 2087-2094.
54. Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K., Shiraki K., Smee D.F., Barnard D.L. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor // *Antiviral Res*, Vol. 100, No. 2, Nov 2013. pp. 446-454.
55. Monto A.S., Kendal A.P. Effect of neuraminidase antibody on Hong Kong influenza // *Lancet*, Vol. 1, No. 7804, Mar 1973. pp. 623-625.
56. Johansson B.E., Pokorny B.A., Tiso V.A. Supplementation of conventional trivalent influenza vaccine with purified viral N1 and N2 neuraminidases induces a balanced immune response without antigenic competition // *Vaccine*, Vol. 20, No. 11-12, Feb 2002. pp. 1670-1674.
57. Johansson B.E., Moran T.M., Kilbourne E.D. Antigen-presenting B cells and helper T cells cooperatively mediate intravirionic antigenic competition between influenza A virus surface glycoproteins // *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 84, No. 19, Oct 1987. pp. 6869-6873.
58. Смолоногова Т.А., Дешева Ю.А., Горев Н.В., Руденко Л.Г. Оценка антинейраминидазных антител у волонтеров, привитых сезонной трехвалентной живой гриппозной вакциной // *Мед. акад. журнал*, Т. 11, № 3, 2011. С. 44-50.

59. Brockwell-Staats C., Webster R.G., Webby R.J. Diversity of influenza viruses in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza A (H1N1) // *Influenza Other Respir Viruses*, Vol. 3, No. 5, Sep 2009. pp. 207-213.
60. Kim H., Webster R.G., Webby R.J. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen // *Viral Immunol*, Vol. 31, No. 2, Mar 2018. pp. 174-183.
61. Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J.M., Schanzer D., Cowling B.J., et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study // *Lancet*, Vol. 391, No. 10127, Mar 2018. pp. 1285-1300.
62. Aballéa S., Chancellor J., Martin M., Wutzler P., Carrat F., Gasparini R., Toniolo-Neto J., Drummond M., Weinstein M. The cost-effectiveness of influenza vaccination for people aged 50 to 64 years: an international model // *Value Health*, Vol. 10, No. 2, Mar-Apr 2007. pp. 98-116.
63. Prosser L.A., Bridges C.B., Uyeki T.M., Hinrichsen V.L., Meltzer M.I., Molinari N.A.M., Schwartz B., Thompson W.W., Fukuda K., Lieu T.A. Health benefits, risks, and cost-effectiveness of influenza vaccination of children // *Emerg Infect Dis*, Vol. 12, No. 10, Oct 2006. pp. 1548-1558.
64. Doyon-Plourde P., Fakih I., Tadount F., Fortin É., Quach C. Impact of influenza vaccination on healthcare utilization - A systematic review // *Vaccine*, Vol. 37, No. 24, May 2019. pp. 3179-3189.
65. Hay A.J., McCauley J.W. The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS)-A future perspective // *Influenza Other Respir Viruses*, Vol. 12, No. 5, Sep 2018. pp. 551-557.
66. Incalzi R.A., Consoli A., Lopalco P., Maggi S., Sesti G., Veronese N., Volpe M. Influenza vaccination for elderly, vulnerable and high-risk subjects: a narrative review and expert opinion // *Intern Emerg Med*, Vol. 19, No. 3, Apr 2024. pp. 619-640.
67. Edwards D.K., Jasny E., Yoon H., Horscroft N., Schanen B., Geter T., Fotin-Mleczek M., Petsch B., Wittman V. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response // *J Transl Med*, Vol. 15, No. 1, Jan 2017. pp. 1-18.
68. Bahl K., Senn J.J., Yuzhakov O., Bulychev A., Brito L.A., Hassett K.J., Laska M.E., Smith M., Almarsson Ö., Thompson J., et al. Preclinical and Clinical

- Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses // *Mol Ther*, Vol. 25, No. 6, Jun 2017. pp. 1316-1327.
69. Karlsson I., Borggren M., Rosenstierne M.W., Trebbien R., Williams J.A., Vidal E., Vergara-Alert J., Foz D.S., Darji A., Sisteré-Oró M., et al. Protective effect of a polyvalent influenza DNA vaccine in pigs // *Vet Immunol Immunopathol*, Vol. 195, No. 1, Jan 2018. P. *Vet Immunol Immunopathol*.
 70. Zhang H., Zowalaty M.E. DNA-based influenza vaccines as immunoprophylactic agents toward universality // *Future Microbiol*, Vol. 11, No. 1, 2016. pp. 153-164.
 71. Sharabi S., Drori Y., Micheli M., Friedman N., Orzitzer S., Bassal R., GlatmanFreedman A., Shohat T., Mendelson E., Hindiye M., Mandelboim M. Epidemiological and Virological Characterization of Influenza B Virus Infections // *PLoS One*, Vol. 11, No. 8, Aug 2016. pp. 1-12.
 72. Belshe R.B. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza // *Vaccine*, Vol. 28S, Sep 2010. pp. 45-53.
 73. Ray R., Santos G.D., Buck P.O., Claeys C., Matias G., Innis B.L., Bekkat-Berkani R. A review of the value of quadrivalent influenza vaccines and their potential contribution to influenza control // *Hum Vaccin Immunother*, Vol. 13, No. 7, Jul 2017. pp. 1640-1652.
 74. Ерофеева М.К., Бузицкая Ж.В., Шахланская Е.В., Писарева М.М., Стукова М.А., Лиознов Д.А. Оценка профилактической эффективности российских гриппозных вакцин в эпидемические сезоны 2018-2021 годов // *Рос иммун жур*, Т. 27, № 4, Окт 2024. С. 1021–1028.
 75. Гендон Ю.З. Высокая эффективность и безопасность вирусных вакцин и бездоказательная критика // *Вопросы вирусологии*, Т. 58, № 6, 2013. С. 5-13.
 76. Tregoning J.S., Russell R.F., Kinnear E. Adjuvanted influenza vaccines // *Hum Vaccin Immunother*, Vol. 14, No. 3, Mar 2018. pp. 550-564.
 77. Miller E., Andrews N., Stellitano L., Stowe J., Winstone A.M., Shneerson J., Verity C. Risk of narcolepsy in children and young people receiving AS03 adjuvanted pandemic A/H1N1 2009 influenza vaccine: retrospective analysis // *BMJ*, Vol. 346, Feb 2013. P. 14.

78. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы. Классификация, механизм действия // Рос. Аллергол. Журн., Т. 4, 2005. С. 30-43.
79. Никифорова А.Н., Исакова-Сивак И.Н., Ерофеева М.К., Фельдблюм И.В., Руденко Л.Г. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адъювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18 – 60 лет // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, Т. 2, № 75, 2014. С. 72-78.
80. Demicheli V., Jefferson T., Al-Ansary L., Ferroni E., Rivetti A., Di Pietrantonj C. Vaccines for preventing influenza in healthy adults (Review). 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd., 2014. 1-267 pp.
81. Belshe R.B., Edwards K.M., Vesikari T., Black S.V., Walker R.E., Hultquist M., Kemble G., Connor E.M., CAIV-T Comparative Efficacy Study Group. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children // N Engl J Med, Vol. 356, No. 7, Feb 2007. pp. 685-696.
82. Sridhar S., Begom S., Bermingham A., Hoschler K., Adamson W., Carman W., Bean T., Barclay W., Deeks J.J., Lalvani A. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza // Nat Med, Vol. 19, No. 10, Oct 2013. pp. 1305-1312.
83. Belongia E.A., Simpson M.D., King J.P., Sundaram M.E., Kelley N.S., Osterholm M.T., McLean H.Q. Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies // Lancet Infect Dis, Vol. 16, No. 8, Aug 2016. pp. 942-951.
84. Raymond D.D., Stewart S.M., Lee J., Ferdman J., Bajic G., Do K.T., Ernandes M.J., Suphaphiphat P., Settembre E.C., Dormitzer P.R., et al. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain // Nat Med, Vol. 22, No. 12, Dec 2016. pp. 1465-1469.
85. Skowronski D.M., Janjua N.Z., Serres G., Sabaiduc S., Eshaghi A., Dickinson J.A., Fonseca K., Winter A.L., Gubbay J.B., Krajden M., et al. Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses // PLoS One, Vol. 9, No. 3, Mar 2014. pp. 1-15.
86. Zost S.J., Parkhouse K., Gumina M.E., Kim K., Perez S.D., Wilson P.C., Treanor J.J., Sant A.J., Cobey S., Hensley S.E. Contemporary H3N2 influenza viruses have a

- glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains // *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 114, No. 47, Nov 2017. pp. 12578-12583.
87. Zhong W., Gross F.L., Holiday C., Jefferson S.N., Bai Y., Liu F., Katz J.M., Levine M.Z. Vaccination with 2014-15 Seasonal Inactivated Influenza Vaccine Elicits Cross-Reactive Anti-HA Antibodies with Strong ADCC Against Antigenically Drifted Circulating H3N2 Virus in Humans // *Viral Immunol*, Vol. 29, No. 4, May 2016. pp. 259-262.
 88. WHO. WHO Technical Report Series No 941, Annex. 5 “WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines. Available at: <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/>, 2007.
 89. Beare A.S., Schild G.C., Craig J.W. Trials in man with live recombinants made from A/PR/8/34 (H0 N1) and wild H3 N2 influenza viruses // *Lancet*, Vol. 2, No. 7938, Oct 1975. pp. 729-732.
 90. Florent G., Lobmann M., Beare A.S., Zygraich N. RNAs of influenza virus recombinants derived from parents of known virulence for man // *Arch Virol*, Vol. 54, No. 1-2, 1977. pp. 19-28.
 91. Florent G. Gene Constellation of Live Influenza A Vaccines // *Arch Virol*, Vol. 64, No. 2, 1980. pp. 171-173.
 92. Johnson A., Chen L.M., Winne E., Santana W., Metcalfe M.G., Mateu-Petit G., Ridenour C., Hossain M.J., Villanueva J., Zaki S.R., et al. Identification of Influenza A/PR/8/34 Donor Viruses Imparting High Hemagglutinin Yields to Candidate Vaccine Viruses in Eggs // *PLoS One*, Vol. 10, No. 6, Jun 2015. pp. 1-17.
 93. Александрова Г.И. Живая вакцина против гриппа. 1-е-е изд. СПб: Наука. Санкт-Петербург., 1994. 150 с.
 94. Richman D.D., Murphy B.R. The association of the temperature-sensitive phenotype with viral attenuation in animals and humans: implications for the development and use of live virus vaccines // *Rev Infect Dis*, Vol. 1, No. 3, May-Jun 1979. pp. 413-433.
 95. Wright P.F., Karzon D.T. Live attenuated influenza vaccines // *Prog Med Virol*, Vol. 34, 1987. pp. 70-88.

96. Слепушкин А.Н. Роль вакцинации в системе мероприятий по борьбе с гриппом. Москва: б.и., 1968. 26 с.
97. Александрова Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа // Вопросы вирусологии, Т. 22, № 4, 1977. С. 387-395.
98. Kendal A.P. Cold-adapted live attenuated influenza vaccines developed in Russia: can they contribute to meeting the needs for influenza control in other countries? // Eur J Epidemiol, Vol. 13, No. 5, Jul 1997. pp. 591-609.
99. Cox N.J., Maassab H.F., Kendal A.P. Comparative studies of wild-type and cold-mutant (temperature-sensitive) influenza viruses: nonrandom reassortment of genes during preparation of live virus vaccine candidates by recombination at 25 degrees between recent H3N2 and H1N1 epidemic strains an // Virology, Vol. 97, No. 1, Aug 1979. pp. 190-194.
100. Гармашова Л.М., Полежаев Ф.И., Александрова Г.И. Холодоадаптированный штамм А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) - специальный донор аттенуации живой гриппозной вакцины для детей и полученные на его основе рекомбинанты // Вопросы вирусологии, Т. 29, № 1, 1984. С. 28-31.
101. Alexandrova G.I., Polezhaev F.I., Budilovsky G.N., Garmashova L.M., Topuria N.A., Egorov A.Y., Romejko-Gurko Y.R., Koval T.A., Lisovskaya K.V., Klimov A.I. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: reactogenicity and antigenic activity of cold-adapted recombinants and analysis of isolates from the vaccinees // Infect Immun, Vol. 44, No. 3, 1984. pp. 734-739.
102. Rudenko L., Alexandrova G. Current strategies for the prevention of influenza by the Russian cold-adapted live influenza vaccine among different populations // International Congress Series, Vol. 1219, 2001. pp. 945-950.
103. Григорьева Е.П., Дешева Ю.А., Доница С.А., Найхин А.Н., Рекстин А.Р., Баранцева И.Б., Завиткова Е.А., Москвичева Т.М., Жаворонков В.Г., Руденко Л.Г. Сравнительная оценка безвредности, иммуногенной активности и профилактической эффективности взрослого и детского вариантов живой гриппозной вакцины у школьников 7-14 лет при стандартных схемах введения // Вопросы вирусологии, Т. 47, № 4, 2002. С. 24-27.
104. Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П. Безопасность, иммуногенность и эффективность живых гриппозных аттенуированных интраназальных вакцин –

опыт многолетнего применения в различных возрастных группах // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, Т. 71, № 4, 2013. С. 67-73.

