

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение
«Институт экспериментальной медицины»

На правах рукописи

ИСАКОВА-СИВАК

Ирина Николаевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ
К ОПТИМИЗАЦИИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ**

03.02.02 - вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

*на соискание ученой степени
доктора биологических наук*

Научный консультант:
Профессор, д.м.н.
Л.Г. РУДЕНКО

Санкт-Петербург

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

РАЗДЕЛ I. ВВЕДЕНИЕ	6
РАЗДЕЛ II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	20
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	20
1.1 Вирусы гриппа А и их эволюционная изменчивость	20
1.1.1. Классификация вирусов гриппа	20
1.1.2. Организация генома и основные функции белков вируса гриппа А	21
1.1.3. Антигенная изменчивость вируса гриппа А	25
1.1.4. Потенциально-пандемические вирусы гриппа А	26
1.2 Современные вакцины для профилактики сезонного гриппа	31
1.2.1. Инактивированные гриппозные вакцины	32
1.2.2. Живые гриппозные вакцины	34
1.2.2.1. Лицензированные живые гриппозные вакцины	34
1.2.2.2. Основы аттенуации холодоадаптированных вакцинных штаммов ЖГВ	41
1.2.2.3. Культуральные живые гриппозные вакцины	43
1.2.3. Экспериментальные живые гриппозные вакцины	45
1.2.3.1. Экспериментальные холодоадаптированные живые гриппозные вакцины	45
1.2.3.2. Альтернативные подходы к созданию живых гриппозных вакцин	48
1.2.4. Критерии для лицензирования новых гриппозных вакцин для людей	49
1.3 Гриппозные вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа	51
1.3.1. Вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа H2N2	53
1.3.2. Вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа H5N1	55
1.3.3. Вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа H7N9	60
1.4 Подходы к созданию универсальной гриппозной вакцины	62
1.4.1. Подходы к индукции перекрестно-реагирующего гуморального иммунного ответа	63
1.4.2. Подходы к индукции перекрестно-реагирующего Т-клеточного иммунного ответа	68
1.5 Заключение к обзору литературы	72
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	73
2.1 Материалы исследования	73
2.1.1 Клеточные линии	73
2.1.2 Вирусы	73
2.1.3 Плазмидные ДНК	74
2.1.4 Рекомбинантные белки и пептиды	75
2.1.5 Доноры	75
2.2. Методы исследования	75
2.2.1 Подготовка вакцинных штаммов с помощью классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах.	76
2.2.2 Методы обратной генетики для конструирования генно-инженерных вирусов гриппа.	76
2.2.3 Методы оценки биологических свойств вирусов гриппа в опытах <i>in vitro</i> .	77
2.2.4 Методы работы с лабораторными животными.	78
2.2.5 Методы оценки иммунного ответа на живую гриппозную вакцину.	81

2.2.5.1. Системный гуморальный иммунный ответ	82
2.2.5.2. Локальный (секреторный) иммунный ответ	84
2.2.5.3. Т-клеточный иммунный ответ	84
2.2.6 Методы биоинформатики для анализа Т-клеточных эпитопов в составе вирусных белков.	84
2.2.7 Оценка кросс-реактивности Т-клеток человека к различным эпитопам нуклеопротеина <i>in vitro</i> .	85
2.2.7.1. Экспансия человеческих вирус-специфичных Т клеток <i>in vitro</i>	85
2.2.7.2. Перекрестная реактивность эпитоп-специфичных Т клеток	86
2.2.8 Клинические испытания живых гриппозных вакцин на добровольцах.	86
2.2.9 Методы статистического анализа результатов исследований	89
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОГО ДОНОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ РЕАССОРТАНТНЫХ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ДЛЯ ЖИВОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН	90
3.1 Подготовка и характеристика альтернативного донора аттенуации и высокой репродуктивности для живых и инактивированных гриппозных вакцин.	90
3.2 Фенотипическая характеристика модифицированного донора аттенуации 59/М2	93
3.3 Чувствительность модифицированного донора аттенуации 59/М2 к химиопрепаратам адамантанового ряда	94
3.4 Аттенуирующие свойства модифицированного донора 59/М2	95
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ	96
4.1 Разработка обратно-генетической системы для отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	96
4.1.1. Клонирование генов донора аттенуации Лен/17 в векторы для обратной генетики	96
4.1.2 Оценка биологических свойств вируса Лен/17-rg	97
4.2 Изучение роли мутаций донора Лен/17 в проявлении признака температурочувствительности	99
4.3 Определение <i>ts</i> мутаций, реверсия которых необходима для восстановления дикого фенотипа у вакцинного штамма ЖГВ	103
4.4 Изменение <i>ts</i> и <i>att</i> фенотипов антигенно неродственного вирулентного вируса при внесении в его геном <i>ts</i> мутаций, свойственных донору Лен/17	104
ГЛАВА 5. ПОДГОТОВКА, ДОКЛИНИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(H2N2)	108
5.1 Подготовка реассортантных вакцинных штаммов А(H2N2) с использованием новых подходов	108
5.2 Репликативные свойства вакцинных штаммов А(H2N2) <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	111
5.3 Иммуногенность и защитная эффективность вакцинных штаммов H2N2 на модели мышей	113
5.4 Иммуногенность и защитная эффективность вакцинных штаммов H2N2 на модели хорьков	115
5.5 Клинические испытания живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемического вируса А(H2N2) на добровольцах (I фаза).	121
5.5.1. Оценка реактогенности ЖГВ H2N2 на добровольцах	122

5.5.2.	Оценка приживляемости, трансмиссивности и генетической стабильности ЖГВ H2N2 на добровольцах	123
5.5.3.	Оценка иммуногенности ЖГВ H2N2 на добровольцах	125
ГЛАВА 6 ПОДГОТОВКА, ДОКЛИНИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(H7N9)		132
6.1	Подготовка вакцинного штамма ЖГВ из низкопатогенного вируса А(H7N9) методом классической реассортации и изучение его биологических свойств	132
6.2	Оценка влияния мутаций в молекуле гемагглютинина вакцинного штамма ЖГВ А(H7N9) на его основные биологические свойства	135
6.2.1.	Рецепторная специфичность вакцинных штаммов ЖГВ H7N9	137
6.2.2.	Инфекционная активность вакцинных штаммов ЖГВ H7N9 <i>in vitro</i>	137
6.2.3.	Иммуногенность, кросс-реактивность и защитная эффективность вакцинных штаммов ЖГВ H7N9 для мышей линии BALB/c	138
6.3	Доклинические исследования вакцинного штамма А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) на модели хорьков	140
6.3.1.	Оценка безвредности вакцинного штамма А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) на модели хорьков	140
6.3.2.	Оценка иммуногенности и защитной эффективности ЖГВ из штамма А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) на модели хорьков	143
6.4	Подготовка и доклиническое изучение живой гриппозной вакцины против высокопатогенного потенциально-пандемического вируса А(H7N9)	150
6.5	Клинические испытания живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемического вируса А(H7N9) на добровольцах (I фаза)	157
6.5.1.	Оценка реактогенности ЖГВ H7N9 на добровольцах	157
6.5.2.	Оценка приживляемости, трансмиссивности и генетической стабильности ЖГВ H7N9 на добровольцах	158
6.5.3.	Оценка иммуногенности ЖГВ H7N9 на добровольцах	159
ГЛАВА 7 ПОДГОТОВКА И ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(H5N1)		167
7.1	Получение и фенотипическая характеристика вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1)	167
7.2	Изучение вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели мышей	170
7.2.1.	Оценка аттенуации вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели мышей	170
7.2.2.	Оценка иммуногенности вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели мышей	171
7.2.3.	Оценка защитной эффективности вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели мышей	174
7.3	Сравнительное изучение живой и инактивированной гриппозных вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели хорьков	176
7.3.1.	Оценка безвредности живой гриппозной вакцины против высокопатогенного вируса гриппа А(H5N1) на модели хорьков	176
7.3.2.	Оценка иммуногенности живой и инактивированной гриппозных вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели хорьков	177

7.3.3. Оценка защитной эффективности живой и инактивированной гриппозных вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) на модели хорьков	179
7.4 Изучение патогенности живой гриппозной вакцины против высокопатогенного вируса гриппа А(Н5N1) на курах	181
7.4.1. Оценка патогенности вакцинного штамма VN-Лен/17rg (Н5N1) для кур при внутривенном введении	182
7.4.2. Оценка репликации вакцинного штамма VN-Лен/17rg (Н5N1) в органах кур при интраназальном введении	182
ГЛАВА 8 РАЗРАБОТКА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, ИНДУЦИРУЮЩЕЙ ШИРОКИЙ СПЕКТР ПЕРЕКРЕСТНО-РЕАГИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА	185
8.1 Подходы к индукции кросс-реактивного гуморального иммунного ответа	185
8.1.1. Конструирование живых гриппозных вакцин, экспрессирующих химерные молекулы гемагглютинаина, и оценка их биологических свойств	185
8.1.2. Оценка иммуногенности и защитной эффективности живых гриппозных вакцин, экспрессирующих химерные молекулы гемагглютинаина, на модели мышей линии С57BL/6J	189
8.1.3. Оценка иммуногенности и защитной эффективности живых гриппозных вакцин, экспрессирующих химерные молекулы гемагглютинаина, на модели мышей линии BALB/c	195
8.2 Подходы к индукции перекрестно-реагирующего Т-клеточного иммунитета	200
8.2.1. Анализ консервации CD8+ Т-клеточных эпитопов в нуклеопротеине донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) и современных циркулирующих вирусов Н1N1 и Н3N2.	200
8.2.2. Сравнительная оценка ростовых характеристик вакцинных штаммов ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 <i>in vitro</i> .	203
8.2.3. Сравнительная оценка иммуногенности для мышей реассортантных штаммов ЖГВ Н1N1рdm09 и Н7N9 с формулами генома 6:2 и 5:3.	205
8.2.4. Сравнительная оценка безвредности, иммуногенности и защитной эффективности реассортантных штаммов ЖГВ Н3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3 на модели хорьков.	214
8.2.5. Оценка кросс-реактивности Т-клеток человека к различным эпитопам нуклеопротеина <i>in vitro</i>	223
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	230
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	252
ВЫВОДЫ	255
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	257
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	263

РАЗДЕЛ I. ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Вирусы гриппа являются высококонтагиозными респираторными патогенами, представляющими постоянную угрозу мировому сообществу. Ежегодные эпидемии гриппа вызывают от 3 до 5 миллионов случаев тяжелых респираторных заболеваний, до 650 тысяч из которых заканчиваются летальным исходом [521]. Наиболее эффективным средством борьбы с гриппом является вакцинация, основной целью которой является снижение заболеваемости и предотвращение тяжелых случаев заболевания гриппом и его осложнений.

Среди большого разнообразия гриппозных вакцин, применяющихся в практике здравоохранения, а также находящихся на различных стадиях разработки, особое место занимает живая гриппозная вакцина (ЖГВ), разработанная впервые в мире в Российской Федерации и зарегистрированная в 1987 году, тогда как аналогичная американская ЖГВ была зарегистрирована только в 2003 году. Большим преимуществом живой гриппозной вакцины по сравнению с инактивированной гриппозной вакциной (ИГВ) является безболезненный интраназальный способ введения, обеспечивающий формирование не только системного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, но и мощного мукозального иммунитета во входных воротах инфекции. [59, 192, 238]. В отличие от ИГВ, живые вакцины вызывают образование коллективного иммунитета, что особенно важно в организованных детских коллективах, а также способны защищать от дрейфовых вариантов вируса гриппа [420, 425, 444]. В настоящее время для подготовки реассортантных вакцинных штаммов для ЖГВ типа А в России используется хорошо охарактеризованный безвредный для людей холодоадаптированный донора аттенуации – штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [Лен/17]. Для подготовки вакцинных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины в качестве донора высокой урожайности во всем мире используется модельный вирус А/PR/8/34 (H1N1) [PR8], характеризующийся высокой репродуктивной активностью в развивающихся куриных эмбрионах. Реассортантные штаммы для сезонной ИГВ, подготовленные на основе вируса PR8, являются безопасными для людей, однако при подготовке ИГВ из высокопатогенных вирусов гриппа реассортантные штаммы могут сохранять остаточную вирулентность, поэтому при производстве ИГВ необходимо соблюдать повышенные меры предосторожности, чтобы обезопасить персонал. Важно также отметить, что для отечественной ЖГВ весь процесс от получения вакцинных штаммов до выпуска препарата основан полностью на российской технологии, тогда как вакцинные штаммы для производства ИГВ получают из-за рубежа, что может явиться причиной задержки начала производства вакцины в чрезвычайной ситуации. Все это обуславливает целесообразность разработки единого, универсального донорского штамма,

подходящего для создания реассортантных штаммов как для живых, так и для инактивированных гриппозных вакцин, поскольку при возникновении чрезвычайной ситуации (например, при наступлении пандемии) можно будет один вакцинный штамм использовать как на производстве ЖГВ, так и на производстве ИГВ.

Вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные на основе холодоадаптированного донора аттенуации Лен/17, обладают признаками температурочувствительности (*ts* фенотип) и холодоадаптированности (*ca* фенотип), передаваемыми в геном вакцинного штамма вместе с шестью генами негликозилированных белков Лен/17. Ранние исследования определили роль мутантных генов донора Лен/17 в проявлении *ts/ca*, а также аттенуированного фенотипов у вакцинных штаммов ЖГВ [261, 266], однако до проведения настоящего исследования не представлялось возможным оценить роль каждой индивидуальной мутации в проявлении указанных признаков. Поскольку вакцинные штаммы ЖГВ проходят несколько циклов репликации в верхних дыхательных путях привитых, представляется важным оценить генетическую стабильность реассортантных вирусов – т.е. определить, реверсия каких мутаций, свойственных донору Лен/17, требуется для полного восстановления дикого фенотипа вируса. Эти данные позволят на новом методическом уровне охарактеризовать безвредность живой гриппозной вакцины для людей.

Помимо ежегодных эпидемий вирусы гриппа А могут вызывать пандемии гриппа в случае, когда новый вирус антигенно отличается от ранее циркулировавших вариантов, вследствие чего человеческая популяция является иммунологически наивной. Глобальное распространение различных подтипов вирусов гриппа А в популяции птиц обеспечивает предпосылки для межвидовой передачи вирусов: в последние два десятилетия документируется все больше случаев инфицирования людей вирусами гриппа птиц H5, H7 и H9 [51, 189, 203]. Помимо вирусов гриппа птиц, пандемическую опасность представляют собой вирусы гриппа человека, которые не циркулировали в популяции людей продолжительное время, но при этом продолжают существовать в природном резервуаре. К таким вирусам относятся вирусы подтипа H2N2, вытесненные из циркуляции среди людей вирусами H3N2 в 1968 году, но продолжающие детектироваться у птиц и свиней [174, 183, 305, 312]. Одна из наиболее важных инициатив по подготовке к пандемии гриппа сосредоточена на разработке и оценке различных вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) оценила преимущества живых вакцин перед инактивированными в качестве первостепенной защиты населения от пандемического вируса и включила их в Глобальный план ВОЗ по увеличению поставок гриппозных вакцин в случае наступления пандемии [517]. Так, одним из главных преимуществ ЖГВ перед ИГВ явилась доступность вакцины для развивающихся стран, ущерб для которых в случае пандемии гриппа

прогнозируется наиболее серьезный [165, 180]. До начала настоящего исследования не существовало охарактеризованных в доклинических и клинических исследованиях кандидатных вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на основе потенциально-пандемических вирусов гриппа H2N2 и H7N9. Кроме того, до настоящей работы все вакцинные штаммы для отечественной ЖГВ готовились методами классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах донора аттенуации Лен/17 и эпидемического вируса гриппа. Однако такие методы не могут быть применены для конструирования вакцинных штаммов из высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9, поскольку в данном случае требуется удаление полиосновных аминокислот из кливедж-сайта молекулы гемагглютинаина. В этой связи разработка системы получения вакцинных штаммов ЖГВ генно-инженерными методами представляется своевременной и актуальной.

Несмотря на то, что в настоящее время существует большое разнообразие сезонных гриппозных вакцин, их общим недостатком является узкая специфичность, необходимость ежегодного обновления штаммового состава, не всегда удовлетворительная иммуногенность, а, следовательно, эффективность. Соответственно, поиск подходов, способствующих повышению эффективности сезонных и пандемических гриппозных вакцин, является своевременным и актуальным исследованием, имеющим важное социально-экономическое значение. Обширный спектр адаптивного иммунного ответа, формируемый живыми гриппозными вакцинами, делает эту платформу перспективной основой для разработки высокоэффективной вакцины, способной защищать людей от широкого спектра вирусов гриппа.

СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ.

При подготовке к пандемии гриппа целесообразно иметь хорошо охарактеризованный безвредный для человека высокорепродуктивный штамм вируса гриппа, который мог бы выступать универсальным донором для подготовки живых и инактивированных гриппозных вакцин, при этом для первых он будет служить донором аттенуации, а для вторых – донором высокой урожайности. Наиболее подходящим кандидатом для использования в качестве нового донора аттенуации и высокой репродуктивности является холодоадаптированный вирус A/PR/8/59/1 (H1N1) (59/1), разработанный ранее в Отделе вирусологии им. А.А.Смородинцева [137]. Поскольку в качестве основы для подготовки донора 59/1 использовался высокоурожайный вирус PR8, холодоадаптированный штамм также характеризовался высокой репродуктивной активностью в РКЭ. На основе этого донора ранее был подготовлен ряд экспериментальных вакцинных штаммов ЖГВ, и их безвредность была подтверждена в клинических наблюдениях [2]. Однако основным препятствием для массового использования данного штамма в качестве донора аттенуации для ЖГВ является его устойчивость к

химиопрепаратам адамантанового ряда (ремантадин, амантадин), поскольку именно ремантадин является наиболее легкодоступным средством для лечения гриппозной инфекции. Поэтому в настоящем исследовании необходимо было подготовить модифицированный донор на основе вируса 59/1, обладающий чувствительностью к адамантанам.

Современные реассортантные вакцинные штаммы для ЖГВ типа А содержат шесть генов, кодирующих внутренние и неструктурные белки, от холодоадаптированного донора аттенуации Лен/17, которые передают вакцинному штамму признаки температурочувствительности и холодоадаптированности. Сниженная способность вакцинного вируса размножаться при повышенных температурах ограничивает его репликацию в нижних отделах респираторного тракта привитых, тем самым минимизируя клинические проявления болезни, т.е. определяет аттенуированный фенотип вируса [404]. Идентификация ключевых мутаций донора Лен/17, определяющих данный фенотип, представляет значительный интерес.

Ранние попытки идентифицировать гены вируса Лен/17, передающие вакцинным реассортантам *ts* фенотип, использовали классическую генетическую реассортацию между донором Лен/17 и генетически удаленными эпидемическими вирусами. Использование для скрещивания эпидемических вирусов, которые отличались друг от друга по *ts* фенотипу, приводило к противоречивым выводам, в зависимости от конкретного штамма, выбранного для скрещивания [261]. Тем не менее, подробные исследования большого числа реассортантов между донором Лен/17 и различными эпидемическими вирусами привели к выводу, что белок PB2 является основным определяющим фактором *ts* фенотипа, а полимеразные гены PB1 и PA дополняют этот признак [261]. Более точные эксперименты с одногенными реассортантами между генетически однородными вирусами указывали на ведущую роль генов PB2 и PB1 в передаче *ts* фенотипа [266]. Поскольку все предыдущие исследования были сконцентрированы на оценке *ts* фенотипа реассортантов с различным составом генома, получаемых методами классической реассортации, и при этом не проводилось их полногеномного секвенирования, сохраняется вероятность наличия в геноме таких реассортантных вирусов дополнительных мутаций, потенциально влияющих на *ts* фенотип. Кроме того, в работе [266] не определяли принадлежность NA и NA генов у реассортантов между вирусами Лен/17 и его предшественником – штаммом А/Ленинград/134/57, тогда как существуют множественные литературные данные о влиянии мутаций в поверхностных антигенах вирусов гриппа на *ts* фенотип. Таким образом, представлялось необходимым оценить вклад каждой индивидуальной мутации, свойственной донору аттенуации Лен/17, в становление *ts/att* фенотипа вакцинных штаммов ЖГВ, используя самые современные молекулярно-генетические и гено-инженерные подходы. До проведения настоящего исследования было неизвестно, реверсия каких аттенуирующих мутаций в геноме вакцинных штаммов требуется для полного восстановления

дикого фенотипа вируса. Кроме того, с фундаментальной точки зрения представляло интерес определить, носят ли *ts* мутации донора Лен/17 универсальный характер, т.е. будут ли они привносить *ts/att* фенотип в геном генетически удаленного вируса гриппа А.

Эффективность противогриппозных вакцин напрямую связана со степенью антигенного сходства вакцинных и циркулирующих вирусов. Гипервариабельность аминокислотных последовательностей основных антигенных детерминант вируса гриппа – гемагглютинина и нейраминидазы – в значительной степени ответственна за эпидемии и пандемии гриппа, при этом первые являются следствием антигенного дрейфа, а вторые – антигенного шифта. Узкоспецифическое действие современных сезонных вакцин против гриппа приводит к сниженной эффективности вакцинации в случае несоответствия антигенных свойств между вакцинными и циркулирующими вирусами, а также не представляет возможным обеспечить защиту населения от новых антигенных вариантов в случае пандемии. К числу таких потенциально-пандемических вирусов гриппа относятся вирусы подтипа H2N2, поскольку они не циркулировали в человеческой популяции с 1968 года, в результате чего большая часть населения не имеет к ним иммунитета, и, соответственно, будет уязвимой в случае его возвращения в циркуляцию. При этом вирусы, содержащие гемагглютинин H2, продолжают выделяться от водоплавающих птиц, а также свиней [174, 183, 305, 312], тем самым представляя реальную угрозу для их возвращения в человеческую популяцию. Теоретически, в качестве вакцинного штамма H2N2 может быть использован отечественный донор аттенуации для живой гриппозной вакцины типа А – А/Ленинград/134/17/57 (Лен/17). Этот вирус уже использовался в 1960-х годах в качестве вакцинного для иммунизации населения. Однако за период циркуляции H2N2 штаммов в 1957-1968 гг вирус претерпел серьезные эволюционные изменения, и иммунный ответ к вирусам 1950-х годов может быть неэффективным по отношению к вирусам, циркулировавшим в конце H2N2 волны [294]. При подготовке вакцинных штаммов H2N2 методом классической реассортации с вышеуказанным донором аттенуации могут возникнуть методические сложности, т.к. донор Лен/17 имеет тот же сероподтип, и использование в процессе подготовки штамма гипериммунной сыворотки к донору может перекрестно реагировать и с «диким» H2N2 вирусом. В этой связи требовалась разработка новых подходов к конструированию ЖГВ подтипа H2N2.

Ввиду активной циркуляции в природном резервуаре зоонозных вирусов гриппа, обладающих пандемическим потенциалом, под эгидой ВОЗ создана и постоянно пополняется коллекция кандидатных вакцинных вирусов, которые в случае необходимости могут быть востребованы производством, и в кратчайшие сроки наработаны необходимые объемы вакцины для защиты уязвимых слоев населения в начале пандемической волны [520]. Разработке вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа (ВПВГ) H5N1 уделяется особенно пристальное

внимание ввиду их эндемичности во всех регионах мира, а также чрезвычайно высокой степени variability их антигенных свойств. Для подготовки вакцинных штаммов из ВПВГ необходима целенаправленная модификация их молекулы гемагглютинина, что не представляется возможным сделать классическими вирусологическими методами. Ранее была предложена и успешно апробирована стратегия подготовки вакцинных штаммов для ЖГВ H5N1 путем классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах донора аттенуации и штамма для инактивированной гриппозной вакцины. Однако, во-первых, с использованием данного подхода удавалось получать лишь реассортанты с формулой генома 7:1, а не 6:2 [262, 285], а, во-вторых, такой способ существенно замедляет процесс подготовки вакцинных штаммов для ЖГВ, поскольку для каждого нового рекомендованного вируса необходимо будет сначала получить реассортантный штамм для ИГВ, и лишь потом приступить к подготовке штамма для ЖГВ. В связи с этим потребовалась разработка обратно-генетической системы для отечественного донора аттенуации Лен/17 с целью своевременной подготовки вакцинных реассортантов ЖГВ против любых высоковирулентных вирусов гриппа генно-инженерными методами.

В начале 2013 г. были зарегистрированы первые случаи заражения людей новым вирусом гриппа птиц подтипа H7N9, и к 2017 году уже было зарегистрировано более 1500 случаев с 40%-ным уровнем летальности. Высокая вирулентность вирусов H7N9, наличие в геноме множественных маркеров адаптации к клеткам млекопитающих, а также их персистенция в популяции птиц создают предпосылки для возникновения новой пандемии H7N9. Для того чтобы избежать разрушительных последствий новой пандемии, необходимо иметь в наличии вакцинные штаммы H7N9 для своевременной вакцинации наиболее уязвимых групп населения. Изоляты первой волны циркуляции вирусов H7N9 характеризовались гетерогенностью молекулы гемагглютинина, поэтому представлялось важным определить, какие из ключевых аминокислотных замен будут оказывать влияние на значимые биологические свойства вакцинных штаммов ЖГВ, с целью отбора наиболее удачной комбинации мутаций для получения безопасного и эффективного вакцинного препарата. Помимо этого, во время пятой волны циркуляции вирусов H7N9 стали выделяться высокопатогенные изоляты, характеризующиеся наличием полиосновного кливидж-сайта молекулы НА. Соответственно, для подготовки вакцинных штаммов ЖГВ против таких вирусов также потребовалась обратно-генетическая система для донора аттенуации Лен/17.

Все описанные выше способы подготовки к пандемии гриппа представляют собой штаммоспецифический подход, когда готовится коллекция кандидатных вакцинных вирусов против наиболее вероятных возбудителей следующей пандемии. Однако, как показала пандемия 2009 года, такие предсказания не всегда оправданы, и требуются принципиально

новые подходы к созданию вакцин, способных обеспечить защиту от сезонных и вновь возникающих предпандемических штаммов. На протяжении последних двух десятилетий в мире ведутся активные исследования по созданию универсальной гриппозной вакцины, индуцирующей долговременный иммунный ответ широкого спектра действия. В настоящее время на различных стадиях доклинических и, в некоторых случаях клинических, исследований находится ряд разработок, общим принципом которых является перенаправление адаптивного иммунного ответа с иммунодоминантных гипервариабельных на низкоиммуногенные высококонсервативные участки вирусных белков. Ввиду преимущества живых гриппозных вакцин перед инактивированными, рекомбинантными или ДНК-вакцинами, представлялось важным опробовать данную платформу для конструирования генно-инженерными методами универсальной гриппозной вакцины нового поколения, эффективной в отношении широкого спектра вирусов гриппа типа А. До представляемой работы попыток целенаправленной модификации генома вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины с целью усиления ее кросс-протективных свойств в литературе описано не было.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Все вышеизложенное определило основную ЦЕЛЬ настоящей работы, состоящую в разработке молекулярно-генетических подходов, способствующих повышению эффективности сезонных и созданию пандемических живых гриппозных вакцин. В соответствии с целью, были поставлены следующие ЗАДАЧИ:

1. Разработать альтернативный универсальный донор аттенуации и высокой репродуктивности для подготовки вакцинных штаммов для живых и инактивированных гриппозных вакцин и оценить роль мутантных генов в проявлении его биологических свойств;
2. Изучить вклад уникальных мутаций донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в проявление его различных биологических свойств, используя современные молекулярно-генетические и генно-инженерные подходы;
3. Разработать подходы к созданию реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа А(H2N2) и оценить безвредность, иммуногенность и эффективность подготовленных вакцинных штаммов в доклинических исследованиях, а также в первой фазе клинических испытаний на добровольцах;
4. Сконструировать генно-инженерные вакцинные штаммы против высокопатогенных вирусов гриппа птиц А(H5N1), детально охарактеризовать их в системах *in vitro* и *in vivo*, а

также изучить механизмы формирования иммунного ответа на живую и инактивированную вакцины, подготовленные на их основе;

5. Подготовить вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины против низкопатогенных и высокопатогенных потенциально пандемических вирусов гриппа А(Н7N9) и оценить безвредность, иммуногенность и эффективность подготовленных вакцинных штаммов в доклинических исследованиях, а также в первой фазе клинических испытаний на добровольцах;
6. Разработать подходы к усилению Т-клеточного иммунного ответа на сезонные и пандемические живые гриппозные вакцины;
7. Разработать подходы для индукции живой гриппозной вакциной перекрестно-реагирующих антител к консервативному домену молекулы гемагглютинина;
8. Сформулировать предложения по созданию высокоэффективных живых гриппозных вакцин широкого спектра действия (универсальной живой гриппозной вакцины)

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ.

1. Разработан альтернативный холодоадаптированный донор аттенуации А/PR8/59/M2 (H1N1), обладающий чувствительностью к препаратам адамантанового ряда. Данный штамм может быть использован не только как донор аттенуации для подготовки живых гриппозных вакцин, но и как донор высокой урожайности для подготовки вакцинных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины типа А.
2. Разработана обратно-генетическая система для холодоадаптированного штамма А/Ленинград/134/17/57 – отечественного донора аттенуации для живой гриппозной вакцины, позволяющая целенаправленно получать вакцинные штаммы ЖГВ любыми заранее заданными свойствами.
3. В настоящем исследовании на новом методическом уровне показана ведущая роль мутаций в двух полимеразных генах PB2 и PB1 в формировании температурочувствительного фенотипа донора аттенуации Лен/17. При этом мутация K265N в PB1 белке вносит более выраженный вклад, чем мутация V591I. Отмечена минорная роль мутации в M100I NS2 белке в становлении *ts* фенотипа донора, и для полного восстановления дикого фенотипа вируса требуется реверсия всех четырех указанных мутаций в вакцинном штамме ЖГВ 6:2.
4. Впервые подготовлены реассортантные штаммы живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа А(Н2N2), используя модифицированные методики реассортации. Всесторонняя характеристика полученных вакцинных штаммов в

доклинических исследованиях подтвердила их безвредность, иммуногенность и защитную эффективность, свойственные классическим вакцинным штаммам ЖГВ. Впервые проведены клинические исследования ЖГВ подтипа А(Н2N2), подтвердивших безвредность, хорошую переносимость, приживляемость и высокую иммуногенность вакцины для взрослых здоровых добровольцев.

5. Впервые охарактеризованы в доклинических исследованиях вакцинные штаммы отечественной живой гриппозной вакцины против высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) двух различных клонированных штаммов, полученные с использованием методов обратной генетики. Впервые доказана более выраженная защита, обеспечиваемая живой гриппозной вакциной, перед инактивированной, при заражении иммунизированных хорьков гетерологичным высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1).
6. Впервые получен и охарактеризован в доклинических и клинических исследованиях вакцинный штамм живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа А(Н7N9). Используя методы генной инженерии, удалось отобрать наиболее удачную комбинацию мутаций в молекуле гемагглютинаина вируса А(Н7N9), способствующую повышению иммуногенности и кросс-реактивности вакцины.
7. Впервые представлены убедительные свидетельства значительных отличий в составе иммунодоминантных эпитопов для цитотоксических Т лимфоцитов (ЦТЛ), расположенных в молекулах нуклеопротеина донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и современных циркулирующих вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2). Детальное изучение определенных диверсифицированных ЦТЛ-эпитопов на культурах мононуклеаров периферической крови человека показало, что классические живые гриппозные вакцины с формулой генома 6:2 индуцируют мощный Т-клеточный иммунный ответ на устаревшие эпитопы NP, который слабо реагирует с современными вирусами гриппа А.
8. В настоящем исследовании предложена стратегия усиления ЦТЛ-иммунного ответа на вакцинацию живыми гриппозными вакцинами путем внесения в геном вакцинных реассортантов NP гена от современного циркулирующего вируса (т.е. подготовка ЖГВ с формулой генома 5:3). Детальные сравнительные эксперименты вакцинных штаммов ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 на различных моделях животных показали перспективность данной стратегии для усиления перекрестно-реагирующего Т-клеточного иммунного ответа на ЖГВ.
9. Впервые апробирована стратегия усиления выработки кросс-реактивных антител, нацеленных на консервативный участок молекулы гемагглютинаина, путем конструирования вакцинных штаммов ЖГВ, несущих химерные молекулы HA (содержат идентичный stalk-домен от вируса H1N1, а глобулярные части – от различных антигенно-

неродственных вирусов гриппа подтипов H5N1, H8N4, H9N2). Последовательная иммунизация животных такими модифицированными ЖГВ приводит к выработке антител, нацеленных на stalk-домен HA, что, в свою очередь, усиливает защиту иммунизированных животных от дрейфовых вариантов вируса гриппа, а также от вирусов гриппа А других подтипов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Разработанный в настоящем исследовании альтернативный донор аттенуации A/PR/8/59/M2 (H1N1) может быть использован для подготовки безопасных вакцинных штаммов для живой гриппозной вакцины, а также высокорепродуктивных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины. Использование единого вакцинного штамма для производства и ЖГВ, и ИГВ особенно важно в случае наступления пандемии, поскольку позволит избежать задержки начала производства в чрезвычайной ситуации. Высокая урожайность вакцинных вирусов позволит нарабатывать большие объемы вакцины в более короткие сроки, а также будет способствовать снижению себестоимости препарата. Штамм A/PR/8/59/M2 (H1N1) депонирован в Государственной коллекции Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» под №V-654. Вакцинные штаммы, подготовленные с использованием нового донора аттенуации – A/59/M2/Калифорния/66/2211 (H2N2) и A/59/M2/Токио/67/22111 (H2N2) – депонированы в коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского под №2652 и №2653, соответственно.

Важным результатом диссертационной работы является разработка обратно-генетической системы для холодоадаптированного штамма A/Ленинград/134/17/57 – отечественного донора аттенуации для живой гриппозной вакцины, позволяющей получать вакцинные штаммы ЖГВ целиком из плазмидных ДНК, несущих все гены вируса. Успешная апробация данной системы на примере создания безопасных, иммуногенных и эффективных вакцинных штаммов против высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9 открыла перспективы целенаправленного конструирования вакцинных штаммов ЖГВ с любыми заранее заданными свойствами. Кроме того, такая система позволит конструировать рекомбинантные векторные вакцины на платформе живых гриппозных вакцин для защиты от различных вирусных и бактериальных инфекций, а также персонализированных вакцин от различных видов рака.

В результате выполнения данного исследования был решен ряд задач фундаментального характера. В частности, оценен вклад индивидуальных мутаций в генах донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 в проявление таких его биологических свойств, как

температурочувствительность и аттенуация для лабораторных животных. Представленные в работе данные о необходимости реверсии четырех *ts* мутаций в вакцинном штамме ЖГВ для полного восстановления дикого фенотипа вируса указывают на высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин, поскольку одновременная реверсия четырех мутаций, ответственных за *ts* фенотип вакцинного вируса, представляется крайне маловероятной. Кроме того, впервые доказан универсальный характер *ts* мутаций донора аттенуации Лен/17: при внесении данных мутаций в генетически удаленный вирус гриппа он приобретает температурочувствительный и аттенуированный фенотипы. Эти данные могут быть в дальнейшем использованы для рационального дизайна вакцинных штаммов на основе различных эпидемических и потенциально-пандемических вирусов гриппа А.

Большую практическую ценность представляет создание и проведение полного цикла доклинических и клинических исследований кандидатных вакцинных штаммов против потенциально-пандемических вирусов гриппа подтипов H2N2 и H7N9, которые дополнили Национальную коллекцию вакцинных штаммов для производства пандемических вакцин. Вакцинные штаммы A/17/Калифорния/66/4412 (H2N2), A/17/Токио/67/912 (H2N2) и A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) депонированы в коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского под №2650, №2651 и №2738, соответственно.

Вакцинные штаммы, сконструированные на основе высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9 методами геной инженерии, детально охарактеризованы в доклинических исследованиях, что является основанием для проведения первой фазы клинических испытаний на волонтерах экспериментальных серий ЖГВ из данных штаммов. В случае возникновения пандемии подготовленные в данном исследовании штаммы будут в кратчайшие сроки поставлены на производство, что позволит наработать необходимые объемы вакцины и привить наиболее уязвимые контингенты уже в первые месяцы пандемии.

Предложенная в диссертационном исследовании стратегия инкорпорирования NP гена от эпидемического вируса в состав вакцинных штаммов ЖГВ для усиления Т-клеточного иммунного ответа является универсальной и может быть распространена на инактивированные гриппозные вакцины. Вакцинные штаммы для ИГВ в настоящее время готовят на основе высокорепродуктивного вируса A/PR8/34, выделенного более 80 лет назад, и ЦТЛ-эпитопы которого также существенно устарели. Такой подход хоть и не позволяет сконструировать один универсальный вакцинный штамм, способный защитить привитых от различных подтипов вируса гриппа А, однако он очень прост в исполнении и может применяться уже в настоящее время для подготовки более кросс-реактивных живых и инактивированных гриппозных вакцин.

Представленный в диссертационном исследовании оригинальный способ индукции перекрестно-реагирующих антител, направленных на консервативный участок молекулы

гемагглютинина вирусов гриппа, открывает перспективы конструирования универсальной гриппозной вакцины, способной обеспечить защиту от различных подтипов вируса гриппа А. Успешная апробация такой системы в клинических испытаниях позволит защитить население от любого вновь возникшего вируса гриппа, в случае, если соответствующий вакцинный кандидат не был подготовлен заблаговременно (что и произошло во время пандемии 2009 года, вызванной совершенно новым вирусом H1N1pdm09 свиного происхождения).

Обобщая все вышесказанное, полученные в ходе диссертационного исследования научные данные могут быть использованы в практике здравоохранения для производства более эффективных гриппозных вакцин, что будет способствовать сохранению здоровья населения, снижению заболеваемости и смертности от гриппа и его осложнений.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Методология проведенных исследований представляет собой совокупность классических вирусологических, молекулярно-генетических, генно-инженерных, иммунологических, а также биоинформационных методов.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

1. Реассортантные штаммы на основе модифицированного холодаадаптированного донора аттенуации A/PR/8/59/M2 (H1N1) могут быть использованы для производства как живой, так и инактивированной гриппозной вакцины.
2. *Ts* мутации в генах донора аттенуации Лен/17 по степени влияния на температурочувствительный фенотип вируса располагаются следующим образом: PB2(V478L) > PB1(K265N) > PB1(V591I) > NS2(M100I). Для полного восстановления дикого фенотипа вируса требуется одновременная реверсия всех четырех *ts* мутаций, что подтверждает высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин.
3. Разработанная обратно-генетическая система для отечественного донора аттенуации Лен/17 позволяет успешно конструировать вакцинные штаммы ЖГВ против любых вирусов гриппа А, включая высокопатогенные штаммы H5N1 и H7N9.
4. Вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа А, подготовленные с использованием новых методических подходов, безвредны, иммуногенны и кросс-протективны в экспериментах на лабораторных животных и в ограниченных исследованиях на добровольцах.
5. Включение в состав вакцинных штаммов сезонной и пандемической живой гриппозной вакцины NP гена от актуального родительского вируса оптимизирует индукцию перекрестно-реагирующего Т-клеточного ответа. Включение в состав вакцинных штаммов ЖГВ химерных молекул гемагглютинина усиливает выработку антител к консервативному

stalk-домену молекулы НА после иммунизации. Комбинация обоих подходов является перспективной стратегией для создания универсальной гриппозной вакцины.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Достоверность результатов работы определена проведением всех экспериментальных и клинических исследований на самом высоком методическом уровне. Клинические испытания подготовленных в данном исследовании вакцин на добровольцах проводились согласно международным стандартам GCP (Good Clinical Practice, Надлежащая клиническая практика) под соответствующим контролем аккредитованных аудиторов. Положения, выносимые на защиту, а также выводы и практические рекомендации подкреплены большим массивом фактического материала, представленного в 84 рисунках, 52 таблицах и Приложении. Все полученные в ходе исследования экспериментальные данные подвергались тщательному статистическому анализу с использованием различных критериев описательной и аналитической статистики.

Основные положения диссертации были представлены в 23 докладах на 18 отечественных и международных научных конференциях и симпозиумах: Международной научной конференции «Universal influenza vaccines» (Lausanne, Switzerland, 2018); Международной научной конференции «2nd International Meetings on Respiratory Pathogens» (Singapore, 2018); Международной научной конференции «The Sixth European Influenza Conference. ESWI» (Riga, Latvia, 2017); Международной научной конференции «International Conference on Cancer and Infectious Diseases» (Madrid, Spain, 2017); Международной научной конференции «Options for the Control of Influenza IX» (Chicago, USA, 2016); Международной научной конференции «7th Orthomyxovirus Research Conference» (Toulouse, France, 2015); Международном симпозиуме «2015 Keystone Symposia Conference» (Breckenridge, USA, 2015); Международной научной конференции «The Fourth European Influenza Conference. ESWI» (Riga, Latvia, 2014); Международной научной конференции «Options for the Control of Influenza VIII» (Cape Town, South Africa, 2013); Совещании специалистов Всемирной Организации Здравоохранения «The First WHO integrated meeting on development and clinical trials of influenza vaccines that induce broadly protective and long-lasting immune responses» (Hong Kong SAR, China, 2013); Международной научной конференции «Influenza Vaccines for the World» (Valencia, Spain, 2012); Международной научной конференции «The Fourth European Influenza Conference. ESWI» (Malta, 2011); Международной научной конференции «Options for the Control of Influenza VII» (Hong Kong SAR, China, 2010); Всероссийской научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2017); Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2013); цикле

научных конференций молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2010, 2012, 2015).

ПУБЛИКАЦИИ. По материалам диссертационной работы опубликовано 55 научных работ, из них 33 научные статьи (27 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 24 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования) и 22 тезиса международных и отечественных научных конференций. Получено 3 патента на изобретения РФ.

