

МАТЮШЕНКО
Виктория Аркадьевна

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

1.5.10 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Институт экспериментальной медицины»

Научный руководитель: **Исакова-Сивак Ирина Николаевна**
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН,
заместитель директора по научной работе ФГБНУ
«Институт экспериментальной медицины»

Официальные оппоненты: **Свитич Оксана Анатольевна**
доктор медицинских наук, академик РАН, профессор,
директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им И.И. Мечникова»

Ильичева Татьяна Николаевна
доктор биологических наук, доцент, ведущий научный
сотрудник отдела зоонозных инфекций и гриппа,
профессор кафедры молекулярной биологии и
биотехнологии Новосибирского государственного
университета

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт
Петербургский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Защита диссертации состоится 23 декабря 2025 года в 13 часов 00 минут на заседании
диссертационного совета ДС 21.1.017.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»
Минздрава России по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17,
Тел.: 8 (812) 499 15 00;

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им.
А.А. Смородинцева» Минздрава РФ и на сайте <https://www.influenza.spb.ru/>

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2025 года

Ученый секретарь Диссертационного совета Д 21.1.017.01 кандидат
биологических наук Амосова И.В.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Bardiya et al., 2005; Rudenko et al., 1993). 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 (WHO, 2006).

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 (Taaffe et al., 2025). 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 (HA) 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 $\alpha 2,6$ (Matrosovich et al., 2000). 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 (Barr et al., 2018). Одной из причин недостаточной эффективности вакцин является возникновение адаптационных мутаций в молекуле НА вирусов А(H3N2) при их пассировании в куриных эмбрионах (Wu et al., 2017). 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 (Connors et al., 1994). 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 гемагглютинина (Pappas et al., 2010; Xu et al., 2010). В 1968 году в Гонгконге появился вирус А(H3N2), гемагглютинин которого также адаптировался от птичьего типа сиалового рецептора к человеческому, и в начале пандемии обнаруживалась социркуляция вирусов с различной рецепторной специфичностью (Matrosovich et al., 2010). 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 гемагглютинина Q226L является необходимой для переключения рецепторной специфичности вируса гриппа (Ma et al., 2007; Kageyama et al., 2013; Guan et al., 2019), 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 (Manini et al., 2015; Buncher et al., 2019). Ключевыми коммерческими производителями клеточных вакцин для профилактики сезонного гриппа являются CSL Seqirus (Flucelvax Quadrivalent/Tetra) и SK Bioscience (SKYCellflu) (Hamamoto et al., 2024). Начиная с сезона

гриппа 2019/2020 гг. все штаммы четырехвалентного препарата «Flucelvax» были выделены и наработаны исключительно в линии клеток MDCK 33016-PF (Peck et al., 2021).

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 и др., 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 (Мазуркова и др., 2011). 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 (Нечаева и др., 2013; Nechaeva et al., 2011). 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 данного исследования – обоснование целесообразности применения штаммов, подготовленных в развивающихся куриных эмбрионах, для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток MDCK.

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 A(H1N1), A(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

Впервые проведена всесторонняя характеристика антигенно схожих вирусов гриппа A(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 A(H2N2) носит характер escape-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 гемагглютинаина. Учитывая, что рецепторная специфичность гемагглютинаина 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 HA 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

1. Адаптация штаммов живой гриппозной вакцины и эпидемических/пандемических вирусов гриппа к культуре клеток MDCK не меняет их рецепторную специфичность. При этом вирусы А(Н2N2) с рецепторной специфичностью $\alpha 2,3$ индуцируют антитела с более широким антигенным охватом по сравнению с вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2,6$.
2. 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.

3. 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.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. В работе были использованы эпидемические, пандемические, потенциально пандемические и вакцинные штаммы вирусов гриппа, включая: А/Сингапур/1/57 (H2N2), 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/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» (Новосибирск).

Плазмидные ДНК. Набор из восьми плазмидных ДНК с двунаправленным считыванием, кодирующих все сегменты донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), ранее был подготовлен д.б.н. Исаковой-Сивак И.Н.

Куриные эмбрионы. Для накопления вирусных стоков и определения их инфекционной активности были использованы 10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы из АО "Птицефабрика Синявинская" (Россия, Ленинградская обл.).

Лабораторные животные. В работе использовались мыши линии СВА и крысы линии «Вистар», поставляемые из питомника лабораторных животных Филиала НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ - ПЛЖ «Рапполово». Самки сирийских хомячков были получены из Филиала "Столбовая" ФГБУН "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства" России (Московская обл.). 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).

Методы обратной генетики. Подготовка генно-инженерных вакцинных штаммов ЖГВ осуществлялась согласно методикам, описанным в публикации (Isakova-Sivak et al., 2011). Клонирование генов вирусов в векторы для обратной генетики проводилось с использованием универсальных пар праймеров, специфичных для каждого гена (Hoffmann et al., 2001). Нуклеотидные последовательности всех генов определялись с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 3130xl. Жизнеспособные вирусы гриппа были получены при помощи электропорации клеток Vero с использованием

электропоратора Neon (Invitrogen, США) и прилагающегося к нему набора Neon Kit 100 мкл.

Культивирование вирусов гриппа. Для накопления вирусы гриппа культивировались в 10-11-дневных РКЭ при температуре 33°C-37°C в течение 48-72 часов, либо в культуре клеток MDCK в среде DMEM с добавлением антибиотика-антимикотика и 1 мкг/мл трипсина ТРСК. Инфекционные титры вирусов рассчитывались по методу Рида и Мэнча и выражали в lg ЭИД₅₀/мл.

Адаптация вакцинных штаммов к культуре клеток MDCK осуществлялась посредством пяти последовательных пассажей с последующим клонированием методом бляшек. С этой целью проводилось титрование адаптированных вирусов десятикратными серийными разведениями в 6-луночных планшетах, которые инкубировались в течение 72-96 часов под агарозовым покрытием, состоящем из равных объемов двукратной среды DMEM и 1,6% агарозы, с добавлением антибиотика/антимикотика и ТРСК-трипсина в конечной концентрации 1 мкг/мл. На 3-5 сутки визуализировались и отбирались 20-30 индивидуальных вирусных бляшек на предельных разведениях. Из каждой выделенной бляшки изолировался отдельный клон вируса, который затем накапливался на культуре клеток MDCK и секвенировались гены поверхностных белков методом Сэнгера с использованием автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 3130xl.

Исследование рецепторной специфичности вирусов гриппа проводилось в реакции гемагглютинации (РГА) с использованием (i) лошадиных эритроцитов, несущих на своей поверхности только рецепторы типа $\alpha 2,3$; (ii) необработанных куриных эритроцитов, несущих оба типа рецепторов; и (iii) куриных эритроцитов, обработанных ферментом экзосиалидазой, который отщепляет с поверхности эритроцитов рецепторы типа $\alpha 2,3$, оставляя только рецепторы типа $\alpha 2,6$.