105. Rudenko L.G., Lonskaya N.I., Klimov A.I., Vasilieva R.I., Ramirez A. Clinical and epidemiological evaluation of a live, cold-adapted influenza vaccine for 3-14-year-olds // Bull World Health Organ, Vol. 74, No. 1, 1996. pp. 77-84.
106. Dhare R., Yeolekar L., Kulkarni P., Menon R., Vaidya V., Ganguly M., Tyagi P., Barde P., Jadhav S. A pandemic influenza vaccine in India: from strain to sale within 12 months // Vaccine, Vol. 29, No. 1, Jul 2011. pp. A16-21.
107. Ai L., Gao Z., Lv H., Zhang J., Xu N., Zhao H., Lu Q., Zhu H., Shi N., Wei W., Liu D., Yu Q. Immunogenicity and safety of live attenuated influenza vaccine in children aged 3-17 years in China // Vaccine, Vol. 46, Feb 2025.
108. Helmeke C., Gräfe L., Irmischer H.M., Gottschalk C., Karagiannis I., Oppermann H. Effectiveness of the 2012/13 trivalent live and inactivated influenza vaccines in children and adolescents in Saxony-Anhalt, Germany: a test-negative case-control study // PLoS One, Vol. 10, No. 4, Apr 2015. pp. 1-10.
109. Duffy J., Lewis M., Harrington T., Baxter R., Belongia E.A., Jackson L.A., Jacobsen S.J., Lee G.M., Naleway A.L., Nordin J., Daley M.F., Vaccine Safety Datalink. Live attenuated influenza vaccine use and safety in children and adults with asthma // Ann Allergy Asthma Immunol, Vol. 118, No. 4, Apr 2017. pp. 439-444.
110. Nordin J.D., Vazquez-Benitez G., Olsen A., Kuckler L.C., Gao A.Y., Kharbanda E.O. Safety of guidelines recommending live attenuated influenza vaccine for routine use in children and adolescents with asthma // Vaccine, Vol. 37, No. 30, Jul 2019. pp. 4055-4060.
111. Rotrosen E., Zaman K., Feser J., Ortiz J.R., Goswami D., Sharmeen A.T., Rahman M., Lewis K.D.C., Rahman M.Z., Barin B., Brooks W.A., Neuzil K.M. Influenza Among Young Children in Bangladesh: Clinical Characteristics and Outcomes From a Randomized Clinical Trial // Clin Infect Dis, Vol. 65, No. 11, Nov 2017. pp. 1914-1920.
112. Ray G.T., Lewis N., Goddard K., Ross P., Duffy J., DeStefano F., Baxter R., Klein N.P. Asthma exacerbations among asthmatic children receiving live attenuated versus inactivated influenza vaccines // Vaccine, Vol. 35, No. 20, May 2017. pp. 2668-2675.

113. Rudenko L., Isakova-Sivak I., Naykhin A., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Korenkov D., Matyushenko V., Sparrow E., Kieny M.P. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial // *Lancet Infect Dis*, Vol. 16, No. 3, Mar 2016. pp. 303-310.
114. Isakova-Sivak I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Petukhova G., Kuznetsova V., Kiseleva I., Smolonogina T., Dubrovina I., et al. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers // *Hum Vaccin Immunother*, Vol. 11, No. 4, 2015. pp. 970-982.
115. Rudenko L., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Larionova N., Pisareva M., Krivitskaya V., Flores J., Russian LAIV Trial Study Group. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study // *Vaccine*, Vol. 33, No. 39, Sep 2015. pp. 5110-5117.
116. Исакова И.Н., Киселева И.В., Ларионова Н.В., Олейник Е.С., Руденко Л.Г. Лабораторные маркеры аттенуации штаммов живой гриппозной вакцины // *Вопросы вирусологии*, Vol. 52, No. 4, 2007. pp. 22-26.
117. Hussain A.I., Cordeiro M., Sevilla E., Liu J. Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: in vitro cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells // *Vaccine*, Vol. 28, No. 22, May 2010. pp. 3848-3855.
118. Liu J., Shi X., Schwartz R., Kemble G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine // *Vaccine*, Vol. 27, No. 46, Oct 2009. pp. 6460-6463.
119. Moro P.L., Winiecki S., Lewis P., Shimabukuro T.T., Cano M. Surveillance of adverse events after the first trivalent inactivated influenza vaccine produced in mammalian cell culture (Flucelvax(®)) reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), United States, 2013-2015 // *Vaccine*, Vol. 33, No. 48, Nov 2015. pp. 6684-6688.
120. Frey S., Vesikari T., Szymczakiewicz-Multanowska A., Lattanzi M., Izu A., Groth N., Holmes S. Clinical efficacy of cell culture-derived and egg-derived inactivated subunit influenza vaccines in healthy adults // *Sandra Holmes*, Vol. 51, No. 9, Nov 2010. pp. 997-1004.

121. Klein N.P., Fireman B., Goddard K., Zerbo O., Asher J., Zhou J., King J., Lewis N. Vaccine effectiveness of cell-culture relative to egg-based inactivated influenza vaccine during the 2017-18 influenza season // *PLoS One*, Vol. 15, No. 2, Feb 2020. pp. 1-12.
122. Katz J.M., Webster R.G. Efficacy of inactivated influenza A virus (H3N2) vaccines grown in mammalian cells or embryonated eggs // *J Infect Dis*, Vol. 160, No. 2, Aug 1989. pp. 191-198.
123. Chen Z., Zhou H., Jin H. The impact of key amino acid substitutions in the hemagglutinin of influenza A (H3N2) viruses on vaccine production and antibody response // *Vaccine*, Vol. 28, No. 24, May 2010. pp. 4079-4085.
124. Saito T., Nakaya Y., Suzuki T., Ito R., Saito T., Saito H., Takao S., Sahara K., Odagiri T., Murata T., et al. Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation // *J Med Virol*, Vol. 74, No. 2, Oct 2004. pp. 336-343.
125. Lamb Y.N. Cell-Based Quadrivalent Inactivated Influenza Virus Vaccine (Flucelvax® Tetra/Flucelvax Quadrivalent®): A Review in the Prevention of Influenza // *Drugs*, Vol. 79, No. 12, Aug 2019. pp. 1337-1348.
126. Moehling K.K., Zimmerman R.K., Nowalk M.P., Lin C.J., Martin J.M., Alcorn J.F., Susick M., Burroughs A., Holiday C., Flannery B., Levine M.Z. A randomized controlled trial of antibody response to 2018-19 cell-based vs. egg-based quadrivalent inactivated influenza vaccine in children // *Vaccine*, Vol. 38, No. 33, Jul 2020. pp. 5171-5177.
127. Martin J.M., Geffel K.M., Ortiz M.A., Rajasundaram D., Nowalk M.P., Zimmerman R.K., Alcorn J.F. Differential Induction of Interferon-Stimulated Genes by Cell-Based Versus Egg-Based Quadrivalent Influenza Vaccines in Children During the 2018-2019 Season // *J Infect Dis*, Vol. 229, No. 5, May 2024. pp. 1393-1401.
128. Stefanizzi P., Nitto S.D., Spinelli G., Lattanzio S., Stella P., Ancona D., Dell'Aera M., Padovano M., Soldano S., Tafuri S., Bianchi F.P. Post-Marketing Active Surveillance of Adverse Reactions Following Influenza Cell-Based Quadrivalent Vaccine: An Italian Prospective Observational Study // *Vaccines (Basel)*, Vol. 9, No. 456, May 2021. pp. 1-9.
129. Domnich A., Amicizia D., Lai P.L., Ogliastro M., Piedrahita-Tovar M., Orsi A., Icardi G., Panatto D. Three seasons of enhanced safety surveillance of a cell culture-