РАЗДЕЛ II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Вирусы гриппа А и их эволюционная изменчивость

1.1.1. Классификация вирусов гриппа

Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae, одним из отличительных признаков которого является высокая степень эволюционной изменчивости вирусов. Всего различают четыре типа вирусов гриппа: А, В, С и D. Вирионы гриппа представляют собой сферические частицы диаметром 80-120 нм, содержащие в своем составе сегментированную однонитевую антисмысловую РНК, при этом у вирусов гриппа А и В в геноме содержится 8 сегментов РНК, а у вирусов гриппа С и D – по 7 сегментов [346, 369]. Тем не менее, последние исследования морфологии вирусных частиц при помощи электронной микроскопии показали, что все четыре типа вируса гриппа упаковывают в вирион восемь единиц рибонуклеинового комплекса, вне зависимости от количества фрагментов вирусной РНК в геноме [348]. Вирусы гриппа А могут инфицировать широкий круг хозяев, включая человека, лошадей, свиней, тюленей, собак, несколько видов семейства кошачьих, летучих мышей, а также различных птиц [371, 546]. Вирусы гриппа типа В в основном детектируются среди людей, при этом среди животных также встречаются чувствительные к данным вируса организмы (хорьки, тюлени) [210, 321, 367]. Ежегодные эпидемии гриппа вызываются вирусами гриппа А и В, при этом в мире регистрируется от 3 до 5 миллионов случаев тяжелых респираторных заболеваний каждый год, до 650 тысяч из которых заканчиваются летальным исходом [521]. Помимо ежегодных вспышек, вирусы гриппа А могут вызывать глобальные пандемии гриппа, в случае возникновения в циркуляции среди людей совершенно новых антигенных вариантов вирусов, к которым у населения отсутствует предсуществующий иммунитет. Несмотря на то, что вирусы гриппа В наносят меньший экономический и социальный ущерб по сравнению с вирусами гриппа А, они могут приводить к тяжелым осложнениям в виде вирус-индуцированной пневмонии [52], а также зачастую являются причиной летальных исходов у детей младшего возраста [151]. Вирусы гриппа С могут вызывать инфекционное заболевание у людей, собак и свиней, при этом они могут приводить к серьезным осложнениям и вызывать локальные эпидемические вспышки [28, 319, 320, 550]. Относительно недавно включенные в классификацию вирусы гриппа типа D инфицируют преимущественно крупный рогатый скот и другие виды небольших жвачных животных [191], однако в последние годы появились свидетельства циркуляции данных вирусов как среди свиней, так и в популяции лошадей [352]. Кроме того, серологические исследования предполагают эпизодическое инфицирование вирусами гриппа D людей, контактирующих с крупным рогатым скотом [512].

Вирусы гриппа А характеризуются наибольшей степенью генетического разнообразия среди всех типов вирусов гриппа. Эти вирусы далее классифицируются на подтипы, в зависимости от антигенных свойств двух поверхностных гликопротеидов – гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Всего в настоящее время различают 18 субтипов гемагглютинина и 11 субтипов NA, при этом для H1-H16 и N1-N9 подтипов природным резервуаром являются дикие водоплавающие птицы, тогда как вирусы подтипов H17N10 и H18N11 были обнаружены только у летучих мышей [353, 484]. За всю историю наблюдений лишь три подтипа вируса гриппа А были способны вызывать устойчивые эпидемии и пандемии среди людей: H1N1, H2N2 и H3N2 [353]. Вирусы гриппа птиц H5N1 и H7N9 явились причиной тяжелых инфекционных заболеваний у нескольких сотен людей с момента их появления в циркуляции в 1997 (для вирусов гриппа H5N1) и 2013 году (для вирусов подтипа H7N9), однако данные вирусы пока не приобрели способности устойчиво передаваться от человека к человеку [51, 152, 189]. Помимо данных подтипов, вирусы гриппа H5N6, H9N2, H6N1, H7N7, H10N8, H7N2, H7N3 и H7N4 также способны эпизодически передаваться от птиц к человеку, вызывая тяжелые инфекционные заболевания, зачастую с летальным исходом [203, 245, 355, 480, 509, 523, 558].

1.1.2. Организация генома и основные функции белков вируса гриппа А

Геном вируса гриппа А состоит из 8 отдельных сегментов РНК негативной полярности, которые, по современным оценкам кодируют до 17 вирусных белков, основная часть из которых входит в состав вириона, а некоторые белки присутствуют только в зараженной клетке, т.е. являются неструктурными [495, 561] (Рис. 1, табл. 1). Вирусные частицы содержат липидную оболочку, полученную от зараженной клетки в процессе отпочковывания на завершающей стадии репродукции вируса. В мембранную оболочку встроены три различные белка вируса: HA, NA и M2. HA и NA являются гликопротеинами, закрепленными в липидном бислое короткими последовательностями гидрофобных аминокислот. Молекулы HA представлены на мембране вириона в виде гомотримеров и под электронным микроскопом визуализируются в виде стержнеобразных шипов. Гемагглютинин ответственен за связывание вируса с рецепторами (сиаловыми кислотами) на клеточной мембране (Таблица 1). HA синтезируется в клетке в виде предшественника – HA0, который далее расщепляется клеточными протеазами на две субъединицы – HA1 и HA2, которые остаются соединенными дисульфидной связью [91]. Эктодомен HA состоит из двух частей: глобулярной, образованной субъединицей HA1, и стволовой, которая состоит в основном из субъединицы HA2 и частично HA1 (Рисунок 1В). Глобулярная часть включает рецептор-связывающий сайт и пять антигенных сайтов и является основной мишенью для образования антител. Для субъединицы HA1 характерна высокая изменчивость. Стволовая часть HA расположена в непосредственной

близости от вирусной мембраны и отличается слабой иммуногенностью. Субъединица NA2 играет основную роль в обеспечении слияния вирусной мембраны с эндосомальной и отличается высокой консервативностью [13]. Молекулы NA входят в состав вириона в виде гомотетрамеров, и представляют собой грибовидные выступы на вирусной мембране [108]. Функция NA заключается в отщеплении остатков сиаловых кислот от клеточных рецепторов, что позволяет вирусным частицам отпочковываться от зараженной клетки. M2-белок является трансмембранным гомотетрамером, который функционирует как ионный канал для снижения pH внутри вирусной частицы на ранних стадиях вирусной инфекции, что необходимо для высвобождения вирусного генома в цитоплазму зараженной клетки [380]. Под липидной оболочкой вириона имеется прослойка, состоящая из матричного белка M1 – основного структурного компонента вирусной частицы (Рисунок 1). Выстилая внутреннюю поверхность мембраны вирусных частиц и выполняя таким образом стабилизирующую роль, белок M1 выполняет еще целый ряд функций. Он узнает участки мембраны клетки, модифицированные вирусспецифическими поверхностными гликопротеидами, присоединяется к этим участкам с внутренней стороны мембраны и также сам служит местом узнавания при объединении сегментов рибонуклеопротеинового (РНП) комплекса в процессе сборки вирионов [426].

Внутри вириона все восемь сегментов вРНК связаны с нуклеопротеином (NP) и полимеразным комплексом вируса (Рисунок 1). Вслед за M1, NP является самым распространенным белком в вирионе: в каждой вирусной частице присутствует до 1000 копий данного белка, при этом каждый мономер NP взаимодействует приблизительно с 20 нуклеотидами вирусной РНК [108]. Выполняя важную структурную функцию, NP белок является относительно консервативным среди различных вирусов гриппа А, поэтому CD8+ Т-клеточный иммунный ответ, основной мишенью для которого служит NP белок, обладает кросс-реактивным потенциалом [178, 280]

РНК-полимеразный комплекс состоит из трех субъединиц полимеразы (PB2, PB1 и PA). Оба конца вРНК взаимодействуют друг с другом с образованием замкнутых или суперскрученных структур, а вирусная РНК-полимераза взаимодействует с обоими концами вРНК внутри вирусной частицы [267]. Белок NS2, который в настоящее время носит название NEP (nuclear export protein), также присутствует в вирионах в малых количествах. Он участвует в транспортировке вРНК из ядра в цитоплазму в инфицированных клетках [362] (Рисунок 1, Таблица 1).

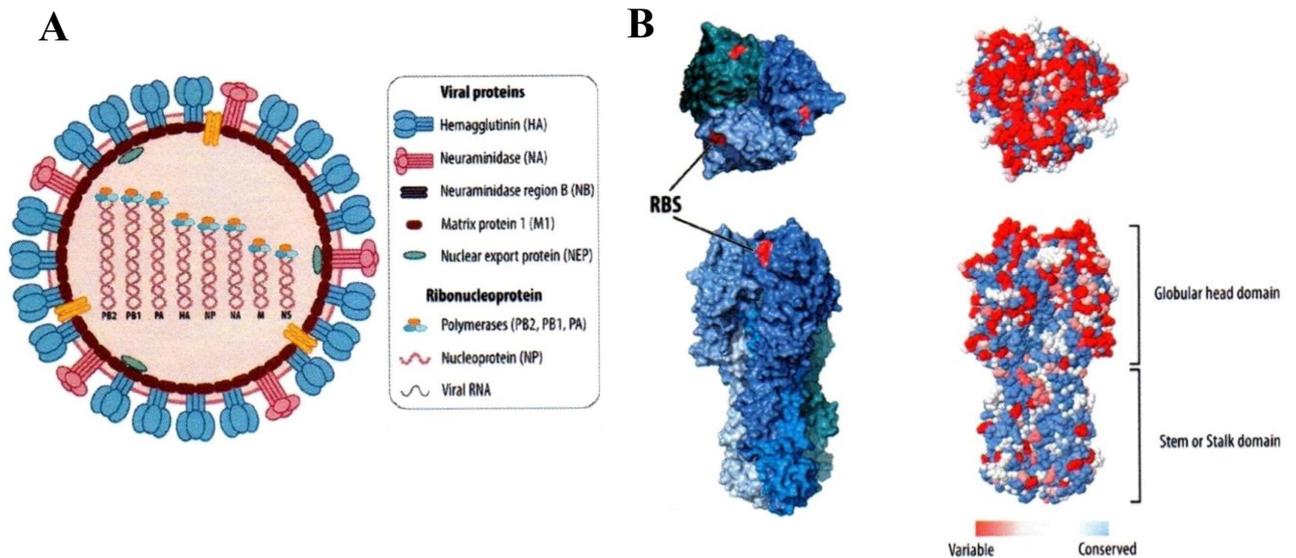


Рисунок 1. Структура вируса гриппа А. **А.** Схематичное изображение вириона гриппа и основных структурных белков вириона. **В.** Трехмерное изображение тримера молекулы гемагглютинина вируса гриппа А. Указаны рецептор-связывающий карман (RBS), а также отмечены вариабельные и консервативные аминокислотные остатки. Адаптировано из [391].

Помимо структурных белков, входящих в вирион гриппа, вирусный геном кодирует ряд неструктурных белков, участвующих в жизненном цикле вируса. Так, у некоторых штаммов вируса гриппа А с альтернативной рамки считывания сегмента 2 транслируется белок PB1-F2, который является фактором патогенности вируса гриппа. Он индуцирует апоптоз, ингибирует функции иммунокомпетентных клеток, а также взаимодействует с PB1 субъединицей вирусной полимеразы и регулирует ее активность [89, 115, 552]. Неструктурный белок NS1 накапливается в цитоплазме зараженных клеток и выполняет множество различных функций, основная из которых – ингибирование системы интерферона клетки-хозяина [144] (Табл. 1). За последние десятилетие были открыты дополнительно шесть белков, закодированных в геноме вируса гриппа А – PB1-N40, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42 и NS3, которые участвуют в регуляции экспрессии вирусных белков, могут влиять на развитие иммунного ответа клетки на вирусную инфекцию, а также влиять на уровень патогенности вируса гриппа для организма в целом [495] (Табл. 1).

Таблица 1. Белки вируса гриппа А и их основные функции (адаптировано из [495]).

Сегмент	Длина, н.о. ¹	Белок	Размер, а.к. ¹	Функция
1	2341	PB2	759	PB2 является субъединицей вирусной РНК-зависимой РНК полимеразы, напрямую взаимодействует с белком PA. PB2 распознает 5'-кэпированную пре-мРНК клетки-хозяина. Является фактором контроля патогенности вируса гриппа А и определяет диапазон круга хозяев.
2	2341	PB1	757	Каталитическая субъединица вирусной полимеразы, взаимодействует с субъединицами PB2 и PA.
		PB1-N40	718	PB1-N40 является усеченным по N-концу вариантом белка PB1. Участвует в регуляции экспрессии белков PB1 и PB1-F2 для поддержания их баланса.
		PB1-F2	90	PB1-F2 является фактором патогенности вируса гриппа А. Индуцирует апоптоз, взаимодействует с PB1 субъединицей вирусной полимеразы и регулирует ее активность.
3	2233	PA	716	PA является субъединицей вирусной РНК-зависимой РНК полимеразы, взаимодействует с PB1 субъединицей. Обладает эндонуклеазной активностью, отщепляет кэп-структуры пре-мРНК клетки-хозяина. Имеет сигнал ядерной локализации.
		PA-X	252	PA-X участвует в регуляции иммунного ответа на вирусную инфекцию, а также является фактором патогенности вируса гриппа А.
		PA-N155	568	Возможная роль в цикле репликации вируса гриппа.
		PA-N182	535	Возможная роль в цикле репликации вируса гриппа.
4	1733	HA	560	Основной антиген вируса гриппа. HA ответственен за связывание вируса с рецепторами (сиаловыми кислотами) на клеточной мембране.
5	1565	NP	498	Основной компонент рибонуклеинового комплекса вируса гриппа. NP контролирует внутриклеточный транспорт вирусной РНК.
6	1444	NA	465	NA отщепляет остатки сиаловых кислот от клеточных рецепторов, участвует в процессе отпочковывания вирусных частиц от зараженной клетки.
7	1027	M1	252	M1 – основной структурный компонент вирусной частицы, участвует в сборке и почковании вирионов.
		M2	97	M2 – мембранный белок, служит протонным каналом. Необходим для высвобождения вирусного генома в цитоплазму зараженной клетки.
		M42	99	Функции схожи с M2 белком.
8	890	NS1	217	NS1 – многофункциональный белок, вовлеченный в различные стадии взаимодействия вируса и клетки. Антагонист противовирусного ответа клетки, регулятор экспрессии вирусных и клеточных генов.
		NEP	121	NS2 (NEP) - структурный белок вириона, участвует в транспорте вирусной РНК из ядра в цитоплазму.
		NS3	174	Предположительно, участвует в адаптации вируса гриппа А к мышам.
		NEG8?	156	Гипотетический белок. Функции пока не известны.

¹на примере вируса А/Ануи/1/2013 (H7N9).

1.1.3. Антигенная изменчивость вируса гриппа А

Постоянная изменчивость – неотъемлемая черта вирусов гриппа, имеющая важнейшее эпидемиологическое значение. Рекомбинационная (реассортационная) изменчивость вирусов гриппа А обусловлена сегментированностью его геномной РНК. Совместная циркуляция нескольких подтипов вируса гриппа делает возможным появление генетических реассортантов при смешанной инфекции чувствительного организма двумя различными подтипами вируса, в результате чего появляются варианты, унаследовавшие часть сегментов РНК от одного родительского штамма, а часть – от другого. Появление вследствие реассортации новых вирулентных вариантов вируса гриппа А, к которым у населения отсутствует защитный иммунитет, приводит к возникновению глобальных пандемий [65, 268, 542, 549]. Всего за последние 100 лет было зарегистрировано 4 пандемии гриппа (Рисунок 2), наиболее тяжелая из которых пришлась на 1918-1919 гг (пандемия «испанки»), в результате которой по разным оценкам погибло от 30 до 50 миллионов людей во всем мире [242]. Эта пандемия была обусловлена появлением в циркуляции нового вируса гриппа А(Н1N1), причем до настоящего времени остается неясным механизм его появления. Предположительно, вирус Н1N1 возник в результате реассортации вирусов гриппа человека и птиц, однако четких доказательств данного явления пока не получено [397]. В отличие от пандемии 1918 года, происхождение возбудителей всех последующих пандемий удалось четко установить. Так, пандемии 1957 года и 1968 года возникли в результате реассортации вирусов гриппа человека с вирусами диких водоплавающих птиц евразийской линии [250, 432]. Пандемический вирус Н2N2 приобрел НА, NA и PB1 гены от птичьего вируса Н2N2, а остальные 5 сегментов – от вируса гриппа человека Н1N1 [167, 250, 434]. Вирусы Н2N2 быстро распространились в популяции людей, вызвав пандемию «сингапурского» гриппа в 1957 году, вытеснив из циркуляции вирусы Н1N1.

Пандемический вирус Н3N2, или «гонконгский» штамм, появился в циркуляции в 1968 году в результате реассортации циркулирующего вируса Н2N2 и птичьего штамма Н3N2, причем от птичьего вируса он унаследовал только НА и PB1 гены [141, 167, 250, 434]. Интересно, что вирусы Н1N1 вернулись в циркуляцию среди людей в 1977 году, и с тех пор вирусы Н1N1 и Н3N2 социркулируют в человеческой популяции [560]. Последняя пандемия гриппа, возникшая в 2009 году, была вызвана новым вирусом подтипа рН1N1, явившимся результатом реассортации вирусов гриппа свиней, птиц и человека. Так, пандемический штамм унаследовал НА, NP и NS гены от классического вируса свиней Н1N1, NA и М гены – от евразийской линии вируса гриппа свиней Н1N1, PB2 и PA гены – от вируса птиц, и только PB1 ген – от вируса человека [160]. Вирусы рН1N1 вытеснили из циркуляции классические вирусы Н1N1, и в настоящее время они социркулируют в популяции людей с вирусами гриппа подтипа Н3N2.

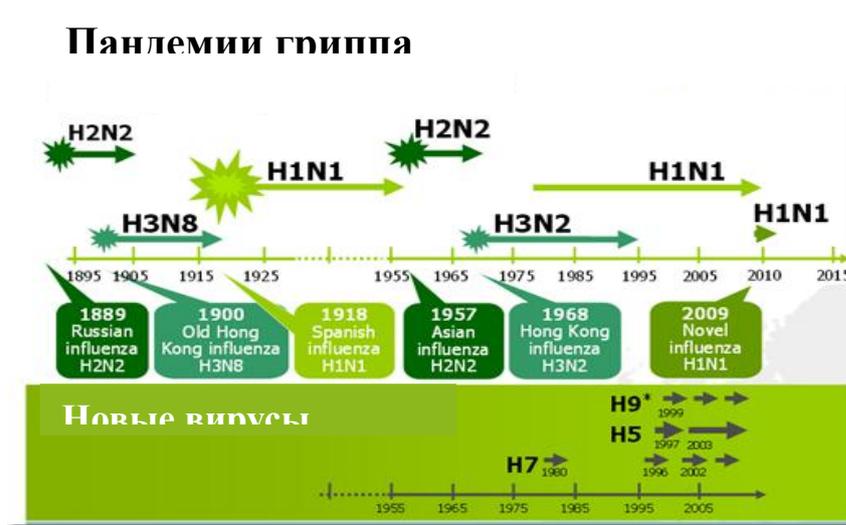


Рисунок 2. Зарегистрированные пандемии гриппа и циркуляция потенциально-пандемических вирусов гриппа птиц. Адаптировано из: [135].

Помимо рекомбинационной изменчивости, вирусам гриппа свойственна постоянная мутационная изменчивость, являющаяся следствием минорных изменений нуклеотидных последовательностей отдельных сегментов РНК вирусного генома. Мутации в основных антигенах вируса гриппа – поверхностных гликозилированных белках HA и NA – позволяют вирусу уходить от нейтрализующего действия антител, выработанных организмом в ответ на предыдущую инфекцию или иммунизацию. Этот процесс, именуемый антигенным дрейфом, ответственен за ежегодно повторяющиеся эпидемии сезонного гриппа в осенне-зимние периоды, в результате чего приходится часто обновлять вакцинные штаммы в составе противогриппозных вакцин [433, 478]. Стоит отметить более высокую степень эволюционной изменчивости эпидемических вирусов гриппа подтипа H3N2 по сравнению с подтипом H1N1, в результате чего вирусы H3N2 характеризуются большим генетическим разнообразием, и новые варианты эпидемически значимых штаммов данного подтипа возникают не только вследствие появления точечных замен в антигенных детерминантах вируса, но и благодаря явлению реассортации между его различными эволюционными ветвями [60, 168, 393, 408, 539].

1.1.4. Потенциально-пандемические вирусы гриппа А

Пандемия гриппа возникает, когда вирус гриппа А, несущий новый ген гемагглютинаина (при этом нейраминидаза может быть как новой, так и принадлежащей уже циркулирующим штаммам), начинает активно циркулировать в популяции людей, не имеющих защитного иммунитета к данным вирусам. Из анализа предыдущих пандемий известно, что источником нового варианта HA служат вирусы гриппа А, циркулирующие в природном резервуаре (птицы, свиньи) [160, 250, 432]. Глобальное распространение вирусов гриппа А

разнообразных подтипов в резервуаре птиц предоставляет постоянную возможность для межвидовой трансмиссии и заноса новых вариантов вирусов в человеческую популяцию [152]. При условии, что новый вирус будет обладать высокой вирулентностью для людей, а также будет легко передаваться от человека к человеку, риск возникновения пандемии очень высок. Каждый случай инфицирования человека зоонозным вирусом гриппа, приводящий к тяжелому заболеванию (зачастую с летальным исходом), представляет уникальную возможность для чрезвычайно изменчивого вируса гриппа либо далее адаптироваться к клеткам человека и стать трансмиссивным, либо реассортировать с адаптированным к человеку циркулирующим штаммом и, таким образом, вызвать следующую пандемию гриппа [324]. В этой связи множественные случаи заражения людей вирусами гриппа птиц различных подтипов в последние десятилетия (рис. 2) являются тревожными сигналами и требуют всестороннего анализа выделяемых штаммов с оценкой их пандемического потенциала [35, 69, 159, 251, 522, 526].

Первые случаи заражения людей высокопатогенными вирусами гриппа (ВПВГ) птиц подтипа H5N1 были зарегистрированы в 1997 году в Гонконге, при этом из 18 заболевших 6 скончались [462]. Причиной заболевания был вирус, появившийся в циркуляции среди диких водоплавающих птиц в 1996 – A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) [541]. Данные вирусы вызвали многочисленные вспышки летальных инфекций у домашней птицы в Китае, приведя к значительному социально-экономическому ущербу [234]. ВПВГ H5N1 вновь возникли в циркуляции среди диких птиц в 2002 году, и с тех пор они стали эндемичными практически на всех континентах [234, 356]. В период с 2003 по 2018 гг было зарегистрировано 860 случаев инфицирования людей ВПВГ H5N1, 454 из которых привели к летальному исходу [526]. Вирусы H5N1 характеризуются широким генетическим разнообразием: современная классификация различает 10 основных клейдов вируса по генетической структуре молекулы HA (нумерация с 0 по 9), каждый из которых далее дивергируется на многочисленные субклеиды [445]. Помимо генетического и антигенного разнообразия молекулы HA ВПВГ H5N1, в циркуляции возникли варианты с заменой молекулы HA с N1 на N2, N3, N5, N6, N8 или N9 [84, 246, 290, 297, 302]. Однако, несмотря на огромное разнообразие антигенных вариантов молекулы HA высокопатогенных вирусов H5, отдельные клейды могут преобладать в циркуляции среди перелетных птиц в том или ином сезоне, вызывая вспышки среди домашней птицы в различных регионах мира. Например, в сезоне 2017-2018 выделялись ВПВГ H5Nx в основном двух линий - 2.3.2.1 и 2.3.4.4 [522]. Начиная с 2014 года, было также зарегистрировано 19 случаев заражения людей вирусами H5N6, как минимум 9 из которых были летальны [522, 556]. Несмотря на то, что были задокументированы случаи ограниченной передачи вирусов H5N1 от человека к человеку, в основном среди кровных родственников, до

настоящего времени данные вирусы не приобрели устойчивой способности к распространению среди людей аэрозольным путем [489, 503].

В начале 2013 г. были задокументированы первые случаи заражения людей новым вирусом гриппа птиц подтипа А(Н7N9), и за первую волну циркуляции вируса было подтверждено инфицирование 139 людей, включая 45 смертельных случаев. К концу 2017 года уже было подтверждено в общей сложности инфицирование 1557 людей, по меньшей мере 605 (39%) из которых закончились летальным исходом, причем больше половины всех случаев было задокументировано во время пятой волны [257] (рисунок 3).

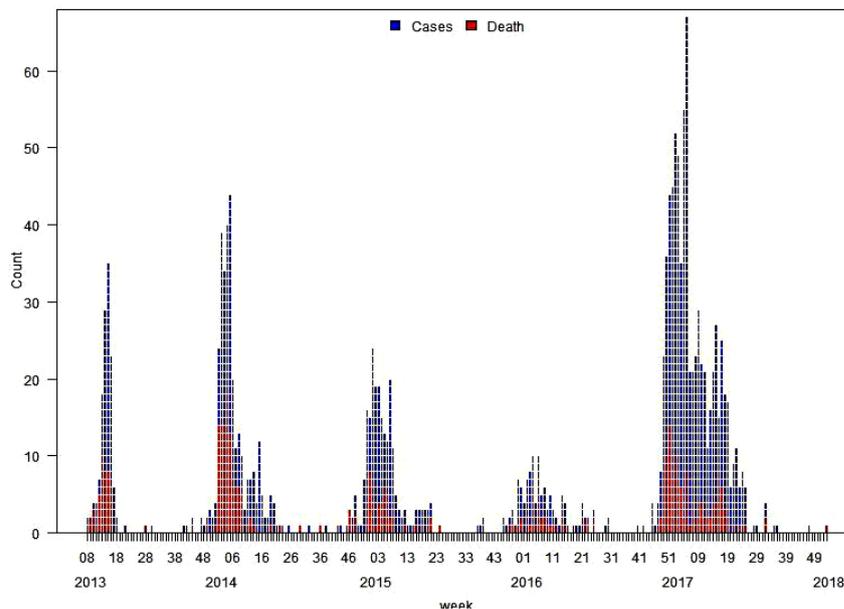


Рисунок 3. Детекция вирусов гриппа H7N9 у людей в период с 2013 по 2017 гг. Красным цветом отмечены летальные случаи заражения. Источник: [527].

Детальное изучение свойств новых вирусов показало, что они являются низкопатогенными для птиц, т.е. не вызывают заболевания у птиц, и, соответственно, практически не поддаются контролю. Данные вирусы обладают способностью связываться как с рецепторами $\alpha 2,3$ типа, свойственными клеткам птиц, так и с рецепторами $\alpha 2,6$ типа, свойственными млекопитающим [438, 563]. И, несмотря на отсутствие эффективной передачи вируса между хорьками воздушно-капельным путем, такая двойственная рецепторная специфичность вирусов H7N9 является тревожным фактором, т.к. даже минорные адаптационные изменения в рецептор-связывающей области гемагглютинаина могут привести к появлению вируса, способного передаваться от человека к человеку [70, 557]. Результаты нескольких исследований указывают на способность вирусов H7N9 активно размножаться в органах мышей (с высоким уровнем смертности), хорьков и приматов, а также в клетках, выстилающих эпителий дыхательных путей человека [70, 563, 564]. Такая высокая вирулентность вирусов H7N9, наличие в геноме множественных маркеров адаптации к клеткам

млекопитающих, а также их персистенция в популяции птиц создают предпосылки для возникновения новой пандемии H7N9. Тревожными сигналами также служат эпизоды выделения от зараженных животных и людей штаммов H7N9, устойчивых к нейраминидазным ингибиторам – основным препаратам, используемым во всем мире для лечения гриппозной инфекции [186, 220, 547], а также случаи выделения высокопатогенных вариантов вирусов A(H7N9), как от домашней птицы, так и от больных людей [298, 388, 460]. Так, среди 759 человеческих инфекций, выявленных в пятой эпидемии, 28 имели высокопатогенный фенотип [519].

Кроме указанных выше случаев заражения людей вирусами гриппа птиц H5N1, H5N6 и H7N9, спорадически регистрируются инфекции, вызванные и другими подтипами вируса гриппа А, чаще всего при тесном контакте с зараженной птицей: H9N2, H6N1, H7N3, H7N7 и H10N8 [47, 211, 244, 355, 551]. Несмотря на то, что до настоящего времени не зарегистрировано устойчивой передачи вирусов гриппа птиц от человека к человеку, последние исследования свидетельствуют, что некоторым патогенным вирусам гриппа достаточно приобрести определенный набор мутаций, чтобы вирус начал распространяться среди млекопитающих воздушно-капельным путем. Кроме того, в популяции птиц уже присутствует пул вирусных генов, способных произвести новый, по-настоящему пандемический вариант вируса [201, 296, 508, 540, 563]. Не стоит забывать, что потенциально пандемические вирусы гриппа могут возникнуть и вследствие реассортации в промежуточном хозяине птичьих вирусов с вирусом гриппа человека, в результате чего может появиться штамм, обладающий вирулентным потенциалом птичьего вируса, при этом способного устойчиво распространяться среди людей [105, 222, 258, 259, 292, 389].

Среди зоонозных вирусов гриппа, помимо вирусов гриппа птиц, определенным пандемическим потенциалом обладают и вирусы млекопитающих, в первую очередь свиней. [47]. Так, в США зарегистрированы множественные случаи инфицирования людей свинным вирусом H3N2v (v – variant), начиная с 2012 года [233]. Данные вирусы в основном вызывают умеренное заболевание, и большинство инфекций было зафиксировано у детей, контактировавших со свиньями на фермерских выставках и шоу [47]. Инфицирование людей вариантными штаммами вирусов гриппа свиней H3N2v было зафиксировано в Азии, Европе и Северной Америке [47, 338]. Вирусы гриппа свиней подтипа H1N1v также вызвали несколько случаев заболевания у людей, однако масштабного распространения эти вирусы не получили и ущерб от них был значительно ниже, по сравнению с вирусами H3N2v [47, 502]

В последние годы в Центре по контролю за заболеваемостью (CDC, Атланта, США) проводят на регулярной основе оценку пандемического потенциала вирусов зоонозного происхождения, которые спорадически передаются человеку. Для этого был разработан

алгоритм, именуемый Influenza Risk Assessment Tool (IRAT), который использует мультифакторную аддитивную модель для определения сводного показателя риска для каждого вируса гриппа. Несмотря на то, что IRAT не предназначен для прогнозирования следующего пандемического вируса гриппа А, этот инструмент вносит важный вклад в принятие решений по различным аспектам подготовки к будущей пандемии гриппа на уровне ВОЗ [92]. По последним оценкам с использованием IRAT, наибольшим пандемическим потенциалом обладают вирусы H7N9, за которыми следуют вирусы H3N2v и H9N2 (Рис. 4). Прогнозируется, что наибольший ущерб будет нанесен в случае пандемии, вызванной вирусами H7N9 и H5N1/H5N6.

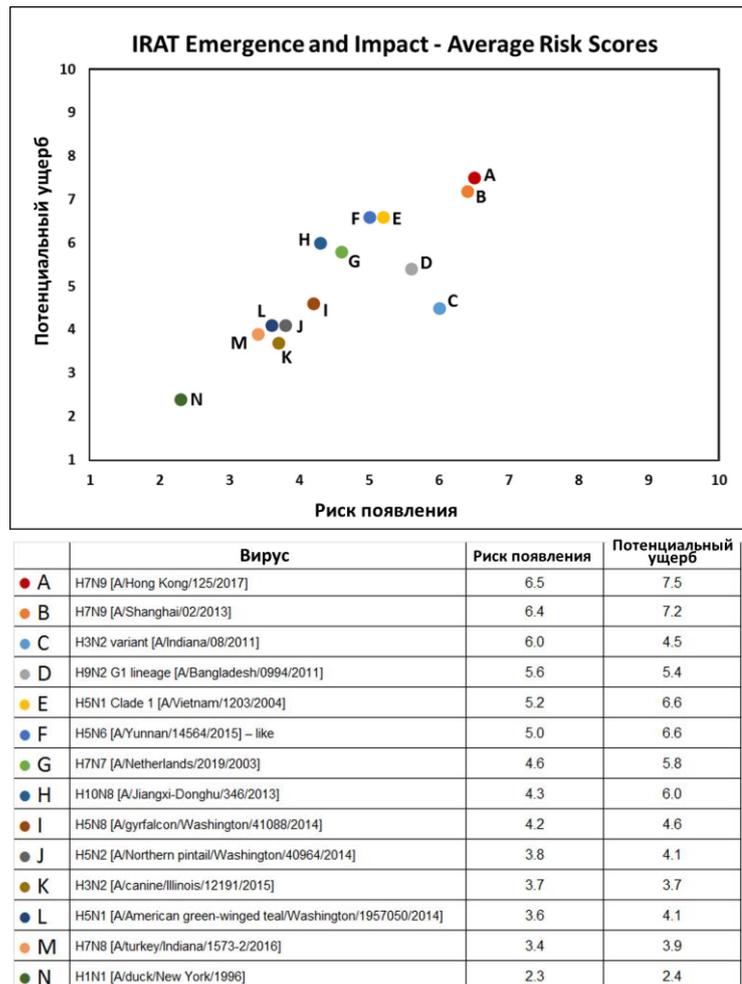


Рисунок 4. Оценка риска появления в циркуляции пандемических вирусов гриппа зоонозного происхождения, а также оценка потенциального ущерба от пандемии, с использованием Influenza Risk Assessment Tool (IRAT). Источник: [100].

Помимо вирусов гриппа А зоонозного происхождения, пандемическим потенциалом обладают вирусы гриппа, ранее циркулировавшие в человеческой популяции, но вытесненные из циркуляции вирусами другого подтипа. Данные сероархеологии свидетельствуют, что вирусы гриппа А, содержащие НА подтипов Н1, Н2 и Н3, рециркулируют в популяции людей, периодически сменяя друг друга [133] (Рис. 2). Ввиду того, что уже на протяжении 50

последних лет в циркуляции присутствовали только сезонные вирусы H1N1 и H3N2, а вирусы, несущие гемагглютинин H2, продолжают существовать в природном резервуаре (дикие и домашние птицы и свиньи), у вирусов подтипа H2N2 сформировались все условия для возвращения в популяцию людей [174, 183, 305, 312, 479]. Поскольку известно, что пандемия азиатского гриппа H2N2 в 1957 году привела к значительным потерям, а у большей части населения (люди младше 50 лет) отсутствует иммунитет к этим вирусам, можно предположить, что следующая пандемия гриппа H2N2 также нанесет серьезный социально-экономический ущерб.

Группа американских ученых провела всесторонний анализ большого числа вирусов подтипа H2, выделенных от птиц и свиней за последние 60 лет, используя алгоритм, аналогичный IRAT, и показала, что вирусы A/Swine/Missouri/2124514/2006 (H2N3) и A/Duck/Hong Kong/319/1978 (H2N2) обладали наивысшим пандемическим потенциалом [243]. Эти данные также подтверждают высокий риск возвращения в циркуляцию среди людей вирусов H2N2 и, соответственно, представляется необходимым подготовиться к такому сценарию.

1.2 Современные вакцины для профилактики сезонного гриппа

Ввиду чрезвычайно высокой изменчивости вирусов гриппа, способных легко преодолеть иммунный барьер чувствительного организма за счет индивидуальных мутаций или путем реассортации отдельных генов, полностью избавиться от данной инфекции в ближайшем будущем не представляется возможным. Среди различных стратегий борьбы с ежегодными эпидемиями гриппа специфическая вакцинопрофилактика является наиболее эффективной, поскольку позволяет защитить наиболее уязвимые категории граждан от тяжелых последствий гриппозной инфекции, а также снизить экономические потери за счет уменьшения заболеваемости трудоспособного населения [34, 386, 525].

Из-за постоянной антигенной изменчивости вирусов гриппа практически ежегодно обновляется состав вакцинных штаммов для сезонных гриппозных вакцин на основе информации, которую предоставляет 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, собирает и анализирует на постоянной основе образцы вирусов гриппа по всему миру, дважды в год давая рекомендации по составу вакцинных штаммов для Южного и Северного полушарий [559].

Существует два основных типа гриппозных вакцин – живые (ЖГВ) и инактивированные (ИГВ). Традиционно вакцины против гриппа были трехвалентными для защиты от двух

циркулирующих подтипов вируса гриппа А (H3N2 и H1N1) и от вируса гриппа В. Социркуляция двух генетических линий вируса гриппа В, и при этом отсутствие перекрестной реактивности антител между этими линиями [468], привела к разработке и лицензированию четырехвалентных вакцин, содержащих штаммы обеих линий вируса гриппа В [72, 396].

1.2.1. Инактивированные гриппозные вакцины

В настоящее время лицензированы для профилактики гриппа четыре вида инактивированных гриппозных вакцин: цельновирионные вакцины, расщепленные вакцины, субъединичные вакцины, а также разрешенная к применению в 2013 году рекомбинантная белковая вакцина Flublok [87, 88, 120]. Цельновирионная гриппозная вакцина представляет собой суспензию инактивированных высокоочищенных не разрушенных (цельных) вирионов вируса гриппа. Расщепленная вакцина содержит разрушенные инактивированные вирионы вируса гриппа, при этом в вакцине присутствуют все вирионные белки вируса. Субъединичная вакцина состоит лишь из двух вирусных белков – гемагглютинина и нейраминидазы – играющих наиболее важную роль в индукции гуморального иммунного ответа против гриппа. Из этих трех видов гриппозных вакцин, цельновирионная вакцина вызывает несколько больше неблагоприятных реакций, особенно у маленьких детей, в сравнении с расщепленной вакциной, а наименее реактогенна субъединичная вакцина. Иммуногенность цельновирионной и расщепленной вакцин практически одинакова [6]. Все инактивированные вакцины вводятся парентерально и стандартизованы по количественному содержанию основного вирусного белка – гемагглютинина. Наиболее часто применяются вакцины с содержанием 15 мкг НА на каждый вакцинный штамм, хотя и вакцины с более высоким содержанием НА (60 мкг на штамм) также лицензированы для применения у пожилых лиц [130, 131]. Адъюванты типа MF59 и ASO3 повышают иммуногенность инактивированных вакцин и используются в основном для иммунизации пожилых лиц, а также для снижения содержания вирусных белков в пандемических вакцинах [106, 361]. Инактивированные вакцины имеют достаточный профиль безопасности, рекомендуются для детей в возрасте от 6 месяцев, пожилых людей, астматиков и лиц других групп риска по здоровью [450]. В России для профилактики сезонного гриппа наиболее широко применяются полимер-субъединичные вакцины, которые содержат пониженное количество гемагглютинина в дозе (5 мкг на каждый вакцинный штамм), но при этом обладают высокой степенью иммуногенности за счет добавления иммуностимулятора полиоксидоний [30].

Основным недостатком инактивированных вакцин является необходимость вводить их парентерально, в результате чего отсутствует формирование мукозального иммунного ответа во 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 [232]. Кроме того, ИГВ не способны индуцировать мощный долгоживущий Т-клеточный иммунный ответ на вакцинацию [73, 449]. Согласно опубликованному в 2016 году мета-анализу данных по эффективности вакцин с 2004 по 2015 гг, эффективность ИГВ составила 33% для вирусов H3N2 (и лишь 23% для дрейфовых вариантов вируса H3N2), 61-67% для вирусов гриппа H1N1 и 54% для вирусов гриппа типа В [68]. Слабая способность ИГВ защищать от дрейфовых вариантов вируса гриппа H3N2 существенным образом сказывается на ее эффективности в эпидемические сезоны, вызванные циркуляцией антигенно отличающихся вариантов вируса H3N2 [395, 443, 539, 567].

Тем не менее, в последнее время появились свидетельства, что ИГВ все же обеспечивают некоторую защиту от дрейфовых вариантов вируса H3N2, даже несмотря на то, что вакцин-индуцированные вируснейтрализующие антитела не способны нейтрализовать эти эволюционировавшие вирусы. Так, появившиеся в циркуляции в 2014-2015 гг в Северном полушарии дрейфовые варианты вируса H3N2 генетических линий 3С.2а и 3С.3а позволили определить, какие факторы вовлечены в обеспечение кросс-протективности инактивированных вакцин, подготовленных из вакцинного штамма, принадлежащего линии 3С.1 [124]. В исследовании американских авторов 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 H3N2 [562].

Подавляющее большинство вакцинных штаммов для ИГВ готовится на основе высокорепродуктивного донора – штамма A/PR/8/34 (H1N1) [518]. Данный вирус прошел более 100 пассажей в тканях мышей, хорьков, а также в системе РКЭ, в результате чего утратил способность реплицироваться в клетках человека, т.е. стал безвредным для людей [67]. Хотя вирусы на основе донора PR8 включаются в вакцину в инактивированном виде, с вакцинными штаммами до их инактивации проводится достаточно много манипуляций, поэтому работники лабораторий и вакцинных производств постоянно подвергаются риску инфицирования этими вирусами. Ранние исследования подтвердили, что реассортантные штаммы на основе вируса PR8 и различных эпидемических циркулирующих вирусов гриппа были в основном безопасны для людей, но при этом степень аттенуации вирулентных свойств вирусов варьировала в зависимости от конкретного поверхностного антигена (в основном НА), включенного в вакцину [66, 67, 147, 368]. Стоит отметить, что в ранних исследованиях количество генов донора PR8, включенных в вакцинный реассортантный штамм, значительно варьировала ввиду использования метода классической реассортации для додготовки высокорепродуктивных

штаммов. При этом было показано, что степень аттенуации вакцинных штаммов для людей напрямую зависела от количества включенных в геном вакцинного вируса генов PR8 [147, 148]. В настоящее время большинство реассортантных штаммов для ИГВ готовится методами обратной генетики, поэтому всегда содержат шесть генов внутренних и неструктурных белков от донора PR8, исключая возможность усиления вирулентных свойств вируса [518]. 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 [241, 518]. В этой связи представляется весьма важным дополнительно модифицировать высокорепродуктивный донор PR8 с целью усиления аттенуирующих свойств вакцинных штаммов ИГВ, подготовленных на его основе.

1.2.2. Живые гриппозные вакцины

Действующим началом живой гриппозной вакцины является ослабленный (аттенуированный) возбудитель, утративший в результате специальных воздействий способность вызывать заболевание при введении в дыхательные пути (безболезненный интраназальный путь введения). Вакцинный вирус сохраняет, однако, способность размножаться в эпителии верхних дыхательных путей и индуцировать в ходе бессимптомной инфекции все основные звенья приобретенного иммунитета.

1.2.2.1. Лицензированные живые гриппозные вакцины

Первая ЖГВ была разработана в СССР в 1930-х годах под руководством профессора А.А. Смородинцева, когда исследователи обнаружили, что вирус гриппа теряет свою вирулентность для людей после серии пассажей в легких мышей [446]. Это наблюдение способствовало разработке вакцин методом переадаптации возбудителя (изменение круга хозяев, *host-range*) путем многократного пассирования вирусов гриппа в органах различных животных, а, начиная с 1948 года – в РКЭ. 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 [2].