Получение гипериммунных сывороток животных. Для получения гипериммунных сывороток против вирусов гриппа был использован одинаковый протокол иммунизации крыс и мышей. 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 адъюванта Фрейнда подкожно в холку в объеме 100 мкл/мышь или 1 мл/крысу, соотношение вируса и адъюванта 1:1. Через неделю после последней иммунизации проводили тотальный забор крови, из которой получали гипериммунную сыворотку.

Эксперименты на лабораторных животных. Для оценки иммуногенности вирусов гриппа с различной рецепторной специфичностью и MDCK-адаптированных вакцинных штаммов были использованы мыши линии СВА или сирийские хомячки, которых заражали интраназально вирусами в дозе $10^5 - 10^6$ lg ЭИД₅₀. На третий день у мышей проводился забор носовых ходов и легких для определения инфекционного титра вируса в тканях. Для исследования иммуногенности и защитной эффективности вакцинных штаммов проводилась ревакцинация животных на 21^й день после начала эксперимента, а на 42^й день у животных собирались сыворотки крови и смывы верхних и нижних дыхательных путей для определения гуморального иммунного ответа. Дополнительно проводилось заражение иммунизированных мышей диким вирусом в дозе 10^6 lg ЭИД₅₀ с последующим мониторингом выживаемости в течение 2 недель.

Иммунологические тесты. Гуморальный иммунный ответ оценивался в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментном анализе (ИФА) в соответствии

со стандартизированными протоколами с применением очищенных цельных вирусов гриппа в качестве антигенов.

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

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

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Адаптация вирусов гриппа A(H2N2) с различной рецепторной специфичностью к клеткам MDCK.

Вирусы гриппа A(H2N2) циркулировали в человеческой популяции с 1957 по 1968 гг., после чего они были вытеснены вирусами A(H3N2), вызвавшими пандемию «гонконгского» гриппа (Kilbourne et al., 2006). Поскольку вирусы A(H2N2) 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 A(H2N2) в циркуляцию (Babu et al., 2018). Тем не менее, в литературе отсутствуют четкие данные о том, какие именно вирусы лучше использовать для подготовки вакцин в начале пандемии, вызванной реассортацией вирусов гриппа птиц и человека, и обладающих сродством к обоим типам клеточных рецепторов.

Два варианта пандемического штамма A/Сингапур/1/57 (H2N2), восстановленные из музейного лиофилизированного материала, отличались уровнем чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови морской свинки. Полногеномное секвенирование показало, что в субъединице HA1 присутствуют аминокислотные отличия в позициях 156 (E/K), 226 (Q/L) и 228 (G/S) (Таблица 1). По данным литературы замены в позициях 226 и 228 отвечают за рецепторную специфичность вируса гриппа (Connog et al., 1994; Matrosovich et al., 2000). Оценка сродства этих вирусов к рецепторам на поверхности эритроцитов в РГА с различными типами эритроцитов подтвердила данные литературы. После адаптации исследуемых вирусов к культуре клеток MDCK было выделено 3 дополнительных варианта вирусов с отличающимися последовательностями HA: Sing- α 2,6-EP с мутациями G158E и L321P в субъединице HA1, Sing- α 2,3-S с мутацией P221S в субъединице HA1 и Sing- α 2,3-V с мутацией A96V в субъединице HA2 (Таблица 1).

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

Вirus	HA						
	HA1						HA2
	156	158	221	226	228	321	96
Sing- α 2,6	Lys	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala
Sing- α 2,3	Glu	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Ala
Sing- α 2,6-EP	Lys	Glu	Pro	Leu	Ser	Pro	Ala
Sing- α 2,3-S	Glu	Gly	Ser	Gln	Gly	Leu	Ala
Sing- α 2,3-V	Glu	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Val

Изучение MDCK-адаптированных вариантов в РГА с различными типами эритроцитов показало, что адаптация «диких» вирусов гриппа A(H2N2) к культуре клеток млекопитающих не оказывает существенного влияния на их рецепторную специфичность (Рисунок 1А). Кроме того, было показано, что вирус Sing- α 2,3 в среднем на два порядка лучше размножался в системе РКЭ, чем вирус Sing- α 2,6, при этом их титры в культуре клеток MDCK были сопоставимы (Рисунок 1Б). Важно отметить, что инфекционная активность MDCK-адаптированных вариантов в культуре клеток была значительно выше, чем у соответствующих исходных вирусов. Таким образом, отмечен вклад мутаций G158E и L321P, P221S в субъединице HA1 и A96V в субъединице HA2 в увеличение инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK (Рисунок 1Б).

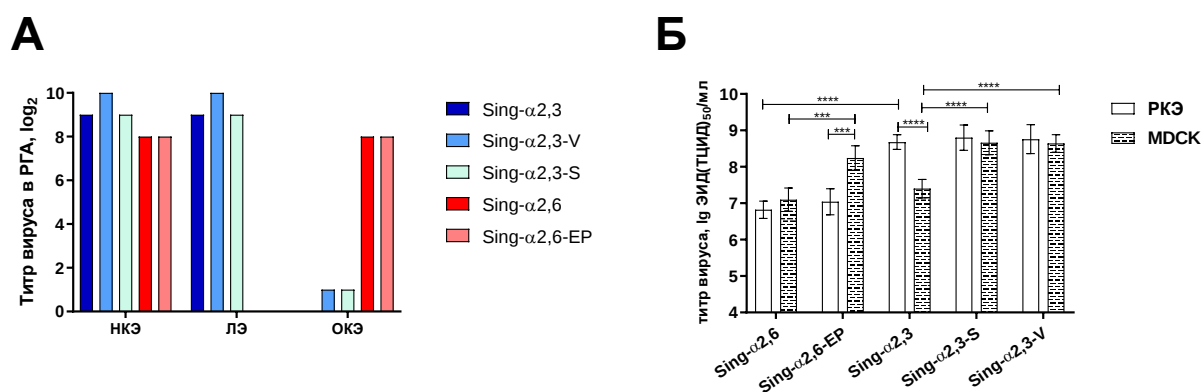


Рисунок 1. Характеристика исследуемых вирусов A(H2N2) *in vitro*. **А.** Титры вирусов в реакции гемагглютинации с необработанными куриными эритроцитами (НКЭ), лошадиными эритроцитами (ЛЭ), а также куриными эритроцитами, обработанных экзосиалидазой (ОКЭ). **Б.** Инфекционная активность исследуемых вирусов в системе РКЭ и культуре клеток MDCK.