- based quadrivalent influenza vaccine // *Hum Vaccin Immunother*, Vol. 19, No. 2, Aug 2023. pp. 1-8.
130. Rödig J.V., Rapp E., Bohne J., Kampe M., Kaffka H., Bock A., Genzel Y., Reichl U. Impact of cultivation conditions on N-glycosylation of influenza virus a hemagglutinin produced in MDCK cell culture // *Biotechnol Bioeng*, Vol. 110, No. 6, Jun 2013. pp. 1691-1703.
 131. Chia M.Y., Lin C.Y., Chen P.L., Lai C.C., Weng T.C., Sung W.C., Hu A.Y.C., Lee M.S. Characterization and Immunogenicity of Influenza H7N9 Vaccine Antigens Produced Using a Serum-Free Suspension MDCK Cell-Based Platform // *Viruses*, Vol. 14, No. 1937, Aug 2022. pp. 1-12.
 132. Palker T., Kiseleva I., Johnston K., Su Q., Toner T., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rubin B., Petrukhin L., Wlochowski J., et al. Protective efficacy of intranasal cold-adapted influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) vaccines comprised of egg- or cell culture-derived reassortants // *Virus Res*, Vol. 105, No. 2, Oct 2004. pp. 183-194.
 133. Heldens J., Hulskotte E., Voeten T., Breedveld B., Verweij P., van Duijnhoven W., Rudenko L., van Damme P., van den Bosch H. Safety and immunogenicity in man of a cell culture derived trivalent live attenuated seasonal influenza vaccine: a Phase I dose escalating study in healthy volunteers // *Vaccine*, Vol. 32, No. 39, Sep 2014. pp. 5118-5124.
 134. Нечаева Е.А., Сенькина Т.Ю., Радаева И.Ф., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Жилина Н.В., Думченко Н.Б., Руденко Л.Г., Киселева И.В., Исакова-Сивак И.Н. Способ получения микрокапсулированной формы живой культуральной вакцины против сезонного и пандемического гриппа для интраназального применения // Патент РФ №2617051 С1, опубл. Бюлл. №11 от 19.04.2017, 2017.
 135. Ganguly M., Yeolekar L., Tyagi P., Sagar U., Narale S., Anaspure Y., Tupe S., Wadkar K., Ingle N., Dhere R., Scorza F.B., Mahmood K. Evaluation of manufacturing feasibility and safety of an MDCK cell-based live attenuated influenza vaccine (LAIV) platform // *Vaccine*, Vol. 38, No. 52, Dec 2020. pp. 8379-8386.
 136. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E., Deyde V., et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans // *Science*, Vol. 325, No. 5937, Jul 2009. pp. 197-201.

137. Tanner W.D., Toth D.J.A., Gundlapalli A.V. The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: a review // *Epidemiol Infect*, Vol. 143, No. 16, Dec 2015. pp. 3359-74.
138. Chen H., Yuan H., Gao R., Zhang J., Wang D., Xiong Y., Fan G., Yang F., Li X., Zhou J., et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study // *Lancet*, Vol. 383, No. 9918, Feb 2014. pp. 714-21.
139. Hu M., Li X., Ni X., Wu J., Gao R., Xia W., Wang D., He F., Chen S., Liu Y., et al. Coexistence of Avian Influenza Virus H10 and H9 Subtypes among Chickens in Live Poultry Markets during an Outbreak of Infection with a Novel H10N8 Virus in Humans in Nanchang, China // *Jpn J Infect Dis*, Vol. 68, No. 5, 2015. pp. 364-9.
140. Yang Z.F., Mok C.K.P., Peiris J.S.M., Zhong N.S. Human Infection with a Novel Avian Influenza A(H5N6) Virus // *N Engl J Med*, Vol. 373, No. 5, Jul 2015. pp. 487-9.
141. Pan M., Gao R., Lv Q., Huang S., Zhou Z., Yang L., Li X., Zhao X., Zou X., Tong W., et al. Human infection with a novel, highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: Virological and clinical findings // *J Infect*, Vol. 72, No. 1, Jan 2016. pp. 52-9.
142. Sun H., Pu J., Wei Y., Sun Y., Hu J., Liu L., Xu G., Gao W., Li C., Zhang X., et al. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N6 Viruses Exhibit Enhanced Affinity for Human Type Sialic Acid Receptor and In-Contact Transmission in Model Ferrets // *J Virol*, Vol. 90, No. 14, Jun 2016. pp. 6235-6243.
143. Gao Y., Zhang Y., Shinya K., Deng G., Jiang Y., Li Z., Guan Y., Tian G., Li Y., Shi J., et al. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host // *PLoS Pathog*, Vol. 5, No. 12, Dec 2009. pp. 1-11.
144. Peng W., Bouwman K.M., McBride R., Grant O.C., Woods R.J., Verheije M.H., Paulson J.C., de Vries R.P. Enhanced Human-Type Receptor Binding by Ferret-Transmissible H5N1 with a K193T Mutation // *J Virol*, Vol. 92, No. 10, Apr 2018. pp. 1-10.
145. Han P., Hu Y., Sun W., Zhang S., Li Y., Wu X., Yang Y., Zhu Q., Jiang T., Li J., Qin C. Mouse lung-adapted mutation of E190G in hemagglutinin from H5N1

- influenza virus contributes to attenuation in mice // *J Med Virol*, Vol. 87, No. 11, Nov 2015. pp. 1816-22.
146. Han P.F., Li J., Hu Y., Sun W., Zhang S., Yang Y.H., Li Y.C., Kang X.P., Wu X.Y., Zhu S.Y., et al. H5N1 influenza A virus with K193E and G225E double mutations in haemagglutinin is attenuated and immunogenic in mice // *J Gen Virol*, Vol. 96, No. 9, Sep 2015. pp. 2522-2530.
 147. Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M.Q., Nidom C.A., Sakai-Tagawa Y., Muramoto Y., Ito M., Kiso M., Horimoto T., et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors // *Nature*, Vol. 444, No. 7117, Nov 2006. pp. 378-82.
 148. Herfst S., Schrauwen E.J.A., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., Sorrell E.M., Bestebroer T.M., Burke D.F., Smith D.J., et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets // *Science*, Vol. 336, No. 6088, Jun 2012. pp. 1534-41.
 149. Mehle A., Doudna J.A. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans // *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 106, No. 50, Dec 2009. pp. 21312-6.
 150. Du L., Li Y., Zhao G., Wang L., Zou P., Lu L., Zhou Y., Jiang S. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) mutants transmissible by air are susceptible to human and animal neutralizing antibodies // *J Infect Dis*, Vol. 208, No. 8, Oct 2013. pp. 1315-9.
 151. Gao R., Gu M., Liu K., Li Q., Li J., Shi L., Li X., Wang X., Hu J., Liu X., et al. T160A mutation-induced deglycosylation at site 158 in hemagglutinin is a critical determinant of the dual receptor binding properties of clade 2.3.4.4 H5NX subtype avian influenza viruses // *Vet Microbiol*, Vol. 217, Apr 2018. pp. 158-166.
 152. Игнатьева А.В., Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Шилов А.А., Масалова О.В., Климова Р.Р., Куц А.А., Ильюшина Н.А., Каверин Н.В. ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В МАЛОЙ СУБЪЕДИНИЦЕ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ H5N2 НА СЕЛЕКЦИЮ МУТАНТОВ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К НЕЙТРАЛИЗУЮЩИМ МОНОКЛОНАЛЬНЫМ АНТИТЕЛАМ // *Молек. Биол. клетки*, Т. 49, № 2, 2015. С. 342-350.