В 1960-х годах был предложен новый подход к получению вакцинных штаммов ЖГВ путем адаптации вирусов гриппа к репродукции при пониженных температурах инкубации. Этот способ был предложен для того, чтобы сделать ЖГВ более безопасной для использования

у детей, исходя из предположения, что вирусы, адаптированные к пониженной температуре (холодоадаптированные, ХА), будут реплицироваться преимущественно в верхних дыхательных путях, а не в легких, и, соответственно, не будут вызывать клинические симптомы заболевания [404, 537]. Этот подход широко использовался в СССР с 1958 по 1972 год для подготовки ЖГВ для детей. Крупномасштабные плацебо-контролируемые исследования эффективности на более чем 200000 детей продемонстрировали в среднем двукратное снижение заболеваемости в вакцинированных группах по сравнению с контролем [2, 27, 40]. Одним из первых вакцинных штаммов, полученным методом холодной адаптации, явился вирус А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), 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. Клинические испытания этой первой холодоадаптированной вакцины в разных возрастных группах показали, что она безопасна для детей в возрасте от 1 года: лишь у 1,6% детей в возрасте 1-2 лет развилась фебрильная реакция [3, 42]. Проведенный в Институте гриппа масштабный анализ оценки эффективности живой гриппозной вакцины на взрослых лицах в 125 эпидемиологических наблюдениях показал, что средняя эффективность вакцины составила от 30% до 70%, в зависимости от близости циркулирующих вирусов вакцинным штаммам [15].

После того, как была обнаружена сегментированность генома вируса гриппа, были предприняты попытки создания стабильных штаммов ЖГВ путем реассортации вируса дикого типа с хорошо охарактеризованным лабораторным штаммом – донором аттенуации [1, 253, 307, 414]. С тех пор подавляющее большинство вакцинных штаммов ЖГВ представляет собой реассортанты между эпидемическим вирусом и донором аттенуации, первый из которых отвечает за антигенную актуальность вируса, а второй – за безвредность вакцинного вируса для людей. Доноры аттенуации для современных лицензированных вакцин являются холодоадаптированными вирусами, которые привносят в вакцинные штаммы ЖГВ признаки температурочувствительности (*ts* фенотип), холодоадаптированности (*ca* фенотип) и аттенуации (*att* фенотип).

Первая в мире реассортантная ЖГВ была подготовлена на основе ХА донора аттенуации Лен/17 [42]. Данный вирус был выбран в качестве донора аттенуации в связи с наличием результатов многочисленных исследований, подтвердивших его безопасность, иммуногенность, а также высокую репродуктивную активность в РКЭ. В то же время, для дополнительного обеспечения безопасности новых реассортантных штаммов ЖГВ для детей был разработан более аттенуированный донор, А/Ленинград/134/47/57 (H2N2), полученный в результате 30 пассажей в РКЭ при пониженной температуре донора Лен/17 [5, 41]. 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 [2, 253, 414]. Трехвалентная вакцина для взрослых на основе доноров Лен/17 и В/60, а также трехвалентная ЖГВ для детей 3-14 лет на основе доноров Лен/47 и В/60 были лицензированы в СССР в 1987 году, после проведения множественных эпидемиологических наблюдений в различных возрастных группах [8, 12, 253, 423, 424]. Сравнительные эпидемиологические исследования сезонных ЖГВ и ИГВ на детях школьного возраста продемонстрировали способность ЖГВ, но не ИГВ, вызывать образование коллективного иммунитета [425]. Последующие сравнительные эпидемиологические наблюдения живых гриппозных вакцин, подготовленных на основе доноров Лен/17 и Лен/47, на детях в возрасте 3-14 лет продемонстрировали схожий уровень переносимости обеих типов ЖГВ, но при этом эти вакцины существенно различались по иммуногенности: две дозы ЖГВ на основе донора Лен/47 требовались для того, чтобы достичь уровни сероконверсий и среднегеометрических титров антител, индуцируемые однократной вакцинацией ЖГВ на основе донора Лен/17 [414]. Основываясь на этих данных, использование ЖГВ на доноре Лен/47 было прекращено в 2001 году. С тех пор и до настоящего времени 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 ЖГВ была передана по лицензионному договору ВОЗ в 2009 году для проведения мероприятий по подготовке к пандемии гриппа в развивающихся странах [421, 422]. Согласно данному договору, пандемическая вакцина из штамма H1N1pdm09 на основе донора Лен/17 была передана в Индию, Таиланд и Китай для производства моновалентной пандемической вакцины. Эти вакцинные кандидаты прошли полный цикл доклинических исследований и показали хорошие результаты в экспериментах на животных [458]. ЖГВ из пандемического штамма H1N1pdm09 была зарегистрирована в Индии и Таиланде и применялась для масштабной кампании по иммунизации (было выпущено несколько миллионов доз вакцины) [129]. Общая эффективность индийской ЖГВ из штамма H1N1pdm09 среди лиц различных возрастных контингентов (от 3 до 87 лет) составила 75,5% [279]. Эти данные способствовали дальнейшему лицензированию Сывороточным Институтом Индии (SII) трехвалентного варианта ЖГВ на основе российской технологии, которая в настоящее время производится как для Индии, так и для ряда других развивающихся стран [422].

Индийская трехвалентная вакцина была изучена в эпидемиологических испытаниях на детях в возрасте 2-5 лет в Бангладеш и Сенегале. Во второй фазе слепого рандомизированного, плацебо-контролируемого исследования была продемонстрирована высокая степень

безопасности ЖГВ для детей в возрасте от 2-х лет [366]. Два параллельных эпидемиологических наблюдения по оценке эффективности ЖГВ в сезонах 2012-2013 и 2013-2014 в этих двух тропических странах показали противоречивые результаты: если в Бангладеш эффективность ЖГВ составила 57,5%, то в Сенегале эффективность отсутствовала [86, 412, 498]. В этих сезонах в обеих странах в циркуляции преобладали вирусы H1N1pdm09, и отсутствие эффективности ЖГВ в Сенегале было связано с этим компонентом вакцины. Поскольку в обоих испытаниях использовали один и тот же лот вакцины, произведенной SII, наиболее приемлемым объяснением может служить низкая термостабильность ранних вирусов H1N1pdm09 ввиду наличия аминокислоты 47E в HA2 субъединице молекулы HA [117]. Иммунизация в Сенегале проводилась в условиях высокой температуры окружающей среды, тогда как в Бангладеш вакцинация проводилась в кондиционированных помещениях [216].

Китайская биотехнологическая компания ВСНТ также использует российскую технологию для производства ЖГВ на территории Китая. Трехвалентная ЖГВ прошла полный цикл доклинических исследований, подтвердивший безвредность, иммуногенность и защитную эффективность вакцины на животных [437, 553]. В сезоне 2016-2017 были проведены эпидемиологические испытания китайской вакцины, результаты которых станут доступны в скором времени.

Живые гриппозные вакцины, подготавливаемые на основе доноров аттенуации А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) [А/АА] и В/Энн Арбор/1/66 [В/АА], были лицензированы в США в 2003 году (коммерческое название – FluMist). Оба донора аттенуации были разработаны профессором John Maassab в конце 1960-х годов путем серийного пассирования исходных эпидемических вирусов в культуре клеток почки куриного эмбриона при постепенно снижающихся температурах [306]. В процессе холодной адаптации вирусы приобрели *ts/ca/att* фенотипы, что позволило использовать их в качестве основы для подготовки ХА штаммов для ЖГВ. Множественные клинические испытания ЖГВ на основе доноров А/АА и В/АА, проведенные как до, так и после ее лицензирования, показали безвредность, хорошую переносимость и эффективность вакцины для людей в возрасте 2-49 лет [43]. Несмотря на то, что данная ЖГВ индуцировала низкие титры сывороточных антигемагглютинирующих антител по сравнению с ИГВ, она была способна вызывать более мощный локальный IgA-опосредованный иммунный ответ на слизистых верхних дыхательных путей, а также Т-клеточный иммунитет [80, 208]. Американская ЖГВ, помимо США, лицензирована к применению в практике здравоохранения в Израиле, Южной Корее, Объединенных Арабских Эмиратах, Мексике и Макао для людей в возрасте 2-49 лет, в Канаде – для лиц в возрасте 2-59 лет, а также в Европе для детей 2-17 лет [238]. Начиная с 2012 года американская ЖГВ выпускается в виде четырехвалентной вакцины, включающей одновременно два вакцинных

штамма против вирусов гриппа В обеих генетических линий (Ямагата, Виктория) [238]. В 2017 году квадριвалентная ЖГВ FluMist была лицензирована в Австралии [36].

В до- и пост-маркетинговых исследованиях американская ЖГВ демонстрировала стабильно высокую эффективность у детей, в том числе в сезоны, когда циркулировали дрейфовые варианты вирусов гриппа [53, 73, 75, 474]. Эффективность данной вакцины была значительно выше эффективности инактивированной вакцины в трех сравнительных рандомизированных исследованиях на детях [403]. Мета-анализ этих трех исследований, а также ряда нерандомизированных клинических испытаний, показал, что у детей младшего возраста, впервые получивших ЖГВ, детектировалось на 46% меньше случаев заражения гриппом, чем у детей, привитых ИГВ. Для детей более старшего возраста этот показатель составил 35% [43, 354]. Основываясь на этих результатах, ряд стран, включая США, Великобританию, Канаду, Германию, Финляндию и Израиль, рекомендовали предпочтительное использование ЖГВ для широкомасштабной иммунизации детей [140, 354]. Начиная с сезона 2013-2014, ЖГВ FluMist показывала сниженную защиту детей младшего возраста от циркулирующих вирусов H1N1pdm09 [99, 155], что привело к исключению данной вакцины из списка рекомендованных вакцин для масштабной иммунизации против гриппа в США в сезонах 2016-2017 [181] и 2017-2018 [182]. Важно отметить, что в других странах (Канада, Финляндия, Великобритания и Германия) в те же сезоны ЖГВ на основе доноров А/АА и В/АА показывала достаточно высокий уровень защиты, не уступая по этому показателю инактивированным вакцинам, что способствовало сохранению данной ЖГВ на рынке вакцинных препаратов [199, 360, 374, 411, 441].

Такие расхождения в данных по эффективности ЖГВ FluMist в США, по сравнению с другими странами, говорит о том, что некие особенности производства и применения ЖГВ в США могли негативно повлиять на показатели защиты. Ученые из США провели многочисленные исследования, пытаясь разгадать причины низкой эффективности ЖГВ FluMist в отношении вируса гриппа H1N1pdm09. По мнению ученых, на защитную способность вакцинных штаммов мог повлиять ряд факторов, ассоциированных как с иммунным статусом привитых, так и с особенностями самих вакцинных штаммов ЖГВ (Табл. 2). Предположительно, общий высокий уровень вакцинации населения США с помощью ИГВ, в результате чего у людей сохраняются высокие уровни антител к гриппу, может отрицательно влиять на развитие иммунного ответа при вакцинации ЖГВ. Однако данные ряда исследований опровергают эту гипотезу. Так, сравнение групп детей, ранее вакцинированных от гриппа, с теми, кто был привит впервые, не выявили значительных отличий в показателях эффективности ЖГВ между ними [97]. Более того, в некоторых исследованиях эффективность ЖГВ была даже несколько выше у тех детей, кто был вакцинирован в предшествующий сезон [97, 360]. Также в

недавнем исследовании была продемонстрирована улучшенная защита от вируса H3N2 при помощи ЖГВ у тех детей, кто был привит в любой из двух предшествующих сезонов [325]. Суммарно, имеющиеся данные не подтверждают предположение, что предшествующая вакцинация или предсуществующий иммунитет могут негативно влиять на показатели эффективности ЖГВ у детей. Более вероятно, что недостаточная защита была обусловлена свойствами самого вакцинного штамма.

Данные по эффективности ЖГВ FluMist в сезоне 2013-2014 указали на то, что вакцинный штамм H1N1pdm09 из вируса А/Калифорния/7/2009 был чувствителен к тепловой деградации (Табл. 2). Комплексные исследования, проведенные компанией MedImmune, показали, что эффективность вакцины напрямую зависела от температуры окружающей среды, при которой транспортировались различные партии вакцины: количество привитых, заболевших вирусом H1N1pdm09, было прямо пропорционально значению температуры воздуха в момент разгрузки вакцины поставщиками в США [97]. Стоит отметить, что данные проблемы касались только штамма H1N1, тогда как эффективность вакцины в отношении вирусов H3N2 и В оставалась высокой. Лабораторные исследования подтвердили сниженную термостабильность вакцинного штамма А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, при этом было показано влияние одной замены в HA2 субъединице молекулы HA на такую чувствительность [117]. По результатам данных исследований штамм А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 был заменен в вакцине на более термостабильный штамм из вируса А/Боливия/559/2013 (H1N1)pdm09 [99]. Но, несмотря на замену штамма, ЖГВ FluMist снова показала отсутствие эффективности в отношении вируса H1N1pdm09 в сезоне 2015-2016 [181, 375], указывая на то, что стабильность молекулы HA является не единственным фактором, влияющим на эффективность вакцины в отношении вируса H1N1pdm09 [98].

Также были выдвинуты предположения о том, что добавление четвертого вакцинного штамма к квадριвалентной формулировке вакцины FluMist могло усилить интерференцию вакцинных вирусов в препарате, однако многочисленные данные по оценке интерференции вирусов в моно-, три- и квадριвалентной вакцинах опровергают это предположение [172]. Кроме того, сниженные показатели эффективности ЖГВ H1N1pdm были отмечены и для трехвалентной вакцины. Наконец, одним из обоснований недостаточной защиты ЖГВ в отношении вирусов H1N1pdm может служить сниженная способность данных вирусов прикрепляться к рецепторам типа $\alpha 2,6$, а также сниженная активность репродукции вирусов в линиях альвеолярных клеток человека и в первичных клетках назального эпителия [98].

Таблица 2. Потенциальные факторы/механизмы, вовлеченные в снижение эффективности ЖГВ FluMist в США (адаптировано из [172]).

Фактор	Потенциальный механизм и подтверждающие данные	Ссылки
<i>Ассоциированные с организмом факторы</i>		
Предыдущие эпизоды вакцинации	<ul style="list-style-type: none"> • Предсуществующий иммунитет может негативно влиять на приживляемость вакцинных вирусов. • Имеющиеся данные не подтверждают данной гипотезы; наоборот, предшествующие вакцинации могут усиливать иммунный ответ на ЖГВ. 	[98, 316, 325, 326, 364, 442]
<i>Ассоциированные с вакцинным штаммом факторы</i>		
Сниженная термостабильность	<ul style="list-style-type: none"> • Нарушение холодовой цепи может вызывать деградацию вакцинных вирусов. • Сниженная термостабильность была показана для ранних вирусов H1N1pdm09. • В сезоне 2017/2018 был изучен новый штамм H1N1pdm09 на основе вируса А/Словения/2903/2015, который показал более высокую иммуногенность по сравнению со штаммом А/Боливия/559/2013. 	[49, 97, 117]
Интерференция вакцинных вирусов	<ul style="list-style-type: none"> • Возможно, включение дополнительного вакцинного штамма типа В в квадριвалентную ЖГВ привело к интерференции с другими компонентами вакцины. • Имеющиеся данные не подтверждают это предположение, т.к. сниженные показатели эффективности ЖГВ H1N1pdm09 были отмечены и для трехвалентной вакцины. 	[57, 111, 199]
Сниженная инфицирующая способность вакцинных штаммов H1N1pdm09	<ul style="list-style-type: none"> • Сниженная «приспособленность» штаммов H1N1pdm09 А/Калифорния/7/2009 и А/Боливия/559/2013 к репликации в клетках млекопитающих была подтверждена на основе данных: <ul style="list-style-type: none"> • сниженная специфичность указанных вирусов к рецепторам типа $\alpha 2,6$; • сниженная активность репродукции как в линиях альвеолярных клеток человека, так и в первичных клетках назального эпителия. • Образование дефективных геномных фрагментов РНК вирусов, ухудшающих репликативные свойства вакцинных штаммов. 	[98, 177]

Принимая во внимание вышеуказанные возможные причины неспособности ЖГВ защищать от вирусов H1N1pdm09, компанией MedImmune был подготовлен новый вакцинный штамм на основе вируса А/Словения/2903/2015, который в ограниченных испытаниях на детях в возрасте 2-4 лет показал высокий уровень приживляемости и иммуногенности, присущие вакцинным штаммам H1N1, подготовленным из вирусов, циркулировавших до 2009 года. Эти данные позволили американской ЖГВ вернуться на американский рынок гриппозных вакцин в сезон 2018-2019 [113].

1.2.2.2. Основы аттенуации холодоадаптированных вакцинных штаммов ЖГВ

В процессе холодной адаптации доноры аттенуации доноры аттенуации Лен/17 и А/АА приобрели признаки температурочувствительности, холодоадаптированности и аттенуации (*ts/ca/att* фенотипы), которые определяются набором мутаций в генах, кодирующих внутренние и неструктурные белки вируса [237, 265] (Табл. 3). Вакцинные вирусы вместе с данными сегментами наследуют и все полезные признаки донора аттенуации. Поскольку одним из ключевых моментов безопасности масштабного использования ЖГВ в практике здравоохранения является генетическая стабильность аттенуированного фенотипа вакцинных вирусов после репликации в верхних дыхательных путях привитых, представляется крайне важным оценить, набор каких мутаций определяет данный фенотип, и одновременная реверсия которых может привести к появлению вирулентного вируса дикого типа.

Таблица 3. Аминокислотные замены в генах внутренних и неструктурных белков холодоадаптированных доноров аттенуации для лицензированных ЖГВ типа А

Белок	А/Ленинград/134/17/57		А/Энн Арбор/6/60	
	Позиция	Мутация [†]	Позиция	Мутация [†]
PB2	478	Val→Leu	265	Asn→Ser
PB1	265	Lys→Asn	391	Lys→Glu
	591	Val→Ile	457	Glu→Asp
			581	Glu→Gly
			661	Ala→Thr
PA	28	Leu→Pro	613	Lys→Glu
	341	Val→Leu	715	Leu→Pro
NP			34	Asp→Gly
M1	15	Ile→Val		
	144	Phe→Leu		
M2			86	Ala→Ser
NS1			153	Ala→Thr
NS2	100	Met→Ile		

[†] по сравнению с исходным вирусом дикого типа, использованным для получения холодоадаптированного варианта

Наибольший интерес вызывает изучение влияния специфических мутаций ХА доноров аттенуации на температурочувствительный фенотип вирусов, поскольку именно нарушенная

способность вакцинных штаммов реплицироваться при высоких температурах нижних отделов респираторного тракта обеспечивает безопасность вакцины – т.е. неспособность вызывать клинические симптомы заболевания [404]. Детальное изучение индивидуальных мутаций американского донора аттенуации А/АА показало, что за *ts* фенотип вируса ответственны пять мутаций, расположенных в трех генах его полимеразного комплекса: PB1 (K391E, E581G, A661T), PB2 (N265S) и NP (D34G) [237, 240]. Такое количество мутаций, расположенных в разных сегментах вируса, обеспечивает генетическую стабильность вакцинных штаммов, поскольку реверсия одновременно всех мутаций представляется крайне маловероятным событием. Исследования на животных подтвердили участие этих пяти мутаций в обеспечении аттенуированного фенотипа ХА вакцинных штаммов ЖГВ FluMist [236]. Эксперименты с минигеномом вируса гриппа продемонстрировали сниженную полимеразную активность донора А/АА температуре 39°C [240], однако более обстоятельное исследование молекулярных механизмов, вовлеченных в поддержание *ts* фенотипа вируса, не выявило нарушений в способности полимеразы транскрибировать вирусную мРНК и синтезировать белки при непермиссивной температуре [101]. Вероятнее, взаимодействие полимеразных белков с некоторыми клеточными факторами может играть решающую роль в неспособности мутантных вирусов эффективно репродуцироваться при высоких температурах. Как было показано для донора А/АА, *ts* мутации в гене PB1 значительно нарушали ядерно-цитоплазматический экспорт вирусной РНК при повышенных температурах, что требует взаимодействия с клеточными факторами, такими, как Hsp70 [101]. Кроме того, в непермиссивных условиях существенно снижается количество инкорпорированного в вирионы матриксного белка М1, что приводит к формированию вирусных частиц нарушенной морфологии [101].

Следует отметить, что, помимо чувствительности к повышенным температурам, аттенуация вирусов гриппа может быть обусловлена и другими молекулярно-клеточными механизмами. Так, было показано, что мутация Ala→Ser в М2 белке донора А/АА, которая не вовлечена в становление *ts* фенотипа вируса, существенно сказывается на активности репликации вакцинного штамма ЖГВ в дифференцированной первичной культуре клеток назального эпителия (hNECs), тогда как репродукция в культуре клеток MDCK не была нарушена [532].

Ранние попытки идентифицировать гены вируса Лен/17, передающие вакцинным реассортантам *ts* фенотип, использовали классическую генетическую ресортацию между донором Лен/17 и генетически удаленными эпидемическими вирусами. Использование для скрещивания эпидемических вирусов, которые отличались друг от друга по *ts* фенотипу, привело к выводу, что белок PB2 является основным определяющим фактором *ts* фенотипа, а полимеразные гены PB1 и PA дополняют этот признак [260]. Более точные эксперименты с

одногенными реассортантами между генетически однородными вирусами указывали на ведущую роль генов PB2 и PB1 в передаче *ts* фенотипа [266]. Поскольку все предыдущие исследования были сконцентрированы на оценке *ts* фенотипа реассортантов с различным составом генома, получаемых методами классической реассортации, и при этом не проводилось их полногеномного секвенирования, сохраняется вероятность наличия в геноме таких реассортантных вирусов дополнительных мутаций, потенциально влияющих на *ts* фенотип. Кроме того, в работе [266] не определяли принадлежность HA и NA генов у реассортантов между вирусами Лен/17 и его предшественником – штаммом А/Ленинград/134/57, тогда как в литературе встречаются данные о влиянии мутаций в HA и NA генах на *ts* фенотип вирусов гриппа [83, 347, 483]. До проведения настоящего исследования не представлялось возможным оценить вклад каждой индивидуальной мутации, свойственной донору аттенуации Лен/17, в становление *ts/att* фенотипа вакцинных штаммов ЖГВ, поскольку не была разработана обратнo-генетическая система для этого вируса, позволяющая целенаправленно вносить мутации в вирусные гены и получать жизнеспособные вирусы целиком из плазмидных ДНК. Кроме того, было неизвестно, являются ли данные *ts* мутации универсальными, т.е. будут ли иметь схожий эффект при внесении в геном генетически удаленного вируса, а также реверсия каких аттенуирующих мутаций в геноме вакцинных штаммов отечественной ЖГВ требуется для полного восстановления дикого фенотипа вируса.

1.2.2.3. *Культуральные живые гриппозные вакцины*

Описанные выше лицензированные живые гриппозные вакцины производятся в настоящее время в развивающихся куриных эмбрионах. Однако, в случае, если пандемия гриппа будет вызвана высокопатогенным штаммом вируса гриппа, высока вероятность нарушения работы птичьих хозяйств, что неизбежно приведет к нехватке куриных эмбрионов для производства вакцин. В связи с этим, в последние два десятилетия активно обсуждается вопрос о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, что сделает производство независимым от поставок куриных эмбрионов. Помимо этого, производство вакцин на перевиваемых линиях клеток млекопитающих позволит в короткие сроки нарабатывать большие объемы вирусной биомассы, при этом будут сохраняться антигенные свойства человеческих вирусов гриппа. Наконец, такие вакцины можно без опаски применять лицам, страдающим аллергией на куриный белок [300, 329, 331, 333, 376]. В настоящее время в Европе и США лицензированы культуральные инактивированные гриппозные вакцины Flucelvac и Optaflu (Novartis, США), производимые на культуре клеток MDCK – одной из перевиваемых линий, одобренных для производства гриппозных вакцин [313].

Способность реассортантных вакцинных штаммов обеих лицензированных ЖГВ активно реплицироваться в культуре клеток MDCK была продемонстрирована в многочисленных исследованиях, как на уровне лабораторий, так и в производственном масштабе [16, 166, 169, 213, 214, 299, 350, 548]. Компания MedImmune разработала собственную сублинию клеток MDCK, которая поддерживала репликацию вакцинных штаммов на основе доноров А/АА и В/АА до титров, сопоставимых с РКЭ, при этом антигенные свойства вирусов не нарушались [213, 299]. Однако данная культуральная ЖГВ далее не была исследована в клинических испытаниях, поэтому отсутствуют сведения об иммуногенности данной вакцины для людей.

В исследованиях, проведенных совместно ФГБНУ «ИЭМ» и компанией Merck, было показано, что российские вакцинные штаммы для сезонной ЖГВ хорошо растут в клеточной линии MDCK, а уровни иммуногенности и защитной эффективности культуральной ЖГВ и классической ЖГВ, подготовленной в РКЭ, были сопоставимы на животных моделях [370]. Трехвалентная сезонная ЖГВ, произведенная на культуре клеток MDCK, была изучена в слепых, плацебо-контролируемых клинических испытаниях на взрослых здоровых добровольцах 18-50 лет в Европе компанией Novilon [198]. Вакцина хорошо переносилась, не вызывая серьезных побочных явлений, и по частоте ожидаемых реакций была сопоставима с группой плацебо. Вакцина индуцировала иммунный хороший ответ к компоненту H3N2, тогда как ответ на два других компонента вакцины был значительно ниже. Кроме того, в данных испытаниях не удалось выделить вакцинный вирус от привитых ни на 3, ни на 10 сутк, скорее всего в силу наличия предсуществующего иммунитета у добровольцев [198].

В России культуральная ЖГВ разрабатывается в НПО «Вектор» (Новосибирск), при этом в качестве исходного сырья используются реассортантные вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные классическим методом реассортации в РКЭ. Так, вакцина из предпандемического реассортантного штамма А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2), произведенная на культурах клеток MDCK и Vero методом роллерного культивирования, индуцировала высокие титры кросс-реактивных сывороточных и мукозальных антител у мышей [20]. Также на основе пандемического штамма ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm) была подготовлена серия вакцины на культуре клеток MDCK, получившая название «Вектор-Флю». При адаптации к культуре клеток вакцинный штамм сохранял свои антигенные свойства, и при этом репродуцировался до высоких титров. В доклинических исследованиях вакцина «Вектор-Флю» была безвредна и вызывала образование мощного иммунного ответа у хорьков после однократной иммунизации [22, 351]. 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 [23].

1.2.3. Экспериментальные живые гриппозные вакцины

1.2.3.1. Экспериментальные холодоадаптированные живые гриппозные вакцины

Ввиду успешного применения лицензированных холодоадаптированных ЖГВ для масштабной профилактики лиц различных возрастных категорий, не прекращаются разработки новых ХА доноров аттенуации в разных странах мира (Табл. 4). Ввиду высокой урожайности вируса PR8, в Отделе вирусологии ИЭМ в 1980-х годах был разработан его ХА вариант – штамм A/PR/8/59/1 (H1N1). Данный вирус был получен после 59 пассажей и одного клонирования при 25°C исходного вируса, в результате чего приобрел свойства донорам аттенуации ЖГВ свойства температурочувствительности, холодоадаптированности и аттенуации для мышей [137]. На основе донора A/PR/8/59/1 был получен ряд реассортантов из эпидемических вирусов H1N1 и H3N2, которые в ограниченных испытаниях на добровольцах были ареактогенны, подтверждая перспективность их использования в качестве высокорепродуктивного ХА донора аттенуации для ЖГВ [2, 14].

Таблица 4. Экспериментальные холодоадаптированные доноры аттенуации для ЖВГ, разработанные к настоящему времени

Страна	Тип	Название ХА штамма	Субстрат	Статус исследований	Ссылки
Россия	A	A/PR/8/59/1 (H1N1)	РКЭ	Проведены ограниченные клинические испытания	[2, 14, 137]
Австрия	A	A/Singapore/1/57 ca	Клетки Vero	Проведены ограниченные клинические испытания	[248, 409]
	B	B/Vienna/1/1999 ca			
Южная Корея	A	X-31 ca (H3N2)	РКЭ	Доклинические исследования	[229, 289, 435]
	B	B/Lee/40 ca			
Россия	A	A/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2)	РКЭ	Доклинические исследования	[4, 24, 26, 31]
Россия	A	A/Краснодар/101/35/59 (H2N2)	РКЭ, клетки MDCK	Доклинические исследования	[7, 17, 21].
	B	B/Виктория/2/63/87			
Россия	A	A/Москва/21/17/65 (H2N2)	РКЭ	Доклинические исследования	[3, 9]

Новые ХА доноры аттенуации на основе вирусов A/Singapore/1/57-*ca* (H2N2) и B/Vienna/1/1999-*ca* были подготовлены в начале 2000-х [248, 409]. Данные штаммы были получены в результате множественных пассажей исходных вирусов в культуре клеток Vero при пониженной температуре, в результате чего вирусы приобрели *ts/ca* фенотипы [248]. Штаммы ЖГВ подтипов A/H1N1, A/H3N2 и типа В, подготовленные в культуре клеток Vero на основе новых доноров аттенуации, были изучены в доклинических испытаниях, а также в ограниченных клинических исследованиях на добровольцах. Трехвалентная вакцина была безвредна для людей, а также индуцировала гуморальный иммунный ответ, сопоставимый с российской трехвалентной ЖГВ [248, 409]. Несмотря на обнадеживающие результаты, данная технология не получила своего развития и за последние десять лет в литературе не упоминается.

Группа исследователей из Южной Кореи также на протяжении длительного времени разрабатывает новую платформу для конструирования ХА штаммов для живой гриппозной вакцины. Для разработки ХА донора аттенуации типа А они выбрали высокорепродуктивный реассортантный штамм X-31 (H3N2), включающий шесть генов внутренних белков от вируса PR, а HA и NA гены – от вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) [289]. Данный реассортант пассировали в РКЭ при последовательно снижающихся температурах, в результате чего X-31 *ca* мутантный вирус приобрел *ts/ca/att* фенотипы. Для подготовки донора аттенуации типа В был выбран вирус Lee/40, который также после серии пассажей при пониженной температуре в РКЭ приобрел свойственные ХА штамму признаки [435]. Оба корейских донора аттенуации были детально изучены на лабораторных животных, показавших безвредность, иммуногенность и защитную эффективность сезонных и пандемических вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на их основе, вводимых как индивидуально, так и в виде трехвалентной вакцины [226, 228, 229, 289, 435]. Однако, несмотря на интенсивные исследования на животных моделях, данная экспериментальная ЖГВ пока не была апробирована в клинической практике, и для лицензирования вакцины потребуется проведение масштабных клинических и эпидемиологических испытаний, необходимых для подтверждения безопасности и эффективности этой ЖГВ для людей.

Несколько альтернативных холодоадаптированных доноров аттенуации для ЖГВ разрабатываются на протяжении последнего десятилетия в России (Табл. 4). Так, в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России путем серийных пассажей в РКЭ при пониженной температуре пандемического вируса A/Гонконг/1/68 (H3N2) был получен ХА штамм A/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2), характеризующийся, помимо характерными для доноров аттенуации *ts/ca/att* фенотипами, высокой репродуктивной активностью в РКЭ, в результате чего данный штамм может служить универсальным донором для подготовки вакцинных штаммов и для ЖГВ, и для

ИГВ [31]. На основе этого донора был получен ряд вакцинных штаммов ЖГВ против сезонных и потенциально-пандемических вирусов подтипов H1N1, H2N2, H5N1, H3N8, H3N2 и H7N9. Исследования данных вирусов на модели мышей показали перспективность дальнейших доклинических и клинических испытаний новых вакцин на добровольцах [4, 24, 26].

Группа ученых из НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова разработала два ХА штамма, являющихся перспективными донорами аттенуации для подготовки вакцинных штаммов ЖГВ типа А и типа В. Вирус А/Краснодар/101/59 (H2N2) прошел 5 пассажей при 30°C и 25 пассажей при 26°C в РКЭ, после чего было проведено дополнительно 5 пассажей в культуре клеток MDCK при 26°C с последующим клонированием вирусной смеси методом бляшек. В итоге ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) приобрел *ts/ca* фенотипы, а также утратил способность активно реплицироваться в респираторном тракте мышей [7]. Вакцинные штаммы, подготовленные на основе этого донора аттенуации проявляли аттенуированный фенотип и характеризовались иммуногенностью и защитной эффективностью на модели мышей [21]. ХА донор для ЖГВ типа В был подготовлен той же группой исследователей из вируса В/Виктория/2/87, прошедшего 2 пассажа при 30°C, 3 пассажа при 28°C и 6 пассажей при 26°C в РКЭ, а также 34 пассажа в культуре клеток MDCK при 26°C. Для дополнительной аттенуации этот штамм был подвергнут серии из 18 пассажей в РКЭ при 26°C [7]. Полученный ХА штамм после двукратной вакцинации полностью защищал мышей от заражения гомологичным вирулентным вирусом гриппа [17].

В качестве альтернативного донора аттенуации для ЖГВ типа А также был предложен ХА штамм А/Москва/21/17/65 (H2N2), полученный из эпидемического вируса А/Москва/21/65, циркулировавшего в конце пандемического цикла H2N2. Данный ХА вирус, помимо перспективности использования в качестве донора аттенуации, может быть использован в качестве вакцинного штамма в случае возвращения в циркуляцию вирусов H2N2, схожих с ним по антигенной структуре [9].

Все вышеописанные доноры аттенуации приобрели в процессе холодовой адаптации набор специфических мутаций в генах, кодирующих внутренние и неструктурные белки вириона, при этом не выявлено совпадений в локализации данных мутаций в различных ХА донорах – как для ЖГВ типа А, так и для ЖГВ типа В [7, 9, 19]. Эти данные указывают на то, что в процесс адаптации вирусов к репродукции при пониженной температуре вовлечены множественные молекулярные механизмы, и индивидуальные особенности каждого штамма вируса гриппа и системы культивирования приводят к возникновению уникального набора замен в вирусных белках, позволяющих вирусу сохранять жизнеспособность в новых условиях.

1.2.3.2. *Альтернативные подходы к созданию живых гриппозных вакцин*

Помимо метода холодовой адаптации, аттенуация вирусов гриппа для человека может достигаться множеством других способов. Поскольку репликация вируса в чувствительной клетке – комплексный, многостадийный процесс, затрагивающий различные молекулярно-клеточные механизмы, нарушение каких-либо этапов жизненного цикла вируса может приводить к его аттенуации (т.е. ослаблению его вирулентных свойств). Развитие современных генно-инженерных технологий способствовало широкому использованию новых данных о взаимодействии вируса с клеткой для целенаправленного конструирования аттенуированных живых гриппозных вакцин. В последние годы многочисленные стратегии ослабления вирулентных свойств были апробированы на примере различных вирусов гриппа человека и животных (см. обзор [146]). В целом, новые подходы можно свести к следующим категориям: введение мутаций в гены вируса, делеции или инсерции участков вирусных генов, а также перестановка сегментов вирусного генома.

Среди разнообразия новых подходов к конструированию экспериментальных ЖГВ к настоящему моменту лишь мутантные вирусы с делетированным NS1 геном достигли стадии клинических испытаний на добровольцах. Стратегия ослабления вирулентных свойств вируса гриппа А путем удаления NS1 гена основана на том, что нарушение функций соответствующего белка, являющегося антагонистом интерферона, приводит к неспособности вируса противостоять врожденному иммунитету клетки-хозяина, в результате чего вирус становится неспособным к продуктивной мультицикловой инфекции [136]. Тем не менее, поскольку вирус сохраняет остальные белки в неизменном виде, он способен проникать в клетки-мишени, в которых активно экспрессируются вирусные белки, вызывая образование адаптивного иммунного ответа [136]. Несколько кандидатных вакцинных штаммов с делетированным NS1 геном (Δ NS1 ЖГВ) были протестированы в доклинических исследованиях, продемонстрировавших их безвредность и иммуногенность. Вакцинные вирусы были способны инфицировать клетки назального эпителия и экспрессировать вирусные антигены, но при этом не формировалось вирусное потомство. Несмотря на отсутствие продуктивной инфекции, вакцины индуцировали высокие уровни интерферона, который, как известно, способствует развитию В- и Т-клеточного иммунного ответа [143, 288, 410, 454, 535, 536]. Благодаря этим обнадеживающим результатам, изучение Δ NS1 ЖГВ на основе вируса А/Новая Каледония/20/99 (H1N1) было продолжено в клинических испытаниях на здоровых серонегативных добровольцах. Моновалентная Δ NS1-H1N1 ЖГВ хорошо переносилась при введении в различных дозах, и при этом не наблюдалось серьезных нежелательных явлений [500]. Вакцина индуцировала как сывороточный, так и мукозальный гуморальный иммунный ответ после однократной иммунизации: 67% вакцинированных лиц ответили сероконверсиями,

при этом прирост СГТ антител достигал значения 6,4 при иммунизации наибольшей дозой вакцины ($10^{7.7}$ TCID₅₀) [500]. Важно отметить, что мукозальные IgA антитела, образованные в ответ на иммунизацию ΔNS1-H1N1 ЖГВ, были способны нейтрализовать вирусы гриппа других подтипов, таких как H3N2 и H5N1 [335]. Таким образом, экспериментальные ΔNS1 ЖГВ представляют собой перспективную стратегию для защиты людей как от сезонных, так и от пандемических вирусов гриппа. Однако для лицензирования соответствующей технологии потребуется проведение масштабных эпидемиологических наблюдений, необходимых для подтверждения безопасности и эффективности вакцины для различных возрастных контингентов.

1.2.4. Критерии для лицензирования новых гриппозных вакцин для людей

Основными критериями оценки эффективности противогриппозных вакцин являются их профиль безопасности, иммуногенность и эффективность. До сих пор для живых гриппозных вакцин не было идентифицировано факторов иммунного ответа, четко коррелирующих с защитой от последующей инфекции. Существующие нормативные требования, разработанные для ИГВ более 60 лет назад, указывают, что единственным критерием оценки иммуногенности любой вакцины против гриппа является индукция сывороточных антител, выявляемых с помощью реакции торможения гемагглютинации. Так, в США критерием для лицензирования гриппозных вакцин для взрослых до 65 лет и детей является наличие уровней сероконверсий антител, нижняя граница двустороннего 95%-ного доверительного (ДИ) интервала которых составляет $\geq 40\%$, а нижний предел 95%-го ДИ для уровней серопротекции (т.е. титров антител 1:40 и выше) должен быть $\geq 70\%$. [33]. Для взрослых старше 65 лет соответствующие значения должны составлять $\geq 30\%$ и $\geq 60\%$, соответственно. В Европе критерии лицензирования заключаются в том, что уровни сероконверсий и серопротекции после вакцинации взрослых в возрасте 18-60 лет должны составлять $\geq 40\%$ и $\geq 70\%$, соответственно; у взрослых старше 60 лет - $\geq 30\%$ и $\geq 60\%$, соответственно [123, 142]. Эти критерии были разработаны, основываясь на данных о противовирусном иммунитете, полученных в 1950-70 гг. В то время были хорошо изучены только сывороточные антитела, и была четко установлена корреляция между уровнями антигемагглютинирующих антител и защитой от гриппозной инфекции. [204]. Позднее было показано, что для детей титры сывороточных антител в РТГА 1:110 и выше после иммунизации ИГВ обеспечивали 50%-ую защиту от инфекции, вызванной вирусом H3N2 [82]. Кроме того, титры антител, выявляемых в РТГА, не всегда хорошо коррелируют с защитой даже для сезонных инактивированных противогриппозных вакцин. Недавнее исследование показало, что у ряда пациентов с высоким титром антител после вакцинации ИГВ тем не менее развилась симптоматическая лабораторно-подтвержденная гриппозная инфекция [363].

За последние десятилетия наши знания о противовирусном иммунитете значительно расширились, особенно в отношении индукции иммунного ответа на вакцинацию. Было показано, что ЖГВ и ИГВ индуцируют различные типы иммунного ответа: ЖГВ стимулируют как гуморальный (локальный, так и сывороточный), так и клеточный иммунный ответ, тогда как ИГВ преимущественно индуцируют сывороточные антитела [109, 227, 287, 349, 476]. Множественные исследования эффективности сезонных ЖГВ на основе донора А/АА не выявили корреляции между показателями приростов антигемагглютинирующих антител и эффективностью вакцины: высокая эффективность наблюдалась даже в исследованиях, когда вакцина индуцировала низкие уровни антител в РТГА [57, 485]. Новые и усовершенствованные методы позволили на новом уровне изучить различные факторы противогриппозного иммунитета, такие как цитотоксические Т-клетки, различные подклассы Т-хелперов, локальные антитела, а также В- и Т-клетки памяти [132, 469, 555]. В последние годы активно применяется новый подход к изучению иммунологической памяти, формируемой в ответ на введение ЖГВ, путем бустирования иммунной системы субоптимальной дозой инактивированной вакцины через месяцы, и даже годы после исходной иммунизации. Данный подход показал многообещающие результаты, еще раз указывая на то, что иммунный ответ на иммунизацию ЖГВ не может быть адекватно оценен только с помощью уровней гуморальных антител, идентифицированных в РТГА и реакции микронеutralизации [188, 419, 472].

Следует также отметить, что существующие правила оценки иммуногенности вакцин против гриппа были разработаны на основе клинических исследований сезонных вакцин и могут быть неприменимы к пандемическим вакцинам. В случае сезонных вакцин население всегда имеет некоторый уровень предсуществовавшего иммунитета, тогда как в начале пандемии население в основном является иммунологически наивным. В последнем случае у людей отсутствуют В-клетки иммунологической памяти, и гуморальный иммунный ответ на вакцинацию обычно достаточно слаб. В целом, существующие правила и критерии для оценки иммуногенности гриппозных вакцин исключительно путем определения уровней сывороточных антител недооценивают эффективность живых гриппозных вакцин. В связи с этим в ВОЗ был предложен подход к комплексной оценке иммуногенности ЖГВ с использованием ряда критериев. В дополнение к уровням сывороточных антител следует измерять уровни нейтрализующих антител и титры локальных секреторных антител в верхних дыхательных путях; также следует оценивать клеточный иммунный ответ, с уделением особого внимания В- и Т-клеткам иммунологической памяти [173]. Эти рекомендации подтверждаются многочисленными экспериментальными данными о положительной корреляции между уровнями вирус-специфических Т-клеток разных фенотипов и защитой людей от последующей инфекции циркулирующими вирусами гриппа [150, 327, 449, 529]. Учитывая, что Т-клетки

характеризуются широкой кросс-реактивностью [202, 488, 492, 510], поскольку они нацелены на консервативные участки вирусных белков, в последние годы активно развивается направление конструирования гриппозных вакцин, преимущественно индуцирующих перекрестно-реагирующий Т-клеточный иммунитет [194, 405, 448].