Иммунизация мышей линии СВА исходными штаммами Sing- α 2,6 и Sing- α 2,3, а также MDCK-адаптированными вариантами приводила к образованию более высоких уровней гомологичных сывороточных антител у вирусов Sing- α 2,6 и Sing- α 2,6-EP по сравнению с вирусами, имеющими сродство к рецепторам α 2,3 (Рисунки 2А и 2Б). При этом адаптированные к клеткам варианты Sing- α 2,3-S и Sing- α 2,3-V индуцировали значительно меньшие уровни гомологичных сывороточных IgG антител по сравнению с исходным вариантом Sing- α 2,3 (Рисунок 2Б). Исследование местного гуморального иммунного ответа показало существенные приросты секреторных IgA антител у всех исследуемых вирусов (Рисунок 2В).

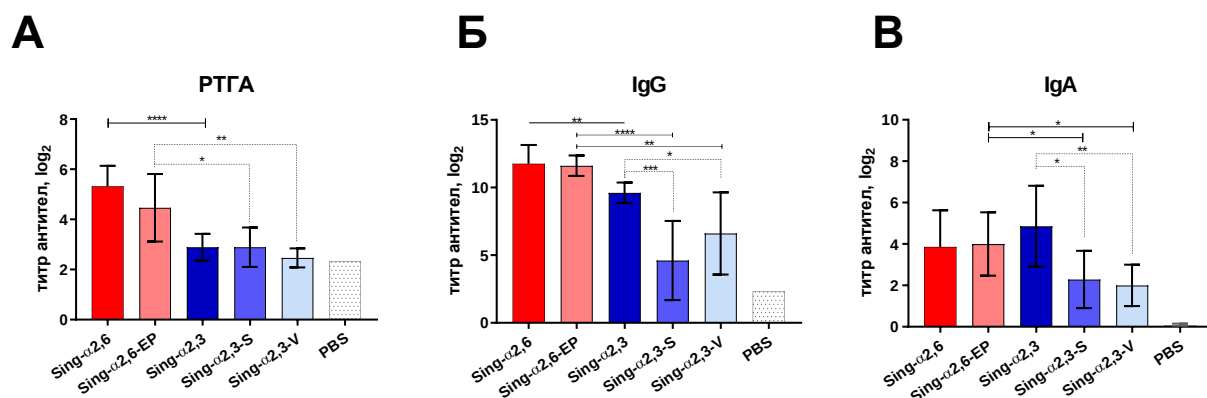


Рисунок 2. Оценка гуморального иммунного ответа на однократное введение исследуемых вирусов мышам линии СВА. **А.** Уровень гомологичных сывороточных антител, выявляемых в реакции торможения гемагглютинации. **Б.** Уровень гомологичных сывороточных IgG антител в иммуноферментном анализе. **В.** Уровень гомологичных секреторных IgA антител в ИФА.

Оценка кросс-реактивности сывороточных антител, выработанных при введении пяти исследованных вариантов вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2), в отношении каждого варианта в РТГА и ИФА показала, что вирусы с рецепторной специфичностью α2,6 в качестве антигенов выявляли наиболее высокие значения титров антител во всех группах, тогда как связывание антител с вирусами с рецепторной специфичностью α2,3 было значительно слабее у животных всех групп (Рисунок 3). Было показано, что антитела, формируемые на иммунизацию вариантами вирусов с рецепторной специфичностью α2,3, обладали более широким спектром реактивности в отношении всех исследованных антигенов, при этом замену P221S в субъединице HA1 можно охарактеризовать как escape-мутацию, поскольку вирус Sing-α2,3-S наиболее эффективно «ускользает» от распознавания антителами у всех исследованных вариантов иммуногенов (Рисунок 3). Интересно, что аналогичная мутация была описана для вирусов гриппа птиц подтипа H9N2, при этом она снижала сродство вируса к аналогу птичьего рецептора α2,3, но в комбинации с мутацией L226Q сродство к данному типу рецептора восстанавливалось, что полностью совпадает с нашими результатами (An et al., 2022). 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 (Barnard et al., 2021).

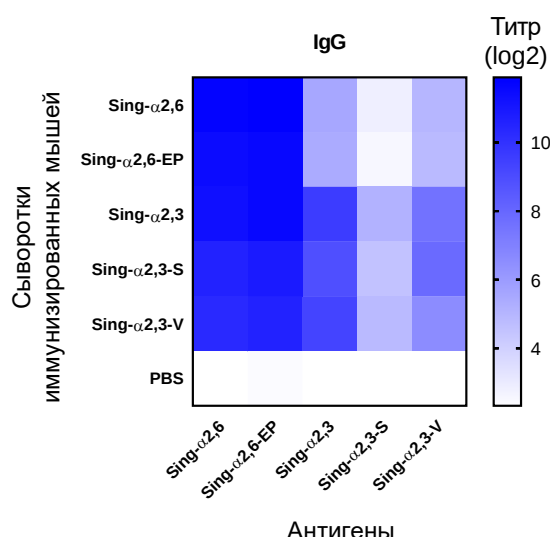


Рисунок 3. «Тепловая карта» иммуногенности и кросс-реактивности исследуемых вариантов вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2) в эксперименте на мышах (n=7). Средние значения уровней сывороточных IgG антител, определенных методов ИФА, у всех иммунизированных групп в отношении различных вирусных антигенов.

Исследование рецепторной специфичности вакцинных штаммов подтвердило ее идентичность диким родительским вирусам, что еще раз подтверждает ключевую роль гемагглютинина в связывании с гликановыми рецепторами клетки-хозяина. Оценка инфекционной активности сконструированных вирусов показала, что вакцинные штаммы 17/Sing-α2,3 и 17/Sing-α2,6 одинаково хорошо размножались в культуре клеток MDCK, тогда как в РКЭ вирус 17/Sing-α2,3 имел инфекционный титр на порядок выше, чем у вируса 17/Sing-α2,6 (Рисунок 4).

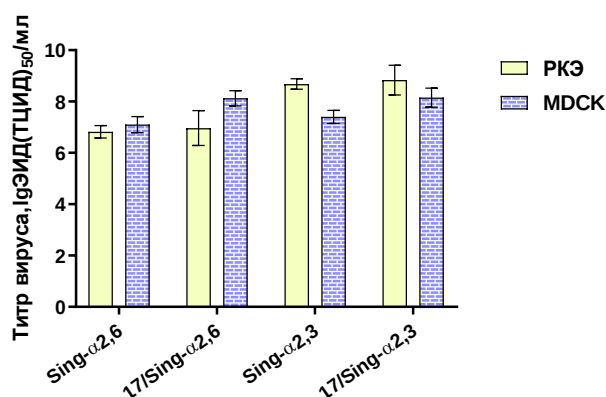


Рисунок 4. Инфекционная активность исследуемых вирусов А(H2N2) в системе РКЭ и культуре клеток MDCK.