153. Watanabe Y., Arai Y., Daidoji T., Kawashita N., Ibrahim M.S., El-Gendy E.E.D.M., Hiramatsu H., Kubota-Koketsu R., Takagi T., Murata T., et al. Characterization of H5N1 influenza virus variants with hemagglutinin mutations isolated from patients // *mBio*, Vol. 6, No. 2, Apr 2015. pp. 1-15.
154. Zhang Q., Shi J., Deng G., Guo J., Zeng X., He X., Kong H., Gu C., Li X., Liu J., et al. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet // *Science*, Vol. 341, No. 6144, Jul 2013. pp. 410-4.
155. Xu R., de Vries R.P., Zhu X., Nycholat C.M., McBride R., Yu W., Paulson J.C., Wilson I.A. Preferential recognition of avian-like receptors in human influenza A H7N9 viruses // *Science*, Vol. 342, No. 6163, Dec 2013. pp. 1230-5.
156. Tharakaraman K., Jayaraman A., Raman R., Viswanathan K., Stebbins N.W., Johnson D., Shriver Z., Sasisekharan V., Sasisekharan R. Glycan receptor binding of the influenza A virus H7N9 hemagglutinin // *Cell*, Vol. 153, No. 7, Jun 2013. pp. 1486-93.
157. de Vries R.P., Peng W., Grant O.C., Thompson A.J., Zhu X., Bouwman K.M., de la Pena A.T.T., van Breemen M.J., Wickramasinghe I.N.A., de Haan C.A.M., et al. Three mutations switch H7N9 influenza to human-type receptor specificity // *PLoS Pathog*, Vol. 13, No. 6, Jun 2017. pp. 1-16.
158. Yang H., Carney P.J., Chang J.C., Guo Z., Stevens J. Structural and Molecular Characterization of the Hemagglutinin from the Fifth-Epidemic-Wave A(H7N9) Influenza Viruses // *J Virol*, Vol. 92, No. 16, Jul 2018. pp. 1-16.
159. Qi W., Jia W., Liu D., Li J., Bi Y., Xie S., Li B., Hu T., Du Y., Xing L., et al. Emergence and Adaptation of a Novel Highly Pathogenic H7N9 Influenza Virus in Birds and Humans from a 2013 Human-Infecting Low-Pathogenic Ancestor // *J Virol*, Vol. 92, No. 2, Jan 2018. pp. 1-12.
160. Ke C., Mok C.K.P., Zhu W., Zhou H., He J., Guan W., Wu J., Song W., Wang D., Liu J., et al. Human Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, China // *Emerg Infect Dis*, Vol. 23, No. 8, Jul 2017. pp. 1332-1340.
161. Lu J., Raghvani J., Pryce R., Bowden T.A., Thézé J., Huang S., Song Y., Zou L., Liang L., Bai R., et al. Molecular Evolution, Diversity, and Adaptation of Influenza A(H7N9) Viruses in China // *Emerg Infect Dis*, Vol. 24, No. 10, Oct 2018. pp. 1795-1805.

162. Uchida Y., Kanehira K., Takemae N., Hikono H., Saito T. Susceptibility of chickens, quail, and pigeons to an H7N9 human influenza virus and subsequent egg-passaged strains // *Arch Virol*, Vol. 162, No. 1, Jan 2017. pp. 103-116.
163. Li X., Gao Y., Ye Z. A Single Amino Acid Substitution at Residue 218 of Hemagglutinin Improves the Growth of Influenza A(H7N9) Candidate Vaccine Viruses // *J Virol*, Vol. 93, No. 19, Sep 2019. pp. 1-15.
164. Liu L., Lu J., Li Z., Zhou J., Guo J., Li X., Liu J., Shu Y., Wang D. 220 mutation in the hemagglutinin of avian influenza A (H7N9) virus alters antigenicity during vaccine strain development // *Hum Vaccin Immunother*, Vol. 14, No. 3, Mar 2018. pp. 532-539.
165. Liu W., Bai T., Guo J., Li X., Yang L., Wang X., Guo J., Ma X., Li X., Liu H., et al. The S128N mutation combined with an additional potential N-linked glycosylation site at residue 133 in hemagglutinin affects the antigenicity of the human H7N9 virus // *Emerg Microbes Infect*, Vol. 5, No. 7, Jul 2016. pp. 1-2.
166. Chen P.L., Weng T.C., Lai C.C., Tzeng T.T., Lin M.H., Hu K.C., Hu A.Y.C., Lee M.S., Sung W.C. MDCK-Adaptive Mutation of A169S Changes Glycosylation Pattern of Hemagglutinin and Enhances MDCK-Based H7N9 Vaccine Virus Production without Loss of Antigenicity and Immunogenicity // *Vaccines (Basel)*, Vol. 12, No. 291, Mar 2024. pp. 1-14.
167. Gambaryan A.S., Marinina V.P., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Rudneva I.A., Sinitsyn B.V., Shilov A.A., Matrosovich M.N. Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties on H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs // *Virology*, Vol. 247, No. 2, Aug 1998. pp. 170-7.
168. Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y., Mochalova L.V., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N. Mutations in Hemagglutinin and Polymerase Alter the Virulence of Pandemic A(H1N1) Influenza Virus // *Mol Biol (Mosk)*, Vol. 52, No. 4, Jul 2018. pp. 644-658.
169. Kim J.I., Lee I., Park S., Lee S., Hwang M.W., Bae J.Y., Heo J., Kim D., Jang S.I., Song J.W., Park M.S. Effects of a hemagglutinin D222G substitution on the pathogenicity of 2009 influenza A (H1N1) virus in mice // *Arch Virol*, Vol. 159, No. 10, Oct 2014. pp. 2559-65.