1.3 Гриппозные вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа

Одна из самых важных инициатив Всемирной Организации Здравоохранения в плане подготовки к будущей пандемии гриппа сосредоточена на разработке и оценке различных вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа. Наличие эффективной вакцины в начале пандемии во многом определит исход первой пандемической волны. Из-за невозможности предсказать, какие именно штаммы вызовут последующие пандемии, для подготовки пандемических вакцин было рекомендовано достаточно обширное число антигенно удаленных вариантов, представляющих различные подтипы потенциально пандемических вирусов гриппа [515, 522]. Различные подходы и платформы были использованы для разработки вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа, и за последние несколько лет накоплен большой массив данных о безопасности и иммуногенности этих вакцин. Последнее резюме клинических исследований пандемических вакцин можно найти на веб-сайте ВОЗ [524].

Эффективность превентивных мер в начале любой пандемии гриппа зависит от качества и доступности специфических гриппозных вакцин. Как показал пример пандемии 2009 года, когда в циркуляции возник совершенно новый штамм, против которого не были готовы резервные вакцины, наиболее важным действием для смягчения риска для общественного здравоохранения является быстрая подготовка, характеристика и производство безопасных и иммуногенных вакцин из соответствующего штамма для иммунизации групп высокого риска. В этом плане живые гриппозные вакцины имеют ряд неоспоримых преимуществ перед инактивированными, наиболее важным из которых в пандемической ситуации является ускоренная наработка большого количества доз вакцины на производстве (Рис. 5). Помимо этого, ЖГВ вводится безболезненным интраназальным способом (распылением в нос), что не требует присутствия квалифицированного медицинского персонала для массовой иммунизации, а также способствует индукции перекрестно-реагирующих факторов адаптивного иммунного ответа [184, 196, 421, 425]. Другим важным преимуществом ЖГВ является индукция мукозального иммунного ответа на слизистых ВДП – первом барьере на пути гриппозной инфекции, что значительно снижает распространение вируса в коллективе [61, 378]. Это, в свою очередь, приводит к формированию коллективного иммунитета, защищающего непривитых лиц [425]. Кроме того, иммунизация ЖГВ вызывает образование CD8⁺ ЦТЛ-иммунного ответа,

обеспечивающего гетеросубтипическую защиту организма [109, 196, 208, 384, 476]. Важное свойство ЖГВ – способность защищать привитых от инфекции уже в первую неделю после вакцинации [425], скорее всего за счет ранней индукции системы интерферона [400]. Все указанные преимущества были признаны экспертами ВОЗ, и ЖГВ была включена в Глобальный план действий ВОЗ для увеличения поставок гриппозных вакцин [517], а также в Глобальный план ВОЗ по подготовке к пандемии [515].

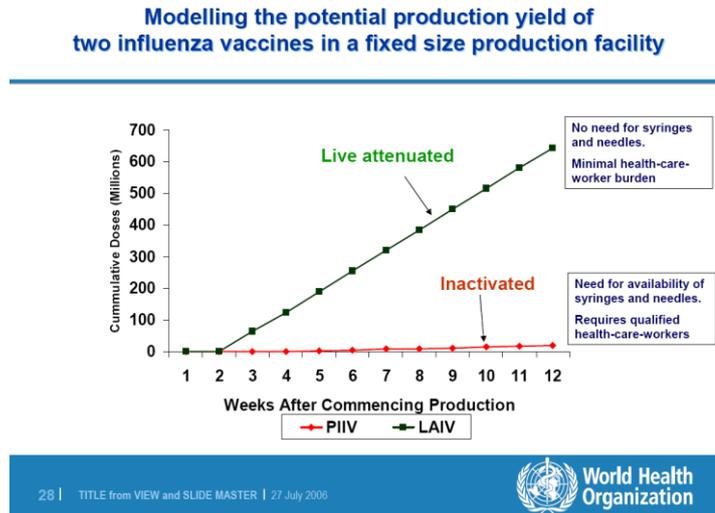


Рисунок 5. Моделирование процесса наработки живой и инактивированной гриппозных вакцин в условиях фиксированных производственных мощностей. Слайд из презентации Dr Laszlo Palkonyay (совещание ВОЗ 12 июня 2007 в Женеве).

В отличие от сезонных гриппозных вакцин, доклиническое изучение вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа обязательно включает оценку аттенуированного фенотипа вакцинного кандидата на хорьках [516]. Данный вид животных является наиболее точной моделью для изучения патогенеза и трансмиссивности вируса гриппа из-за сходства в физиологии легких, распределении рецепторов для вируса гриппа по всему респираторному тракту, а также наличия многочисленных общих клинических признаков и симптомов, сопровождающих гриппозную инфекцию [71].

Общей проблемой при оценке пандемических гриппозных вакцин в клинических наблюдениях является невозможность определить степень их защитной эффективности для людей, поскольку данные вирусы отсутствуют в циркуляции. Поэтому при испытаниях таких вакцин на добровольцах используют суррогатные маркеры иммунного ответа, которые могут коррелировать с защитой. Лабораторные маркеры, коррелирующие с защитным эффектом, включают не только уровни антигемагглютинирующих антител [363], но также титры антител к нейраминидазе [332], секреторные антитела в верхних дыхательных путях, а также стимуляция CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, нацеленных на консервативные эпитопы вирусных белков [150, 196, 405, 449].

1.3.1. Вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа H2N2

Как отмечалось в п.1.1.4, вирусы гриппа подтипа H2N2 обладают пандемическим потенциалом ввиду их персистенции в природном резервуаре, доказанной способности эффективно инфицировать людей и передаваться воздушно-капельным путем, а также благодаря отсутствию специфического иммунитета у людей, рожденных после 1968 года [46, 174, 387, 432, 439]. Имеющийся исторический опыт возвращения в 1977 году в циркуляцию среди людей вирусов H1N1 после их двадцатилетнего отсутствия, и при этом заболели в основном молодые люди младше 25 лет, подтверждает вероятность возврата в циркуляцию и вирусов H2N2 [256]. Поэтому ведущие ученые мира рекомендуют начать кампанию по вакцинации людей от гриппа H2N2 заранее, не дожидаясь начала пандемии [340, 459].

Результаты изучения расщепленной ИГВ, подготовленной из штамма A/Singapore/1/57 (H2N2) показали, что, в отличие от иммунизации сезонной вакциной, для достижения необходимых уровней сероконверсий и серопротекции требовалась двукратная иммунизация вакциной H2N2, поскольку включенные в исследование добровольцы являлись непраймированными, т.е. никогда не встречались с вирусами данного подтипа [197].

Несколько экспериментальных ИГВ, подготовленных на основе вирусов, содержащих гемагглютинин подтипа H2, были изучены на животных моделях. Кросс-протективный потенциал ряда вирусов гриппа птиц H2Nx был изучен в совместных российско-американских исследованиях, при этом вирусы вводились мышам в виде цельновирионных инактивированных вакцин. Была показана различная степень перекрестной защиты исследованных вирусов, а высокорепродуктивный реассортантный штамм на основе донора PR8 и вируса A/pintail duck/Primorie/965/76 (H2N3) был выбран как наиболее перспективный для производства резервной инактивированной вакцины против вирусов H2N2 [249].

Цельновирионная инактивированная вакцина, подготовленная из вируса A/duck/Hokkaido/162/2013 (H2N1), обладающего широкой кросс-реактивностью к современным вирусам подтипа H2, выделяемым от водоплавающих птиц, также показала хорошую защиту против вируса A/swine/Missouri/2124514/2006 (H2N3) на модели мышей [467]. Другая группа ученых применила стратегию включения в вакцинный препарат цельновирионной ИГВ одновременно нескольких антигенных вариантов вирусов подтипа H2 и на модели мышей показала, что такая мультимерная вакцина (состоящая из штаммов A/Singapore/1/1957, A/duck/HongKong/319/1978 и A/swine/Missouri/2124514/2006) имела преимущества перед моновалентным препаратом в плане широты индуцируемого гуморального иммунного ответа, способности защищать животных от клинических проявлений инфекции, вызванной вирулентным вирусом H2N2, а также снижения титров вируса в тканях респираторного тракта мышей [291].

Две изученные в клинических наблюдениях ЖГВ H2N2 были подготовлены из штаммов, являющихся в настоящее время донорами аттенуации для подготовки лицензированных сезонных ЖГВ в разных странах: А/Ленинград/134/17/57 и А/Энн Арбор/6/60. Штамм Лен/17 широко использовался в качестве холодадаптированной вакцины в 1960-х годах для массовой вакцинации людей в СССР, с хорошо задокументированным профилем безопасности, иммуногенности и эпидемиологической эффективности [3]. Вакцинный штамм А/АА никогда не использовался в качестве вакцины в клинической практике, однако ввиду возможного использования этого вируса в качестве вакцины в случае наступления пандемии H2N2, была проведена первая фаза клинических испытаний данной вакцины на взрослых здоровых добровольцах. Результаты исследования продемонстрировали низкую иммуногенность вакцины А/АА, вероятнее всего ввиду слабой приживляемости вируса в эпителии верхних дыхательных путей [471]. Данные результаты стали неожиданностью, поскольку штамм А/АА был подготовлен из человеческого изолята, способного эффективно инфицировать людей, и в экспериментах на животных (мыши, хорьки) продемонстрировавшего высокую иммуногенность и эффективность после однократной вакцинации [102]. Последующие исследования штамма А/АА на приматах подтвердили сниженную способность этого вируса репродуцироваться в верхних дыхательных путях животных, что лучше согласуется с данными, полученными на людях, чем эксперименты на мышах и хорьках [85]. Американской компанией MedImmune был подготовлен новый вакцинный штамм ЖГВ на основе вируса А/swine/Missouri/4296424/2006 (H2N3), показавший многообещающие результаты в доклинических исследованиях [103]. Эти результаты способствовали проведению первой фазы клинических испытаний на добровольцах (Clinicaltrials.gov: NCT01175122), однако до настоящего времени результаты изучения вакцины на людях не были опубликованы.

В качестве резервной ЖГВ подтипа H2N2 может быть использован холодадаптированный вирус А/Москва/21/17/65 (H2N2), входивший в состав ЖГВ для детей в 1967 году, и проявивший себя как безвредный и высокоиммуногенный вакцинный штамм для детей [3, 9]. По молекулярной структуре НА штамм А/Москва/21/17/65 является наиболее близким к эталонному штамму А/Англия/12/64 (H2N2), значительно отличающегося по антигенным признакам от свойств пандемического возбудителя 1957 года [9]. Однако за последующие 3 года циркуляции вирусы H2N2 претерпели еще более серьезные изменения, разошедшись на две эволюционные ветви, сильно отличающиеся между собой по антигенным свойствам [294]. Поскольку невозможно предсказать, вирусы какой ветви могут вернуться в циркуляцию, необходимо иметь в резерве вакцинные штаммы, подготовленные из вирусов обеих эволюционных ветвей.

Экспериментальный реассортантный вакцинный штамм ЖГВ подтипа H2N2 был разработан учеными из ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ на базе альтернативного ХА донора аттенуации А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2), содержащего поверхностные антигены пандемического вируса А/Сингапур/1/1957 (H2N2). Данная вакцина была изучена на модели мышей, продемонстрировав ее безвредность, иммуногенность и защитную эффективность [4]. Ввиду своей высокой репродуктивности в системе РКЭ, данный реассортант может использоваться и для производства инактивированной гриппозной вакцины.

Несмотря на разнообразие разработанных экспериментальных вакцин против потенциально-пандемических вирусов гриппа H2N2, лишь очень ограниченное их число было изучено в клинических наблюдениях на людях, и при этом не было представлено вакцин, включающих антигены двух различных эволюционных ветвей позднего периода циркуляции вирусов H2N2, непосредственно предшествующих их вытеснению из популяции вирусами гриппа H3N2 в 1968 году.

1.3.2. Вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа H5N1

Ввиду чрезвычайно широкого генетического разнообразия циркулирующих среди птиц высокопатогенных вирусов гриппа H5N1, обладающих слабой перекрестной реактивностью, под эгидой Всемирной Организации Здравоохранения подготовлена и постоянно обновляется коллекция вакцинных штаммов вирусов H5N1 различных генетических линий [522]. Основным фактором патогенности вирусов H5N1 является наличие ряда полиосновных аминокислот в кливедж-сайте молекулы НА, что позволяет повсеместно присутствующим во всех тканях организма фурин-подобным протеазам расщеплять данную молекулу, вызывая продуктивную инфекцию. В отличие от высокопатогенных вирусов, молекула НА низкопатогенных вирусов имеет моноосновный кливедж-сайт, в результате чего только трипсин-подобные протеазы, присутствующие в респираторном тракте млекопитающих и в кишечном тракте птиц, способны расщеплять данную молекулу и запускать инфекционный процесс [440]. Данное обстоятельство определяет стратегию подготовки вакцинных штаммов, содержащих H5 молекулу гемагглютинина, поскольку данные вакцинные вирусы должны быть безопасны как для человека, так и для птиц в случае их непредвиденной утечки в окружающую среду.

Один из ранних подходов к конструированию вакцинных штаммов против ВПВГ H5N1 предполагал использование антигенно-родственных низкопатогенных вирусов гриппа птиц. Так, одна из первых субвирионных ИГВ, прошедших клинические испытания на добровольцах, была подготовлена на основе низкопатогенного штамма A/duck/Singapore/97 (H5N3), который по антигенным характеристикам соответствовал вирусам H5N1, выделенным в Гонконге в 1997 году [358, 462]. Однако наиболее распространенным в настоящее время методом ослабления

вирулентных свойств вирусов H5N1 является удаление полиосновного сайта из молекулы HA, тем самым переводя вирус в апаатогенную форму [454]. За последние два десятилетия было подготовлено множество вакцинных штаммов против вирусов подтипа H5 различных клейдов, используя разнообразные подходы и платформы [64].

Высокорепродуктивные штаммы для инактивированных гриппозных вакцин чаще всего готовятся методами обратной генетики на основе вируса PR8, при этом такие вакцинные кандидаты свободно доступны для производства в различных странах благодаря инициативе ВОЗ [522]. Многочисленные клинические испытания ИГВ против потенциально-пандемических вирусов H5N1 показали, что иммунный ответ у людей на данные вакцины был намного слабее, чем ответ на сезонные ИГВ [64]. Так, при использовании субвирионной ИГВ без адьюванта требовалась двукратная иммунизация дозой 90 мкг для достижения значимых серопротективных уровней нейтрализующих антител у 58% взрослых здоровых добровольцев [486]. Однако такое количество антигена в вакцине, а также необходимость двукратной иммунизации, не является оптимальным в плане подготовки к пандемии, поскольку наработка необходимых доз вакцины в начале пандемии будет отсрочена и экономически нецелесообразна.

Применение различных адьювантов позволило существенно снизить количество антигена в расщепленных и субъединичных вакцинах H5N1, при этом эмульсионные адьюванты MF59 и ASO3 показали лучшую способность усиливать иммуногенность и кросс-реактивность инактивированных вакцин по сравнению с адьювантами на основе солей алюминия [64]. Использование цельновирионных вакцинных препаратов H5N1 также показало преимущество перед расщепленными и субъединичными вакцинами в плане индукции мощного гуморального иммунного ответа на введение более низких доз вакцины, что может существенно сказаться на эффективности превентивных мер в случае наступления пандемии (см. обзор [64], а также результаты клинического изучения всех пандемических вакцин [524]). Кроме того, с целью усиления иммуногенности и кросс-реактивности пандемических вакцин H5N1 для людей были предложены разнообразные стратегии прайм-буст иммунизации, используя для праймирования одну вакцинную платформу, а для бустирования иммунного ответа – другую (различные комбинации таких платформ, как рекомбинантные белковые вакцины, ДНК-вакцины, векторные, а также живые аттенуированные вакцины) (см. обзор [304]). Однако, несмотря на многообещающие результаты, практическое применение таких экспериментальных режимов вакцинации на практике маловероятно, особенно в случае иммунизации детских контингентов.

Как указывалось выше, лицензированные живые гриппозные вакцины являются наиболее перспективной платформой для конструирования вакцин против потенциально-

пандемических вирусов гриппа. Первая предпандемическая вакцина, разработанная и лицензированная в России, была подготовлена из реассортантного штамма А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2). Данный реассортант был получен методом классической реассортации в РКЭ и унаследовал ген НА от низкопатогенного вируса гриппа птиц А/утка/Потсдам/1402-6/86 (H5N2), а остальные семь генов – от донора аттенуации Лен/17 [128]. Доклинические исследования показали полную апатогенность вакцинного штамма для цыплят – вирус не обнаруживался у птиц ни при интраназальном, ни при внутривенном введении. Оценка безвредности штамма на мышах линии BALB/c показала, что вирус преимущественно репродуцировался в ВДП, тогда как его репродукция в легких была ограничена [128]. Изучение иммуногенности, кросс-реактивности и защитной эффективности ЖГВ H5N2 на животных моделях показало, что вакцина индуцировала перекрестно-реагирующий гуморальный иммунный ответ и защищала мышей от ВПВГ H5N1 клэйда 1, выделенных в 2004 году, уже после однократной иммунизации [128, 303]. Важные результаты были получены при изучении ЖГВ А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2) на хорьках: несмотря на слабый гуморальный иммунный ответ, регистрируемый к гетерологичному ВПВГ А/индюк/Турция/1/05 (H5N1), животные были защищены от тяжелого поражения дыхательных путей после челленджа этим летальным вирусом [416]. Результаты исследований ЖГВ H5N2 на макаках JAVA подтвердили предыдущие данные о перекрестной защите, индуцируемой этой вакциной: 50% животных были полностью защищены от гетерологичного ВПВГ, о чем свидетельствовали сниженная продолжительность и интенсивность клинических проявлений болезни, отсутствие вiremии и репродукции вируса в ВДП [415].

В клинических испытаниях на добровольцах ЖГВ из штамма А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2) показала хороший профиль безвредности, не отличающийся от сезонных ЖГВ [415]. Вакцина была иммуногенна для людей: после двукратной иммунизации 47,1–54,8% волонтеров ответили сероконверсиями антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител к гомологичному вирусу. Эти антитела также обладали перекрестной реактивностью, поскольку около 30% образцов сывороток реагировали с антигенно-удаленным вирусом А/Индонезия/05/2005 (H5N1) [415]. Кроме того, у 65% привитых были зарегистрированы сероконверсии локальных IgA антител в назальных секретах, а у 30% и 40% привитых индуцировался CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточный ответ, соответственно [109, 349]. ЖГВ «Ультрагривак» из штамма А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2) была зарегистрирована в России в качестве резервной вакцины для профилактики вируса гриппа птиц у людей.

Вакцинный штамм А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2) был подготовлен из вируса, выделенного более 30 лет назад, и современные циркулирующие вирусы подтипа H5 значительно отличаются от него по антигенным свойствам [522]. Поэтому потребовалась

разработка новых вакцинных штаммов ЖГВ против современных ВПВГ H5N1. Для подготовки реассортантных штаммов H5N1 методом классической реассортации в РКЭ была использована стратегия скрещивания донора аттенуации Лен/17 с реассортантными вирусами подтипа H5N1, созданными для производства инактивированной гриппозной вакцины. Так, для скрещивания были использованы H5N1 реассортанты VN/PR/CDC-RG (НА и NA гены от вируса A/Vietnam/1203/04, клайд 1) и NIBRG-23 (НА и NA гены от вируса A/индюк/Турция/1/2005, клайд 2.2). Кливедж-сайты молекулы НА обоих штаммов PR8-H5N1 были модифицированы для их перевода в апатогенную форму. Важно отметить, что все попытки получения реассортантов с формулой генома 6:2 при такой стратегии не увенчались успехом, даже при использовании различных модификаций процедуры скрещивания [285]. Все полученные реассортантные штаммы ЖГВ наследовали вместе с генами внутренних белков и ген нейраминидазы от донора Лен/17, тем самым образуя 7:1 реассортанты. Такая же проблема присутствовала и при подготовке реассортантного штамма A/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2), а также при попытках получения штаммов ЖГВ H5N1 другими группами исследователей, что указывает на наличие особых молекулярных механизмов, определяющих констелляцию генов между вирусами гриппа птиц и человека [128, 156].

Два вакцинных кандидата, подготовленных путем скрещивания в РКЭ штаммов VN/PR/CDC-RG и NIBRG-23 с донором Лен/17, были изучены в доклинических исследованиях, показавших их безвредность, иммуногенность и (кросс)протективную активность на модели хорьков [285], а ЖГВ из штамма A/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) была далее изучена в первой фазе плацебо-контролируемых клинических испытаний на добровольцах. Данная вакцина хорошо переносилась при двукратном введении, при этом число слабых местных и системных нежелательных явлений было сопоставимо между вакцинной и контрольной группами [416]. В данных испытаниях для оценки иммуногенности ЖГВ H5N2 был использован расширенный набор иммунологических методов, включающих оценку системного гуморального иммунного ответа в РТГА, РМН и ИФА-IgG, локального секреторного иммунитета в назальных секретах и слюне в ИФА-IgA, а также выявление различных субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти в периферической крови, с последующим определением Т-клеток центральной (CCR7+CD45RA-) и эффекторной (CCR7-CD45RA-) памяти. Суммарно, гуморальный иммунный ответ был зафиксирован у 24/29 привитых лиц, хотя СГТ выявляемых антител были достаточно низкие. Учитывая Т-клеточные иммунные ответы, суммарная иммуногенность вакцины составила 96,6% [416].

Специалисты американской компании MedImmune использовали методы обратной генетики для подготовки реассортантных штаммов ЖГВ против ВПВГ H5N1 на основе донора аттенуации A/AA, при этом реассортанты имели классический состав генома 6:2. Два

вакцинных кандидата, подготовленных на основе высокопатогенных вирусов A/Hong Kong/213/2003 и A/Vietnam/1203/04, были безвредны и иммуногенны в исследованиях на мышах и хорьках, причем у хорьков даже после двукратной иммунизации образовывались лишь небольшие уровни сывороточных антител. Тем не менее, животные были защищены от репродукции в легких как гомологичных, так и гетерологичных ВПВГ H5N1 [464]. В исследованиях на добровольцах обе вакцины практически не детектировались в смывах ВДП привитых, и, как следствие, иммунный ответ, выявляемый в РТГА и ИФА, был достаточно слабый, как по количеству сероконверсий, так и по уровням среднегеометрических титров антител [247]. Одной из причин гиператтенуированного фенотипа ЖГВ H5N1 исследователи называют удаление полиосновного кливедж-сайта из молекулы НА [463], однако включение в состав вакцинных штаммов ЖГВ немодифицированной молекулы НА высокопатогенных вирусов невозможно ввиду потенциальной возможности образования реассортантных вирусов, несущих гемагглютинин ВПВГ H5N1, и при этом обладающих свойствами трансмиссивности эпидемических вирусов гриппа человека.

Важно отметить, что изученные в клинических испытаниях ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа H5N1, даже в случае достаточного высокого уровня сероконверсий сывороточных антител, индуцировали значительно более низкие титры антител по сравнению с сезонными ЖГВ – как для отечественных вакцин на базе донора аттенуации Лен/17, так и для американских вакцин на базе донора A/AA [64, 218, 253, 254, 416, 423-425]. Однако, даже в случае отсутствия определяемого классическими методами иммунного ответа после исходной иммунизации ЖГВ H5N1 или ЖГВ H5N2, последующая однократная иммунизация привитых низкой дозой инактивированной вакцины H5N1 (буст-иммунизация) вызывала ускоренную продукцию высоких уровней сывороточных антител, обладающих широкой кросс-реактивностью [381, 419, 472].

Суммарно, предложенная ранее стратегия подготовки вакцинных штаммов для отечественной ЖГВ H5N1 путем классической реассортации в РКЭ донора аттенуации и штамма для инактивированной гриппозной вакцины показала свою перспективность. Однако, во-первых, с использованием данного подхода удавалось получать лишь реассортанты с формулой генома 7:1, а не 6:2 [262, 285], а, во-вторых, такой способ существенно замедляет процесс подготовки вакцинных штаммов для ЖГВ, поскольку для каждого нового рекомендованного вируса необходимо будет сначала получить реассортантный штамм для ИГВ, и лишь потом приступить к подготовке штамма для ЖГВ. В связи с этим потребовалась разработка обратно-генетической системы для отечественного донора аттенуации Лен/17 с целью своевременной подготовки вакцинных реассортантов ЖГВ против любых высоковирулентных вирусов гриппа генно-инженерными методами.

1.3.3. Вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа H7N9

Поскольку вирусы подтипа H7 уже вызывали ранее локальные вспышки заболевания людей, эти вирусы были включены в Глобальный план ВОЗ по подготовке к пандемии [515], и несколько вакцин H7, как живых, так и инактивированных, уже были протестированы в клинических испытаниях [55, 122, 224, 418, 470]. К сожалению, ни один из вакцинных штаммов подтипа H7 не содержал нейраминидазу подтипа N9. Известно, что нейраминидаза, наряду с гемагглютинином, является важным иммуногеном вакцинных штаммов, и что анти-NA антитела блокируют рецептор-разрушающую функцию нейраминидазы, тем самым предотвращая дальнейшее развитие инфекции. Разработанные до 2013 года вакцины подтипа H7 содержали NA подтипов N1, N3 или N7, и, несмотря на принадлежность генов N2, N7 и N9 к одной филогенетической группе 2 [158], их последовательности очень сильно отличаются друг от друга, и гомология по аминокислотному составу не превышает 50%. Нейраминидаза подтипа N1 принадлежит к другой филогенетической группе и еще больше отличается от N9. Такие различия в последовательностях различных подтипов нейраминидаз говорит о низкой вероятности выработки кросс-реактивных антинейраминидазных антител против N9 после вакцинации штаммами, содержащими нейраминидазу подтипов N1, N3 или N7. Кроме того, анализ аминокислотных последовательностей гемагглютининов показал наличие более 20 различий между вирусами H7N9 и штаммами, входящими в состав существующих H7 вакцин [417].

Сразу после выделения от людей новых вирусов гриппа H7N9 начались интенсивные работы по конструированию безопасных и эффективных вакцин для защиты населения в случае приобретения данными вирусами способности к передаче воздушно-капельным путем. К настоящему времени получено и изучено на животных моделях большое разнообразие вакцинных кандидатов H7N9 на основе различных технологий, включая традиционные подходы (цельновирионные, расщепленные и субъединичные ИГВ, а также ЖГВ) и более технически совершенные технологии, такие как вирусоподобные частицы (VLP), синтетические рекомбинантные белки, ДНК- и РНК-вакцины, а также вакцины на основе вирусных векторов [219]. Следует отметить, что анализ методами иммуноинформатики предсказал, что вакцины на основе вируса H7N9 будут индуцировать более слабый иммунный ответ у людей, чем классические вакцины против сезонного гриппа [125, 126].

Несмотря на разнообразие платформ, использованных для разработки вакцин против вирусов H7N9, и в основном положительные результаты исследований на животных моделях, только несколько кандидатов достигли стадии клинических испытаний на добровольцах. Первое клиническое исследование было проведено компанией NovaVax с использованием H7N9 VLP вакцины [153]. Как и ожидалось, вакцина, полученная из вируса птичьего гриппа, имела низкую

иммуногенность у людей при введении без адъюванта. Добавление адъюванта ISCOMATRIX значительно усиливало иммуногенность вакцины даже при половинной дозе адъюванта. Важно отметить, что исследование антител, индуцированных в ходе этого клинического исследования, показало, что адъювант ISCOMATRIX не только увеличивает титры антител, но также улучшает качество индуцированных антител [112]. Позднее компания Novavax провела исследование у людей VLP вакцины H7N9 с новым адъювантом на основе сапонины Matrix-M1. Это исследование продемонстрировало хороший профиль безопасности и значительное снижение необходимой для индукции мощного иммунного ответа дозы антигена, что могло бы существенно увеличить количество произведенных доз в условиях пандемии [48].

Несколько клинических испытаний было проведено для оценки безвредности и иммуногенности расщепленных и субъединичных ИГВ, содержащих эмульсионные адъюванты MF59 и ASO3, как по-отдельности, так и в различных комбинациях. Как и в случае с H7N9 VLP вакциной, субъединичная вакцина, была слабо иммуногенна для людей: только у 3% и 6% взрослых здоровых добровольцев обнаруживались сероконверсии сывороточных антител в РТГА и РМН, соответственно [63]. Добавление адъюванта значительно усиливало выработку сывороточных антител, даже при снижении стандартной дозы антигена в 2 и в 4 раза [63].

Изучение расщепленной вакцины H7N9, вводимой как без адъюванта, так и с MF59 адъювантом, показало схожие результаты: безадъювантная вакцина была слабо иммуногенна даже при введении высоких доз антигена (45 мкг), тогда как при добавлении адъюванта вакцина индуцировала мощный гуморальный иммунный ответ на введение существенно более низких доз [336]. Сравнительное исследование иммунопотенцирующего эффекта двух эмульсионных адъювантов, вводимых с расщепленной ИГВ H7N9 здоровым взрослым добровольцам, продемонстрировало превосходство характеристик адъюванта ASO3 над MF59: ASO3-адъювантная вакцина была более иммуногенной по сравнению с MF59-адъювантной, даже при введении 1/4 дозы антигена (3,75 мкг против 15 мкг) [221]. Эти данные согласуются результатами изучения этих вакцин на модели хорьков [533]. Еще одна изученная в клинических исследованиях расщепленная вакцина H7N9 компании GSK показала более высокую иммуногенность, по сравнению с аналогами других производителей: доза 15 мкг безадъювантной вакцины вызывала приросты антител в РТГА и РМН у 23% и 33% привитых лиц, тогда как эти показатели у других вакцин не превышали 10-12% [310]. Добавление адъюванта ASO3 приводило к увеличению уровня сероконверсий до 90%, даже при использовании половины стандартной дозы антигена, при этом СГТ этих антител были наивысшими среди всех ИГВ H7N9, изученных на людях [219].

Как и в случае с другими вакцинными штаммами ЖГВ против потенциально-пандемических вирусов гриппа, живая вакцина из вируса H7N9, разработанная компанией

MedImmune, индуцировала очень слабый гуморальный иммунный ответ у здоровых взрослых добровольцев: лишь несколько из привитых лиц ответили сероконверсиями после двукратной иммунизации [447]. Тем не менее, учитывая полученные в последнее время данные об индукции пандемическими ЖГВ долговременной иммунологической памяти [55, 419, 472], авторы использовали стратегию прайм-буст иммунизации для оценки иммуногенности ЖГВ H7N9. Так, отсроченное бустирование иммунизированных ЖГВ H7N9 добровольцев одной дозой безадыювантной субвирионной ИГВ приводило к усиленной выработке антител, выявляемых в РТГА, РМН и ИФА [447]. Эти антитела обладали перекрестной реактивностью к антигенно-удаленным вирусам гриппа птиц H7N3 и H7N7. Кроме того, ЖГВ H7N9 обладала выраженным праймирующим эффектом для индукции после бустирования ИГВ H7-специфичных ADCC антител, СГТ которых увеличивались с 93 до 2128 [447].

1.4 Подходы к созданию универсальной гриппозной вакцины

Классические гриппозные вакцины стимулируют в основном образование нейтрализующих антител к поверхностным антигенам вируса, главным образом к их иммунодоминантным гипервариабельным участкам. Постоянный антигенный дрейф позволяет вирусу легко уходить от действия данных антител, снижая эффективность вакцинации и вызывая необходимость практически ежегодного обновления вакцинных штаммов в составе сезонных гриппозных вакцин [230, 377, 505, 567]. Кроме того, сезонные вакцины не способны защитить от вновь возникающих пандемических вирусов гриппа, а подготовленные резервные вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа также обладают узкой специфичностью и могут не обладать перекрестной реактивностью даже внутри одного подтипа. Одним из подходов к расширению спектра защитного действия гриппозных вакцин является включение в состав вакцинного препарата иммуногенных эпитопов одновременно из нескольких эволюционно-удаленных вирусов. Такие поливалентные вакцины были разработаны для вирусов гриппа птиц H5N1, включающих эпитопы вирусов различных клейдов, и способных обеспечивать перекрестную защиту против различных гетерологичных вирусов гриппа H5N1 [385].

Для вирусов H5N1 широко используется стратегия создания вакцин на основе консенсусных последовательностей различных белков вирусов, таких как HA, NA и M1, направленных на индукцию перекрестно-реагирующего В- и Т-клеточного иммунного ответа. Например, недавно была разработана мультивалентная вакцина на основе аденовирусного вектора, экспрессирующего полноразмерные консенсусные последовательности молекулы HA подтипов H1, H2, H3 и H5. Такая вакцина обеспечивала защиту мышей от летального заражения различными гетерологичными вирусами гриппа [295]. Ранее ДНК-вакцины из таких

синтетических антигенов также показали способность защищать животных от генетически удаленных вирусов H5N1 [171]. Данная технология была усовершенствована путем разработки алгоритма создания консенсусных последовательностей молекул HA различных вирусов гриппа А, именуемого *Computationally Optimized Broadly Reactive Antigen (COBRA)*. Использование COBRA HA молекул в составе вирусоподобных частиц показало свою перспективность в исследованиях на моделях животных: такие вакцины индуцировали антигемагглютинирующие антитела широкого спектра действия и защищали животных от антигенно-удаленных вирусов подтипа H3N2 [534], H1N1 [95, 96] и H5N1 [170, 171]. Однако такая стратегия позволяет лишь расширить спектр гуморального иммунного ответа внутри определенного подтипа вируса гриппа А, но не способна обеспечить гетеросубтипическую защиту привитых.

Более перспективным подходом к конструированию универсальной гриппозной вакцины является усиленная индукция перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа, нацеленных на высококонсервативные антигены, присутствующие в вирусах гриппа различных подтипов [212, 268, 274, 339, 373]. Так, в составе вириона гриппа присутствуют множественные консервативные домены, которые, в силу своей функциональной значимости, являются достаточно слабыми иммуногенами, и классические подходы к иммунизации не способны индуцировать мощный иммунный ответ к этим участкам.

В настоящее время стратегии разработки универсальной гриппозной вакцины можно разделить на две основные категории:

- (1) Вакцины, направленные на индукцию антител к структурно консервативным участкам вирусных белков – стеблевому домену молекулы HA, к вирусной нейраминидазе и к эктодомену мембранного белка M2 (M2e). При этом индуцируемые антитела могут обладать как нейтрализующей функцией, так и участвовать в процессе антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, тем самым ускоряя элиминацию вируса из зараженного организма.
- (2) Вакцины, направленные на индукцию кросс-реактивного Т-клеточного иммунного ответа к внутренним белкам вириона, таким как NP и M1. В данном случае защитный эффект вакцинации сказывается на снижении тяжести заболевания и ускорении процесса выздоровления, а не на предотвращении заражения [78].

1.4.1. Подходы к индукции перекрестно-реагирующего гуморального иммунного ответа

Одним из перспективных кандидатов для создания универсальной вакцины является ионный канал вириона – белок M2, экспрессируемый на поверхности вирусной частицы в виде гомотетрамера. Эктодомен M2e состоит из 23-х аминокислотных остатков и является высококонсервативным участком среди всех вирусов гриппа А, циркулирующих у людей с 1918-го по настоящее время [127, 145], хотя и имеются аминокислотные замены по сравнению с

вирусами гриппа птиц и свиней. Поскольку M2 белок вносит существенный вклад в развитие окислительного стресса при гриппе, индукция иммунного ответа на него представляется высокофункциональной для защиты от гриппозной инфекции [32].

Однако белок M2e является очень слабым иммуногеном, поскольку он имеет чрезвычайно малые размеры и представлен в вирусной частице в малом числе копий на вирион (около 20), тогда как два других поверхностных антигена – HA и NA имеют гораздо большие размеры и представлены с большей плотностью на вирусной мембране, экранируя действие M2e антигена [391]. При этом на модели экспериментальной инфекции у людей был продемонстрирован защитный эффект анти-M2e антител в снижении вирусной нагрузки и клинических симптомов заболевания, вызванного заражением вирусом H3N2 [394].

На протяжении последних 20 лет активно ведутся работы по созданию универсальных гриппозных вакцин на основе M2e белка, и к настоящему времени описаны многочисленные стратегии усиления иммуногенных свойств данного белка и представлены перспективные кандидатные M2e-вакцины, находящиеся на различных стадиях доклинических и клинических исследований. Наиболее перспективные прототипные M2e вакцины представляют собой ДНК-вакцины, рекомбинантные тетрамерные M2e белки, фрагменты M2e, экспрессированные на поверхности вирусоподобных частиц, M2e мультимерные комплексы, сшитые с различными белковыми носителями, выступающими в роли адъювантов, а также экспрессированные M2e антигены в составе различных вирусных векторов (см. обзоры [32, 78, 274]). Несмотря на очевидные успехи в разработке универсальной вакцины на основе M2e белка, представляется маловероятным скорое лицензирование таких вакцин для масштабного применения у людей, особенно у детей младшего возраста, поскольку у данных контингентов использование адъювантов с недоказанным профилем безопасности недопустимо.

Другой мишенью для конструирования гриппозных вакцин широкого спектра действия является поверхностный антиген вируса гриппа нейраминидаза. Несмотря на значительную степень вариации данного белка между вирусами различных подтипов, скорость его эволюционной изменчивости все же значительно ниже скорости антигенного дрейфа основного антигена вируса гриппа – гемагглютинина [38]. Ранее было показано, что несколько моноклональных антител, распознающих консервативные участки молекулы NA, обладают широким спектром ингибирующего действия в отношении гетерологичных вирусов гриппа А и, в некоторых случаях, и вирусов гриппа В [530]. Кроме того, именно уровни анти-NA антител в настоящее время признаны единственным независимым фактором, предсказывающим эффективность защиты людей от различных клинических проявлений заболевания, вызванного вирусом гриппа [328, 332, 372]. Однако пока остается невыясненным, индуцируются ли в процессе натуральной инфекции или вакцинации анти-NA антитела, направленные на

консервативные участки молекулы NA, или только на гипервариабельные домены [274]. Использование консервативных иммуногенных эпитопов нейраминидазы вирусов гриппа А и В для целенаправленного конструирования вакцин широкого спектра действия пока слабо представлено в научной литературе, хотя, несомненно, является перспективным направлением дальнейшего усовершенствования гриппозных вакцин [269]. Следует отметить, что иммунизация живыми гриппозными вакцинами индуцирует существенные уровни анти-NA антител, способных перекрестно ингибировать нейраминидазную активность антигенно-удаленных вирусов гриппа [11, 29].

Наиболее перспективным и динамично развивающимся направлением конструирования универсальной гриппозной вакцины является стратегия направленной индукции антител, специфичных stalk-домену молекулы NA вируса гриппа [185, 273, 275, 276, 301, 314, 344, 379]. Stalk-домен молекулы NA содержит эпитопы, которые высококонсервативны среди вирусов гриппа А, принадлежащих одной филогенетической группе. Так, к группе 1 относятся гемагглютинины подтипов H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18, а к группе 2 - H3, H4, H7, H10, H14, H15 [37] (Рис. 6).

Поскольку NA2 stalk-домен является низкоиммуногенным, предлагаются различные стратегии для усиления иммуногенности данного фрагмента. Одним из направлений является дизайн стабильных белковых структур, состоящих исключительно из stalk-домена молекулы NA, тогда как глобулярная часть NA1 субъединицы удаляется. На начальных этапах конструирования таких вакцин не удавалось получить «усеченные» структуры вирусных NA, конформационно идентичные естественным вирусным белкам, и индуцируемый иммунный ответ лишь частично защищал животных от заражения гетерологичными вирусами гриппа других подтипов [428, 455]. В последние годы удалось получить стабильные белковые структуры рекомбинантных stalk-доменов NA2, которые индуцировали кросс-реактивные анти-NA2 антитела, обладающие гетеросубтипической защитной активностью на животных моделях [215, 531, 545]. Кроме того, экспрессия NA2 субъединицы в виде белка, конъюгированного с различными белковыми носителями, также представляется перспективным направлением для конструирования вакцин широкого спектра действия [452, 456, 504] Следует отметить, что такие усеченные варианты молекулы NA не могут быть включены в состав репликативных форм вируса гриппа и могут лишь быть использованы в качестве рекомбинантных белковых вакцин, антигенов, экспрессируемых на поверхности вирусоподобных частиц, или в качестве ДНК-вакцины [78].

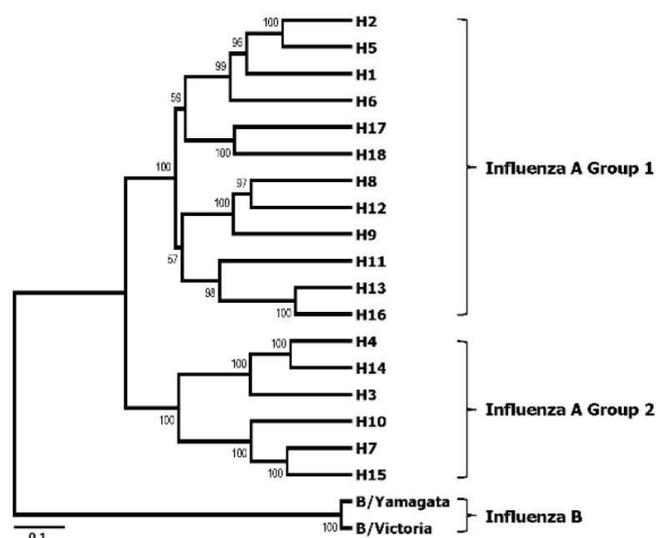


Рисунок 6. Филогенетическое дерево всех подтипов гемагглютинаина вирусов гриппа А и В. Адаптировано из [231].

Другая стратегия индукции высоких уровней анти-stalk HA антител предполагает последовательную иммунизацию вакцинами, экспрессирующими химерные молекулы HA (сНА), которые содержат идентичный stalk-домен (например, из вируса H1N1), но при этом глобулярные домены у них значительно различаются по антигенности, т.е. принадлежат различным подтипам вирусов гриппа А (Рис. 7) [185, 273].