Важно отметить, что обнаруженные мутации не повлияли на рецепторную специфичность вирусов. В целом, полученные результаты указывают на то, что для производства клеточной пандемической вакцины А(H2N2) наиболее подходящими вирусами являются варианты с рецепторной специфичностью α2,3, адаптированные к культуре клеток MDCK или выделенные на ней, поскольку они индуцируют антитела, способные связываться с вирусами с любой рецепторной специфичностью.

Для подтверждения этой гипотезы методами обратной генетики были сконструированы два штамма живой гриппозной вакцины подтипа H2N2 на основе донора аттенуации Лен/17: 17/Sing-α2,3 и 17/Sing-α2,6, которые содержали гены НА и NA от соответствующих диких вирусов.

Далее было проведено серийное пассирование реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ 17/Sing-α2,3 и 17/Sing-α2,6 в культуре клеток MDCK с последующей идентификацией возможных аминокислотных замен в молекуле НА. Однако секвенирование всех изолированных клонов показало отсутствие адаптационных мутаций, что указывает на стабильность вакцинных вирусов А(H2N2), полученных генно-инженерным путем.

Двукратная иммунизация сирийских хомячков генно-инженерными вакцинными штаммами 17/Sing- α 2,3 и 17/Sing- α 2,6 приводила к формированию у животных схожих уровней сывороточных IgG антител, связывающихся с антигеном Sing- α 2,3, при этом вакцинный вирус 17/Sing- α 2,3 индуцировал достоверно более высокие уровни антител к антигену Sing- α 2,6, чем к собственному антигену Sing- α 2,3 (Рисунок 5). Полученные результаты полностью согласуются с результатами изучения антигенности пандемических вариантов A/Сингапур/1/57 в эксперименте на мышах (Рисунок 3). Также было проведено исследование кросс-реактивности локальных IgA антител в смывах верхних и нижних дыхательных путей в ИФА с теми же вирусными антигенами. Было показано, что использование вируса Sing- α 2,6 в качестве антигена позволяет выявлять существенно более высокие уровни секреторных вирусспецифических антител по сравнению с использованием в качестве антигена вируса Sing- α 2,3 (Рисунок 5).

Рисунок 5. Оценка гуморального иммунного ответа на двукратное введение исследуемых вакцинных штаммов ЖГВ сирийским хомячкам. В левом столбце представлены значения ОП₄₅₀ при различных разведениях сывороток или смывов ВДП и БАЛ к вирусу Sing-α2,3 в ИФА. В центральном столбце представлены значения ОП₄₅₀ при различных разведениях сывороток или смывов ВДП и БАЛ к вирусу Sing-α2,6 в ИФА. В правом столбце приведены значения площади под кривой ОП₄₅₀ в ИФА с соответствующим антигеном.

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 случае пандемии.

Несмотря на то, что выдвинутая гипотеза нашла экспериментальное подтверждение на моделях различных животных, для потенциального широкого применения штамма ЖГВ 17/Sing- α 2,3 среди людей требуется изучение его иммуногенности и кросс-реактивности в клинических испытаниях. Одним из препятствий к использованию штамма ЖГВ 17/Sing- α 2,3 в клинической практике может служить потенциально сниженная репликативная активность вируса в верхних дыхательных путях людей, поскольку у людей рецепторы типа α 2,3 слабо представлены в ВДП и преимущественно экспрессируются в нижних отделах респираторного тракта (de Graaf et al., 2014), 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 α 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 (Rudenko et al., 2015; Talaat et al., 2014). 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.

2.2. Стабильность свойств вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK в лабораторном и производственном масштабах.

Адаптация вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H5N1 и H7N9 к культуре клеток MDCK

В настоящее время ряд подтипов вируса гриппа А признаны потенциально пандемическими, однако, на протяжении последних двух десятилетий наиболее опасными считаются подтипы H5N1 и H7N9 (Даниленко и др., 2023; Kageyama et al., 2013). Ряд исследований по адаптации к хорькам вирусов гриппа A(H5N1) показали возможность постепенной смены рецепторной специфичности таких вирусов с птичьего рецептора на человеческий, либо увеличения сродства к человеческому типу рецепторов α 2,6, однако в природе до сих пор таких изменений не произошло (Herfst, 2012; Yamada, 2006; Peng, 2018).

H5N1. Предложенная стратегия ВОЗ для борьбы с вероятной пандемией птичьего гриппа заключается в подготовке вакцинных штаммов против наиболее вероятных возбудителей будущей пандемии. Так, в Китае была разработана и успешно прошла доклинические испытания культуральная цельновирионная инактивированная вакцина против гриппа A(H5N1) (Zhang et al., 2015). В отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» на основе штамма NIBRG-23 для инактивированной гриппозной вакцины, гемагглютинин и нейраминидаза которого соответствовали дикому вирусу гриппа А/индюк/Турция/1/2005 (H5N1), был получен штамм ЖГВ А/17/индюк/Турция/2005/133 (H5N2) (**Тип17**) с

вакциной формулой генома 7:1 (Kiseleva et al., 2017; Larionova et al., 2013). При адаптации штамма Typ17 к культуре клеток MDCK во всех выделенных клонах данного вируса был обнаружен одинаковый набор мутаций R145K в HA1 и R68K в HA2 (Таблица 2). Те же мутации были идентифицированы в двух изолятах от волонтеров из фазы I клинических испытаний ЖГВ H5N2, а также был обнаружен изолят с дополнительной мутацией E147K в HA2 (Kiseleva et al., 2015; Rudenko et al., 2015).

Таблица 2. Мутации, обнаруженные в гемагглютинине MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Typ17.

Субъединица гемагглютинина	Аминокислотная позиция	Исходный вирус Typ17	Клоны, адаптированные к MDCK	Клоны, полученные из изолятов	
			Typ17-1	B1	A5
HA1	145	Arg	Lys	Lys	Lys
HA2	68	Arg	Lys	Lys	Lys
	147	Glu	Glu	Glu	Lys

Поскольку аргинин и лизин являются структурно похожими аминокислотами, данные замены не повлияли на антигенные свойства вакцинного штамма. Это было подтверждено в исследованиях кросс-реактивности и иммуногенности MDCK-адаптированного варианта Typ17-1. Также в клинических испытаниях не было выявлено отличий в иммунных ответах волонтеров, у которых были выделены данные мутации (Rudenko et al., 2015). Однако, по результатам исследования было показано, что обнаруженные мутации повлияли на инфекционную активность штаммов Typ17 и Typ17-1 (Рисунок 6), что требует дальнейших исследований.