170. Wang W., Lu J., Cotter C.R., Wen K., Jin H., Chen Z. Identification of critical residues in the hemagglutinin and neuraminidase of influenza virus H1N1pdm for vaccine virus replication in embryonated chicken eggs // *J Virol*, Vol. 87, No. 8, Apr 2013. pp. 4642-9.
171. Hough H.S.H., Garner J., Zhou Y., Lyons A., Kuschner R., Deye G., Clair K.S., Douce R.W., Chicaiza W., Blair P.J., et al. Emergent 2009 influenza A(H1N1) viruses containing HA D222N mutation associated with severe clinical outcomes in the Americas // *J Clin Virol*, Vol. 53, No. 1, Jan 2012. pp. 12-5.
172. Wu C., Cheng X., Wang X., Lv X., Yang F., Liu T., Fang S., Zhang R., Jinqian. Clinical and molecular characteristics of the 2009 pandemic influenza H1N1 infection with severe or fatal disease from 2009 to 2011 in Shenzhen, China // *J Med Virol*, Vol. 85, No. 3, Mar 2013. pp. 405-12.
173. Kong W., Liu L., Wang Y., Gao H., Wei K., Sun H., Sun Y., Liu J., Ma G., Pu J. Hemagglutinin mutation D222N of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus alters receptor specificity without affecting virulence in mice // *Virus Res*, Vol. 30, No. 189, Aug 2014. pp. 79-86.
174. Abed Y., Pizzorno A., Hamelin M.E., Leung A., Joubert P., Couture C., Kobasa D., Boivin G. The 2009 pandemic H1N1 D222G hemagglutinin mutation alters receptor specificity and increases virulence in mice but not in ferrets // *J Infect Dis*, Vol. 204, No. 7, Oct 2011. pp. 1008-16.
175. Wen F., Li L., Zhao N., Chiang M.J., Xie H., Cooley J., Webby R., Wang P.G., Wan X.F. A Y161F Hemagglutinin Substitution Increases Thermostability and Improves Yields of 2009 H1N1 Influenza A Virus in Cells // *J Virol*, Vol. 92, No. 2, Jan 2018. pp. 1-17.
176. Cotter C.R., Jin H., Chen Z. A single amino acid in the stalk region of the H1N1pdm influenza virus HA protein affects viral fusion, stability and infectivity // *PLoS Pathog*, Vol. 10, No. 1, Jan 2014. pp. 1-9.
177. Yang H., Chang J.C., Guo Z., Carney P.J., Shore D.A., Donis R.O., Cox N.J., Villanueva J.M., Klimov A.I., Stevens J. Structural stability of influenza A(H1N1)pdm09 virus hemagglutinins // *J Virol*, Vol. 88, No. 9, May 2014. pp. 4828-38.
178. Nakowitsch S., Waltenberger A.M., Wressnigg N., Ferstl N., Triendl A., Kiefmann B., Montomoli E., Lapini G., Sergeeva M., Muster T., Romanova J.R. Egg-

or cell culture-derived hemagglutinin mutations impair virus stability and antigen content of inactivated influenza vaccines // *Biotechnol J*, Vol. 9, No. 3, Mar 2014. pp. 405-14.

179. Lee H.K., Tang J.W.T., Kong D.H.L., Loh T.P., Chiang D.K.L., Lam T.T.Y., Koay E.S.C. Comparison of mutation patterns in full-genome A/H3N2 influenza sequences obtained directly from clinical samples and the same samples after a single MDCK passage // *PLoS One*, Vol. 8, No. 11, Nov 2013. pp. 1-9.
180. Mishin V.P., Sleeman K., Levine M., Carney P.J., Stevens J., Gubareva L.V. The effect of the MDCK cell selected neuraminidase D151G mutation on the drug susceptibility assessment of influenza A(H3N2) viruses // *Antiviral Res*, Vol. 101, Jan 2014. pp. 93-6.
181. Okomo-Adhiambo M., Sleeman K., Ballenger K., Nguyen H.T., Mishin V.P., Sheu T.G., Smagala J., Li Y. Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: a laboratory surveillance perspective // *Viruses*, Vol. 2, No. 10, Oct 2010. pp. 2269-2289.
182. Matsumoto S., Chong Y., Kang D., Ikematsu H. High genetic stability in MDCK-SIAT1 passaged human influenza viruses // *J Infect Chemother*, Vol. 25, No. 3, Mar 2019. pp. 222-224.
183. Matrosovich M., Matrosovich T., Carr J., Roberts N.A., Klenk H.D. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors // *J Virol*, Vol. 77, No. 15, Aug 2003. pp. 8418-25.
184. Cohen-Daniel L., Zakay-Rones Z., Resnick I.B., Shapira M.Y., Dorozhko M., Mador N., Greenbaum E., Wolf D.G. Emergence of oseltamivir-resistant influenza A/H3N2 virus with altered hemagglutination pattern in a hematopoietic stem cell transplant recipient // *J Clin Virol*, Vol. 44, No. 2, Feb 2009. pp. 138-40.
185. Kumari K., Gulati S., Smith D.F., Gulati U., Cummings R.D., Air G.M. Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses // *Virol J*, Vol. 4, No. 42, May 2007. pp. 1-12.
186. Cardenas M., Seibert B., Cowan B., Fraiha A.L.S., Carnaccini S., Gay L.C., Faccin F.C., Caceres C.J., Anderson T.K., Baker A.L.V., Perez D.R., Rajao D.S. Amino acid 138 in the HA of a H3N2 subtype influenza A virus increases affinity for

- the lower respiratory tract and alveolar macrophages in pigs // PLoS Pathog, Vol. 20, No. 2, Feb 2024. pp. 1-32.
187. Daniels P.S., Jeffries , Yates P., Schild G.C., Rogers G.N., Paulson J.C., Wharton S.A., Douglas A.R., Skehel J.J., Wiley D.C. The receptor-binding and membrane-fusion properties of influenza virus variants selected using anti-haemagglutinin monoclonal antibodies // EMBO J, Vol. 6, No. 5, May 1987. pp. 1459-65.
 188. Narasaraju T., Sim M.K., Ng H.H., Phoon M.C., Shanker N., Lal S.K., Chow V.T.K. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis // Microbes Infect, Vol. 11, No. 1, Jan 2009. pp. 2-11.
 189. Stevens J., Chen L.M., Carney P.J., Garten R., Foust A., Le J., Pokorny B.A., Manojkumar R., Silverman J., Devis R., et al. Receptor specificity of influenza A H3N2 viruses isolated in mammalian cells and embryonated chicken eggs // J Virol, Vol. 84, No. 16, Aug 2010. pp. 8287-99.
 190. Lin Y.P., Wharton S.A., Martín J., Skehel J.J., Wiley D.C., Steinhauer D.A. Adaptation of egg-grown and transfectant influenza viruses for growth in mammalian cells: selection of hemagglutinin mutants with elevated pH of membrane fusion // Virology, Vol. 233, No. 2, Jul 1997. pp. 402-10.
 191. Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhlán D., Malyshev N.A. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells // J Clin Virol, Vol. 45, No. 4, Aug 2009. pp. 322-33.
 192. Parker L., Wharton S.A., Martin S.R., Cross K., Lin Y., Liu Y., Feizi T., Daniels R.S., McCauley J.W. Effects of egg-adaptation on receptor-binding and antigenic properties of recent influenza A (H3N2) vaccine viruses // J Gen Virol, Vol. 97, No. 6, Jun 2016. pp. 1333-1344.
 193. Баженова Е.А., Киселева И.В., Кузнецова А., Федорова А., Руденко Г. ВАКЦИННЫЙ ШТАММ ВИРУСА ГРИППА А/17/Боливия/2013/6585 (H1N1) pdm09 ДЛЯ ТВА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ВЗРОСЛЫХ И ДЛЯ ДЕТЕЙ // Патент РФ 2 605 314 С1 Опубликовано: 20.12.2016 Бюл. № 35.