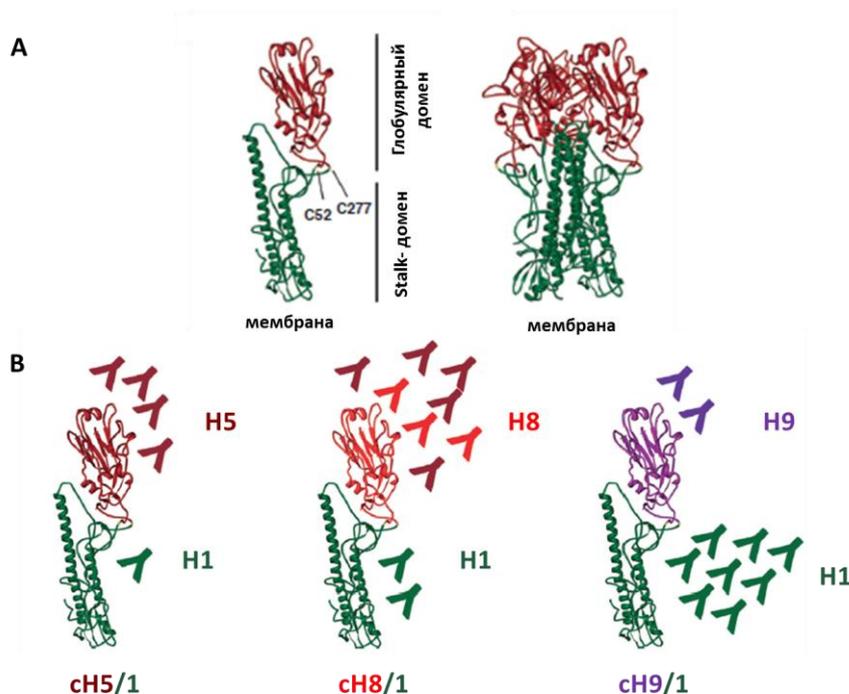


Рисунок 7. Конструирование универсальной гриппозной вакцины на основе химерных молекул гемагглютинаина. **А.** Мономер и тример молекулы HA с обозначенными глобулярным и stalk доменами. **В.** Стратегия повышения иммуногенности консервативного stalk-домена молекулы HA путем последовательной иммунизации химерными конструкциями. Адаптировано из:[273].

При таком подходе снижается иммунодоминантность глобулярной части молекулы НА, поскольку каждый последующий вирус имеет существенные различия в основных антигенных сайтах по сравнению с предыдущим, в результате чего не происходит бустирования гуморального ответа к этой части НА. Stalk-домен, наоборот, идентичен у всех вирусов, и каждое последующее введение антигена усиливает иммунный ответ к этому домену, тем самым увеличивая пропорцию анти-stalk антител в общем пуле вакцин-индуцируемых антител, что, в свою очередь, повышает кросс-протективный потенциал вакцинных конструкций [273].

К настоящему времени были апробированы несколько платформ гриппозных вакцин для индукции stalk-реактивных антител с использованием таких химерных молекул НА на животных моделях. Среди них (i) ДНК-вакцинация мышей с последующим бустированием рекомбинантной белковой вакциной, а также праймирование и бустирование рекомбинантным белком [175, 275]; (ii) иммунизация мышей адъювантной инактивированной гриппозной вакциной [341]; (iii) праймирование хорьков векторной вакциной на основе вируса везикулярного стоматита, экспрессирующего сНА, с последующим бустированием векторной вакциной на основе анденовируса [270, 344]; (iv) иммунизация мышей векторной вакциной на основе вируса везикулярного стоматита [427]. Во всех упомянутых исследованиях на животных вакцины, содержащие химерные молекулы НА, индуцировали достоверно более высокие уровни кросс-реактивных анти-stalk-НА антител, по сравнению с классическими вакцинами, экспрессирующими полноразмерные натуральные молекулы НА. В результате животные, привитые сНА-содержащими конструкциями, были лучше защищены от заражения гетерологичными вирусами гриппа А различных подтипов, чем животные контрольных групп, получавших стандартные вакцинные препараты.

Живые гриппозные вакцины представляют собой перспективную платформу для конструирования универсальной гриппозной вакцины на основе химерных молекул НА, поскольку они безопасны для людей различных возрастных категорий и способны индуцировать все звенья адаптивного иммунного ответа. Недавно ЖГВ, экспрессирующая химерную молекулу НА, была изучена в доклинических исследованиях на хорьках [343]. В этих испытаниях сН8/1 ЖГВ (содержит stalk-домен от вируса Н1N1pdm, а глобулярный домен – от вируса Н8N4) сравнивалась с сН8/1 ИГВ по способности праймировать животных для последующей индукции stalk-реактивных антител в ответ на бустирующую дозу ИГВ, несущей химерную молекулу сН5/1 (содержит идентичный stalk-домен от вируса Н1N1pdm, а глобулярный домен – от вируса Н5N1). Несмотря на индукцию схожих уровней кросс-реактивных антител после иммунизации, ЖГВ-ИГВ режим вакцинации обеспечивал лучшую защиту хорьков от заражения вирусом Н1N1pdm, чем режим ИГВ-ИГВ, указывая на перспективность использования ЖГВ с химерными молекулами НА в качестве универсальной

гриппозной вакцины [343]. Однако до настоящего времени оставался открытым вопрос о целесообразности применения режима последовательной иммунизации живыми гриппозными вакцинами, экспрессирующими химерные молекулы НА, т.е. не существовало свидетельств о преимуществах таких конструкций перед последовательной иммунизацией классическими ЖГВ различных подтипов в плане индукции кросс-протективного гуморального иммунного ответа.

Необходимо отметить, что в литературе имеются сведения о том, что stalk-реактивные антитела могут вызывать усиление вирусной инфекции у свиней после заражения гетерологичным вирусом гриппа, вместо того, чтобы защищать организм от инфицирования [162, 163]. Общим объяснением такого побочного эффекта является то, что если перекрестно-реактивные антитела, полученные в результате предшествующей вакцинации или инфекции, связывают, но плохо нейтрализуют вирус, связывание не нейтрализующих антител фактически облегчает проникновение вируса в клетки через хорошо известный процесс, Fc-γ-опосредованный эндоцитоз, что усиливает вирусную активность [255, 482]. Следует отметить, что подобные побочные явления были зарегистрированы только при вакцинации свиней цельновирионными ИГВ с последующим заражением гетерологичным штаммом вируса гриппа, тогда как в аналогичных экспериментах на животных с иммунизацией живыми гриппозными вакцинами данного эффекта не наблюдалось [161]. Кроме того, эффекта вакцин-индуцируемого усиления тяжести заболевания до сих пор не было продемонстрировано для вакцинных конструкций, содержащих химерные молекулы НА.

1.4.2. Подходы к индукции перекрестно-реагирующего Т-клеточного иммунного ответа

Т-клеточный иммунитет играет важную роль в контроле гриппозной инфекции. Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) уничтожают клетки, зараженные вирусом гриппа, на поверхности которых они распознают чужеродные антигены, полученные в результате эндогенного процессинга вирусных белков и презентированные молекулами класса МНС-I. Таким образом, ЦТЛ способствуют выведению вируса из организма и предотвращают распространение вирусной инфекции [453]. Несмотря на то, что Т-клеточный иммунитет не предотвращает заражение организма вирусом гриппа, существуют многочисленные свидетельства о способности Т-клеток, распознающих консервативные эпитопы вирусных белков, снижать вирусную нагрузку и облегчать симптомы заболевания у животных и людей после заражения гетерологичными вирусами гриппа [193, 327, 449, 529]. Многочисленные исследования продемонстрировали образование функциональных, специфичных вирусу гриппа CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток как после интраназального, так и после внутримышечного введения ЖГВ и ИГВ [45, 190, 252, 488, 493, 506], однако амплитуда такого ответа остается невысокой,

что ограничивает защиту привитых от дрейфовых вариантов вирусов гриппа, а также не позволяет защитить от вновь возникающих пандемических вариантов.

В этой связи уже на протяжении продолжительного времени ведутся активные исследования по созданию альтернативных подходов к вакцинации, нацеленных на индукцию Т-клеточного иммунного ответа к консервативным эпитопам вирусных белков и способных защищать от антигенно-удаленных сезонных и пандемических вирусов гриппа. Такие вакцины будут особенно полезны для групп риска, таких как пожилые люди, у которых зачастую гриппозная инфекция протекает с тяжелыми осложнениями. Поскольку такие вакцины предназначены для снижения тяжести заболевания, а не для предотвращения инфекции, неизбежно возникнут проблемы с оценкой их иммуногенности в лицензионных и маркетинговых целях. В настоящее время на различных стадиях клинических исследований находится ряд вакцинных кандидатов, большинство из которых экспрессирует NP и M1 антигены вируса гриппа [453].

Наиболее продвинутым в плане клинического изучения Т-клеточным вакцинным кандидатом является векторная вакцина на основе модифицированного вируса осповакцины (modified vaccinia Ankara, MVA), экспрессирующая NP и M1 белки вируса гриппа А. Данная вакцина была безопасна в первой фазе клинических испытаний и индуцировала NP- и M1-специфичные CD8⁺IFN- γ ⁺ Т клетки, а в исследовании на экспериментальной модели челленджа снижала длительность выделения вируса у инфицированных людей [79, 293]. Авторы позже оценили в клинических наблюдениях аналогичную вакцину, но с использованием другого вирусного вектора – рекомбинантного аденовируса обезьян (ChAdOx1), которая также была безвредна и иммуногенна для людей [50]. Комбинация обеих векторных вакцин в режиме гетерологичной прайм-буст иммунизации позволила значительно повысить амплитуду Т-клеточного ответа на NP и M1 белки вируса гриппа у молодых и пожилых людей, причем иммунитет сохранялся у привитых лиц как минимум на протяжении 18 месяцев [119].

Помимо экспрессии Т-клеточных эпитопов в составе полноразмерных белков вируса гриппа, Т-клеточные вакцины могут быть представлены в виде синтезированных коротких полипептидов, содержащих набор консервативных Т-клеточных эпитопов из различных белков вируса гриппа. Вакцина FLU-v, содержащая эквимольное количество четырех полипептидов, включающих не менее 20 человеческих ЦТЛ-эпитопов вирусов гриппа А и В, показала способность индуцировать вирус-специфичные CD8⁺ Т-клетки в I фазе клинических испытаний [383], однако она не смогла снизить вирусную нагрузку и симптомы заболевания при экспериментальной челлендж-инфекции у людей [382]. Другой вакцинный кандидат, Multimeric-001, представляет собой рекомбинантный белок, содержащий консервативные линейные эпитопы белков NP, M1 и HA вируса гриппа А. Данная вакцина индуцировала Т-

клеточный ответ при введении пожилым людям I и II фазе клинических испытаний [54]. Другие стратегии целенаправленной индукции Т-клеточного иммунитета включают использование вирусоподобных частиц, экспрессирующих на своей поверхности консервативные белки вирусов гриппа, РНК-репликоны, ДНК-вакцины, а также использование различных адъювантов (см. Обзор [448]).

Преимущественное использование NP и M1 белков для дизайна экспериментальных Т-клеточных вакцин базируется на том, что данные белки являются основными мишенями для развития иммунодоминантного CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа на гриппозную инфекцию и вакцинацию [104, 178]. Это звено вакцин-индуцируемого иммунного ответа отвечает за более высокую эффективность расщепленных вакцин по сравнению с субъединичными ИГВ, у которых данные белки отсутствуют [473]. Цельновирионные ИГВ, в свою очередь, считаются более эффективными в сравнении с расщепленными из-за лучшей структуры вакцинных антигенов, которые могут быть гораздо более эффективно презентированы дендритными клетками и макрофагами Т-клеткам [187].

Другой причиной широкого использования белков NP и M1 для дизайна универсальных гриппозных вакцин является их относительная консервативность среди различных подтипов вирусов гриппа А, что объясняет высокую степень кросс-реактивности Т-клеточного иммунного ответа после вакцинации или натуральной инфекции. Тем не менее, гены NP и M1 белков все же подвержены медленным эволюционным изменениям в силу ускользания вирусов от распознавания цитотоксическими Т-лимфоцитами. Этот механизм вирусного эскейпа базируется на мутациях, возникающих в Т-клеточных эпитопах и приводящих к нарушениям процессинга эпитопов, как на этапе презентации пептида комплексами гистосовместимости, так и на этапе распознавания пептид-МНС комплексов Т-клеточными рецепторами [494].

За последние 20 лет было опубликовано большое количество исследований, свидетельствующих об исчезновении некоторых иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов в процессе эволюции вирусов гриппа [77, 406, 477]. Это означает, что мутации в таких эпитопах приводят к неэффективному распознаванию зараженных вирусом клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами, нацеленными на исходные, немутированные эпитопы. Другими словами, ЦТЛ, нацеленные на некоторые эпитопы NP и M1 белков вакцинных штаммов (то есть белков, унаследованных от донора аттенуации или донора высокой репродуктивности) после иммунизации ЖГВ или ИГВ, уже не распознают эти белки у современных циркулирующих вирусов гриппа.

Решить данную проблему можно путем включения в состав вакцинных штаммов дополнительно хотя бы один из вышеупомянутых генов от современных циркулирующих

вирусов гриппа. Основной вопрос заключается в том, можно ли заменить NP или M ген основных донорских штаммов соответствующими генами эпидемических вирусов без потери их высокой урожайности (для ИГВ и ЖГВ) и аттенуированного фенотипа (только для ЖГВ). В нескольких недавних исследованиях была предпринята попытка идентифицировать молекулярные детерминанты высокоурожайного фенотипа реассортантных вирусов на основе донорского штамма PR8. В двух исследованиях была обнаружена критическая роль M гена вируса PR8 в становлении высокорепродуктивного фенотипа реассортантных штаммов для ИГВ, поскольку почти все высокотитражные реассортанты, полученные методом классической реассортации, унаследовали этот ген от вируса PR8 [154, 392]. Напротив, NP ген не был ассоциирован с передачей высокоурожайного фенотипа реассортантным вакцинным штаммам, что свидетельствует о том, что этот ген можно легко заменить соответствующим геном циркулирующего вируса без потери урожайности. Кроме того, недавнее исследование показало, что поверхностные белки HA и NA, а не внутренние и неструктурные белки, оказывают самое сильное влияние на ростовые свойства вакцинных штаммов для ИГВ [241].

Гораздо труднее предсказать влияние включения NP и/или M гена эпидемического вируса в геном реассортантов для живой гриппозной вакцины, поскольку в этом случае требуется сохранить как высокоурожайные, так и аттенуированные свойства вирусов. Аттенуированный фенотип вакцинных штаммов ЖГВ в основном определяется их температурочувствительным фенотипом, который ограничивает репликацию вируса в нижних дыхательных путях и минимизирует симптомы заболевания [404]. Следовательно, замена гена NP или M в геноме вакцинных штаммов ЖГВ не должна влиять на *ts* фенотип вакцинного вируса. Поиск молекулярных основ *ts* фенотипа доноров аттенуации A/AA и Лен/17 показал, что этот фенотип определяется мутациями в полимеразных белках PB2 и PB1. Соответственно, замена NP или M гена в геноме вакцинного штамма ЖГВ на таковой эпидемического вируса не должна нарушать *ts* фенотип вакцинного реассортанта [237, 261, 266]. Стоит отметить, что одна мутация в NP белке донора A/AA (D34G) также вовлечена в становление температурочувствительности данного вируса [237]. Тем не менее, внесение *ts* мутаций, свойственных вирусу A/AA, только в гены PB2 и PB1 вируса PR8, были достаточны для становления его *ts* фенотипа и аттенуации для хорьков, указывая на минорную роль мутации D34G в NP белке [239]. Таким образом, вполне допустимо включение в состав вакцинных штаммов ЖГВ дополнительно NP и/или M генов от актуального эпидемического штамма без потери аттенуированного фенотипа вируса, однако до проведения настоящего диссертационного исследования данная возможность не была изучена экспериментально.

1.5 Заключение к обзору литературы

Представленный обзор литературы позволил обобщить имеющиеся сведения по общим характеристикам вирусов гриппа, их структуре и изменчивости в природе. Проведенный анализ различных типов лицензированных и экспериментальных противогриппозных вакцин позволил оценить их основные преимущества и недостатки.

Выявлены пробелы в изучении молекулярных основ аттенуации и генетической стабильности вакцинных штаммов для отечественной живой гриппозной вакцины, что послужило предпосылкой для детального изучения на новом методическом уровне роли мутаций донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в проявлении его основных биологических свойств.

Достаточно большой массив данных, представленных в литературе, подтверждает неизбежность возникновения новых пандемий гриппа, позволяя очертить круг наиболее вероятных возбудителей будущей пандемии – вирусов гриппа А подтипов H7N9, H5N1 и H2N2. При этом разрабатываемые подходы к конструированию новых противогриппозных вакцин, призванных защитить население от надвигающейся пандемии, имеют определенные ограничения и недостатки. Обоснована целесообразность разработки универсального донора аттенуации и высокой репродуктивности для подготовки вакцинных штаммов, подходящих для производства как живой, так и инактивированной гриппозных вакцин.

Отсутствие безопасных, эффективных и легко доступных в наиболее уязвимых регионах (т.е. в развивающихся и вновь индустриализованных странах с высокой плотностью населения) вакцин против широкого спектра потенциально-пандемических вирусов гриппа и явилось предпосылкой для проведения настоящего исследования, направленного на разработку подходов к созданию кросс-протективных гриппозных вакцин на базе отечественной живой гриппозной вакцины. При этом обоснована целесообразность оптимизация свойств отечественной ЖГВ одновременно по двум направлениям:

(1) конструирование вакцинных штаммов ЖГВ против наиболее вероятных возбудителей следующих пандемий;

(2) расширение спектра защитного действия сезонных и пандемических штаммов ЖГВ с целью создания универсальной гриппозной вакцины нового поколения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Клеточные линии

Культуры клеток почки собаки (MDCK, Madin–Darby canine kidney) и почки эмбриона человека (HEK293T) были получены из Американской Коллекции Культур Клеток (American Type Culture Collection, ATCC) и поддерживались культивированием в среде DMEM (Invitrogen, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика-антимикотика (Gibco, США). Сертифицированная для производства гриппозных вакцин культура клеток Vero была получена из Европейской коллекции клеточных культур (линия WHO cat. no. CB884). Клетки были адаптированы к росту в бессывороточной среде OptiPro (Gibco, США) с добавлением GlutaMAX (Gibco, США) и антибиотика-антимикотика (Gibco, США). Клетки выращивали в культуральных флаконах (Sarstedt, Германия или Thermo, США) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

2.1.2 Вирусы

В работе были использованы различные эпидемические, потенциально пандемические и лабораторные штаммы вирусов гриппа типа А, включая: А/Ленинград/134/57 (H2N2), А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), А/PR/8/34 (H1N1), А/PR8/34/59/1 (H1N1), А/Новая Каледония/10/99 (H1N1), А/17/Новая Каледония/99/145 (H1N1), А/Калифорния/1/66 (H2N2), А/Токио/3/67 (H2N2), А/Ануи/1/2013 (H7N9), А/Шанхай/2/2013-PR8 (H7N9, 6:2 реассортант для ИГВ), НК-Х31 (НА и NA гены от вируса А/Гонконг/1/68 (H3N2), а остальные шесть генов от вируса PR8), А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2), А/17/Гонконг/2017/75108 (H7N9), А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1), А/Египет/321/2007 (H5N1), А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09, А/дикая утка/Швеция/24/02 (H8N4), А/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2), А/серебристая чайка/Сарма/51/2006 (H6N1), А/Гонконг/1073/97 (H9N2), А/Техас/50/2012 (H3N2), А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), А/Миссисипи/10/2013 (H1N1)pdm09, А/Нью Йорк/61/15 (H1N1)pdm09, А/Перт/16/2009 (H3N2), А/Бризбен/10/07 (H3N2) и А/Панама/2007/99 (H3N2).

Вирусы были получены из коллекций штаммов вирусов гриппа следующих учреждений: ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ, ФГБНУ «ИЭМ», Centers for Disease Control and Prevention (CDC, США), National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Великобритания). Для оценки уровней антинейраминидазных антител в сыворотках крови иммунизированных животных использовали диагностические штаммы, полученные ранее в Отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» к.б.н. Смолоногой Т.А.

Вакцинные штаммы ЖГВ, несущие химерные молекулы НА (глобулярный домен от вирусов А/Вьетнам/1203/2004 (ΔН5N1) и А/дикая утка/Швеция/24/02 (Н8N4), а stalk домен от вируса А/Калифорния/7/2009 (Н1N1)pdm09), были любезно предоставлены профессором F.Krammer (Mount Sinai School of Medicine, Нью-Йорк, США).

Вирусы накапливались в 10-11 дневных развивающихся куриных эмбрионах, за исключением холодоадаптированного штамма А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2), использованного при разработке для него обратно-генетической системы (Глава 4). Данный штамм был получен компанией Nobilon Schering-Plough (Голландия) из оригинального вируса Лен/17, изолированного в РКЭ, путем пассирования в культуре клеток MDCK при оптимальной температуре (32-34°C) и последующего клонирования методом бляшек [198]. Накопленные вирусы гриппа хранились в 1 мл аликвотах при -70°C.

2.1.3 Плазмидные ДНК

Векторы для обратной генетики вирусов гриппа, pCIPolISapIT и pHW2000, содержащие все необходимые элементы для самосборки вирусных частиц в чувствительных клетках, были любезно предоставлены Dr. Ervin Fodor (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, Великобритания) и Dr. Robert Webster (St. Jude Children's Hospital, Memphis, TN, США), соответственно.

Набор из восьми плазмидных ДНК с двунаправленным считыванием, кодирующих все сегменты вируса гриппа А/PR/8/34 (Н1N1), был также получен из CDC [206, 461].

Плазмидные ДНК на основе вектора pUC19, кодирующие НА и NA гены высокопатогенного вируса гриппа А/Гуандонг/17SF003/2016 (ΔН7N9), были получены из NIBSC (Великобритания).

Плазмидные ДНК на основе векторов pHW2000, кодирующие интактные и химерные молекулы НА вирусов гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (ΔН5N1) и А/mallard/Sweden/24/02 (Н8N4), были любезно предоставлены профессором F.Krammer (Mount Sinai School of Medicine, Нью-Йорк, США).

Плазмидные ДНК на основе вектора pUC19, кодирующие химерные конструкции НА (содержащие stalk-домен от вируса гриппа PR8, а глобулярные домены от вирусов А/Вьетнам/1203/2004 (ΔН5N1) и А/перепел/Гонконг/G1/97 (Н9N2)), получали при помощи химического синтеза компанией ООО «АТГ Сервис Ген» (г. Санкт-Петербург). Трансформация клеток E.coli плазмидными ДНК осуществлялась с помощью коммерческого набора TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific, США), после чего проводился отбор трансформированных искомой плазмидой колоний клеток. Для этого бактерии накапливали в жидкой среде Luria-Bertani (Amersham, США) с селективным антибиотиком

(ампициллин). Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора GeneJet™ Mini (Thermo Scientific, США). Для получения высокоочищенной плазмидной ДНК без эндотоксинов использовали набор EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США). Плазмидная ДНК хранилась при -20°C.

Целенаправленный точечный мутагенез проводили либо с помощью набора QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, США) согласно инструкциям производителя, либо при использовании стратегии перекрывающейся ПЦР. Во втором случае желаемая мутация вводилась при помощи пары праймеров для ПЦР, которые использовали для амплификации двух частей нужного фрагмента (каждый при этом содержал вводимую мутацию), с последующим объединением фрагментов в перекрывающейся (overlap) ПЦР [81].

2.1.4 Рекомбинантные белки и пептиды

В работе в качестве антигенов были использованы рекомбинантные молекулы HA, экспрессированные в клетках насекомых High Five с использованием бакуловирусной системы [272, 315], и любезно предоставленные профессором F.Krammer (Mount Sinai School of Medicine, Нью-Йорк, США). Рекомбинантный белок HA подтипа H2 был получен из вируса А/Албания/1/1968 (H2N2), H3 – из штамма А/Перт/16/2009 (H3N2), H6 – из штамма А/дикая утка/Швеция/81/02 (H6N1), H9 – из штамма А/кураца/Гонконг/G9/1997 (H9N2). Также был использован химерный белок сH6/1, содержащий stalk-домен от вируса PR8, а глобулярный домен – от штамма А/дикая утка/Швеция/81/02 (H6N1).

Для оценки NP эпитоп-специфичного ЦТЛ-иммунного ответа использовали пептиды, соответствующие иммуногенным эпитопам NP белка различных вирусов гриппа. Твердофазный химический синтез пептидов осуществлялся компанией Алмабион (г. Воронеж) и ООО «АТГ Сервис Ген» (г. Санкт-Петербург) с чистотой продукта не менее 95% по ВЭЖХ и масс-спектрометрическим подтверждением его состава. Пептиды растворялись в воде или ДМСО до концентрации 1мМ. Сток-растворы хранились при -70°C.

2.1.5 Доноры

Кровь здоровых доноров была получена и HLA-типирована в the Australian Red Cross Blood Service (ARCBS) (Victoria, Австралия). Мононуклеары периферической крови (МПК) были выделены с помощью Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Швеция) градиента плотности.

2.2. Методы исследования

2.2.1 Подготовка вакцинных штаммов с помощью классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах.

Подготовку вакцинных штаммов для ЖГВ методом классической реассортации в РКЭ осуществляли согласно методикам, описанным ранее [1]. В качестве селективных факторов использовали инкубацию зараженных вирусной смесью РКЭ при пониженной до 26°C температуре и крысиную гипериммунную сыворотку против ХА донора аттенуации. После двукратного клонирования смеси в РКЭ методом предельных разведений отбирали клоны, которые далее анализировали в РТГА с гипериммунными крысиними сыворотками к эпидемическому вирусу и донору аттенуации. Реассортанты, унаследовавшие антигенные свойства эпидемического родителя, подвергались анализу состава генома методом частичного секвенирования вирусных генов с использованием специально разработанных универсальных пар праймеров [322].

2.2.2 Методы обратной генетики для конструирования генно-инженерных вирусов гриппа.

Клонирование вирусных генов в векторы для обратной генетики. Вирусную РНК выделяли с помощью набора реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, США). ДНК-копии вирусных генов получали методом ОТ-ПЦР, используя набор универсальных праймеров, специфичных каждому сегменту вируса гриппа А [207]. Амплифицированные кДНК далее клонировали в векторы для обратной генетики, используя специфические эндонуклеазы (SapI или BsmBI) [149, 206, 461]. Нуклеотидные последовательности всех генов верифицировали с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США) и набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1. При необходимости проводили целенаправленный точечный мутагенез с использованием набора QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, США) согласно инструкциям производителя.

Генно-инженерные вирусы гриппа получали двумя способами: при помощи липидной трансфекции или электропорации.

Липидная трансфекция. Смесь из восьми плазмидных ДНК, кодирующих все гены заданного вируса, трансфецировали ко-культуру клеток НЕК293Т/MDCK, используя реагент TransIT LT-1 (Mirus, США), согласно инструкциям производителя. Для холодоадаптированных вирусов трансфецированные клетки инкубировались при 33°C, а для вирулентных штаммов – при 37°C. Через 4 дня после трансфекции клетки вместе с супернатантами собирали в криопробирки и, в зависимости от задач, использовали их для заражения культуры клеток MDCK или РКЭ. Накопленные вирусы очищали низкоскоростным центрифугированием и хранили в аликвотах при -70 – -80°C.

Электропорация. С помощью данного метода осуществляли сборку жизнеспособных вирусов в культуре клеток Vero. Культуру клеток и набор из 8 плазмид, несущих все заданные гены желаемого вируса гриппа, готовили по методике, описанной в [235]. Трансфекцию проводили с использованием электропоратора Neon® (Invitrogen, США) и прилагающегося к нему набора Neon® Kit 100 мкл, в режиме двух импульсов по 1150 вольт в течение 20 мс каждый. Трансфецированные клетки инкубировали в 6-луночных планшетах Nunclon в 3,0 мл среды OptiPro с GlutaMAX при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 часов, после чего клетки промывали DPBS и добавляли 3 мл среды OptiPro с GlutaMAX и антибиотиком-антимикотиком и 4 мкг/мл трипсина. Температура инкубации далее зависела от задач исследования и составляла 33°C или 37°C. На 3 сутки после трансфекции клетки ресуспендировали в культуральной среде и использовали для заражения РКЭ.

2.2.3 Методы оценки биологических свойств вирусов гриппа в опытах *in vitro*.

Оценка фенотипических свойств вирусов гриппа. Сравнительное изучение ростовых характеристик исследуемых вирусов проводили в двух системах: развивающихся куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK. 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 39°C. Длительность инкубации вирусов составляла 48 часов для температур 33°C-39°C и 6 суток – для 26°C. Титры вирусов рассчитывали по методу Рида и Мэнча и выражали в IgЭИД₅₀/мл. Вирус считали температурочувствительным (т.е. обладающим *ts* фенотипом), если разница в титрах при оптимальной и повышенной температурах была не ниже 5,0 IgЭИД₅₀. Вирус считали холодадаптированным (т.е. обладающим *ca* фенотипом), если инфекционный титр при 26°C был ниже такового при оптимальной температуре 33°C не более, чем на 3,0 IgЭИД₅₀ [264].

Оценку кинетики репродукции вирусов при оптимальной температуре проводили в культуре клеток MDCK, используя заражающие дозы 0,01 и 0,001 MOI. Для этого сначала определялись титры вирусных стоков путем их титрования в 96-луночных планшетах, покрытых монослоем клеток MDCK. Титры вирусов также рассчитывали по методу Рида и Мэнча и выражали в IgТЦИД₅₀/мл. Для изучения кинетики репродукции вирусов 6-луночные планшеты, покрытые монослоем клеток MDCK, заражали соответствующими дозами вирусов в трех повторах и инкубировали при 33°C в атмосфере 5% CO₂. Пробы культуральной жидкости отбирали каждые 12 часов в течение 3-4 суток и хранили при -70°C до их титрования в клетках MDCK по вышеописанному методу.

Ts фенотип вирусов также оценивали методом бляшкообразования в культуре клеток MDCK. Зараженные различными разведениями клетки инкубировали под твердой

поддерживающей средой (среда MEM с 0,8%-ой агарозой и ТРСК трипсином в конечной концентрации 1 мкг) при 33, 37 или 38°C. Визуализацию бляшек осуществляли при помощи раствора кристаллического фиолетового (0,05% раствор в формалине). Видимые бляшки подсчитывали и титр вируса выражали в IgБОЕ/мл. Вирусы считали температурочувствительными при ≥ 100 -кратном снижении титра вируса при повышенной температуре инкубации, по сравнению с оптимальной температурой 33°C.

Генетический анализ вирусов гриппа. Для определения последовательности генома вирусов использовали автоматический капиллярный секвенатор ABIPrism 3130xl (Applied Biosystems), с набором реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1. Для выделения РНК использовали либо набор QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, США), либо набор MagJET™ Viral DNA and RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Для получения кДНК и амплификации фрагментов использовали набор реагентов SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, США). Выделение амплифицированного материала из агарозного геля и очистка осуществлялись с помощью набора реагентов KR-011 («Омникс», Санкт-Петербург).

Оценку чувствительности вирусов гриппа к препаратам адамантанового ряда проводили путем параллельного титрования вируса в 96-луночных планшетах, покрытых монослоем клеток MDCK без препарата, и в присутствии ремантадина. Заражение монослоя клеток MDCK проводили по вышеописанной схеме, при этом в один из планшетов в поддерживающую среду добавляли раствор ремантадина в конечной концентрации 10 мкг/мл. О чувствительности вируса к ремантадину судили по снижению титра вируса при добавлении в среду препарата.

Рецепторную специфичность вирусов гриппа оценивали в РГА с различными видами эритроцитов: (1) лошадиными эритроцитами, которые, как известно, содержат только $\alpha 2,3$ -связанные остатки сиаловых кислот [466]; (2) куриными эритроцитами, содержащими как $\alpha 2,6$ -, так и $\alpha 2,3$ -связанные сиаловые остатки; (3) куриными эритроцитами, обработанными экзосиалидазой, специфично удаляющей с поверхности эритроцитов $\alpha 2,3$ -связанные остатки сиаловых кислот [466].

2.2.4 Методы работы с лабораторными животными.

Исследования выполнялись на мышах линий BALB/c, CBA и C57BL/6J, на хорьках и на курах. До начала эксперимента животные содержались на стандартном пищевом рационе в условиях вивария не менее двух недель. Все животные имели свободный доступ к пище и воде. В ходе экспериментов животные подвергались легкой анестезии, не угрожающей жизни животных. Проводимые манипуляции не были сопряжены с болевыми ощущениями, а все эксперименты проводились с одобрения соответствующих локальных этических комитетов тех

организаций, на базе которых проводились экспериментальные процедуры. Работа с высокопатогенными вирусами гриппа проводилась в специализированных лабораториях с уровнем биобезопасности ABL3-3.

Мыши

Для оценки репродукции вирусов гриппа в респираторном тракте и системных органах (селезенка, мозг) мышей животным под легким наркозом (посредством эфира или изофлюрана) вводили интраназально необходимую дозу вируса в объеме 50 мкл. Органы забирали на 3 или 6 сутки после заражения и хранили при -70°C . Гомогенаты тканей готовили с использованием гомогенизатора TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) в 1 мл стерильного PBS, содержащего антибиотик-антимикотик (Invitrogen, Великобритания), после чего осветленную низкоскоростным центрифугированием (6000 об/мин, 2 мин) надосадочную жидкость использовали для определения титра вируса методом предельных разведений в РКЭ или методом бляшек в культуре MDCK описанным выше способом.

Для оценки иммуногенности вакцин мышей иммунизировали двукратно или трехкратно по вышеописанной схеме, с интервалом 21-28 суток. Через 3-4 недели после последней иммунизации собирали образцы сывороток крови мышей, а также бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), и оценивали уровни вирус-специфических антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) или иммуноферментном анализе (ИФА) по методикам, описанным ниже. Для оценки защитной эффективности вакцин иммунизированных мышей, а также животных групп плацебо, заражали интраназально патогенным вирусом гриппа в объеме 50 мкл и титры вируса в различных органах определяли по вышеописанной схеме. Защитный эффект оценивался по снижению титров вирусов в легких мышей вакцинных групп по сравнению с группой плацебо.

Для экспериментов по пассивной иммунизации сыворотки иммунизированных мышей вводились наивным животным внутривенно через ретро-орбитальную инъекцию в объеме 100 мкл, по методике, описанной в [544]. Через 6 часов после пассивного переноса мышей заражали интраназально вирулентными вирусами в разных дозировках и оценивали титры вирусов в легких на 3 и/или 6 сутки после заражения по вышеописанным методикам.

Хорьки

Эксперименты на хорьках проводились совместно со следующими научными центрами: The Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Билтховен, Голландия), CDC (Атланта, США), The WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (VIDRL, Мельбурн, Австралия) и ООО «Институт доклинических исследований» (Россия). Все протоколы исследований и экспериментальные процедуры были одобрены соответствующими локальными этическими комитетами указанных центров. При изучении

защитного эффекта вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных потенциально пандемических вирусов гриппа все экспериментальные процедуры проводились в лаборатории уровня безопасности BSL-3.

Взрослых аутбредных хорьков обоих полов получали из специализированных племрепродукторов или из независимых фермерских хозяйств. Хорьков отбирали на основании отрицательного теста на предыдущие инфекции вирусами гриппа, а также алеутскую болезнь норок. Животных ежедневно проверяли на общее состояние, а экспериментальную работу с хорьками проводили с использованием легкого анестетика, вводимого внутримышечно (кетамин 5 мг/кг и медетомидин гидрохлорид 0,1 мг/кг смеси либо «Золетил 100»). Для измерения температуры тела животных использовали один из двух способов: (1) чипирование (вживление чипа с температурным транспондером), или (2) имплантация в перитонеальную полость животного температурного логгера (DST micro T, Star-Oddi, Исландия) за 14 дней до иммунизации. При использовании чипа температуру измеряли ежедневно; температурные логгеры регистрировали показатели температуры тела каждые 30 минут. Вес экспериментальных животных измеряли ежедневно. Для каждого эксперимента группы формировали с равномерным распределением животных по полу и весу.

Иммунизацию хорьков вакцинными штаммами проводили путем интраназального введения вирусосодержащей жидкости в объеме 0,5 мл (доза вируса указана в соответствующих главах результатов исследований) либо однократно, либо двукратно с интервалом 14-28 суток. Контрольные животные получали препарат плацебо (PBS). Назальные смывы и/или мазки из зева иммунизированных хорьков забирали на 1-6 сутки в 1 мл PBS (с антибиотиком-антимикотиком, Gibco) и хранили при -70°C до определения титра вируса методом предельных разведений либо в РКЭ, либо в культуре клеток MDCK. В отдельных экспериментах проводили количественное определение вирусной РНК (vRNA) в смывах ВДП методом real-time RT-PCR с использованием SensiFAST™ Probe Lo-ROX One-Step Kit (Bioline, Германия) в соответствии с протоколом производителя и набором праймеров CDC influenza virus real-time RT-PCR influenza A(H1/N3/N1pdm09) subtyping panel (RUO) (LOT: 12-0134).

Образцы сывороток крови хорьков собирали до начала эксперимента, а также в различные временные интервалы после иммунизации, и хранили при -20°C до проведения серологических исследований (п. 2.2.5.). Через 3-4 недели после иммунизации хорьков заражали вирулентным вирусом гриппа (челлендж), используя интраназальный или интратрахеальный способ введения. После челленджа проводили мониторинг клинических симптомов заболевания, веса, температуры тела, а также забирали назальные смывы или мазки из зева для определения уровня репликации челлендж-вируса в верхних дыхательных путях. Часть животных забивали на 3-5 сутки после заражения путем обескровливания для

определения титра челлендж-вируса в тканях ВДП и легких, а также для проведения гистопатологических исследований.

С целью оценки патологических изменений гистологическому анализу подвергали носовые ходы, трахею и легкие (одна доля) экспериментальных животных. Материал для гистологического исследования фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, после чего по общепринятой методике заливали в парафин. Готовые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили светооптическим микроскопом Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) при увеличении 50, 100, 200 и 400. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры AxioCam Icc 1 и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8 (Германия). Морфометрические измерения проводили вручную с помощью программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8 (Германия). Оценку патологических изменений в дыхательной системе на фоне инфекционного заболевания проводили по трем главным категориям: эпителиальные повреждения, воспаление и альвеолярные повреждения. По гистопатологическим параметрам проводили полуколичественную оценку в баллах: 0 (отсутствует), 1 (минимальные); 2 (незначительные); 3 (умеренные); 4 (сильные) и 5 (серьезные) [528].

Куры

Оценку патогенности вакцинных штаммов, подготовленных из высокопатогенных вирусов гриппа H5N1, проводили совместно с Департаментом сельского хозяйства США (Афины, Джорджия) с использованием цыплят породы Белый леггорн SPF (Specific pathogen free). Для оценки индекса патогенности группам 4-х-недельных цыплят вводили внутривенно тестируемые вирусы в объеме 0,2 мл (разведение вирусного стока 1:10) и наблюдали за животными в течение 14 суток. Индекс патогенности 3,0 указывал на гибель всех птиц в течение 24 часов после введения вируса, тогда как индекс 0,0 обозначал отсутствие у птиц каких-либо клинических признаков заболевания в течение всего периода наблюдения.

Чтобы определить, могут ли вакцинные вирусы в значительных количествах попадать в окружающую среду через инфицированных птиц, 4-недельным цыплятам (n=8) вводили интраназально вирус в дозе 10^6 ЭИД₅₀ в объеме 0,1 мл, а мазки из клоаки и трахеи собирали через 3 дня после заражения или в день смерти. Дополнительно группы птиц инфицировали таким же образом, чтобы определить уровень репликации вируса во внутренних органах на 3 сутки после заражения. Титры вирусов в мазках и гомогенатах тканей определяли титрованием в РКЭ или культуре клеток MDCK.

2.2.5 Методы оценки иммунного ответа на живую гриппозную вакцину.

В работе оценивали следующие параметры иммунного ответа у привитых животных:

- системный гуморальный иммунный ответ в сыворотках крови животных, выявляемый в реакции торможения гемагглютинации (антигемагглютинирующие антитела), иммуноферментном анализе (сывороточные IgG и IgA антитела), реакции микронейтрализации (нейтрализующие антитела), а также в реакции ингибирования нейраминидазной активности (антинейраминидазные антитела);
- локальный (секреторный, мукозальный) ответ в назальных смывах и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ), выявляемый в ИФА (секреторные IgA антитела);
- Т-клеточный иммунный ответ, выявляемый в двух тестах: метод проточной цитометрии (уровни вирус/эпитоп-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток) и метод ЦТЛ *in vivo* (цитотоксическая активности Т-лимфоцитов в живом организме).

2.2.5.1. Системный гуморальный иммунный ответ

Уровни антигемагглютинирующих антител выявляли в РТГА по общепринятой методике, используя 4 агглютинирующие единицы вирусного антигена и различные виды эритроцитов (кур, человека, лошади, индюшки). Сыворотки перед РТГА предварительно обрабатывали рецептор-разрушающим ферментом RDE (Denka Seiken, Япония) или куриными эритроцитами для удаления неспецифических ингибиторов [457, 513].

Уровни IgA и IgG антител в сыворотках крови животных выявляли в иммуноферментном анализе. Для этого 96-луночные планшеты высокой сорбции (Microlon, Greiner bio-one, Германия) покрывали антигеном в объеме 100 мкл при 4°C в течение ночи. В качестве антигенов использовали цельные вирусы гриппа, очищенные на градиенте сахарозы, в количестве 16 гемагглютинирующих единиц, а также рекомбинантные белковые молекулы гемагглютинина в концентрации 2 мкг/мл. В качестве вторичных антител использовали козьи анти-IgA или анти-IgG антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США). В качестве субстрата для проявки использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ, Thermo, США); оптическую плотность образцов определяли при длине волны 450 нм (OD₄₅₀) с помощью планшетного ридера (ELx800, Bio-Tek Instruments Inc, США). Титры антител определяли как последнее разведение сыворотки, при котором значение OD₄₅₀ как минимум в два раза превышала среднее значение OD₄₅₀ для контрольных лунок (все компоненты ИФА, за исключением добавления сыворотки).