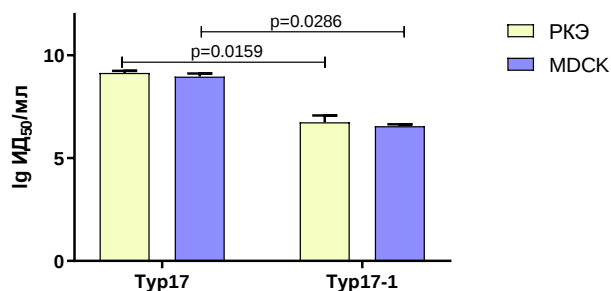


Рисунок 6. Репродукция вакцинных штаммов Typ17, Typ17-1 в различных системах культивирования.

H7N9. Заражение человека вирусами гриппа подтипа H7N9 впервые было зафиксировано в марте 2013 года, официальная статистика смертности составляет 39%, а последний известный случай инфицирования произошел в 2019 году (WHO, 2025). Несмотря на это, пандемический потенциал вируса гриппа A(H7N9) считается высоким, поскольку рецепторная специфичность штаммов начала меняться в естественных условиях циркуляции вируса (Kageyama et al., 2013). Ситуация, когда происходит социркуляция штаммов с различной рецепторной специфичностью в начале пандемической волны, крайне схожа с началом пандемии 1957 года, когда социркулировали штаммы Sing- α 2,3 и Sing- α 2,6.

Для подготовки к пандемии гриппа А(Н7N9) ВОЗ рекомендовала готовить вакцинные штаммы для ИГВ и ЖГВ на основе штамма А/Ануи/1/2013. Соответственно, в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» методом классической реассортации был получен штамм ЖГВ А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9) (**Ануи17**) и проведена фаза I клинических испытаний (Rudenko et al., 2016). В ходе этих испытаний было показано, что ЖГВ безопасна и высокоиммуногенна, при этом вакцинный штамм активно выделялся у волонтеров в первые дни после иммунизации, а у двух волонтеров была обнаружена мутация L68F в HA2 на 2й и 3й дни после иммунизации (Rudenko et al., 2016).

После адаптации штамма Ануи17 к культуре клеток MDCK были выявлены два клона, имеющие аминокислотные отличия в молекуле гемагглютинина по сравнению с исходным вирусом, накопленным в РКЭ (Таблица 3).

Таблица 3. Мутации, обнаруженные в молекуле гемагглютинине MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Ануи17 и изолятах, выделенных в фазе I клинических испытаниях от волонтеров.

Субъединица гемагглютинина	Аминокислотная позиция	Исходный вирус	Клоны, адаптированные к MDCK		Клон, полученный из изолятов
		Ануи17	Ануи17-3	Ануи17-5	V18, V19
HA1	278	Ser	Asn	Ser	Ser
	285	Asn	Asn	Lys	Asn
HA2	69	Phe	Leu	Phe	Phe
	68	Leu	Leu	Leu	Phe

Обнаруженные мутации не повлияли на репродукцию Ануи17 в обеих системах культивирования (Рисунок 7), а также их рецепторную специфичность и иммуногенность на модели мышей, что говорит о высокой стабильности штамма Ануи17 для живой гриппозной вакцины.

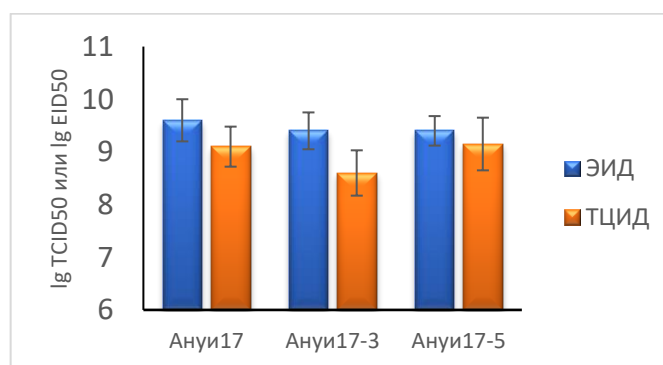


Рисунок 7. Репродукция вакцинных штаммов Ануи17, Ануи17-3 и Ануи17-5 в различных системах культивирования.

Адаптация вакцинных штаммов подтипов H1N1 и H3N2 к культуре клеток MDCK в лабораторных условиях

H1N1. В результате проведения серийного пассирования вакцинного штамма A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) (**Калиф17**) в культуре клеток MDCK были обнаружены 3 варианта с различным набором мутаций: N156D в HA1, A44V в HA2, либо обе мутации одновременно (Таблица 4).

Таблица 4. Мутации, обнаруженные в молекуле гемагглютинина MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Калиф17.

Субъединица гемагглютинина	Аминокислотная позиция	Исходный вирус Калиф17	Клоны, адаптированные к MDCK		
			Калиф17-1 (9 клонов)	Калиф17-4 (7 клонов)	Калиф17-8 (3 клон)
HA1	156	Asn	Asp	Asn	Asp
HA2	44	Ala	Ala	Val	Val

Исследование ростовых характеристик исходного штамма Калиф17 и его MDCK-адаптированных вариантов показало, что репродукция исходного вируса Калиф17 на различных субстратах отличалась почти на два порядка (Рисунок 8). При этом мутация A44V в HA2 положительно повлияла на репликацию вакцинного штамма Калиф17 в культуре клеток MDCK (варианты Калиф17-4), а сцепка обеих обнаруженных мутаций (вариант Калиф17-8) позволила сохранить инфекционный титр в РКЭ, а также увеличить репродукцию в клеточной культуре.

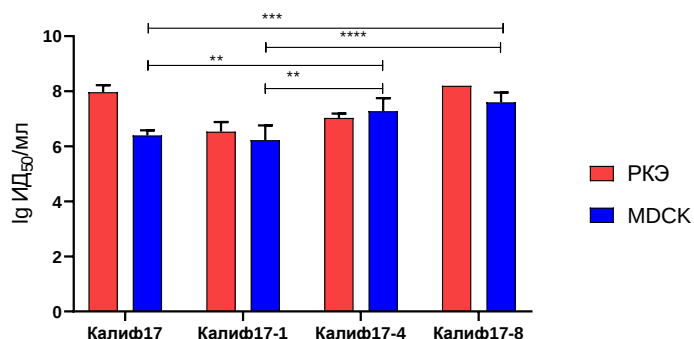


Рисунок 8. Инфекционная активность вакцинного штамма ЖГВ A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) и его MDCK-адаптированных вариантов в развивающихся куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK.