194. Gustin K.M., Maines T.R., Belser J.A., van Hoeven N., Lu X., Dong L., Isakova-Sivak I., Chen L.M., Voeten J.T.M., Heldens J.G.M., et al. Comparative immunogenicity and cross-clade protective efficacy of mammalian cell-grown inactivated and live attenuated H5N1 reassortant vaccines in ferrets // *J Infect Dis*, Vol. 204, No. 10, Nov 2011. pp. 1491-9.
195. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T.M., Kiseleva I., Heldens J.G.M., van den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N.J., Donis R.O. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) // *Virology*, Vol. 412, No. 2, Apr 2011. pp. 297-305.
196. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *Am. J. Hygiene*, Vol. 27, No. 493, 1938.
197. Hoffmann E., Neumann G., Hobom G., Webster R.G., Kawaoka Y. "Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template // *Virology*, Vol. 267, No. 2, Feb 2000. pp. 310-7.
198. Петухова Г.Д., Найхин А.Н., Баранцева И.Б., Дони́на С.А., Чиркова Т.В., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Локальный гуморальный клеточный иммунный ответ мышей при гриппозной инфекции и вакцинации // *Медицинская Иммунология*, Т. 8, № 4, 2006. С. 511-516.
199. Matyushenko V., Kotomina T., Kudryavtsev I., Mezhen'skaya D., Prokopenko , Matushkina A., Sivak K., Muzhikyan A., Rudenko L., Isakova-Sivak I. Conserved T-cell epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) delivered by recombinant live attenuated influenza vaccine viruses efficiently induce RSV-specific lung-localized memory T cells and augment influenza-specific resident memory T-cell responses // *Antiviral Res*, Vol. 182, Oct 2020. pp. 1-12.
200. Kawaoka Y., Krauss S., Webster R.G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics, Vol. 63, No. 11, Nov 1989. pp. 4603–4608.
201. Rumschlag-Booms E., Guo Y., Wang J., Caffrey M., Rong L. Comparative analysis between a low pathogenic and a high pathogenic influenza H5 hemagglutinin in cell entry // *Virol J*, Vol. 6, No. 76, Jun 2009.
202. Larionova N., Kiseleva I., Isakova-Sivak I., Rekstin A., Dubrovina I., Bazhenova E., Ross T.M., Swayne D., Gubareva L., Tsvetnitsky V., et al. Live

- Attenuated Influenza Vaccines against Highly Pathogenic H5N1 avian Influenza: Development and Preclinical Characterization // *J Vaccines Vaccin*, Vol. 4, No. 204, 2013.
203. Kilbourne E.D. Influenza pandemics of the 20th century // *Emerg Infect Dis*, Vol. 12, No. 1, Jan 2006. pp. 9-14.
 204. Babu T.M., Perera R.A.P.M., Wu J., Fitzgerald T., Nolan C., Cowling B.J., Krauss S., Treanor J.J., Peiris M. Population Serologic Immunity to Human and Avian H2N2 Viruses in the United States and Hong Kong for Pandemic Risk Assessment // *ЖМЭИ*.
 205. Schäfer J., Khristova M.L., Busse T.L., Sinnecker R., Kharitonov I.G., Schrader C., Süss J., Bucher D. Analysis of internal proteins of influenza A (H2N2) viruses isolated from birds in East Germany in 1983 // *Acta Virol*, Vol. 36, No. 2, Mar 1992. pp. 113-20.
 206. Makarova N.V., Kaverin N.V., Krauss S., Senne D., Webster R.G. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America // *J Gen Virol*, Vol. 80, No. 12, Dec 1999. pp. 3167-3171.
 207. Jones J.C., Baranovich T., Marathe B.M., Danner A.F., Seiler J.P., Franks J., Govorkova E.A., Krauss S., Webster R.G. Risk assessment of H2N2 influenza viruses from the avian reservoir // *J Virol*, Vol. 88, No. 2, Jan 2014. pp. 1175-88.
 208. Isakova-Sivak I., de Jonge J., Smolonogina T., Rekstin A., van Amerongen G., van Dijken H., Mouthaan J., Roholl P., Kuznetsova V., Doroshenko E., Tsvetnitsky V., Rudenko L. Development and pre-clinical evaluation of two LAIV strains against potentially pandemic H2N2 influenza virus // *PLoS One*, Vol. 9, No. 7, Jul 2014.
 209. Hegde N.R. Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future // *Hum Vaccin Immunother*, Vol. 11, No. 5, 2015. pp. 1223-34.
 210. Genzel Y., Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines // *Expert Rev Vaccines*, Vol. 8, No. 12, Dec 2009. pp. 1681-92.
 211. An S.H., Son S.E., Song J.H., Hong S.M., Lee C.Y., Lee N.H., Jeong Y.J., Choi J.G., Lee Y.J., Kang H.M., Choi K.S., Kwon H.J. Selection of an Optimal Recombinant Egyptian H9N2 Avian Influenza Vaccine Strain for Poultry with High Antigenicity and Safety // *Vaccines (Basel)*, Vol. 10, No. 2, Jan 2022. P. 162.

212. Barnard K.N., Wasik B.R., Alford B.K., Hayward J.J., Weichert W.S., Voorhees I.E.H., Holmes E.C., Parrish C.R. Sequence dynamics of three influenza A virus strains grown in different MDCK cell lines, including those expressing different sialic acid receptors // *J Evol Biol*, Vol. 34, No. 12, Dec 2021. pp. 1878-1900.
213. de Graaf M., Fouchier R.A.M. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis // *EMBO J*, Vol. 33, No. 8, Apr 2014. pp. 823-41.
214. Rudenko L., Naykhin A., Donina S., Korenkov D., Petukhova G., Isakova-Sivak I., Losev I., Stukova M., Erofeeva M., Nikiforova A., Power M., Flores J. Assessment of immune responses to H5N1 inactivated influenza vaccine among individuals previously primed with H5N2 live attenuated influenza vaccine // *Hum Vaccin Immunother*, Vol. 11, No. 12, 2015. pp. 2839-48.
215. Talaat K.R., Luke C.J., Khurana S., Manischewitz J., King L.R., McMahon B.A., Karron R.A., Lewis K.D.C., Qin J., Follmann D.A., et al. A live attenuated influenza A(H5N1) vaccine induces long-term immunity in the absence of a primary antibody response // *J Infect Dis*, Vol. 209, No. 12, Jun 2014. pp. 1860-9.
216. Pitisuttithum P., Boonnak K., Chamnanchanunt S., Puthavathana P., Luvira V., Lerdsamran H., Kaewkungwal J., Lawpool Sri S., Thanachartwet V., Silachamroon U., et al. Safety and immunogenicity of a live attenuated influenza H5 candidate vaccine strain A/17/turkey/Turkey/05/133 H5N2 and its priming effects for potential pre-pandemic use: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet Infect Dis*, Vol. 17, No. 8, Aug 2017. pp. 833-842.
217. Thompson A.J., Wu N.C., Canales A., Kikuchi C., Zhu X., de Toro B.F., Cañada F.J., Worth C., Wang S., McBride R., et al. Evolution of human H3N2 influenza virus receptor specificity has substantially expanded the receptor-binding domain site // *Cell Host Microbe*, Vol. 32, No. 2, Feb 2024. pp. 261-275.
218. Allen J.D., Ross T.M. H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation // *Hum Vaccin Immunother*, Vol. 14, No. 8, 2018. pp. 1840-1847.
219. Liu M., Bakker A.S., Narimatsu Y., van Kuppeveld F.J.M., Clausen H., de Haan C.A.M., de Vries E. H3N2 influenza A virus gradually adapts to human-type receptor binding and entry specificity after the start of the 1968 pandemic // *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 120, No. 31, Aug 2023.