Уровни нейтрализующих антител оценивали по методике, описанной в руководстве [514]. Сыворотки иммунизированных животных инактивировали при 56°C в течение 30 минут и готовили в 96-луночных планшетах двукратные разведения на среде MEM (Gibco, США), содержащей 2 мкг/мл ТРСК трипсина (Sigma, США). Далее в каждую лунку вносили одинаковый объем вируса в дозе 100 ТЦИД₅₀. Лунки, содержащие только среду, а также лунки,

содержащие среду и вирус, служили отрицательным и положительным контролем, соответственно. Полученной смесью заражали монослой клеток MDCK, инкубировали при 33-37°C либо в течение 4-5 суток, до наступления цитопатического эффекта в контрольных лунках, либо в течение 48 часов, после чего выявляли наличие вируса в лунках планшета методом ИФА, для чего использовали моноклональные антитела к нуклеопротеину вируса гриппа А, конъюгированного с пероксидазой хрена (ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ).

Титр нейтрализующих антител определялся как максимальное разведение сыворотки, при котором значение OD₄₅₀ было меньше, чем пороговое значение OD₄₅₀ (cut-off value, CV), вычисляемое по формуле:

$$CV = \left[\frac{VWD \text{ OD}_{450} - CC \text{ OD}_{450}}{2} \right] + OD_{450}CC$$

где VWD OD₄₅₀ - среднее значение оптической плотности в контрольных лунках, содержащих рабочее разведение вируса (virus working dilution),

CC OD₄₅₀ - среднее значение оптической плотности в контрольных лунках, без добавления вируса (cell culture).

Уровни антинейраминидазных антител оценивали при помощи твердофазной реакции ингибирования нейраминидазной активности (РИНА) по методу [281]. Вкратце, 96-луночные планшеты покрывали в течение ночи 150 мкл фетуина в концентрации 50 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Двукратные разведения диагностических штаммов, очищенных на градиенте сахарозы, готовили на PBS с 1% BSA и добавляли в лунки подготовленного планшета в объеме 100 мкл в диапазоне от 8 до 512 АЕ. В качестве положительного контроля один ряд содержал лунки с RDE, разведенным 1:10 на PBS-BSA. После часовой инкубации при 37°C лунки отмывали и добавляли 100 мкл лектина арахиса, конъюгированного с пероксидазой (2.5 мкг/мл; Sigma-Aldrich, США), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Проявку осуществляли при помощи субстрата ТМВ по описанной ранее схеме. Для дальнейших тестов выбирали дозу антигена, для которой значение OD₄₅₀ составляло 1. Для определения титра анти-NA антител готовили двукратные разведения сывороток животных и инкубировали с выбранной дозой диагностического штамма в течение 1 часа при 37°C. Далее смесь переносилась на планшеты, покрытые фетуином, и обрабатывалась по приведенному выше способу. За титр антинейраминидазных антител принималось последнее разведение сыворотки, дающее 50%-ное ингибирование активности NA.

2.2.5.2. Локальный (секреторный) иммунный ответ

Уровни секреторных IgA антител в смывах верхних и нижних дыхательных путей иммунизированных животных выявляли в ИФА по описанной в п. 2.2.5.1 схеме, при этом разведение образцов начинали с 1:2.

2.2.5.3. Т-клеточный иммунный ответ

Оценка уровней вирус/эпитоп-специфичных CD8+ Т клеток методом ICS.

Спленоциты иммунизированных мышей выделяли в указанные в результатах сроки. Ткани селезенок гомогенизировали с помощью клеточного сита Cell Strainer 70um (BD). Для оценки вирус-специфичных Т клеток в образцы добавляли очищенный на градиенте сахарозы вирус в дозе 1 MOI. Для оценки эпитоп-специфичных Т клеток добавляли указанные в результатах пептиды в концентрации 1 uM. Уровни вирус/эпитоп-специфичных CD8+ Т клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием набора для внутриклеточного окрашивания BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) со следующими реагентами: Live/Dead Fixable FarRed (Invitrogen), CD8-PerCP5.5, CD3-APC-Cy7 и IFN-gamma-PE (BD Biosciences) антителами [217, 399]. Проточная цитометрия выполнялась на приборе BC Navios (Beckman Coulter).

Оценку цитотоксической активности ЦТЛ in vivo проводили по описанному ранее методу [134] с небольшими модификациями. В качестве клеток мишеней были использованы спленоциты наивных мышей линии C57BL/6J. Клетки мишени нагружали 0,5 MOI вируса или 1 uM раствором пептида. В качестве клеток-мишеней сравнения (контроль спонтанного лизиса) использовали спленоциты, обработанные аллантойсной жидкостью интактных куриных эмбрионов или растворителем для пептидов. Образцы клеток-мишеней окрашивали различными концентрациями CFSE (Sigma) с шагом разведения 20, 2 и 0,2 uM. Клетки-мишени смешивали в эквивалентном количестве с конечной концентрацией $1,5 \times 10^7$ клеток/мл. Смесь клеток инъецировали опытным мышам через ретро-орбитальный синус. На следующий день животных забивали, выделяли спленоциты и оценивали количество CFSE-меченых клеток-мишеней методом проточной цитометрии. Соотношением количества нагруженных антигеном и контрольных клеток-мишеней характеризовали специфическую цитотоксичность к искомым антигенам [217].

2.2.6 Методы биоинформатики для анализа Т-клеточных эпитопов в составе вирусных белков.

Отбор последовательностей актуальных штаммов вируса гриппа А проводили с помощью базы данных NCBI Influenza Virus Sequence Database [58]. Предсказание последовательности ЦТЛ-эпитопов нуклеопротеина донора аттенуации Лен/17 проводили в

базе данных иммунноэпитопов IEDB (Immune Epitope Database) [499] с помощью алгоритмов netCTL major histocompatibility complex I (MHC I) peptide binding [286]. Для оценки протеосомного кливдежа NP был использован алгоритм IEDB netChop [359]. Параметры вклада С-концевого протеолиза, эффективности транспорта ТАР (Transporter associated with antigen processing), порога отбора эпитопов были установлены по умолчанию, соответственно 0,15, 0,05 и 0,75. Иммуногенность предсказанных ЦТЛ-эпитопов оценивалась с помощью алгоритма T cell class I peptide MHC (pMHC) immunogenicity predictor [93]; предполагалось, что пептиды с уровнем иммуногенности выше нуля являются иммуногенными. Анализ консервации эпитопов проводили с помощью алгоритма epitope Conservancy Analysis в режиме оценки линейных эпитопов с порогом идентичности последовательности 100% [90]. Для экспериментов на мышах аффинность связывания ЦТЛ-эпитопа и МНС комплекса предсказывалась с помощью алгоритма netMHCpan [209].

Для **анализа экспериментально-установленных Т клеточных эпитопов** нуклеопротеина вируса гриппа также использовали базу данных IEDB. Экспериментальные эпитопы были отобраны по следующим ключам из IEDB: Organism: Influenza A virus (ID:11320, influenza A) AND Antigen: Nucleoprotein [P03466] (Nucleoprotein Influenza A virus) AND MHC Restriction Type: Class I AND Host: Homo sapiens (human). В анализ отбирались эпитопы, суммарное число независимых экспериментальных подтверждений которых за вычетом отрицательных тестов составляло один и более. Карта эпитопов нуклеопротеина строилась в Geneious 6.0 software (Biomatters Ltd).

2.2.7 Оценка кросс-реактивности Т-клеток человека к различным эпитопам нуклеопротеина *in vitro*.

2.2.7.1. Экспансия человеческих вирус-специфичных Т клеток *in vitro*

Мононуклеары периферической крови доноров выращивали в полной среде RPMI-1640 с 10% сывороткой эмбрионов коров. $3-5 \times 10^6$ клеток/мл высевали в 24-луночных планшетах. 5×10^5 МПК заражали разными штаммами ЖГВ при множественности инфекции 10 в течение 1 часа при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Зараженные клетки отмывали в полной среде RPMI-1640 и добавляли в планшеты в соотношении 1 к 9. Культуры МПК поддерживались в течение 10 дней с частичным обновлением среды и добавлением 10 Ед/мл человеческого рекомбинантного IL-2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) каждые три дня. Полученные клетки были собраны и соотношение общего числа клеток к посевному количеству было выражено в виде процента восстановления клеток - для оценки эффективности экспансии МПК.

2.2.7.2. Перекрестная реактивность эпитоп-специфичных Т клеток

Перекрестная реактивность эпитоп-специфичных Т клеток, индуцируемых различными вакцинными штаммами ЖГВ, против вариантных пептидов нуклеопротеинов донора аттенуации Лен/17 и современного эпидемического вируса Н3N2 была оценена с помощью ICS-теста. C1R.A*01:01 и C1R.B*35:01 трансфицированные C1R клеточные линии [554] были любезно предоставлены Dr. Nicole Mifsud (Monash University, Clayton, Victoria, Австралия). Эти клетки были использованы для стимуляции эпитоп-специфичных Т клеток. C1R клетки поддерживали в полной среде RPMI-1640 с добавлением 0.3 мг/мл Гигромицин В (Gibco, США) для C1R.A*01:01 и 0.5 мг/мл Geneticin (G418, Gibco) для C1R.B*35:01 трансформированных клеток. C1R клетки были инфицированы 10 MOI 5:3 или 6:2 вариантом ЖГВ при 35°C в течении 1 часа в полной среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и дополнительно 16 часов после смены среды на полную среду RPMI-1640 с 10% FBS. Для контроля эффективности заражения клеток использовали внутриклеточное окрашивание согласно протоколу производителя набора BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) с помощью анти-NP-FITC антител (GeneTex, Irvine, США). Для проверки эпитопной кросс-реактивности Т клеток, C1R были нагружены 10 мкМ каждого из исследуемых пептидов в течении часа при 37°C. Десятидневные культуры МПК смешивали с нагруженными вирусами или пептидами C1R клетками в соотношении 2:1 и инкубировали в течение 6 часов в полной среде RPMI-1640 в присутствии GolgiPlug (BD Biosciences) при 37°C. Далее образцы были обработаны согласно протоколу производителя набора для внутриклеточного окрашивания BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) со следующими реагентами: Live/Dead Fixable Aqua blue stain (Invitrogen), CD4-PE, CD8-PerCP5.5, CD3-PC7, CD14-APC-H7, CD19-APC-H7, IFN-gamma-V450 (BD Biosciences) и NP-FITC антителами. Проточная цитометрия выполнена на приборе BD FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). Для определения вирус-специфичных Т клеток был оценен процент IFN γ ⁺ TNF α ⁺ CD8⁺ Т клеток.

2.2.8 Клинические испытания живых гриппозных вакцин на добровольцах.

В настоящем исследовании оценивалась безвредность и иммуногенность живых гриппозных вакцин против двух потенциально пандемических вирусов гриппа: ЖГВ H2N2 из штамма А/17/Калифорния/66/395 и ЖГВ H7N9 из штамма А/17/Ануи/2013/61. Исследования проводились на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ и были одобрены Министерством здравоохранения РФ, локальным этическим комитетом НИИ гриппа, Institutional Review Board (IEC/IRB) и этическим комитетом ВОЗ. Исследования на добровольцах проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и были зарегистрированы на ресурсе

<http://www.clinicaltrials.gov/> под идентификаторами NCT01982331 (ЖГВ H2N2) и NCT02480101 (ЖГВ H7N9).

Дизайн исследования

Дизайн исследования, критерии включения/исключения добровольцев подробно изложены в публикациях [416, 418]. В каждом исследовании участвовали 38-40 здоровых добровольцев (мужчин и женщин) в возрасте от 18 до 49 лет, рандомизированных в соотношении 3:1 для включения в группу вакцины или группу плацебо. В исследовании был использован двойной слепой метод маскировки, то есть субъекты исследования, исследователи и спонсор не знали, в какую группу (вакцины или плацебо) был распределен каждый субъект, до тех пор, пока база данных клинического исследования не была объявлена законченной и закрытой. В День 0 тридцать добровольцев получали интраназально по 0,5 мл ЖГВ, и 10 добровольцев получали интраназально по 0,5 мл плацебо. В День 28 добровольцы получали вторую дозу вакцины или плацебо. Все добровольцы находились в изоляции в клинике НИИ гриппа в течение 6 суток после каждой дозы вакцины или плацебо, при этом лица групп ЖГВ и плацебо содержались совместно для оценки трансмиссивности исследуемых вакцин.

Оценка безвредности ЖГВ на добровольцах

В качестве показателя профиля безопасности вакцины была определена доля лиц, у которых было зарегистрировано развитие нежелательных явлений (НЯ) четырех нижеследующих категорий:

- Нежелательные явления немедленного типа, возникающие в течение двух часов после введения какой-либо дозы вакцины и выявленные как медицинским персоналом, так и по информации, сообщенной добровольцем персоналу исследования.
- Поствакцинальные реакции (предвиденные клинические проявления местного и системного характера), как правило, возникающие вследствие интраназальной вакцинации и возникающие в период через два часа и последующих 6 дней после введения какой-либо дозы исследуемой вакцины или плацебо и выявленные как медицинским персоналом, так и по информации, сообщенной добровольцем персоналу исследования.
- Другие нежелательные явления (включая непредвиденные клинические проявления), возникающие в течение 6 дней после введения какой-либо дозы исследуемой вакцины или плацебо и выявленные как медицинским персоналом, так и по информации, сообщенной добровольцем персоналу исследования. При этом также учитывают патологические изменения данных лабораторного анализа образцов крови и мочи, собранных на 3-й, 6-й и 34-й день исследования.

- Все серьезные нежелательные явления (СНЯ), возникающие в период до 4-х недель после введения какой-либо дозы препарата и выявленные как медицинским персоналом, так и по информации, сообщенной добровольцем персоналу исследования или зарегистрированной вакцинируемым в Дневнике самонаблюдения. При этом также учитывают патологические изменения данных лабораторного анализа образцов крови и мочи, собранных на 28-й (перед вакцинацией) и 56-й дни исследования.

Оценка иммуногенности ЖГВ на добровольцах

Оценка иммунного ответа осуществлялась по доле лиц, у которых после введения какой-либо дозы исследуемого препарата был выявлен не менее чем четырехкратный прирост титров антител по сравнению с базовыми показателями, или по уровню среднего геометрического титра после каждой вакцинации, определяемых согласно нижеследующим показателям:

- Содержание сывороточных антител к вирусу гриппа по данным РТГА;
- Содержание сывороточных нейтрализующих антител по данным РМН;
- Содержание сывороточных IgA или IgG антител по данным ИФА;
- Содержание секреторных IgA антител в образцах носовых секретов по данным ИФА;
- Содержание секреторных IgA антител в образцах слюны по данным ИФА.
- Содержание вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в мононуклеарах периферической крови с использованием метода проточной цитометрии.

РТГА проводили по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ [513]. Образцы сывороток крови перед РТГА обрабатывали RDE. В качестве антигена использовали 4 АЕ вакцинного вируса, использованного для иммунизации. Сероконверсией считали прирост титра антител в 4 и более раза после иммунизации, по сравнению с исходным уровнем антител до вакцинации [513]. Реакцию микронейтрализации проводили с использованием культуры клеток MDCK по методике, описанной в [413]. За титр нейтрализующих антител принимали обратную величину максимального разведения сыворотки, приводящую к 50%-ному ингибированию цитопатического эффекта, вызываемого вакцинным вирусом в культуре клеток.

Вирус-специфические IgG и IgA антитела в сыворотках крови и секретах ВДП привитых выявляли в ИФА по методике, описанной в п. 2.2.5.1. и [418], используя 16 АЕ очищенного на градиенте сахарозы вакцинного вируса в качестве антигена. Начальное разведение для сывороток составляло 1:10, для секретов ВДП – 1:2. За сероконверсию также принимали ≥ 4 -кратный прирост титра антител после иммунизации, по сравнению с исходным уровнем антител до вакцинации.

Определение вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии как описано в [418].

Оценка приживляемости ЖГВ на добровольцах

Оценка вирусовыделения осуществлялась по доле лиц, у которых по данным детекции вируса методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, а также методом культивирования в РКЭ в образцах мазков из полости носа и/или зева был обнаружен вирус гриппа. Выделение РНК из образцов проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, Москва). Далее на первом этапе проводили ПЦР в режиме реального времени с помощью набора SuperScript III Platinum One-step qRT-PCR System (Invitrogen) и праймеров и зондов для выявления РНК вируса гриппа А (CDC, Атланта, США). На втором этапе все образцы подвергали реакции обратной транскрипции с помощью комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L» с последующей ПЦР с использованием «Набора реагентов для амплификации кДНК вируса гриппа А (Influenza virus A) и идентификации субтипов H5, H7 и H9 Influenza virus A в биологическом материале с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (ИнтерЛабСервис, Москва).

Для выделения вакцинных изолятов в РКЭ эмбрионы заражали образцами назальных смывов или мазков и инкубировали при 32°C в течение 72 часов. Соответствие изолированных вирусов вакцинному штамму, а также наличие всех аттенуирующих мутаций в генах внутренних белков вирусов определяли методом частичного секвенирования генов [322].

2.2.9 Методы статистического анализа результатов исследований

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6 и GraphPad Prizm 5. Для сравнения данных использовали следующие тесты:

- Mann-Whitney U-test: для сравнения различных количественных показателей между двумя независимыми группами (титры вирусов, уровни антител, пропорции вирус-специфических Т-клеток и др.);
- Wilcoxon Matched Pairs Test: для сравнения среднегеометрических титров антител до и после вакцинации внутри одной группы привитых;
- Fisher exact (two-tailed) – для сравнения пропорции лиц, ответивших на вакцинацию, между двумя независимыми группами (группа вакцины против группы плацебо);
- ANOVA (two way) – для множественных сравнений количественных показателей иммунного ответа среди нескольких исследуемых групп;
- Версия Wilcoxon-Mann-Whitney test, адаптированная для анализа данных с небольшим размером выборки: для сравнения патоморфологических изменений между тестируемыми группами вакцин на модели хорьков.

Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОГО ДОНОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ РЕАССОРТАНТНЫХ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ДЛЯ ЖИВОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Как отмечалось выше, целесообразно наличие единого, универсального донорского штамма, подходящего для создания реассортантных штаммов и для живых, и для инактивированных гриппозных вакцин, поскольку при возникновении чрезвычайной ситуации (например, при наступлении пандемии) можно будет один вакцинный штамм использовать как на производстве ЖГВ, так и на производстве ИГВ.

3.1 Подготовка и характеристика альтернативного донора аттенуации и высокой репродуктивности для живых и инактивированных гриппозных вакцин.

Наиболее подходящим кандидатом для использования в качестве нового донора аттенуации и высокой репродуктивности является холодоадаптированный вирус A/PR/8/59/1 (H1N1) [59/1], разработанный ранее в Отделе вирусологии им. А.А.Смородинцева [137]. Поскольку в качестве основы для подготовки донора 59/1 использовался высокоурожайный вирус A/PR/8/34, холодоадаптированный штамм также характеризовался высокой репродуктивной активностью в РКЭ. На основе этого донора ранее был подготовлен ряд экспериментальных вакцинных штаммов ЖГВ, и их безвредность была подтверждена в клинических наблюдениях [2]. Однако основным препятствием для массового использования данного штамма в качестве донора аттенуации для ЖГВ является его устойчивость к химиопрепаратам адамантанового ряда (ремантадин, амантадин), поскольку именно ремантадин является наиболее легкодоступным средством для лечения гриппозной инфекции. Поэтому необходимо было подготовить модифицированный донор на основе вируса 59/1, обладающий чувствительностью к адамантанам.

Поскольку для целенаправленного изменения свойств вируса необходимо использование современных генно-инженерных методов, при создании нового донора аттенуации была использована обратная-генетическая система, разработанная ранее для эпидемического вируса A/PR/8/34 (H1N1) [PR8 wt] [149]. При помощи целенаправленного точечного мутагенеза были модифицированы шесть генов, кодирующие внутренние и неструктурные белки вируса PR8 wt таким образом, чтобы консенсусная аминокислотная последовательность этих генов полностью соответствовала сиквенсу донора аттенуации 59/1. Все мутированные аминокислотные позиции обозначены в таблице 5. Следует отметить, что в настоящее время существует несколько вариаций штамма PR8 wt, значительно отличающихся между собой по сиквенсу [337]. Приведенные в таблице 5 многочисленные аминокислотные различия между вирусами говорят о том, что клонированный в плазмиды вирус PR8 wt принадлежал другому источнику, нежели «дикий» вирус PR8, использованный в 1980-е гг. для получения ХА донора аттенуации 59/1.

Таблица 5. Аминокислотные отличия во внутренних генах вируса А/PR8/34 (H1N1) и его производных

Ген	Нуклеотидные отличия						Белок	Аминокислотные отличия						
	Нукл.	База данных		PR8-са 59/1	PR8wt плаз- миды	59/M2		а.к.	База данных		PR8- са 59/1	PR8wt плаз- миды	59/M2	
		1*	2**						1*	2**				
PB2	342	ATG	ATA	ATA	ATG	ATA	PB2	105	Met	Ile	Ile	Met	Ile	
	779	AAG	AGG	AGG	AAG	AGG		251	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	
	923	AAG	AGG	AGG	AAG	AGG		299	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	
	1106	TAT	TAT	TAT	TCT	TAT		360	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	
	1537	GTC	ATC	ATC	GTC	ATC		504	Val	Ile	Ile	Val	Ile	
	1660	GTG	GTG	TTG	GTG	TTG		545	Val	Val	Leu	Val	Leu	
	1916	AGA	AGA	AAA	AGA	AAA		630	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	
	2132	AGG	AAG	AAG	AGG	AAG		702	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	
	196	AAC	AAC	GAC	AAC	GAC		58	Asn	Asn	Asp	Asn	Asp	
PB1	549	AAA	AAC	AAC	AAA	AAC	PB1	175	Lys	Asn	Asn	Lys	Asn	
	639	ATA	ATG	ATG	ATA	ATG		205	Ile	Met	Met	Ile	Met	
	647	AGG	AAG	AAG	AGG	AAG		208	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	
	670	AGT	AGT	AGT	GGT	AGT		216	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	
	1335	TGG	TGG	TGC	TGG	TGC		437	Trp	Trp	Cys	Trp	Cys	
	294	AAG	AAG	AGG	AAG	AGG		PB1-F2	59	Lys	Lys	Arg	Lys	Arg
	297	CAA	CAA	CGA	CAA	CGA			60	Gln	Gln	Arg	Gln	Arg
PA	65	GTC	GTC	GCC	GTC	GCC	PA	14	Val	Val	Ala	Val	Ala	
	497	AAG	AAG	AAG	AGG	AAG		158	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	
	1101	AAT	AAT	AAA	AAT	AAA		359	Asn	Asn	Lys	Asn	Lys	
	1672	CTA	ATA	ATA	CTA	ATA		550	Leu	Ile	Ile	Leu	Ile	
NP	98	GAA	GAA	GGA	GAA	GGA	NP	18	Glu	Glu	Gly	Glu	Gly	
	328	CCT	CCT	TCT	CCT	TCT		95	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	
	1102	GTC	CTC	CTC	GTC	CTC		353	Val	Leu	Leu	Val	Leu	
	1318	GTT	ATT	ATT	GTT	ATT		425	Val	Ile	Ile	Val	Ile	
	1334	ACT	AAT	AAT	ACT	AAT		430	Thr	Asn	Asn	Thr	Asn	

Таблица 5 (продолжение). Аминокислотные отличия во внутренних генах вируса A/PR8/34 (H1N1) и его производных

Ген	Нуклеотидные отличия						Белок	Аминокислотные отличия					
	Нукл.	База данных		PR8-са 59/1	PR8wt плаз- миды	59/M2		а.к.	База данных		PR8- са 59/1	PR8wt плаз- миды	59/M2
		1*	2**						1*	2**			
M	434	GCT	GCT	ACT	GCT	ACT	M1	137	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr
	476	TGT	TGT	AGT	TGT	AGT		151	Cys	Cys	Ser	Cys	Ser
	792	GCT	ACT	GCT	GCT	GTT	M2	27	Ala	Thr	Thr	Thr	Val
	805	AAT	AAT	AAT	AAT	AGT		31	Asn	Asn	Asn	Asn	Ser
NS	94	GCA	GCA	GCA	GTA	GCA	NS1	23	Ala	Ala	Ala	Val	Ala
	329	GAA	GAC	GAC	GAA	GAC		71	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp
	575	GAG	GAG	GGG	GAG	GGG	NS2	25	Glu	Glu	Gly	Glu	Gly
	763	GTA	ATA	ATA	GTA	ATA		88	Val	Ile	Ile	Val	Ile

* Номера доступа в базе данных: PB2 - GI: 60484; PB1 - GI: 324897; PA - GI: 60808; NP - GI: 324709, M – GI: 60788; NS – GI: 324833.

** Номера доступа в базе данных: PB2 - GI: 126599244; PB1 - GI: 126599244; PA - GI: 126599259; NP - GI: 126599284, M – GI: 126599292, NS – GI: 126599211

Желтым цветом в таблице 5 выделены мутации, которые появились в доноре аттенуации 59/1 в процессе его холодовой адаптации, и которые не встречаются ни в одном из вариантов вируса PR8 wt. В общей сложности в геном вируса PR8 wt была внесена 31 мутация: по восемь в PB2 и PB1 гены, 4 – в PA ген, 5 – в NP ген, 2 – в M ген и 4 – в NS ген.

Для получения адамантан-чувствительного варианта донора аттенуации был проведен дополнительный мутагенез M гена вируса 59/1. Известно, что устойчивость к химиопрепаратам адамантанового ряда обеспечивается за счет появления мутаций в M2 белке вируса гриппа, который является ионным каналом, и на блокировку которого направлено действие адамантанов [511]. Имеющийся донор аттенуации 59/1 содержал две мутации в M2 белке, которые делали его адамантан-устойчивым: Val-27-Thr и Ser-31-Asn. Соответственно, для получения адамантан-чувствительного варианта были заменены треонин на валин и аспарагин на серин в позициях 27 и 31 M2 белка, соответственно (Табл. 5). Далее, путем трансфекции клеток набором из восьми плазмид, шесть из которых содержали мутированные гены внутренних и неструктурных белков, а две плазмиды несли интактные HA и NA гены вируса PR8 wt, был получен модифицированный донор аттенуации, которому было присвоено название A/PR/8/59/M2 (59/M2).

3.2 Фенотипическая характеристика модифицированного донора аттенуации 59/M2

Изучение фенотипических характеристик нового донора аттенуации 59/M2 показало, что он по активности репродукции в РКЭ был идентичен исходному вирусу 59/1, проявляя чувствительность к повышенным до 38-39°C температурам инкубации (*ts*-фенотип), при этом активно размножаясь при пониженной до 26°C температуре (*ca*-фенотип) (Рис. 8). Для изучения вклада отдельных генов донора 59/M2 в проявлении его фенотипических свойств методами обратной генетики был сконструирован набор одногенных реассортантов, несущих один ген вируса 59/M2, а остальные семь генов – от штамма PR8 wt. Оценка репликативных свойств данных реассортантов в РКЭ при различных температурах инкубации показала, что наиболее существенный вклад как в *ts*, так и в *ca* фенотип вносит PB2 ген вируса 59/M2 (Рис. 8). Внесение PB2 гена в геном вируса PR8 wt существенно снижало титр вируса как при 39°C, так и при 38°C (на 4-5 lgЭИД₅₀), при этом титр вируса при 26°C увеличился на 2,0 lgЭИД₅₀. Помимо PB2 гена, существенное влияние на *ts* фенотип вируса 59/M2 при 39°C оказывали PB1 и M гены: показатель RCT₃₉ для данных ОГР составлял 3,5 и 5,0 lgЭИД₅₀ соответственно. Мутации в генах PB1, PA и NP также повышали титр вируса при 26°C на 1,0 lgЭИД₅₀. Таким образом, показано влияние каждого гена донора 59/M2 в становлении его температурочувствительного и холодоадаптированного фенотипов.

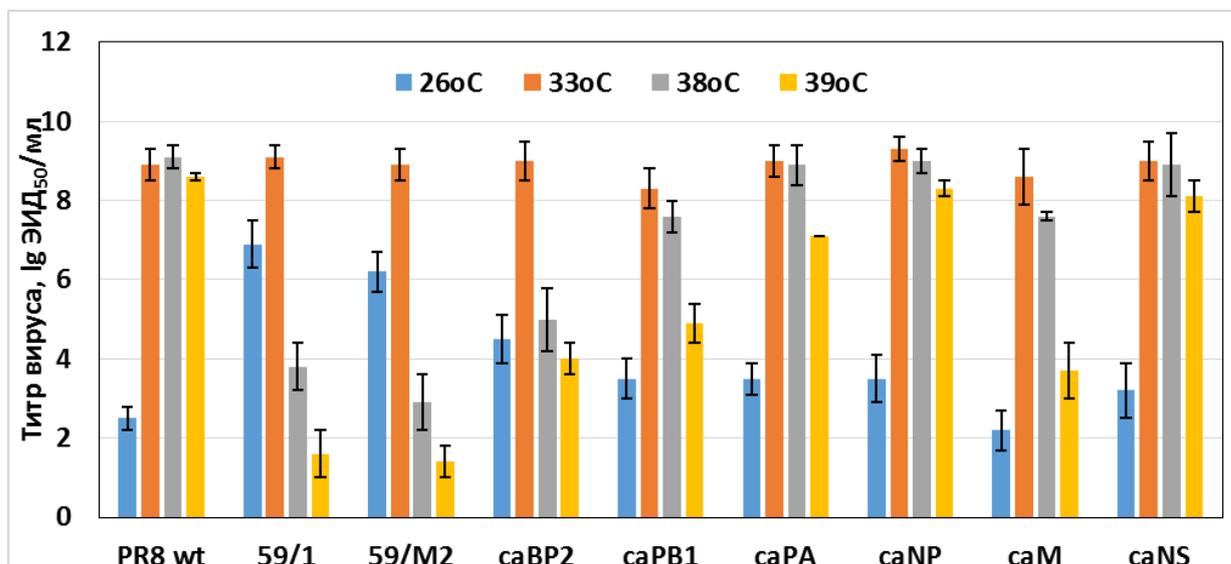


Рисунок 8. Инфекционная активность вирусов PR8 wt, 59/1, 59/M2, а также одногенных реассортантных штаммов PR8, содержащих один ген от вируса 59/M2, в развивающихся куриных эмбрионах при различных температурах инкубации.

3.3 Чувствительность модифицированного донора аттенуации 59/M2 к химиопрепаратам адамантанового ряда

Оценку чувствительности модифицированного донора аттенуации 59/M2 к химиопрепаратам адамантанового ряда проводили в культуре клеток MDCK, культивируемых под жидкой средой в присутствии 10 мкг/мл ремантадина. В качестве контрольных вирусов были взяты следующие штаммы: PR8 wt, 59/1, а также одногенный реассортант caM. Данный реассортант был использован для подтверждения влияния именно M гена вируса 59/M2 на его чувствительность к ремантадину. Из таблицы 6 видно, что титр вирусов 59/1 и PR8 wt, содержащих Thr и Asn в позициях 27 и 31 M2 белка, соответственно, не изменяется в присутствии ремантадина, тогда как титр вирусов 59/M2 и caM, содержащих Val-27 и Ser-31, падает в 40-50 раз, что свидетельствует об их чувствительности к препаратам адамантанового ряда.

Таблица 6. Снижение репродуктивной активности вирусов в культуре клеток MDCK в присутствии в среде 10 мкг/мл ремантадина

Вирус	Инфекционная активность вирусов, lg ТЦИД ₅₀ /мл		Снижение инфекционного титра	
	Без ремантадина	С ремантадином	lg ТЦИД ₅₀ /мл	Абсолютное значение
PR8	8,3±0,7	8,3±0,5	0,1±0,2	1,1±1,6
59/1	5,4±0,4	5,1±0,0	0,3±0,4	2,0±2,5
59/M2	5,7±0,6	4,1±0,1	1,6±0,5	39,8± 3,2
caM	8,0±0,1	6,3±0,0	1,7±0,1	50,0±1,2

3.4 *Аттенуирующие свойства модифицированного донора 59/M2*

Аттенуацию нового донора оценивали по определению 50%-ной летальной дозе (MLD₅₀), а также по интенсивности его репродукции в респираторном тракте (носовых ходах и легких) мышей линии СВА в сравнении с исходным вирусом 59/1 и вирусом дикого типа PR8 wt. Среди всех исследованных вирусов, только штамм PR8 wt вызывал гибель мышей, и показатель MLD₅₀ составил 3,6 lg ЭИД₅₀ (Табл. 7). Репродукция в носовых ходах мышей всех исследованных вирусов колебалась в пределах 3,9-5,3 lg ЭИД₅₀/мл. Вирус PR8 wt активно репродуцировался в легких мышей, тогда как репродукция донора аттенуации 59/M2 и его прототипа в легких была существенно снижена (1,5 lgЭИД₅₀/мл против 6,8 lgЭИД₅₀/мл соответственно) (Табл. 7). Суммарно, полученные данные указывают на аттенуированный фенотип доноров 59/1 и 59/M2.

Таблица 7. Репродуктивная активность нового донора аттенуации 59/M2, а также реассортантных вакцинных штаммов А(Н2N2) на модели мышей линии СВА

Вирус	Титр вируса [†] , lg ЭИД ₅₀ /мл		MLD ₅₀ , lg ЭИД ₅₀	Фенотип
	носовые ходы	легкие		
A/PR/8/34 (H1N1) wt	5,3±0,3	6,8±0,2	3,6	<i>non-att</i>
A/PR/8/59/1 (H1N1)	3,9±0,8	≤1,5	≥6,5	<i>att</i>
A/PR/8/59/M2 (H1N1)	4,3±0,5	≤1,5	≥6,5	<i>att</i>

[†] мышей заражали интраназально в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀ и титр в органах определяли на 3 сутки после заражения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения данной работы был подготовлен альтернативный донор аттенуации 59/M2, соответствующий требованиям, предъявляемым к донорам аттенуации для живой гриппозной вакцины. Показана ведущая роль мутантного PB2 гена в становлении *ts/ca* фенотипов донора 59/M2. Также значительный вклад в *ts* признак вносят мутации в PB1 и M генах, и, в меньшей степени – в PA гене. Новый донор также обладает очень высокой урожайностью, что может способствовать увеличению производственной мощности и снижению себестоимости ЖГВ. Важным достоинством данного штамма является его универсальность, так как он может использоваться не только в качестве донора аттенуации при подготовке живых гриппозных вакцин, но и как донор высокой репродуктивности при подготовке инактивированных вакцин.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

В настоящем исследовании представлялось необходимым оценить вклад индивидуальных мутаций, свойственных донору аттенуации Лен/17, в становление *ts/att* фенотипа вакцинных штаммов ЖГВ, используя современные молекулярно-генетические и генно-инженерные подходы. До проведения настоящего исследования было неизвестно, реверсия каких аттенуирующих мутаций в геноме вакцинных штаммов требуется для полного восстановления дикого фенотипа вируса. Проведение подобных генетических экспериментов потребовало разработки обратно-генетической системы для отечественного донора аттенуации Лен/17. Кроме того, с фундаментальной точки зрения представляло интерес определить, носят ли *ts* мутации донора Лен/17 универсальный характер, т.е. будут ли они приносить *ts/att* фенотип в геном генетически удаленного вируса гриппа А.

4.1 Разработка обратно-генетической системы для отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)

4.1.1. Клонирование генов донора аттенуации Лен/17 в векторы для обратной генетики

Набор из восьми плазмид, несущих все гены донора аттенуации Лен/17, был получен путем клонирования полноразмерных ДНК-копий генов вируса в векторы pCIPolISapIT или pHW2000, содержащие промоторы для Pol I и Pol II, по методике, описанной Hoffmann [205]. При этом в качестве источника вирусной РНК был использован вариант вируса Лен/17, адаптированный к клеткам MDCK [198]. Гены HA, NP, NA, M и NS были амплифицированы в полноразмерном виде с использованием универсальных праймеров, содержащих сайты посадки рестриктаз SapI (для вектора pCIPolISapIT) или BsmBI (для вектора pHW2000). Полноразмерные копии полимеразных генов PB2, PB1 и PA не удавалось получить в ходе одной реакции, поэтому клонирование данных генов проводили в несколько этапов. Стратегия клонирования гена PB2 представлена на рисунке 9. Так, на первом этапе проводили амплификацию трех перекрывающихся участков генов, причем в участках «А» и «С» искусственно вводили сайт рестрикции XbaI при помощи специфических праймеров. Затем, с использованием эндонуклеаз SapI и XbaI проводили клонирование части гена в вектор pCIPolISapIT. На последнем этапе в полученную конструкцию вносили оставшуюся часть гена, также используя специфические эндонуклеазы (в данном случае BclI и HhaI).

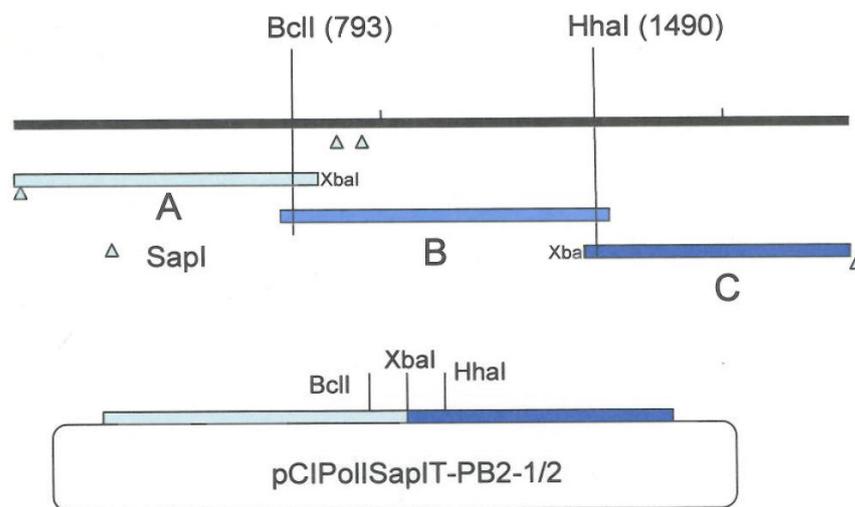


Рисунок 9. Стратегия клонирования гена PB2 донора аттенуации Лен/17 в вектор для обратной генетики вируса гриппа pCIPollSapIT.

Таким образом были клонированы все гены донора аттенуации Лен/17 в векторы для обратной генетики, и секвенирование полученных плазмид подтвердило идентичность последовательностей плазмидных вставок исходным вирусным генам. Жизнеспособный вирус Лен/17-rg получали путем трансфекции ко-культуры клеток 293Т/MDCK полученным набором плазмид. Необходимо отметить, что классический способ трансфекции клеток млекопитающих при помощи липофекции подразумевает инкубацию трансфецированных клеток при температуре 37°C, что является оптимальным для работы клеточных полимераз, считывающих вирусные гены в составе плазмид. Однако для ХА вирусов данная температура является рестриктивной, что не позволяло получить жизнеспособный вирус Лен/17-rg по стандартной методике. Модификация протокола трансфекции путем снижения температуры инкубации клеток через 24 часа после трансфекции позволила успешно получить обратно-генетическую копию донора аттенуации Лен/17. Полногеномное секвенирование вируса Лен/17-rg подтвердило полную идентичность всех вирусных генов исходному штамму Лен/17.

4.1.2 Оценка биологических свойств вируса Лен/17-rg

Полученный методами обратной генетики вирус Лен/17-rg проявлял температурочувствительный фенотип в культуре клеток MDCK, сравнимым с исходным вирусом Лен/17. Так, оба вируса активно реплицировались при оптимальной температуре 33°C, тогда как их инфекционная активность при 38°C, и даже при 37°C, значительно снижалась (рис. 10). Кроме того, эти вирусы формировали четкие бляшки при 33°C, тогда как при 38°C бляшки практически не образовывались. Контрольный «дикий» вирус А/Ленинград/134/57 (Лен/134), наоборот, активно реплицировался на всех исследуемых температурах, формируя четкие крупные бляшки на монослое клеток MDCK (рис. 10).

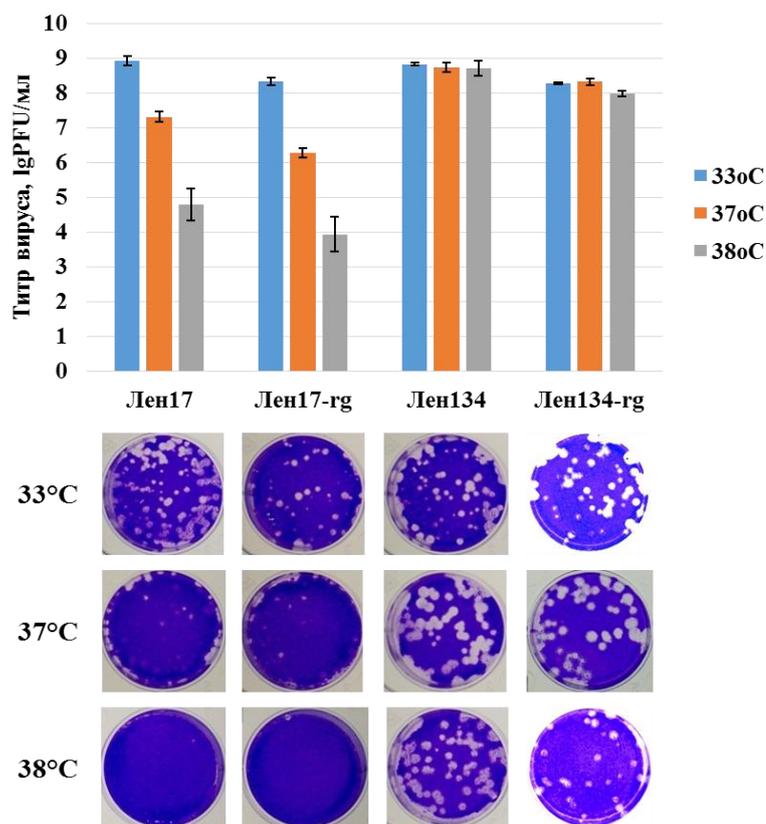


Рисунок 10. Репродукция доноров аттенуации Лен/17 и Лен/17-rg, а также «диких» вирусов Лен134 и Лен134-rg, в культуре клеток MDCK при различных температурах инкубации.

Определение *ts/ca* фенотипов в системе РКЭ также подтвердило сохранность этих характеристик в генно-инженерном варианте вируса Лен/17. Оба варианта хорошо репродуцировались при пониженной до 26°C температуре, но при этом практически не размножались при температурах 38°C и выше (рис.11). Контрольный вирус, наоборот, активно рос при температурах 38-39°C, но его репродукция при 26°C была ограничена.