Важно отметить, что изолированные после клонирования методом бляшек варианты вируса Калиф17, имеющие одну из двух мутаций, при последующем накоплении в культуре клеток MDCK приобретали обе мутации – A44V в HA2 и N156D в HA1, становясь идентичными по аминокислотному составу варианту Калиф17-8. Этот феномен говорит о том, что эти две мутации сильно ассоциированы с адаптацией вируса к клеточной линии млекопитающих, но при этом исходное пятикратное пассирование не полностью заменило соответствующие аминокислоты в гетерогенной популяции вируса. Результаты эксперимента по иммуногенности и протективной активности вирусов на мышах, где исследовались штамм Калиф17-8 и исходный вирус Калиф17, показали отсутствие

негативного влияния обнаруженных адаптационных мутаций A44V в HA2 и N156D в HA1 на иммуногенность живой гриппозной вакцины A(H1N1pdm09) (Рисунок 9).

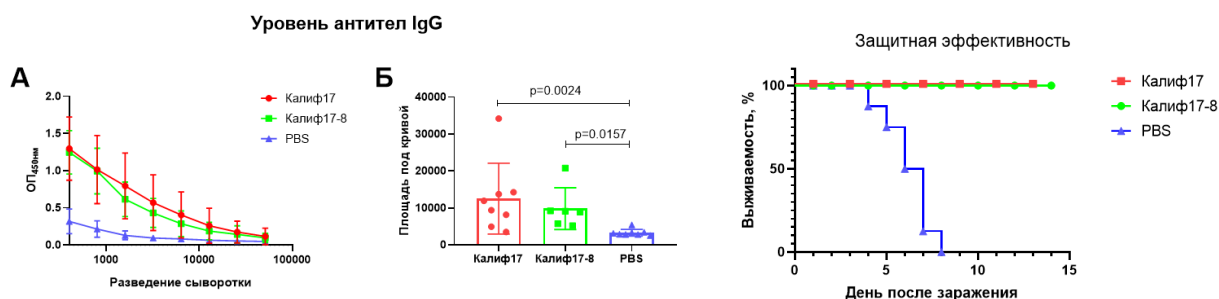


Рисунок 9. Иммуногенность и протективная активность вакцинного штамма A(H1N1pdm09), полученного в РКЭ, и его аналога, адаптированного к культуре клеток MDCK, в эксперименте на мышах линии СВА. **А.** График зависимости оптической плотности от разведения сывороток в иммуноферментном анализе. **Б.** Расчет площади под кривой по данным графика А. **В.** Уровень выживаемости иммунизированных и контрольных мышей после экспериментального заражения летальным вирусом А/Калифорния/09/07 МА.

Кросс-реактивность антител, индуцируемых MDCK-адаптированным вариантом Калиф17-8 и вакцинным штаммом Калиф17, оценивалась в реакции торможения гемагглютинации по классической методике. Было показано, что адаптационные мутации не повлияли на способность продуцируемых антител связывать исходный вариант гемагглютинина штамма А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09), что полностью согласуется с данными по иммуногенности, представленными выше.

Н3N2. В работе был использован вакцинный штамм А/17/Техас/12/30 (H3N2) (**Tex17**), содержащий гены гемагглютинина и нейраминидазы от эпидемического вируса гриппа А/Техас/50/2012 (H3N2). После адаптации Tex17 к культуре клеток MDCK у ряда клеточных клонов были обнаружены различные аминокислотные отличия в молекуле гемагглютинина (Таблица 5).

В молекуле гемагглютинина MDCK-адаптированных клонов вакцинного штамма Tex17 не было найдено общих комбинаций мутаций, но были отмечены часто встречающиеся аминокислотные замены: V176I, P215T, P221S и D265E в HA1. Также были выявлены одиночные мутации: R301K в HA1, D79N, D79G, Y83H, E85D, W92G, K124E, N154K, D160H и N169K в HA2. Следует отметить, что локализация часто встречающихся и одиночных мутаций различная: первые располагаются в глобулярной части HA вблизи рецептор-связывающего сайта, вторые – в ножке молекулы гемагглютинина.

Исследование репродуктивной активности исследуемых вариантов показало, что исходный вакцинный штамм Tex17 в 50 раз лучше размножается в системе куриных эмбрионов, чем в культуре клеток MDCK. Интересно, что один из MDCK-адаптированных вариантов, штамм Tex17-16, показал наиболее значимое увеличение инфекционного титра в культуре клеток MDCK по сравнению с исходным штаммом Tex17 (Рисунок 10). Таким образом, набор мутаций V176I, P221S, D265E в HA1 и N154K в HA2 ассоциируется с повышением репродуктивной активности вакцинного штамма в культуре клеток MDCK.

Таблица 5. Мутации, обнаруженные в молекуле гемагглютинаина MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Tex17

Субъединица гемагглютинаина	Аминокислотная позиция	Исходный вирус	Клоны, адаптированные к культуре клеток MDCK									
		Tex17	Tex17-1	Tex17-4	Tex17-8	Tex17-9	Tex17-11	Tex17-15	Tex17-16	Tex17-17	Tex17-20	Tex17-21
HA1	176	Val	Val	Val	Ile	Ile	Val	Val	Ile	Val	Val	Ile
	215	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Pro	Thr	Pro	Pro
	221	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Ser
	265	Asp	Asp	Asp	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp	Asp	Asp
	301	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg
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

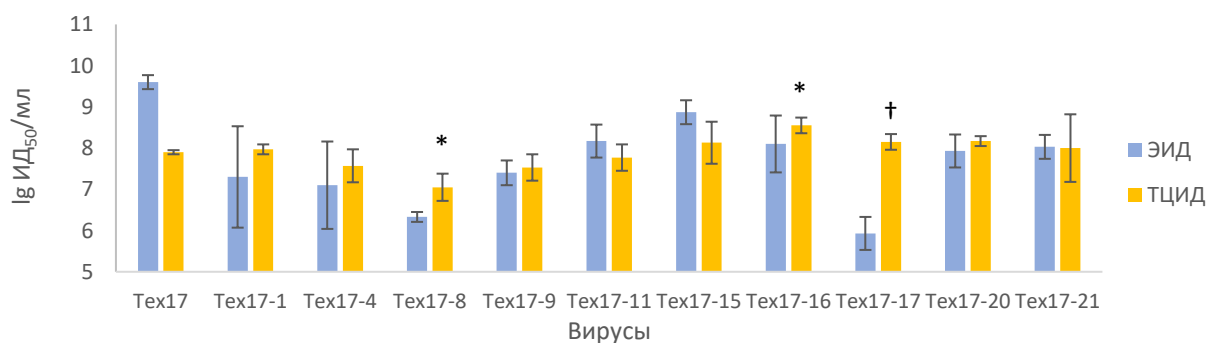


Рисунок 10. Репродукция вакцинного вируса A/17/Техас/12/30 (H3N2) и его MDCK-адаптированных вариантов в РКЭ и культуре клеток MDCK. * $p < 0,05$ по сравнению с ТЦИД₅₀/мл Tex17; † $p < 0,05$ по сравнению с ЭИД₅₀/мл Tex17-17.