220. Martin E.T., Cheng C., Petrie J.G., Alyanak E., Gaglani , Middleton D.B., Ghamande S., Silveira F.P., Murthy K., Zimmerman R.K., et al. Low Influenza Vaccine Effectiveness Against A(H3N2)-Associated Hospitalizations in 2016-2017 and 2017-2018 of the Hospitalized Adult Influenza Vaccine Effectiveness Network (HAIVEN) // *J Infect Dis*, Vol. 233, No. 12, June 2021. pp. 2062-2071.
221. Rondy M., Gherasim A., Casado I., Launay O., Rizzo C., Pitigoi D., Mickiene A., Marbus S.D., Machado A., Syrjänen R.K., et al. Low 2016/17 season vaccine effectiveness against hospitalised influenza A(H3N2) among elderly: awareness warranted for 2017/18 season // *Euro Surveill*, Vol. 22, No. 41, Oct 2017. pp. 17-00645.
222. Kissling E., Pozo F., Buda S., Vilcu A.M., Gherasim A., Brytting M., Domegan L., Gómez V., Meijer A., Lazar M., et al. Low 2018/19 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) among 15-64-year-olds in Europe: exploration by birth cohort // *Euro Surveill*, Vol. 24, No. 48, Nov 2019.
223. Pandey A., Singh N., Sambhara S., Mittal S.K. Egg-independent vaccine strategies for highly pathogenic H5N1 influenza viruses // *Hum Vaccin*, Vol. 6, No. 2, Feb 2010. pp. 178-88.
224. Greene J.L. Congressional Research Service // Update on the Highly-Pathogenic Avian Influenza Outbreak of 2014-2015. Washington, D.C. 2015. pp. 1-15.
225. Даниленко Д.М., Комиссаров А.Б., Передерий А.А., Фадеев А.В., Лиознов Д.А. Высокопатогенный грипп Н5: риски формирования нового пандемического штамма // *Журнал инфектологии*, Т. 15, № 4, 2023. С. 14-24.
226. WHO. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2024, 12 December 2024 // available at [https://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a\(h5n1\)-reported-to-who--2003-2024--20-december-2024](https://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a(h5n1)-reported-to-who--2003-2024--20-december-2024), Dec 2024. pp. 1-4.
227. Zhang Z., Jiang Z., Deng T., Zhang J., Liu B., Liu J., Qiu R., Zhang Q., Li X., Nian X., et al. Preclinical immunogenicity assessment of a cell-based inactivated whole-virion H5N1 influenza vaccine // *Open Life Sci*, Vol. 17, No. 1, Sep 2022. pp. 1282-1295.

228. Kiseleva I., Larionova N., Rudenko L. Live Attenuated Reassortant Vaccines Based on A/Leningrad/134/17/57 Master Donor Virus Against H5 Avian Influenza // Open Microbiol J, Vol. 30, No. 11, Nov 2017. pp. 316-329.
229. Kiseleva I., Dubrovina I., Fedorova E., Larionova N., Isakova-Sivak I., Bazhenova E., Pisareva M., Kuznetsova V., Flores J., Rudenko L. Genetic stability of live attenuated vaccines against potentially pandemic influenza viruses // Vaccine, Vol. 33, No. 49, Dec 2015. pp. 7008-14.
230. Yeolekar L.R., Guilfoyle K., Ganguly M., Tyagi P., Stittelaar K.J., van Amerongen G., Dhere R.M., BerlandaScorza F., Mahmood K. Immunogenicity and efficacy comparison of MDCK cell-based and egg-based live attenuated influenza vaccines of H5 and H7 subtypes in ferrets // Vaccine, Vol. 38, No. 40, Sep 2020. pp. 6280-6290.
231. WHO. Avian Influenza Weekly Update Number 993 // available at https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai_20250411-erratum.pdf?sfvrsn=4c458559_1&download=true, Apr 11 2025.
232. Skowronski D.M., Sabaiduc S., Chambers C., Eshaghi A., Gubbay J.B., Krajden M., Drews S.J., Martineau C., De Serres G., Dickinson J.A., et al. Mutations acquired during cell culture isolation may affect antigenic characterisation of influenza A(H3N2) clade 3C.2a viruses // Euro Surveill, Vol. 21, No. 3, 2016. P. 30112.
233. Chambers B.S., Parkhouse K., Ross T.M., Alby K., Hensley S.E. Identification of Hemagglutinin Residues Responsible for H3N2 Antigenic Drift during the 2014-2015 Influenza Season // Cell Rep, Vol. 12, No. 1, Jul 2015. pp. 1-6.
234. Melidou A., Gioula G., Exindari M., Ioannou E., Gkolfinopoulou K., Georgakopoulou T., Tsiodras S., Papa A. Influenza A(H3N2) genetic variants in vaccinated patients in northern Greece // J Clin Virol, Vol. 94, Sep 2017. pp. 29-32.
235. Rudneva I., Ignatieva A., Timofeeva T., Shilov A., Kushch A., Masalova O., Klimova R., Bovin N., Mochalova L., Kaverin N. Escape mutants of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus: variations in antigenic specificity and receptor affinity of the hemagglutinin // Virus Res, Vol. 166, No. 1-2, Jun 2012. pp. 61-7.
236. Shen J., Ma J., Wang Q. Evolutionary trends of A(H1N1) influenza virus hemagglutinin since 1918 // PLoS One, Vol. 4, No. 11, Nov 2009.

237. Shin D., Park K.J., Lee H., Cho E.Y., Kim M.S., Hwang M.H., Kim S.I., Ahn D.H. Comparison of immunogenicity of cell-and egg-passaged viruses for manufacturing MDCK cell culture-based influenza vaccines // *Virus Res*, Vol. 204, Jun 2015. pp. 40-6.
238. Jakubcová L., Vozárová M., Hollý J., Tomčíková K., Fogelová M., Polčicová K., Kostolanský F., Fodor E., Varečková E. Biological properties of influenza A virus mutants with amino acid substitutions in the HA2 glycoprotein of the HA1/HA2 interaction region // *J Gen Virol*, Vol. 100, No. 9, Sep 2019. pp. 1282-1292.