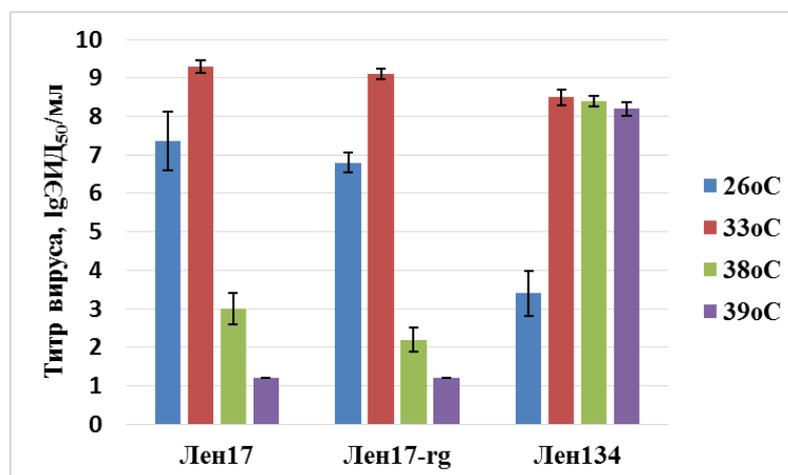


Рисунок 11. Репродукция доноров аттенуации Лен17 и Лен17-rg, а также контрольного вируса Лен134, в развивающихся куриных эмбрионах при различных температурах инкубации.

Оценку безвредности (аттенуированного фенотипа) вируса Лен/17-rg проводили на мышах линии BALB/c. В качестве контрольных вирусов также использовали исходный штамм Лен/17 и его «дикий» предшественник Лен/134. Значение MID₅₀ было сопоставимо у обоих ХА вирусов (3,3-3,5 lgБОЕ), при этом MID₅₀, рассчитанная по обнаружению вируса в легких значительно превышала дозу, рассчитанную по детекции вируса в носовых ходах, что говорит о предпочтительной репродукции вирусов в верхних дыхательных путях животных (Табл. 8). Вирус Лен/134, наоборот, более эффективно размножался в нижних дыхательных путях, и значение MID₅₀, вычисленное по детекции вируса в легких, составило 1,8 lgБОЕ.

Заражение мышей исследуемыми вирусами, взятыми в одинаковой дозе 300 MID₅₀, показало аттенуированный фенотип ХА вирусов Лен/17 и Лен/17-rg, поскольку они существенно хуже репродуцировались в нижних дыхательных путях мышей, по сравнению с вирусом Лен/134, тогда как уровень репродукции в носовых ходах был сопоставим у всех изучаемых вирусов. Следует отметить отсутствие нейроинвазивности у изучаемых вирусов: ни один из вариантов не обнаруживался в тканях мозга мышей, ни на 3, ни на 6 сутки после заражения.

Таблица 8. Репродукция исследуемых вирусов в органах мышей линии BALB/c

Вирус	MID ₅₀ , lgБОЕ			Доза вируса ¹ , lgБОЕ	Титр вируса, lgБОЕ/мл (M±SD)					
					день 3			день 6		
	носы	легкие	итог		носы	легкие	мозг	носы	легкие	мозг
Лен/17	3,32	≥5,0	3,32	5,80	3,6±0,1	1,0±0,6	<0,6	2,8±0,4	<0,6	<0,6
Лен/17-rg	3,50	≥5,5	3,50	5,98	3,4±0,2	2,0±0,1	<0,6	2,5±0,5	0,8±0,5	<0,6
Лен/134	2,68	1,83	1,83	4,31	3,4±0,1	5,1±0,2	<0,6	1,6±0,8	3,8±0,2	<0,6

¹доза вируса, равная 300 MID₅₀.

4.2 Изучение роли мутаций донора Лен/17 в проявлении признака температурочувствительности

Полногеномное секвенирование вирусов Лен/17 и Лен/134, использованных в данном исследовании, выявило ряд аминокислотных отличий во всех вирусных генах (Табл. 9).

Для изучения роли индивидуальных мутаций в *ts* фенотипе вируса необходимо было создать генно-инженерную копию «дикого» вируса Лен/134, обладающую сходным *non-ts* фенотипом. Для этого при помощи целенаправленного точечного мутагенеза были заменены соответствующие аминокислоты в геноме вируса Лен/17-rg, чтобы аминокислотная последовательность соответствовала таковой вируса Лен/134. Полученный в результате мутагенеза вирус Лен/134-rg по фенотипическим свойствам соответствовал целевому вирусу

Лен134 (Рис. 10). Следует отметить, что для получения такого вируса потребовался мутагенез всех вирусных генов, включая гемагглютинин и нейраминидазу, поскольку при замене аминокислот только во внутренних и неструктурных белках вируса Лен/17-rg не происходило полного восстановления *non-ts* фенотипа, свойственного вирусу Лен/134. Это указывает на определенный вклад мутаций в поверхностных гликопротеинах вируса Лен/17 в становлении его температурочувствительного фенотипа.

Таблица 9. Аминокислотные отличия в геноме вирусов Лен/17 и Лен/134

Белок	Положение	Лен/134		Лен/17	
		Аминокислота	Кодон	Аминокислота	Кодон
PB2	478	Val	<u>G</u> TA	Leu	<u>T</u> TA
PB1	265	Lys	AA <u>G</u>	Asn	AA <u>T</u>
	591	Val	<u>G</u> TT	Ile	<u>A</u> TT
PA	28	Leu	CT <u>G</u>	Pro	CC <u>G</u>
	341	Val	<u>G</u> TA	Leu	<u>T</u> TA
HA1	181	Asn	AA <u>T</u>	Thr	AC <u>T</u>
	197	Val	<u>G</u> TT	Ile	<u>A</u> TT
	225	Met	AT <u>G</u>	Ile	AT <u>A</u>
	314 ¹	Thr	<u>A</u> CA	Ala	<u>G</u> CA
HA2	18	Ile	<u>A</u> TT	Val	<u>G</u> TT
NP	492 ¹	Asn	AA <u>T</u>	Ser	AG <u>T</u>
NA	366	Ile	A <u>T</u> C	Thr	AC <u>C</u>
M1	15	Ile	<u>A</u> TC	Val	<u>G</u> TC
	144	Phe	TT <u>T</u>	Leu	TT <u>G</u>
NS2	100	Met	AT <u>G</u>	Ile	AT <u>A</u>

¹ Мутации, возникшие при адаптации вируса Лен/17 к культуре клеток MDCK.

На начальном этапе были получены одногенные реассортанты (ОГР), несущие один ген донора Лен/17-rg, а остальные семь генов – от вируса Лен/134-rg. Реассортант, несущий саNP ген, также был включен в анализ, несмотря на то, что мутация Asn-492-Ser возникла в вирусе Лен/17 в результате его адаптации к культуре клеток MDCK, и ранее не была описана (Табл. 9). Чтобы исключить влияние мутаций в поверхностных антигенах вируса Лен/17, был сконструирован дополнительный контрольный штамм–прототип живой гриппозной вакцины (ЖГВ 6:2), содержащий HA и NA гены от вируса Лен/134-rg, а остальные шесть генов – от донора Лен/17-rg. Одногенные реассортанты саPA, саNP и саM размножались при температурах 37-38°C так же активно, как и при 33°C, при этом практически не нарушалась морфология

бляшек при всех изученных температурах (Рис. 12). Это указывает на отсутствие влияния мутаций в данных генах на *ts* фенотип вируса Лен17.

Наиболее существенное снижение титров при 38°C наблюдалось у вирусов caPB2 и caPB1: инфекционная активность падала в ~450-1300 раз, по сравнению с титром при 33°C. Тем не менее, при 37°C титры данных вирусов были близки оптимальным значениям, но при этом наблюдалась тенденция уменьшения размера бляшек при данной температуре (Рис. 12). Следует отметить 10-кратное снижение титра вируса caNS при 38°C, значительно отличаясь по этому показателю от контрольного штамма Лен/134-rg ($p=0,023$). Поскольку разница в титрах при 38°C и 33°C у вируса caNS была значительно ниже таковой у штаммов caPB2 и caPB1 ($p=0,005$), можно предположить минорный вклад мутации M100I белка NS2 в проявление признака температурочувствительности. Обращает на себя внимание способность реассортантов caPA и caM формировать более крупные и четкие бляшки при 38°C (и при 37°C для вируса caM), чем контрольный вирус Лен/134-rg (Рис. 12). Эта особенность может указывать на ускоренную репликацию вирусов, содержащих мутации в PA и M генах донора Лен17, позволяющую за тот же промежуток времени лизировать большее количество окружающих клеток в монослое.

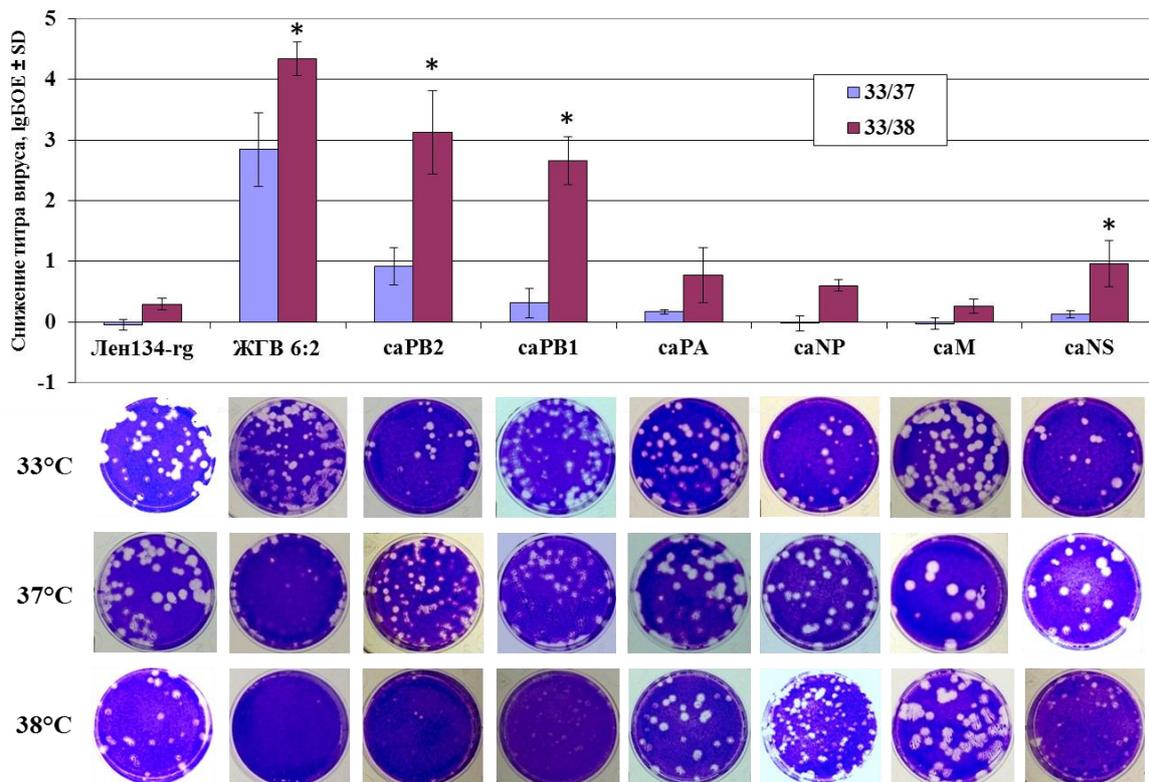


Рисунок 12. Репродукция Лен/134-rg и реассортантных вирусов (6:2 и ОГР) в культуре клеток MDCK при различных температурах инкубации. Столбики представляют собой разницу в инфекционном титре вируса при оптимальной (33°C) и повышенных (37°C, 38°C) температурах. На нижней панели представлена морфология бляшек, формируемых исследуемыми вирусами на монослое клеток MDCK. Статистически значимые отличия в снижении титра по сравнению с вирусом Лен/134-rg ($p<0,05$) обозначены звездочкой.

Далее была проведена оценка вклада одиночных мутаций донора Лен/17 в проявление его *ts* фенотипа. Для этой цели был сконструирован ряд мутантных вирусов гриппа на основе штамма Лен/134, несущих одну или более мутаций донора Лен/17. При этом наибольший интерес вызывали три мутации, расположенные в генах PB2 и PB1, поскольку одногенные реассортанты на их основе показали наибольшее снижение титра вируса при повышенной температуре инкубации. Внесение отдельных мутаций PB1^{265N} и PB1^{591I} в вирус Лен/134 снижали его титр при 38°C на 1,8 и 0,7 IgБОЕ, соответственно (по сравнению с Лен/134-rg: $p=0,0001$ для PB1^{265N} и $p=0,028$ для PB1^{591I}), при этом титры вирусов при 37°C оставались неизменными (Рис. 13). Одиночная мутация K265N в PB1 белке существенно нарушала морфологию бляшек при 38°C, тогда как для мутации V591I данный эффект был гораздо менее выражен. Тем не менее, комбинация этих двух мутаций приводила к существенным нарушениям репликации вируса при 38°C (Рис.12, PB1-ОГР).

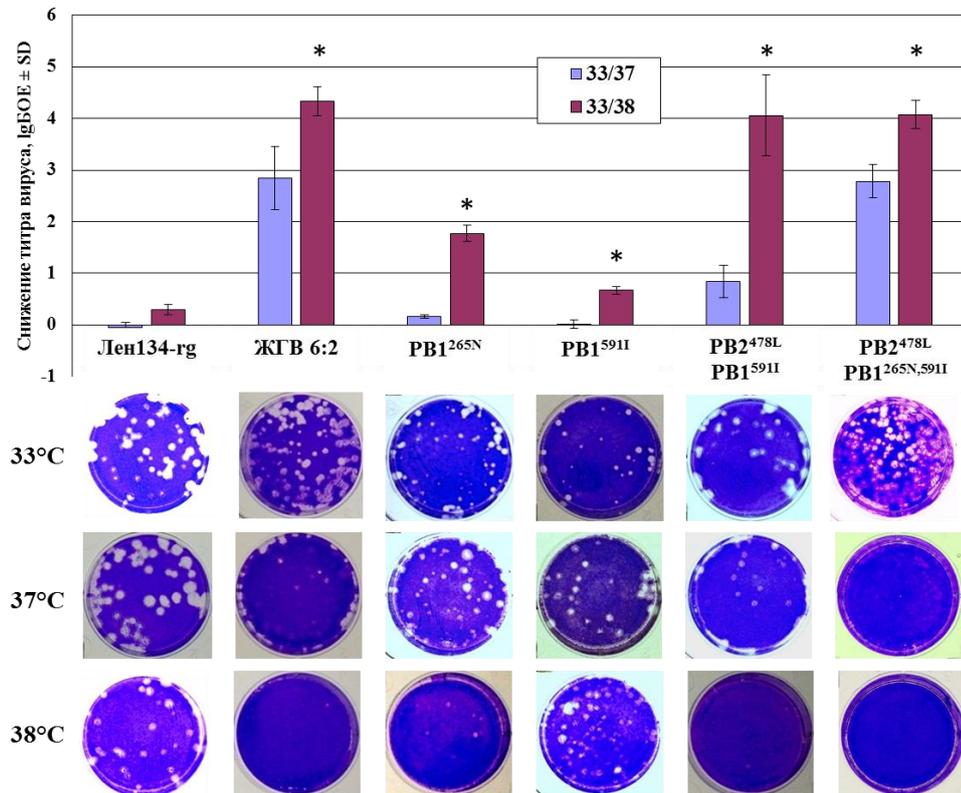


Рисунок 13. Репродукция штамма Лен/134-rg и мутантных вирусов в культуре клеток MDCK при различных температурах инкубации. Столбики представляют собой разницу в инфекционном титре вируса при оптимальной (33°C) и повышенных (37°C, 38°C) температурах. На нижней панели представлена морфология бляшек, формируемых исследуемыми вирусами на монослое клеток MDCK. Статистически значимые отличия в снижении титра по сравнению с вирусом Лен/134-rg ($p<0,05$) обозначены звездочкой.

Попытки получения генетически стабильного мутантного вируса, несущего комбинацию двух мутаций PB2^{478L}/PB1^{265N}, не увенчались успехом: полногеномное секвенирование всех

вариантов, полученных в результате нескольких независимых трансфекций, показало наличие множественных гетерогенностей в генах полимеразного комплекса вируса (примесь не менее 30% минорных популяций). Мутация PB1^{591I}, напротив, была совместима с мутацией PB2^{478L}, что позволило получить мутантный штамм, несущий две мутации донора Лен17: PB2^{478L}/PB1^{591I}. Данный вирус практически не реплицировался при 38°C, при этом наблюдалось синергическое действие двух аттенуирующих мутаций при данной температуре инкубации (Рис.13). Тем не менее, снижение титра вируса PB2^{478L}/PB1^{591I} при 37°C не достигало 1,0 IgБОЕ, и лишь добавление третьей мутации PB1^{265N} к данной комбинации позволило получить вирус, неотличимый по *ts* фенотипу от контрольного вируса ЖГВ 6:2 (Рис.13, $p=0,88$ и $p=0,25$ при сравнении ЖГВ 6:2 и штамма PB2^{478L}/PB1^{265N,591I} при 37°C и 38°C, соответственно). Мутантный вирус PB2^{478L}/PB1^{265N,591I} не формировал бляшки при 38°C, а при 37°C бляшки были едва различимы, тогда как все мутантные штаммы, содержащие одну или две аттенуирующие мутации, формировали четкие бляшки при 37°C, а иногда и при 38°C (Рис. 12, 13). Таким образом, наличие трех мутаций в PB2 и PB1 генах вируса Лен/134 является достаточным для получения температурочувствительного штамма, идентичному по данной характеристике донору аттенуации Лен/17.

4.3 Определение *ts* мутаций, реверсия которых необходима для восстановления дикого фенотипа у вакцинного штамма ЖГВ

Безопасность живых гриппозных вакцин во многом обусловлена генетической стабильностью вакцинных штаммов, т.е. сохранностью аттенуирующих мутаций в процессе репликации вирусов в респираторном тракте привитых. Реверсия этих мутаций к дикому типу может серьезно усилить вирулентные потенции вирусов, поэтому представлялось важным определить, реверсия каких аттенуирующих мутаций в штамме ЖГВ 6:2 необходима для того, чтобы полностью восстановить *non-ts* фенотип «дикого» вируса Лен/134. Для этого был сконструирован набор мутантных вирусов на основе штамма ЖГВ 6:2 (НА и NA гены от вируса Лен/134-rg, а остальные шесть генов – от донора Лен/17-rg), содержащих единичные или комбинированные мутации–реверсии к дикому типу Лен/134. Анализ *ts* фенотипа полученных вирусов показал, что реверсия одной мутации в PB2 гене (L478V) или двух мутаций в PB1 гене (N265K, I591V) нарушали *ts* фенотип вирусов при 37°C, но при этом данные вирусы оставались высокочувствительны к температуре 38°C, размножаясь при данной температуре на >4,5 IgБОЕ менее активно, чем при оптимальной температуре 33°C (рис. 14). Комбинация мутаций PB2^{478V}/PB1^{265K} приводила к образованию вируса, который реплицировался при 38°C до титров, схожих с таковыми дикого вируса Лен/134-rg ($p=0,21$). Но, в отличие от штамма Лен/134-rg, данный мутант формировал едва различимые бляшки при 38°C, что указывает на неполную

реверсию *ts* фенотипа при помощи двух указанных мутаций. Добавление к данной комбинации третьей мутации PB1^{591V} немного изменило морфологию бляшек при 38°C, однако они все еще отличались от бляшек вируса Лен/134-rg. Поскольку в экспериментах с одногенными реассортантами было отмечено влияние мутации M100I в белке NS2 на формирование бляшек при 38°C (рис. 12), в мутантном вирусе PB^{2478V}/PB1^{265K,591V} была дополнительно ревертирована данная мутация в NS2 белке. Полученный штамм PB^{2478V}/PB1^{265K,591V}/NS2^{100M} формировал четкие бляшки при 38°C, сравнимые по морфологии с контрольным вирусом Лен/134-rg (Рис. 14).

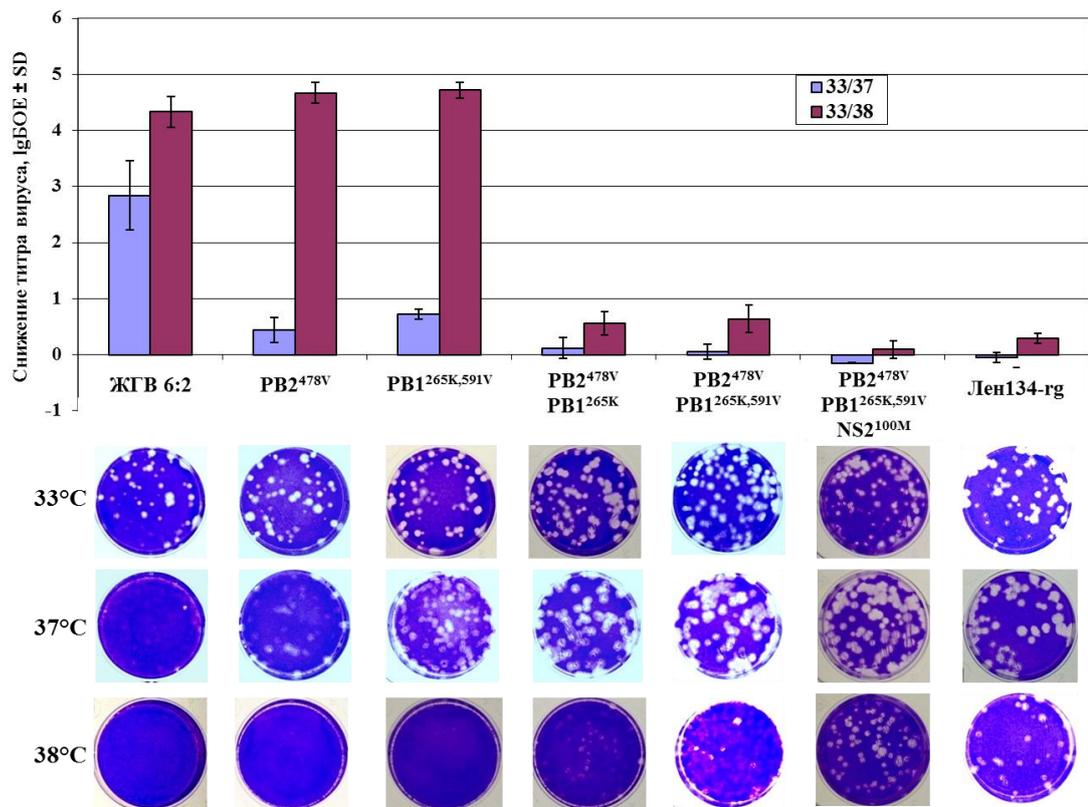


Рисунок 14. Репродукция вирусов в культуре клеток MDCK при различных температурах инкубации. Столбики представляют собой разницу в инфекционном титре вируса при оптимальной (33°C) и повышенных (37°C, 38°C) температурах. На нижней панели представлена морфология бляшек, формируемых исследуемыми вирусами на монослое клеток MDCK.

4.4 Изменение *ts* и *att* фенотипов антигенно неродственного вирулентного вируса при внесении в его геном *ts* мутаций, свойственных донору Лен/17

Чтобы оценить, носят ли *ts* мутации донора аттенуации Лен/17 универсальный характер, данные мутации были внесены в геном модельного штамма A/PR8/34 (H1N1), характеризующегося температуроустойчивым фенотипом, а также высокой степенью вирулентности для мышей. Для целенаправленного мутагенеза генов вируса PR8 были отобраны пять мутаций, сосредоточенных в полимеразных генах вируса - PB2 (V-478-L), PB1

(K-265-N; V-591-I), PA (L-28-P; V-341-L), а также M100I мутация в NS2 белке. Мутантные штаммы подвергались полногеномному секвенированию, чтобы убедиться в отсутствии любых нежелательных мутаций или других неоднородностей генетического материала.

Изучение *ts* фенотипа полученных мутантных штаммов показал, что они значительно отличаются друг от друга по способности репродуцироваться в культуре клеток MDCK при повышенных температурах 37-38°C (Табл. 10). Так, внесение мутаций NS2 (M100I), PB1 (V-591-I) и PA (L-28-P; V-341-L) не приводило к изменению *ts* фенотипа, а добавление мутации PB1 (K-265-N) приводило к снижению титра вируса при 38°C на 0,7-0,8 lgБОЕ, но при этом не изменялся титр вируса при 37°C. Наибольшим эффектом обладала мутация в PB2 гене (V-478-L), которая индивидуально привносила *ts* фенотип при 38°C, а в сочетании с мутациями в PB1 гене – и при 37°C. Эти данные четко соотносятся с влиянием описанных мутаций на *ts* фенотип вируса Лен/134, т.е. эти мутации имеют универсальный характер и могут привносить *ts* фенотип в генетически удаленные вирусы гриппа (Табл. 10, Рис. 12, 13). Исключение составила мутация в NS2 белке, которая не снижала инфекционный титр вируса PR8 при 38°C, тогда как в составе вируса Лен/134 она снижала титр при этой температуре на 1,0 lgБОЕ (Рис. 12).

Полученный набор мутантных вирусов с широким спектром фенотипических характеристик (от *non-ts* до *ts+++*) позволил оценить вклад данных мутаций в аттенуацию вируса для мышей. Поскольку вирус Лен/134 не является летальным для мышей, ранее не представлялось возможным изучить индивидуальное и сочетанное влияние различных *ts* мутаций донора Лен/17 на безвредность вируса гриппа на данной модели лабораторных животных. Сопоставление *ts* фенотипа каждого мутантного вируса с его летальностью для мышей показало, что способность вирусов вызывать гибель мышей находилась в четкой обратной зависимости от степени температурочувствительности штамма. То есть, чем лучше мутантный штамм размножался при повышенной температуре в культуре клеток MDCK, тем выше была его летальность (т.е. значение MLD₅₀ ниже). Единственным исключением выглядит мутантный штамм 17PB2+PA, который имел *ts*-фенотип, сопоставимый с мутантами 17PB2 и 17PB2+PB1b, однако сохранял вирулентность «дикого» штамма PR8 (Табл. 10). Эти данные могут указывать на то, что мутации в PA гене, наоборот, усиливают репликативную активность вируса, и, как следствие – его вирулентность. Данное предположение подкрепляется наблюдением об усиленной способности реассортанта саРА формировать более крупные и четкие бляшки при 38°C, чем контрольный вирус Лен/134-rg (Рис.12). Таким образом, взаимодействие изучаемых *ts*-мутации носит сложный комплексный характер. При этом можно выделить две мутации, привносящие наибольший вклад в аттенуирующие свойства вируса: PB2 (V-478-L) и PB1 (K-265-N). Мутация PB1 (V-591-I) сама по себе не влияет на свойства вируса, однако она ослабляет его вирулентные свойства, когда сочетается с двумя вышеприведенными

Таблица 10. Характеристика мутантных штаммов вируса PR8 по степени их температурочувствительности и уровню репродукции в органах мышей

Мутантный штамм	Наличие (+) или отсутствие (-) мутации в полимеразных генах					Титр вируса в клетках MDCK при температуре (lgБОЕ/мл ± SD)			Фено-тип	MLD ₅₀ lgБОЕ	MID ₅₀ lgБОЕ	Титр вируса в органах мышей*		
	PB1		PB2		PA	NS2	33°C	37°C				38°C	легкие	носы
	K265N	V591I	V478L	L28P и V341L	M100I									
wtPR8	-	-	-	-	-	8,7±0,0	8,8±0,0	8,7±0,3	<i>non-ts</i>	3,6	0,5	6,9±0,1	2,4±1,4	
NS2	-	-	-	-	+	8,8±0,1	9,0±0,1	8,9±0,2	<i>non-ts</i>	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	
PA	-	-	-	+	-	8,6±0,2	8,5±0,2	8,5±0,3	<i>non-ts</i>	3,6	0,7	6,9±0,1	2,8±1,1	
PB1a	-	+	-	-	-	8,7±0,5	8,6±0,4	8,2±0,3	<i>non-ts</i>	3,5	0,8	6,7±0,3	1,9±1,2	
PB1b	+	-	-	-	-	8,7±0,5	8,4±0,4	7,9±0,5	<i>non-ts</i>	4,2	1,8	5,7±0,2	2,1±1,4	
PB1	+	+	-	-	-	9,1±0,2	8,5±0,2	7,9±0,2	<i>non-ts</i>	4,2	1,8	6,3±0,4	1,5±0,4	
PB1+PA	+	+	-	+	-	8,6±0,2	8,1±0,1	7,2±0,7	<i>non-ts</i>	4,2	1,0	5,1±0,3	1,9±1,0	
PB2+PA	-	-	+	+	-	8,6±0,0	7,9±0,1	6,4±0,4	<i>ts +</i>	3,7	1,2	5,8±0,8	1,3±0,0	
PB2	-	-	+	-	-	8,5±0,4	7,7±0,1	6,4±0,0	<i>ts +</i>	4,5	1,0	5,7±0,2	2,0±1,5	
PB2+PB1b	-	+	+	-	-	8,9±0,2	8,2±0,2	6,3±0,4	<i>ts +</i>	4,5	1,0	5,2±1,0	2,0±1,3	
PB2+PB1a	+	-	+	-	-	9,0±0,1	7,2±0,2	4,3±0,5	<i>ts ++</i>	5,8	3,2	2,7±1,1	2,0±1,0	
PB2+PB1	+	+	+	-	-	8,8±0,2	6,5±0,1	3,9±0,4	<i>ts +++</i>	≥ 6,5	4,0	2,5±0,5	1,3±0,0	
PB2+PB1+PA	+	+	+	+	-	8,4±0,1	5,7±0,4	3,7±0,0	<i>ts +++</i>	≥ 6,5	3,2	2,6±0,3	1,3±0,0	

non-ts – температуроустойчивый; н.д. – не делали;

ts + – температурочувствительный, разница титров при 33°C и 38°C составляет 2,0 – 3,0 lgБОЕ; при 33°C и 37°C может быть < 2,0 lgБОЕ;

ts ++ – температурочувствительный, разница титров при 33°C и 38°C составляет 3,0 – 4,0 lgБОЕ; при 33°C и 37°C может быть < 2,0 lgБОЕ;

ts +++ – температурочувствительный, разница титров при 33°C и 38°C ≥ 4,0 lgБОЕ; при 33°C и 37°C ≥ 2,0 lgБОЕ;

MLD₅₀ – 50%-ная мышьяная летальная доза; MID₅₀ – 50%-ная мышьяная инфицирующая доза (мышь считали инфицированной, если вирус выделился либо в носках, либо в легких);

* мышей заражали одинаковой дозой каждого вируса, 4,0 lgБОЕ, и титры вирусов определяли в гомогенатах органов через три дня после заражения.

мутациями (см. пару вирусов 17PB2+PB1a и 17PB2+PB1). Что касается способности мутантных вирусов инфицировать нижние дыхательные пути мышей (легкие), то можно выделить три группы вирусов – высокоинфекционные (значение MID_{50} не превышает 0,75 IgБОЕ), среднеинфекционные (значение MID_{50} варьирует от 1,0 до 2,0 IgБОЕ) и низкоинфекционные (значение MID_{50} превышает 3,4 IgБОЕ). Данное распределение в инфицирующей способности вирусов также хорошо коррелирует со степенью их температурочувствительности. В отношении репродукции вирусов в верхних дыхательных путях такой четкой зависимости выявлено не было (Табл. 10).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования была разработана обратно-генетическая система для донора аттенуации Лен/17, которая позволила на новом методическом уровне подтвердить ведущую роль мутаций в двух полимеразных генах PB2 и PB1 в формировании *ts* фенотипа вируса. Мутации в генах донора аттенуации Лен/17 по степени влияния на *ts* фенотип вируса располагаются следующим образом: PB2(V478L) > PB1(K265N) > PB1(V591I) > NS2(M100I). В настоящем исследовании удалось подтвердить универсальный характер *ts* мутаций в полимеразных генах PB2 и PB1 донора Лен/17: их внесение в геном генетически удаленного вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) проводило к формированию температурочувствительного, и, как следствие, аттенуированного фенотипа вируса для мышей. Впервые отмечена минорная роль мутации в NS2 белке в становлении *ts* фенотипа донора, и одновременная реверсия четырех *ts* мутаций в вакцинном штамме ЖГВ требуется для полного восстановления дикого фенотипа вируса. Эти данные указывают на высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин, подготовленных на доноре аттенуации Лен/17, поскольку одновременная реверсия четырех мутаций, ответственных за *ts* фенотип вакцинного вируса, представляется крайне маловероятной.

Кроме того, с разработкой данной системы стало возможным конструировать генно-инженерные живые гриппозные вакцины на основе донора аттенуации Лен/17. Например, для потенциально-пандемических высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) или А(H7N9) невозможно подготовить вакцинные реассортанты с использованием только метода классической генетической реассортации в РКЭ, поскольку в таких вирусах необходимо удаление основного фактора патогенности для птиц – полиосновного кливевдж-сайта молекулы гемагглютинина.

ГЛАВА 5. ПОДГОТОВКА, ДОКЛИНИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н2N2)

Начиная с 1977 года, вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины готовятся методом генетической реассортации эпидемического вируса с холодоадаптированным донором аттенуации Лен/17 с последующей селекцией вакцинного реассортанта при пониженной до 26°C температуре инкубации в присутствии антисыворотки к донору аттенуации. При подготовке вакцинных штаммов Н2N2 методом классической реассортации с вышеуказанным донором аттенуации могут возникнуть методические сложности, т.к. донор аттенуации Лен/17 имеет тот же сероподтип, и использование в процессе подготовки штамма гипериммунной сыворотки к донору может перекрестно реагировать и с «диким» Н2N2 вирусом. Решить эту проблему можно двумя способами. Во-первых, можно использовать принципиально новый донор аттенуации с отличными от Н2N2 поверхностными антигенами. В данном случае наиболее перспективным является разработанный нами альтернативный донор аттенуации 59/M2. Во-вторых, можно использовать в качестве источника шести генов негликозилированных белков реассортантный штамм, подготовленный на основе донора Лен/17 и эпидемического вируса подтипа Н1N1 или Н3N2, и использованный ранее в качестве сезонной вакцины. В качестве такого вируса может быть использован вакцинный штамм А/17/Новая Каледония/99/145 (Н1N1) [17/НК/145], применявшийся ранее для сезонной вакцинации населения. Поскольку в процессе селекции вакцинных реассортантов используется гипериммунная сыворотка к вирусу А/Новая Каледония/20/99 (Н1N1) [НК wt], перекрестного подавления антигенов А(Н2N2) происходить не будет.

5.1 Подготовка реассортантных вакцинных штаммов А(Н2N2) с использованием новых подходов

Поскольку к концу своей циркуляции эпидемические вирусы разошлись на две эволюционно удаленные ветви (Рисунок 15), представлялось целесообразным подготовить вакцинные штаммы к вирусам обеих ветвей. Для этих целей были отобраны два эпидемических вируса – представителя каждой эволюционной группы Н2N2: А/Токио/3/67 и А/Калифорния/1/66.

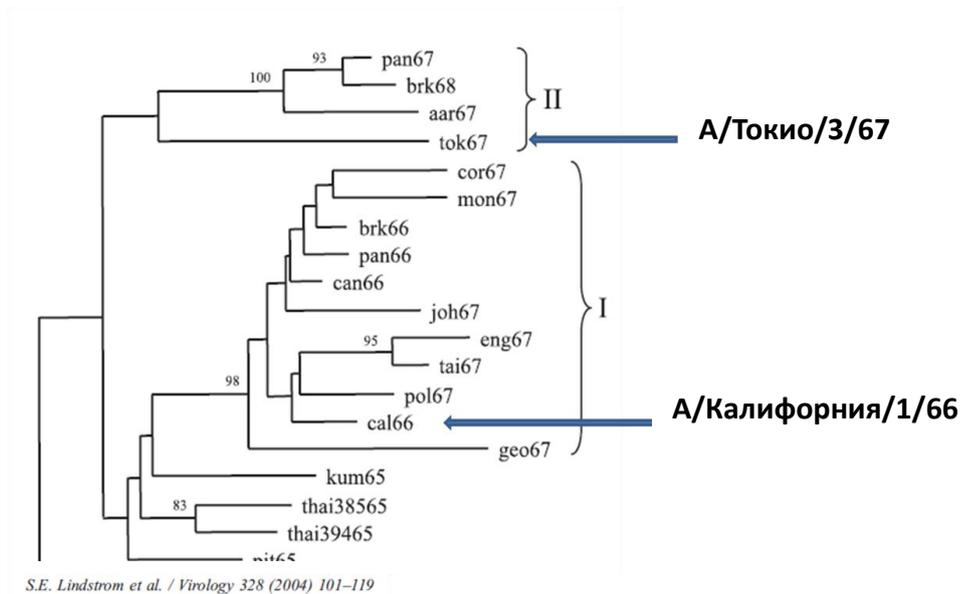


Рисунок 15. Эволюционное родство вирусов гриппа А(Н2Н2), циркулировавших в 1965-1968 гг. Филогенетическое дерево построено на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена гемагглютинина. Адаптировано из [294].

Два реассортантных вакцинных штамма Н2Н2 были подготовлены методом классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах эпидемических вирусов Н2Н2 с модифицированным донором аттенуации 59/М2, при этом в качестве селективного фактора использовалась сыворотка к вирусу PR8. Полученные вакцинные реассортанты А/59/М2/Токио/67/22111 [59/Ток/22111] и А/59/М2/Калифорния/66/2211 [59/Кал/2211] содержали шесть генов, кодирующих внутренние белки, от донора аттенуации и два поверхностных антигена – гемагглютинин и нейраминидазу – от соответствующего эпидемического вируса (формула генома 6:2). Полногеномное секвенирование не выявило наличия спонтанных мутаций ни в одном из генов вакцинных штаммов.

Вторая пара реассортантных штаммов Н2Н2 была подготовлена методом классической реассортации с использованием в качестве источника генов внутренних и неструктурных белков вакцинного штамма 17/НК/145. Данный штамм был получен ранее методом генетической реассортации эпидемического вируса НК wt и донора аттенуации Лен/17 [18]. В результате скрещивания и последующей селекции с использованием сыворотки к вирусу НК wt были получены вакцинные реассортанты Н2Н2, обладающие формулой генома 6:2: А/17/Калифорния/66/4412 [17/Кал/4412] и А/17/Токио/67/912 [17/Ток/912]. Полногеномное секвенирование вакцинных штаммов 17/Кал/4412 и 17/Ток/912 выявило наличие двух кодирующих замен в генах полимеразного комплекса, по сравнению с последовательностью донора Лен/17: Met-317-Ile в РВ1 белке и Leu-341-Pe в нуклеопротеине. Данные замены свойственны более аттенуированному донору А/Ленинград/134/47/57, который до 2002 года использовался в качестве специального

донора аттенуации для детского варианта ЖГВ [12]. Дополнительное секвенирование вакцинного штамма 17/НК/145 показало наличие в нем указанных замен. Таким образом, для получения вакцинного штамма 17/НК/145 мог использоваться неклонированный донор Лен/17, который является гетерогенным по данным позициям [25], при этом полногеномное секвенирование штамма 17/НК/145 ранее не проводилось.

Поскольку наличие дополнительных аттенуирующих мутаций в генах внутренних белков вакцинных штаммов H2N2 может негативно сказаться на их иммуногенности и защитной эффективности, был подготовлен альтернативный вакцинный штамм H1N1 путем скрещивания в РКЭ эпидемического вируса НК wt с донором аттенуации Лен/17. Полученный вакцинный реассортант А/17/Новая Каледония/99/513 [17/НК/513] обладал необходимой формулой генома 6:2, и при этом не содержал дополнительных мутаций в своих генах. На основе данного вакцинного штамма были получены 6:2 реассортанты, несущие HA и NA гены эпидемических вирусов А/Калифорния/1/66 и А/Токио/3/67, а остальные 6 генов – от донора Лен/17: А/17/Калифорния/66/395 [17/Кал/395] и А/17/Токио/67/326 [17/Ток/326]. Полногеномное секвенирование вакцинных штаммов H2N2 выявило наличие одной замены в HA1 субъединице вируса 17/Ток/326 (Glu-121-Gly, нумерация H2). Данная мутация расположена за пределами известных антигенных и рецептор-связывающих сайтов молекулы HA, поэтому ее влияние на антигенные и иммуногенные свойства вируса маловероятно [317, 487].

Антигенные характеристики вакцинных штаммов H2N2 изучались в перекрестной РТГА с гипериммунными крысиными сыворотками, полученными к эпидемическим вирусам H2N2, а также донорам аттенуации 59/M2 и Лен/17 и вакцинному штамму 17/НК/513, использованному в качестве источника генов донора аттенуации Лен/17. Как видно из Таблицы 11, вакцинные штаммы H2N2 по антигенности были идентичны своим эпидемическим родительским вирусам. Отсутствие различий в титре анти-А/Ток/3/67 сыворотки для антигенов А/Ток/3/67 и 17/Ток/326 указывает на то, что мутация Glu-121-Gly в HA1 белке не влияет на антигенные свойства вакцинного штамма 17/Ток/326. Стоит отметить, что антитела к вирусу А/Кал/1/66 были строго штамм-специфичными, не реагируя ни с вирусом А/Ток/3/67, ни с донором Лен/17, тогда как анти-Лен/17 антитела кросс-реагировали с вирусом А/Кал/1/66 до гомологичного титра, а также нейтрализовали штамм А/Ток/1/67 до 1:8 титра (Таблица 11). Сыворотка к вирусу А/Ток/3/67 также реагировала со штаммом А/Кал/1/66 до 1:8 гомологичного титра, но при этом не распознавала донор аттенуации Лен/17. Таким образом, сыворотка к вирусу Лен/17 обладала наибольшей кросс-реактивностью, тогда как сыворотки к штаммам, выделенным

в более позднем периоде циркуляции вирусов H2N2, являются более узкоспецифичными и неспособны распознавать ранние вирусы H2N2.

Таблица 11. Антигенная характеристика вирусов H2N2

Вирус H2N2	Титр гипериммунной крысиной сыворотки, выработанной к вирусу:				
	PR8 wt	17/НК/513	А/Кал/1/66	А/Ток/3/67	Лен/17
А/Кал/1/66	5	5	2560	40	160
А/Ток/3/67	5	5	5	320	20
59/М2	2560	н.д.	5	5	5
59/Кал/2211	5	н.д.	2560	10	80
59/Ток/22111	5	н.д.	5	320	20
17/НК/513	н.д.	1280	5	5	5
Лен/17	н.д.	5	5	5	160
17/Кал/395	н.д.	5	2560	20	160
17/Ток/326	н.д.	5	5	320	10

н.д.: не делали.