Кроме того, был выявлен вариант Tex17-8, который имел значительно меньший титр в культуре клеток MDCK по сравнению с контрольным штаммом Tex17, 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. То есть адаптационные мутации P215T в HA1 и W92G, D160N в HA2

дали вакцинному штамму существенное преимущество для размножения в культуре клеток MDCK, что может быть эффективно использовано в производстве культуральной ЖГВ. Однако следует отметить, что набор указанных мутаций значительно снизил репродукцию вирусов в развивающихся куриных эмбрионах, и если обратить внимание на вирусы Tex17-11 и Tex17-15, которые отличаются только мутациями в субъединице HA2, можно отметить, что мутации, расположенные в стеблевом домене молекулы гемагглютинина – D265E в HA1 и N169K в HA2 – тоже влияют на инфекционную активность вакцинных вирусов в различных системах культивирования.

Поскольку современные вирусы гриппа подтипа H3N2 не способны эффективно инфицировать мышей, для оценки антигенности наиболее интересных MDCK-адаптированных вариантов были получены гипериммунные крысиные сыворотки. Исследование этих сывороток в РТГА показало, что адаптационные мутации не повлияли на способность продуцируемых антител связывать исходный вариант гемагглютинина штамма A/Texas/50/2012 (H3N2).

Адаптация вакцинных штаммов трехвалентной живой гриппозной вакцины к культуре клеток MDCK в условиях промышленного производства

Секвенирование генов поверхностных белков HA и NA вакцинных штаммов культуральной трехвалентной ЖГВ, подготовленных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» методом роллерного культивирования в производственных условиях, показало, что адаптационные мутации появились только в молекулах гемагглютинина вирусов гриппа А, тогда как в штамме B/60/Пхукет/2013/26 аминокислотных замен обнаружено не было (Таблица 6). Так, в вакцинном штамме A/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm09) была идентифицирована мутация K116E в субъединице HA2, а в штамме A/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) – две мутации S219Y и N246K в субъединице HA1.

Таблица 6. Аминокислотные замены в поверхностных антигенах экспериментальных клеточных моновалентных живых гриппозных вакцин.

Вакцина	Ген	Белок	Аминокислота	Исходный штамм	Вакцинный штамм после производства
A/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm)	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		

На рисунке 11 на мономерах соответствующих молекул гемагглютинина выделены позиции, в которых были обнаружены аминокислотные замены при адаптации вакцинных штаммов к культуре клеток в лабораторном масштабе (A44V в HA2 подтипа H1N1, V176I, P215T, P221S и D265E в HA1 подтипа H3N2) и в процессе производства серий

культуральной ЖГВ (K116E в HA2 подтипа H1N1, S219Y и N246K в HA1 подтипа H3N2). Несмотря на то, что выявленные мутации не идентичны в различных вирусах, можно наблюдать их общую локализацию внутри каждого подтипа. Так, позиции 44 и 116 в HA2 подтипа H1N1 находятся в непосредственной близости друг от друга также, как и позиции 176, 215, 219, 221 в HA1 подтипа H3N2 локализуются в районе рецептор-связывающего сайта.

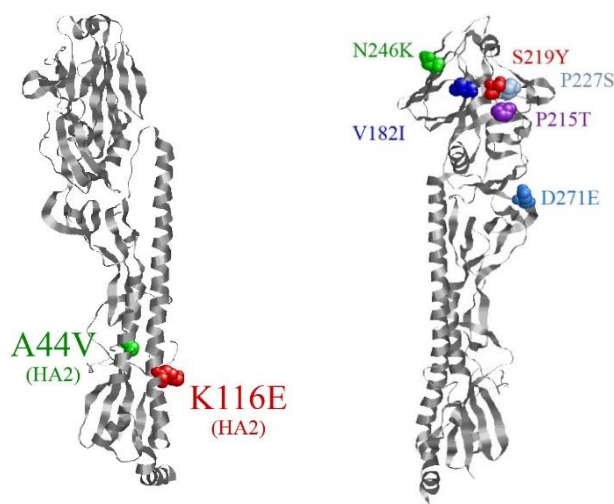


Рисунок 11. Картирование адаптационных аминокислотных замен в молекуле гемагглютинаина вакцинных штаммов Калиф17 и Боливия 17 (слева), Тех17 и Швейцария17 (справа). Расположение аминокислот показано на мономере гемагглютинаина A/California/04/2009 (H1N1) и A/Singapore/H2011.447/2011 (H3N2) (PDBID: 3UYX и 4WEA, соответственно). Иллюстрации получены с использованием программы RasMol 2.7.5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было инициировано для обоснования возможности использования вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины, полученных классическим скрещиванием в развивающихся куриных эмбрионах, для производства ЖГВ на культуре клеток млекопитающих. Культуральная ЖГВ рассматривается Всемирной организацией здравоохранения в качестве приоритетного препарата для применения во время пандемии гриппа, однако оставался открытым вопрос выбора оптимального штамма для получения вакцины, особенно в случае совместной циркуляции пандемических вариантов, различающихся рецепторной специфичностью молекулы гемагглютинаина. Для этого было проведено всестороннее исследование вирусов гриппа A(H2N2) начала пандемии 1957 года, имеющих различную рецепторную специфичность, а также были изучены особенности адаптации к культуре клеток MDCK вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на основе этих вирусов. Показано, что 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 $\alpha 2,6$.

Также был проведен исчерпывающий анализ влияния MDCK-адаптационных мутаций основных антигенов вакцинных штаммов ЖГВ против сезонных (H1N1 и H3N2) и потенциально пандемических (H5N2 и H7N9) вирусов гриппа A на основные характеристики вакцинных вирусов, в ходе которого не было выявлено негативного влияния обнаруженных мутаций на важные биологические свойства вакцинных штаммов. Кроме того, был проведен анализ экспериментальных серий моновалентных ЖГВ подтипов A(H1N1), A(H3N2) и B, произведенных на культуре клеток MDCK. Было показано, что адаптационные мутации, возникающие у различных подтипов вируса гриппа в

лабораторных условиях и условиях промышленного производства ЖГВ на культуре клеток MDCK, имеют сходное расположение в молекуле гемагглютинаина, что позволяет использовать разработанную модель адаптации для предсказания свойств культуральной живой гриппозной вакцины.

Научные данные, полученные в ходе данного диссертационного исследования, предоставляют необходимое экспериментальное обоснование возможности применения реассортантов, подготовленных классическим скрещиванием на куриных эмбрионах, для производства ЖГВ на культуре клеток млекопитающих. Реализация данного подхода позволит расширить показания к применению клеточной 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.

Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации

Полученные в данном исследовании результаты обосновывают использование вакцинных реассортантов ЖГВ, полученных в развивающихся куриных эмбрионах, для производства живой гриппозной вакцины на культуре клеток MDCK. Обнаруженный феномен индукции антител широкого спектра вирусами с рецепторной специфичностью $\alpha 2$ -3 требует дальнейших доклинических исследований и клинических испытаний.

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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

(жирным шрифтом отмечены публикации в рецензируемых изданиях: рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования)

СТАТЬИ

1. Матюшенко В.А. Адаптация вирусов гриппа H2N2 с различной рецепторной специфичностью к клеткам MDCK: возможности для разработки культуральной пандемической вакцины против гриппа H2N2 / Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. // **ЖМЭИ** – 2025. – Т.102. – №1. – С.31-42.

2. Матюшенко В.А. Стабильность вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK / Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Степанова Е.А., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. // **ЖМЭИ** – 2025. – Т.102. – №3. – С.296-309.

3. E.A.Stepanova. Amino Acid Substitutions N123D and N149D in Hemagglutinin Molecule Enhance Immunogenicity of Live Attenuated Influenza Vaccine Strain in Experiment / E.A. Stepanova, T.S. Kotomina, V.A. Matyushenko, T.A. Smolonogina, V.S. Shapovalova, L.G. Rudenko, and I.N. Isakova-Sivak // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine** – 2019. – V.166. – No.5. – P.631-636.

4. Rudenko L. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial / Rudenko L, Isakova-Sivak I, Naykhin A, Kiseleva I, Stukova M, Erofeeva M, Korenkov D, Matyushenko V, Sparrow E, Kieny M-P. // **Lancet Infectious Diseases**. – 2016. – Vol.16. – No.3. – P.303-10.

5. Rudenko L. 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 / Rudenko L, Kiseleva I, Stukova M, Erofeeva M, Naykhin A, Donina S, Larionova N, Pisareva M, Krivitskaya V, Dubrovina I, Isakova-Sivak I, Petukhova G, Bazhenova E, Smolonogina T, Kuznetsova V (Matyushenko V), Losev I, Nikiforova A, Kiselev O, Power M, Tsvetnitsky V, Tang Y, Flores J. // **Vaccine**. – 2015. – Vol.33. – No.39. – P.5110-7.

6. Kiseleva I. Genetic stability of live attenuated vaccines against potentially pandemic influenza viruses / Kiseleva I, Dubrovina I, Fedorova E, Larionova N, Isakova-Sivak I, Bazhenova E, Pisareva M, Kuznetsova V (Matyushenko V), Flores J, Rudenko L. // **Vaccine**. – 2015. – Vol.33. – No.49. – P.7008-14.

7. Кузнецова В.А., Ростовые характеристики эпидемического вируса гриппа A(H3N2) и реассортантного штамма для живой гриппозной вакцины на его основе, адаптированных к культуре клеток MDCK / Кузнецова В.А. (Матюшенко В.А.), Смолоногина Т.А., Третьяк Т.С. // **InterMedical**. – 2015. – №4. – С. 99-102.

ТЕЗИСЫ

1. V Kuznetsova (V Matyushenko). Evaluation of immunogenicity and cross-reactivity of influenza A viruses with different receptor-binding specificity in a mouse model. / V Kuznetsova, I Isakova-Sivak, S Kuznetsova, L Rudenko. // In: Abstract book, Options for the Control of Influenza VIII. Cape Town, South Africa, 5-10 September, 2013. P.302.

2. Кузнецова В.А. (Матюшенко В.А.) Иммуногенность и кросс-реактивность вирусов гриппа с различной рецепторной специфичностью на модели мышей / В.А. Кузнецова, С.А. Кузнецова, И.Н. Исакова-Сивак // Материалы научно-практической конференции «От

эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2014 г.

3. Kuznetsova V. (Matyushenko V) Replication of MDCK-adapted viruses with different receptor specificity in vitro and in vivo. / Kuznetsova V (Matyushenko V), Isakova-Sivak I, Rudenko L. // In abstract book of The Fourth European Influenza Conference. ESWI. Riga, Latvia. 14-17 September 2014, P. 21.

4. Кузнецова В.А. (Матюшенко В.А.) Влияние системы культивирования на основной антиген вируса гриппа / Кузнецова В.А. (Матюшенко В.А.), Исакова-Сивак И.Н., Федорова Е.А. // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, 30 марта – 1 апреля, 2015 г., стр.183.

5. Irina Kiseleva. Optimization of wild type influenza virus selection for the development of live attenuated reassortant vaccine. / Irina Kiseleva, Ekaterina Bazhenova, Irina Dubrovina, Victoria Matyushenko (Victoria Matyushenko), Tatiana Smolonogina, Irina Isakova-Sivak, Larisa Rudenko // Abstract book “Options for the control of influenza”, 24-28 August 2016, Chicago, USA.

6. Матюшенко В.А. Адаптация вакцинного штамма для живой гриппозной вакцины подтипа А/Н1N1 к культуре клеток MDCK и влияние адаптационных мутаций в поверхностных антигенах вируса на его биологические характеристики. / Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. // Материалы V Всероссийской конференции молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике». Санкт-Петербург, 11-12 апреля 2024 г.

7. V. Matyushenko. MDCK cells as a substrate for the production of engineered live attenuated influenza vaccine candidates expressing SARS-CoV-2 immunogenic epitopes. / V. Matyushenko, I. Isakova-Sivak, E. Stepanova, A. Rak, A. Kostromitina, A. Chistyakova, P-F Wong and L. Rudenko. // In Abstract book, Options for the Control of Influenza XII. Brisbane, Australia, 29 Sept – 2 Oct. 2024.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н., член-корреспонденту РАН Исаковой-Сивак Ирине Николаевне за неоценимый вклад в работу, чуткое руководство и тактичность при планировании и проведении экспериментов, ценные комментарии и советы при написании диссертации, за личный пример самоотверженного служения науке. Отдельно хочу выразить глубокое почтение д.м.н., з.д.н., главному научному сотруднику отдела вирусологии и иммунологии им. А.А.Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» – Руденко Ларисе Георгиевне, за терпение и наставничество, за годы, проведенные под ее руководством. Также хочу поблагодарить сотрудников отдела вирусологии и иммунологии им. А.А.Смородинцева: к.б.н. Степанову Екатерину Алексеевну, к.б.н. Котомину Татьяну Сергеевну, к.м.н. Коренькова Даниила Анатольевича, к.б.н. Кузнецову Светлану Анатольевну, к.б.н. Баженову Екатерину Андреевну, Костромитину Арину Дмитриевну, Прокопенко Полину Игоревну за помощь в проведении диссертационных исследований. Также выражаю благодарность заведующему лабораторией клеточной иммунологии к.б.н. Кудрявцеву Игорю Владимировичу за помощь в освоении иммунологических методов.