5.2 Репликативные свойства вакцинных штаммов А(H2N2) *in vitro* и *in vivo*

Полученные вакцинные вирусы были фенотипически охарактеризованы в системе РКЭ, а также в респираторном тракте мышей линии СВА (Табл. 12).

Таблица 12. Репродуктивная активность эпидемических вирусов H2N2, а также реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на его основе *in vitro* и *in vivo*

Вирус	Инфекционная активность вирусов при указанной температуре, Ig ЭИД ₅₀ /мл				Титр вируса, Ig ЭИД ₅₀ /мл		Фенотип
	33°C	38°C	39°C	26°C	носовые ходы	легкие	
А/Ток/3/67	7,2±0,3	6,7±0,7	6,7±0,5	2,1±1,2	3,2±0,6	5,7±0,7	<i>non-ts, non-ca, non-att</i>
А/Кал/1/66	8,0±0,6	7,1±0,5	2,4±0,5	2,8±0,8	2,2±0,4	3,8±0,6	<i>non-ts, non-ca, non-att</i>
59/М2	9,0±0,5	2,9±0,8	1,5±0,4	6,2±0,6	4,3±0,5	≤1,5	<i>ts, ca, att</i>
59/Ток/22111	9,1±0,4	3,5±0,7	2,2±0,5	6,7±0,8	3,3±0,9	≤1,5 [†]	<i>ts, ca, att</i>
59/Кал/2211	9,2±0,3	3,1±0,8	≤1,2	6,9±0,7	3,4±0,7	≤1,5 [†]	<i>ts, ca, att</i>
17/НК/513	8,9±0,5	3,2±0,5	1,8±0,5	7,0±0,2	3,3±0,4	2,0±0,5	<i>ts, ca, att</i>
17/Ток/326	9,2±0,7	3,5±0,7	3,2±0,5	6,3±0,8	2,0±0,8	2,1±0,2 [†]	<i>ts, ca, att</i>
17/Кал/395	9,0±0,3	3,1±0,8	3,2±0,5	6,6±0,7	3,0±0,8	2,3±0,3 [†]	<i>ts, ca, att</i>

ts, temperature sensitive (температурочувствительный); *ca*, cold-adapted (холодоадаптированный); *att*, attenuated (аттенуированный); н/д, не делали.

[†]p<0,05 по сравнению с соответствующим эпидемическим вирусом (критерий Манна-Уитни).

Было показано, что все четыре вакцинных штамма H2N2 проявляли свойства температурочувствительности и холодоадаптированности, тогда как эпидемические вирусы H2N2, наоборот, были неспособны размножаться при пониженной температуре, но при этом сохраняли высокий уровень репродукции при повышенных до 38-39°C температурах. Кроме того, вакцинные штаммы H2N2 проявляли аттенуированный фенотип: титры вирусов в легких мышей после их интраназального заражения дозой 6,0 lg ЭИД₅₀, были значительно ниже таковых эпидемических вирусов H2N2 (Табл. 12).

Поскольку модифицированный донор аттенуации 59/M2 создавался как универсальный высокорепродуктивный донор для живых и инактивированных гриппозных вакцин, представлялось важным сравнить ростовые характеристики вакцинных штаммов, подготовленных из одного эпидемического вируса, но отличающихся набором генов, кодирующих внутренние и неструктурные белки вируса. Несмотря на схожие показатели инфекционной активности вакцинных штаммов 59/Ток/22111 и 17/Ток/326 в РКЭ при различных температурах инкубации (Табл. 12), сравнение кинетики накопления вирусов в РКЭ при 33°C выявило ускоренное накопление вакцинного штамма 59/Ток/22111 по сравнению с 17/Ток/326, как по гемагглютинирующей, так и по инфекционной активности (Рис. 16). Эти данные указывают на то, что одно и то же число доз ЖГВ H2N2 из штамма, подготовленного на основе модифицированного донора аттенуации 59/M2, может быть произведено за более короткие сроки, чем ЖГВ из штамма на основе донора аттенуации Лен/17. Более высокие показатели гемагглютинирующей активности штамма 59/Ток/22111 также могут свидетельствовать о возможности наработки большего числа доз инактивированной вакцины из данного штамма, по сравнению с реассортантом 17/Ток/326.

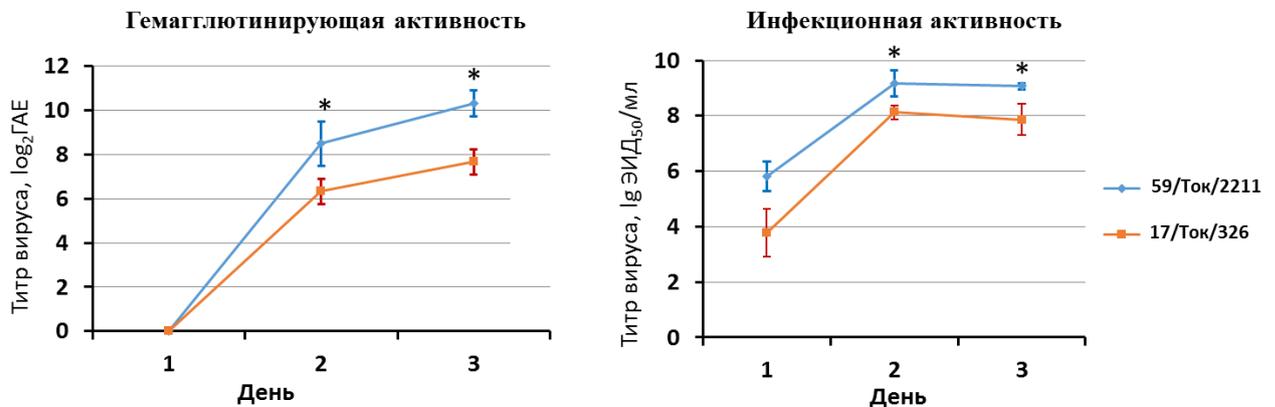


Рисунок 16. Кинетика накопления вакцинных штаммов H2N2 в развивающихся куриных эмбрионах при оптимальной температуре. РКЭ заражали исследуемыми вирусами 59/Ток/22111 и 17/Ток/326 в дозе 10³ ЭИД₅₀. Титр вирусов в разные временные точки определяли в реакции гемагглютинации (слева) и путем титрования образцов в РКЭ по методу Reed & Muench (справа). *p<0,05, критерий Манна-Уитни.

5.3 Иммуногенность и защитная эффективность вакцинных штаммов H2N2 на модели мышей

Иммуногенность вакцинных штаммов 59/Кал/2211, 59/Ток/22111, 17/Кал/395 и 17/Ток/326 оценивали путем двукратной иммунизации мышей линии СВА вакцинными штаммами, взятыми в дозах 100 МИД₅₀ и 1000 МИД₅₀. Иммунизация вакцинными штаммами приводила к формированию гуморальных антител не только против гомологичного вируса, но и против гетерологичного штамма H2N2 (Табл. 13). Вакцинные штаммы, подготовленные на основе вируса А/Калифорния/1/66, были более иммуногенны, чем вакцинные штаммы против вируса А/Токио/3/67, вызывая образование более высоких уровней гомологичных антител после двукратной вакцинации обеими дозами вакцины. При этом штамм 17/Кал/326 индуцировал более выраженный иммунный ответ к гомологичному вирусу, чем вакцинный штамм 59/Кал/2211. Вакцинные реассортанты на основе вируса А/Токио/3/67 имели противоположную тенденцию: штамм на основе донора аттенуации 59/М2 был более иммуногенен, чем штамм на основе донора Лен/17 (Табл. 13). Антитела, индуцированные вакцинами 59/Ток/22111 и 17/Ток/326, были кросс-реактивными и ингибировали вирус А/Кал/1/66 до титров 1:42-1:52 при гомологичных титрах 1:60-1:122, тогда как антитела к вакцинам 59/Кал/2211 и 17/Кал/395 были более штамм-специфичными, и титры антител к гетерологичному вирусу отличались от гомологичных в 6,2-100 раз (Табл. 14).

Таблица 14. Иммуногенность вакцинных штаммов H2N2 в экспериментах на мышах

Вакцинная группа	Доза, МИД ₅₀	Средняя геометрическая величина титров антигемагглютинирующих антител с антигеном H2N2			
		А/Калифорния/1/66		А/Токио/3/67	
		День 28	День 56	День 28	День 56
59/Кал/2211	100	6,8	56,6	5,0	12,3
	1000	22,3	255,8	5,0	41,2
59/Ток/22111	100	5,0	20,5	10,2	60,3
	1000	6,9	42,5	20,6	122,8
17/Кал/395	100	5,0	115,5	5,0	5,5
	1000	105,6	844,5	5,0	8,7
17/Ток/326	100	5,5	20,6	5,0	33,5
	1000	17,4	52,8	5,7	60,6
Плацебо	-	5,0	5,0	5,0	5,0

Эти данные указывают на то, что иммуногенность вакцинных штаммов H2N2 зависит не только от донора аттенуации, на основе которого подготовлен штамм, но также от источника поверхностных антигенов вируса, при этом сочетанное действие обоих факторов определяет степень иммуногенности и кросс-реактивности вакцины. Важно отметить, что, несмотря на вариации в уровнях антител, выявляемых в РТГА, все четыре вакцинных штамма полностью защищали мышей как от гомологичного, так и гетерологичного эпидемического вируса H2N2 при иммунизации высокой дозой 1000 МИД₅₀: инфекционный вирус не выявлялся в респираторном тракте иммунизированных мышей, тогда как в легких и носовых ходах контрольных мышей челлендж-вирусы размножались до высоких титров (Рис. 17). Мыши, иммунизированные меньшей дозой 100 МИД₅₀, были полностью защищены от размножения гомологичного вируса, тогда как гетерологичный вирус обнаруживался в легких мышей в незначительных титрах. Данные титры были достоверно ниже таковых у мышей контрольных групп ($p < 0,001$).

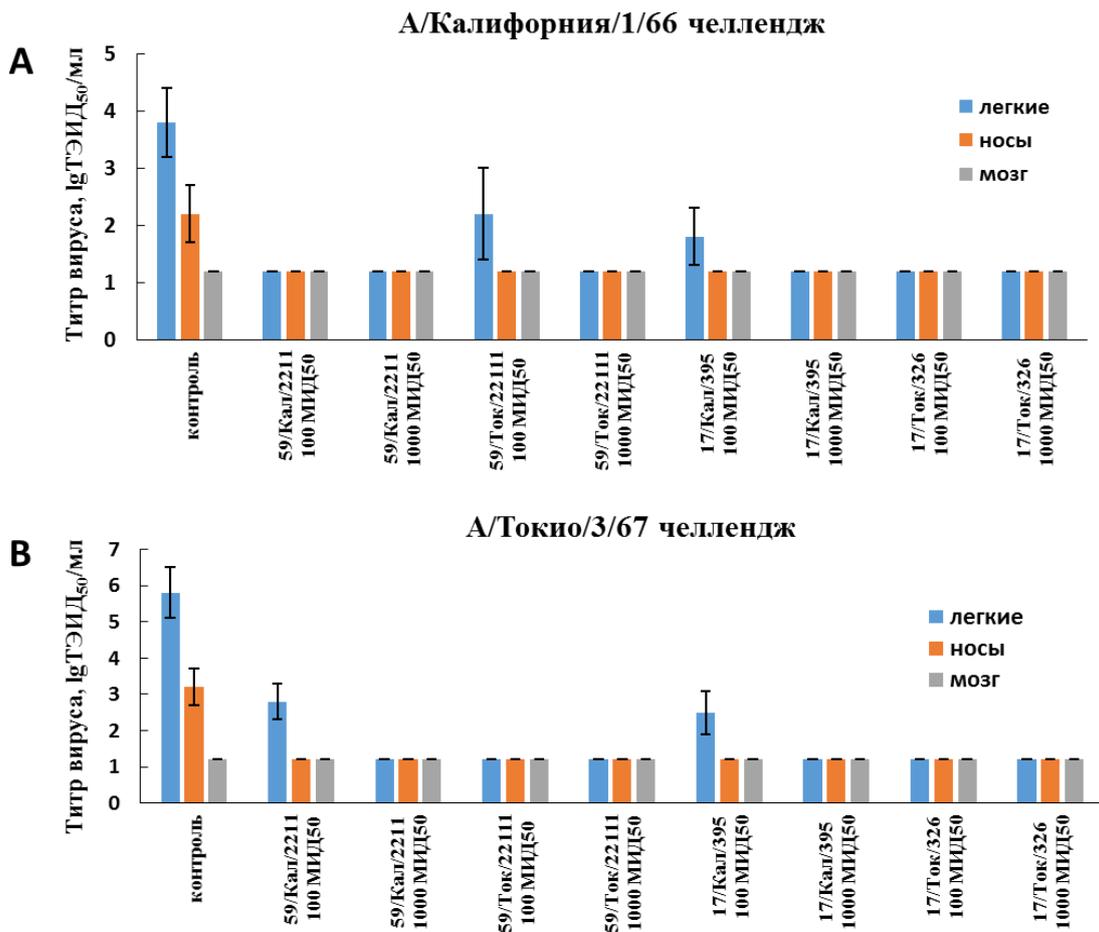


Рисунок 17. Титры вирусов в органах иммунизированных мышей линии СВА после экспериментального заражения эпидемическими вирусами А/Калифорния/1/66 (А) и А/Токио/3/67 (В). Уровень детекции вируса составил 1,2 lg ЭИД₅₀/мл.

Таким образом, изучение вакцинных штаммов А/59/М2/Калифорния/66/2211 (Н2N2), А/59/М2/Токио/67/22111 (Н2N2), полученных с использованием нового донора аттенуации А/PR/8/59/М2 (Н1N1), а также штаммов А/17/Калифорния/66/395 (Н2N2) и А/17/Токио/67/326 (Н2N2), полученных с использованием промежуточного вакцинного штамма ЖГВ подтипа А(Н1N1) в качестве источника генов донора аттенуации Лен/17, доказало их безвредность, иммуногенность и профилактическую эффективность от инфекции, вызванной как гомологичным, так и гетерологичным вирусом Н2N2.

5.4 Иммуногенность и защитная эффективность вакцинных штаммов Н2N2 на модели хорьков

В настоящем исследовании для оценки иммуногенности вакцинных кандидатов Н2N2 на модели хорьков были выбраны только штаммы, содержащие гены внутренних и неструктурных белков от донора аттенуации Лен/17. Животных иммунизировали однократно интраназально штаммами 17/Кал/395 и 17/Ток/326, а также донором аттенуации Лен/17, взятым в качестве контрольного штамма ЖГВ подтипа Н2N2. Кроме того, контрольная группа хорьков получала препарат плацебо (PBS). Уровни гомологичных и кросс-реактивных антител в сыворотках хорьков оценивали на 14 и 21 сутки после иммунизации при помощи РТГА и реакции микронеutralизации (РМН), при этом в качестве антигенов использовали эпидемические вирусы А/Кал/1/66 и А/Ток/3/67, а также донор аттенуации Лен/17. Все три вакцинных штамма Н2N2 индуцировали высокие уровни антигемагглютинирующих и нейтрализующих гомологичных антител, при этом штамм 17/Кал/395 был наиболее иммуногенен (Рис. 18А). Наименьшие гомологичные титры антител были зафиксированы у хорьков, привитых донором Лен/17. В большинстве случаев индуцированные антитела обладали выраженной кросс-реактивностью к гетерологичным штаммам Н2N2, за исключением штамма 17/Ток/326, который не вызывал образования антител в РТГА к донору Лен/17. Тем не менее, в данной вакцинной группе обнаруживались нейтрализующие антитела к вирусу Лен/17, что указывает на участие в нейтрализации других классов антител, помимо антигемагглютинирующих (Рис. 18А). Важно отметить, что уровни гетерологичных антител, индуцируемых вакцинным штаммом 17/Кал/395, были лишь немного ниже уровней гомологичных антител, вызываемых соответствующим вакцинным штаммом, и чаще всего статистически были неотличимы. Вакцины 17/Ток/326 и Лен/17, наоборот, были слабыми индукторами гетерологичного гуморального иммунного ответа: кросс-реактивные антитела были значительно ниже соответствующих гомологичных титров, или вовсе отсутствовали (Рис. 18А).

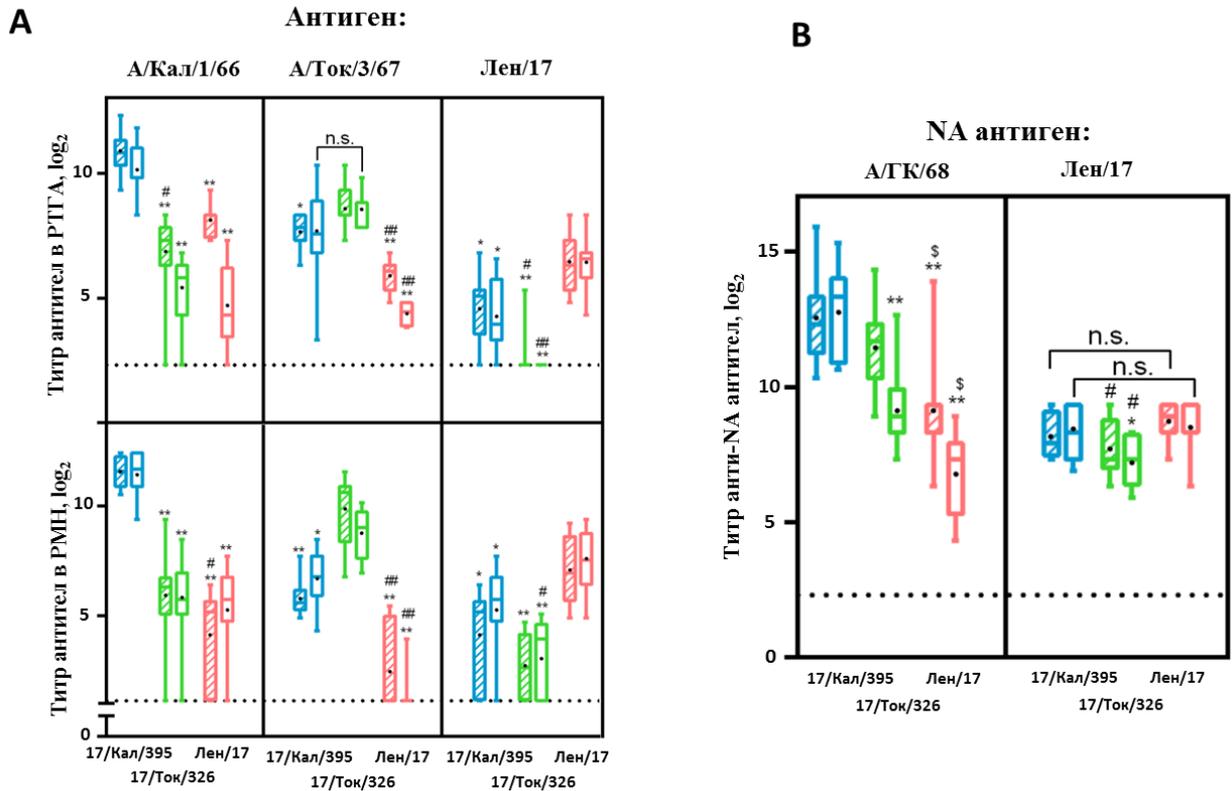


Рисунок 18. Иммуногенность и кросс-реактивность вакцинных штаммов H2N2 на модели хорьков. Гомологичные и кросс-реактивные антигемагглютинирующие (А, верхняя панель), нейтрализующие (А, нижняя панель) и антинейраминидазные (В) антитела определяли на 14 (заштрихованные ячейки) и 21 (пустые ячейки) сутки после однократной иммунизации. Ячейки представляют собой 5-95 перцентиль, точки – средние значения титров. Уровень детекции обозначен пунктирной линией. n.s. – отличия не достоверны. Статистически значимое снижение титра антител по отношению к гомологичному титру обозначено * ($p < 0,05$) и ** ($p < 0,0001$). Статистически значимое отличие по отношению к другому гетерологичному вирусу обозначено # ($p < 0,05$) и ## ($p < 0,0001$). Статистически значимое снижение титра анти-NA антител по отношению к штамму 17/Ток/326 обозначено [§] ($p < 0,05$)

У вакцинированных хорьков также были оценены уровни антинейраминидазных антител в сыворотках крови на 14 и 21 день после иммунизации при помощи реакции ингибирования нейраминидазной активности (РИНА). Ограничением данной методики является невозможность использования вирусов со сходными молекулами НА в качестве антигенов, поскольку анти-НА антитела, присутствующие в сыворотке иммунизированных животных, могут также ингибировать активность нейраминидазы за счет стерических взаимодействий. Поэтому в качестве антигенов использовались реассортантные штаммы, содержащие N2 гены, соответствующие раннему и позднему этапу циркуляции вирусов H2N2. Штамм НК-Х31, содержащий НА и NA гены вируса А/Гонконг/1/68 (H3N2), а остальные шесть генов от вируса PR8, представлял собой поздний ген NA. Вакцинный 7:1 реассортант А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2), содержащий НА ген от вируса H5N2, а остальные семь генов, включая NA, от донора

Лен/17, представлял собой вирус с ранней нейраминидазой N2. Вакцинный штамм 17/Кал/395 индуцировал значительно более высокие титры антител к более позднему белку NA, чем 17/Ток/326 или Лен/17 (Рис. 18B). Данные антитела проявляли кросс-реактивность и к более раннему варианту NA, поскольку уровни Лен/17-специфичных анти-NA антител у хорьков, иммунизированных штаммом 17/Кал/395, были сопоставимы с таковыми хорьков, привитых донором Лен/17. Штамм 17/Ток/326 также образовывал антитела к раннему NA белку, однако их уровни были достоверно ниже, чем в группе Лен/17-привитых животных (Рис. 18B).

Для оценки защитной эффективности вакцинных штаммов H2N2 по 6 хорьков из каждой группы заражали интраназально эпидемическими вирусами А/Кал/1/66 и А/Ток/3/67 на 21 сутки после иммунизации. В предварительном эксперименте по титрованию эпидемических вирусов H2N2 на хорьках было показано, что данные вирусы вызывают умеренное заболевание у животных, без таких клинических проявлений гриппозной инфекции, как насморк, чихание и потеря веса. Тем не менее, имплантированные датчики температуры фиксировали у контрольных неиммунизированных животных подъем температуры в первые трое суток после челленджа, при этом лихорадка была более выраженной при заражении вирусом А/Кал/1/66, чем А/Ток/3/67 (Рис. 19). У всех иммунизированных хорьков отсутствовал существенный подъем температуры после челленджа.

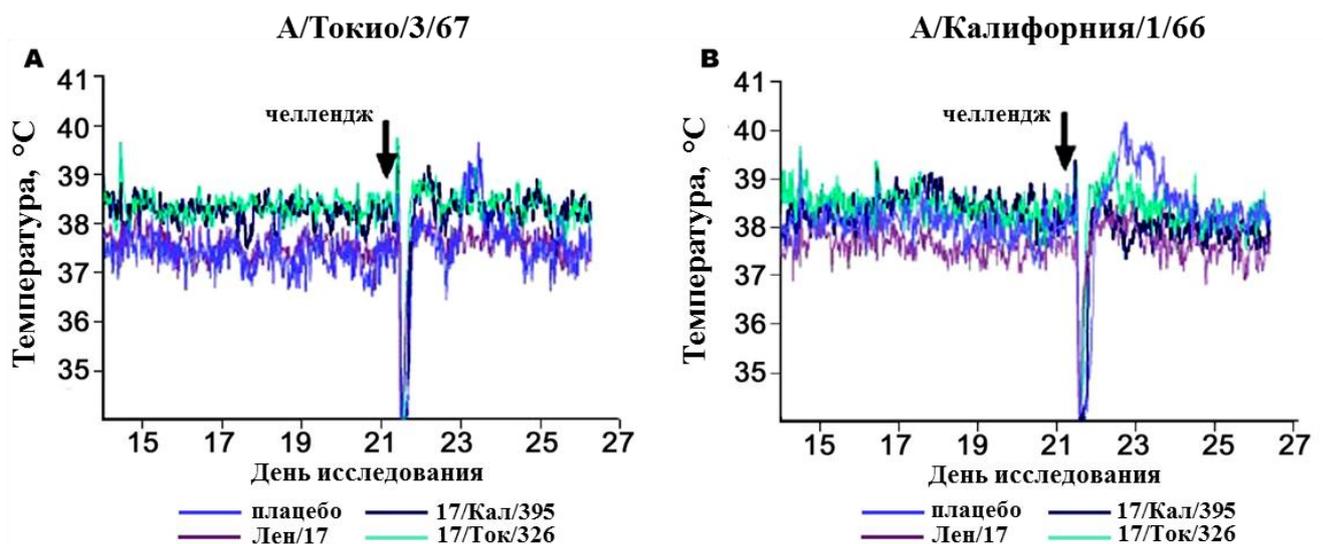


Рисунок 19. Динамика изменения температуры тела иммунизированных хорьков до и после челленджа эпидемическими вирусами А/Ток/3/67 (А) и А/Кал/1/66 (В).

Анализ площади под кривыми показателей датчиков температуры на 21-26 сутки эксперимента выявил существенное снижение данного показателя у всех вакцинных групп при заражении вирусом А/Кал/1/66 (Табл. 14). Этот показатель также был снижен у иммунизированных хорьков при заражении вирусом А/Ток/3/67, однако разница с группой плацебо была недостоверной, ввиду малого количества животных в контрольной группе (данные температурных датчиков были читаемы лишь у двух хорьков).

Таблица 14. Анализ температуры тела хорьков после челленджа вирусами H2N2

Группа №	Иммунизация	Челлендж	Кол-во хорьков	Площадь под кривой (дни 21–26) ¹	Максимальное повышение температуры, °С (дни 21–26) ²
1	17/Кал/395	А/Кал/1/66	5	0,0 ± 1,0*	1,6 ± 0,2*
2	17/Кал/395	А/Ток/3/67	4	0,2 ± 0,3	1,5 ± 0,4
3	17/Ток/326	А/Кал/1/66	3	-0,7 ± 0,6*	1,5 ± 0,3*
4	17/Ток/326	А/Ток/3/67	4	0,1 ± 0,2	1,7 ± 0,2
5	Лен/17	А/Кал/1/66	5	0,5 ± 0,4*	1,4 ± 0,3*
6	Лен/17	А/Ток/3/67	4	0,1 ± 0,5	1,4 ± 0,6
7	Плацебо	А/Кал/1/66	4	2,5 ± 1,1	2,4 ± 1,3
8	Плацебо	А/Ток/3/67	2	1,4 ± 0,5	2,4 ± 0,6

¹Площадь под кривыми показателей датчиков температуры измерялась относительно базового значения температуры каждого животного и выражалась в виде среднего от всех животных в группе ± стандартное отклонение;

²Максимальное повышение температуры относительно базового значения температуры каждого животного, выраженное в виде среднего от всех животных в группе ± стандартное отклонение;

*достоверное отличие от контрольной группы №7 (p<0,05 по критерию Манна–Уитни).

Детекция эпидемических вирусов H2N2 в мазках из зева хорьков группы плацебо показала их активную репликацию вплоть до 5 суток после заражения (Рис. 20). В целом, у вакцинированных животных репликация вируса снижалась к 2 (для А/Кал/1/66) и 3 (А/Ток/3/67) суткам, и при этом титры были значительно ниже таковых группы плацебо. Следует отметить слабый защитный эффект ЖГВ из штамма 17/Ток/326 против гомологичного вируса А/Ток/3/67, тогда как гетерологичный вакцинный штамм 17/Кал/395 обеспечивал практически полную защиту хорьков от этого вируса, а штамм Лен/17 также частично защищал животных (Рис. 20). При заражении хорьков вирусом А/Кал/1/66 обе реассортантные ЖГВ H2N2 обеспечивали сходную степень защиты, тогда как контрольный штамм Лен/17 практически не обладал кросс-протективной активностью.

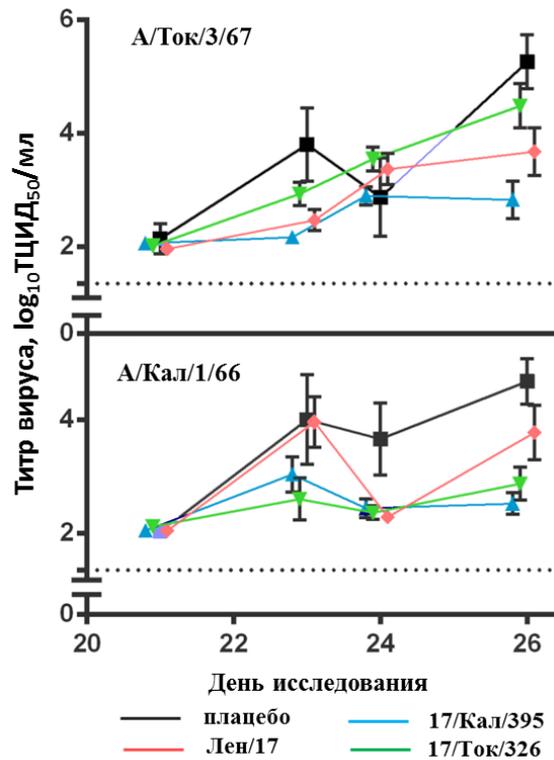


Рисунок 20. Выделение вируса из мазков из зева иммунизированных хорьков после заражения эпидемическими вирусами H2N2: A/Tок/3/67 и A/Кал/1/66.

Выделение инфекционного вируса из тканей носовых ходов на 5 сутки после челленджа также показало высокий уровень репликации обоих эпидемических вирусов в группе непривитых хорьков. Все вакцинированные животные демонстрировали значительное снижение репликации вируса в верхних дыхательных путях, как для гомологичных, так и для гетерологичных штаммов (Рис. 21).

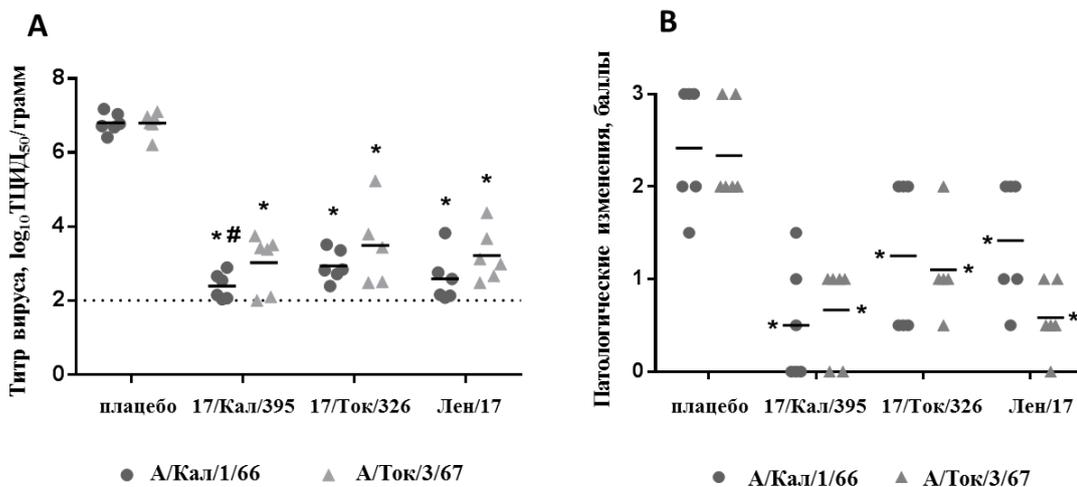


Рисунок 21. Репликация вирусов (А) и патологические изменения (В) в носовых ходах иммунизированных хорьков после заражения эпидемическими вирусами H2N2. Достоверное снижение титров по сравнению с группой плацебо обозначено * ($p < 0,05$). Достоверное снижение титров по сравнению с группой 17/Ток/326 обозначено # ($p < 0,05$).

Как и в случае с выделением вирусов из мазков из зева, ЖГВ 17/Кал/395 значительно лучше защищала от репликации гетерологичного вируса А/Ток/3/67, чем гомологичная вакцина 17/Ток/326. Инфекционный вирус не обнаруживался в нижних дыхательных путях хорьков (трахее и легком) ни в одной из исследуемых групп.

Чтобы найти возможные причины различий в иммуногенности, кросс-реактивности и защитной эффективности между двумя вакцинными штаммами H2N2 мы сравнили ферментативную активность нейраминидазы реассортантных штаммов 17/Кал/395 и 17/Ток/326, поскольку этот фактор может влиять на спектр и амплитуду вырабатываемого иммунного ответа, в частности, через воздействие на длительность репродукции вируса у вакцинированных лиц. На рисунке 22 представлена зависимость выхода продукта сиалидазной реакции от концентрации вируса, выраженной в агглютинирующих единицах. Интересно, что NA-индуцированное десалирование фетуина, вызванное штаммом 17/Кал/395, было значительно более эффективным по сравнению с аналогичными дозами вируса 17/Ток/326.

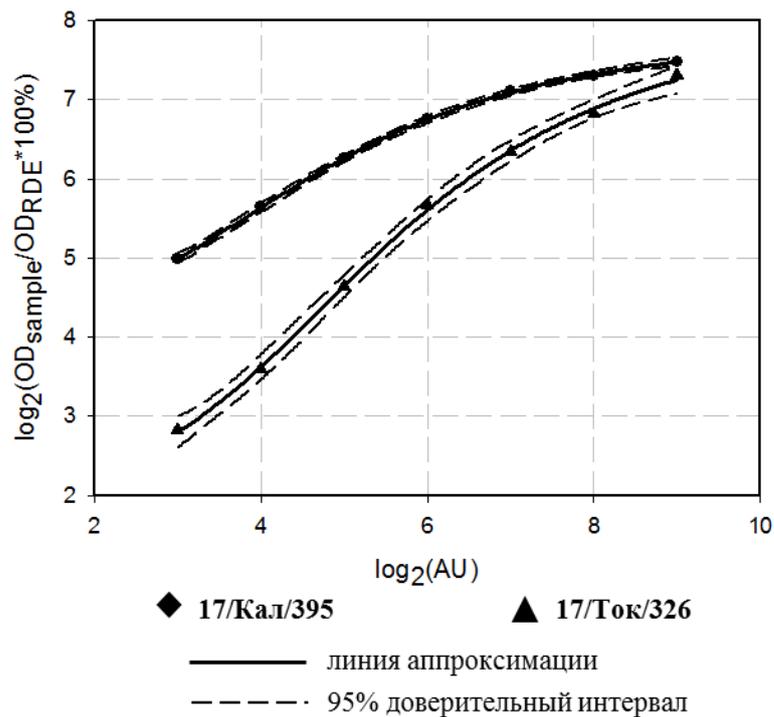


Рисунок 22. Активность нейраминидазы вакцинных штаммов H2N2. Активность NA выражена в процентах от активности RDE в тесте десалирования фетуина. Пунктирные линии указывают 95% доверительный интервал к линии аппроксимации (сплошная линия).

Эти данные могут указывать как на то, что активность нейраминидазы у штамма 17/Кал/395 выше, чем у вируса 17/Ток/326, так и на то, что эти два штамма отличаются соотношением гемагглютинирина и нейраминидазы в вирусных частицах. В первом случае это могло бы объяснить более высокие уровни гомологичных и кросс-реактивных функциональных (антигемагглютинирующих, нейтрализующих и анти-NA) антител после вакцинации 17/Кал/395 по сравнению с 17/Ток/326, поскольку вирус будет распространяться от клетки к клетке более эффективно и расти до более высоких титров. Во втором случае это объяснило бы более высокие титры анти-NA антител в группе хорьков, привитых 17/Кал/395, так как плотность NA у этого штамма ЖГВ тогда была бы выше.

Таким образом, детальная характеристика вакцинных штаммов ЖГВ H2N2 в экспериментах на хорьках показала более высокую иммуногенность и кросс-протективность вакцинного реассортанта 17/Кал/395 по сравнению со штаммом 17/Ток/326. Поэтому для дальнейших клинических испытаний на добровольцах была рекомендована ЖГВ H2N2 из вакцинного штамма 17/Кал/395.

5.5 Клинические испытания живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемического вируса А(H2N2) на добровольцах (I фаза).

Клинические испытания (фаза I) 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). Верхний возрастной предел был обусловлен необходимостью включения в исследование только тех лиц, кто никогда не контактировал с вирусами гриппа H2N2. В данных клинических испытаниях оценивалась безвредность, приживляемость, трансмиссивность и иммуногенность ЖГВ H2N2 для взрослых здоровых лиц. Вакцину и препарат плацебо (лиофилизированная аллонтаисная жидкость незараженных куриных эмбрионов, содержащая те же стабилизаторы, что и ЖГВ) вводили стандартным коммерческим распылителем в обе ноздри по 0,25 мл в каждую. Рисунок 23 отражает схему вакцинации и отбора биологических материалов для оценки иммунного ответа на ЖГВ H2N2. Точки III (День 28) и IV (День 56) давали возможность оценить иммунный ответ соответственно на первую и вторую иммунизацию в отдельности, точка I (День 0) – фоновое состояние иммунитета, точка V (День 112) – состояние иммунитета через 84 дня после двукратной иммунизации, точка II (День 6) – индукцию клеточного иммунитета на ранних сроках после однократной вакцинации (продукция эффекторных Т клеток). Помимо этого, забор мазков для постановки ПЦР на наличие РНК вируса гриппа А и определения его подтипа

осуществлялся на 0 день (до вакцинации), 1–6 дни исследования после вакцинации, 28 день (до ревакцинации), 29–34 дни исследования. Участники исследования находились в клинике в течение 6-7 суток после каждой вакцинации, и могли быть выписаны только при условии отсутствия вирусной РНК в мазках из носа/зева.

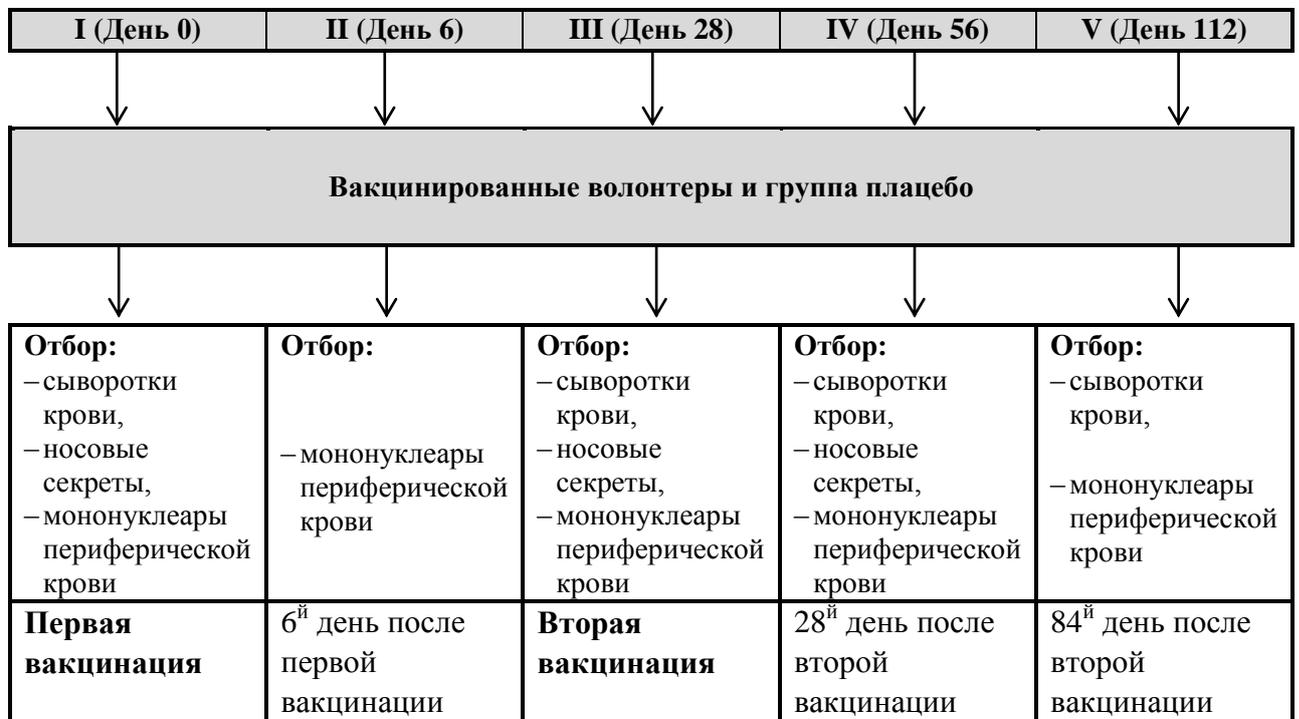


Рисунок 23. Схема вакцинации и отбора биологических проб у волонтеров для исследования иммуногенности ЖГВ H2N2.

5.5.1. Оценка реактогенности ЖГВ H2N2 на добровольцах

Безвредность ЖГВ H2N2 для волонтеров оценивали по результатам ежедневного осмотра добровольцев специально обученным медперсоналом непосредственно после каждой иммунизации, а также в течение недели после каждой дозы вакцины. Кроме того, проводили биохимический и гематологический анализ крови через неделю после каждой вакцинации. Было показано, что ЖГВ H2N2 хорошо переносилась добровольцами. Не было зафиксировано каких-либо побочных реакций на вакцину в течение первых 2 часов после вакцинации. В течение 7 дней после вакцинации местные реакции наблюдались у 4 (14,3%) вакцинированных лиц после первой дозы, но не после второй (Приложение 1). Местные реакции также наблюдались у двух добровольцев (20,0%) в группе плацебо после первого введения препарата. Ожидаемые побочные системные реакции регистрировались на одинаковых уровнях как для лиц из группы ЖГВ H2N2 (46,4% после дозы 1, 32,1% после дозы 2), так и для группы плацебо (50% после дозы 1, 20% после дозы 2). Наиболее распространенной системной реакцией, наблюдаемой среди лиц группы

ЖГВ H2N2, было повышение температуры, которое наблюдалось у 12 волонтеров (42,9%) после дозы 1 и у 4 лиц (14,3%) после дозы 2. Среди пациентов, получавших плацебо, у 1 (10%) добровольца также наблюдалась лихорадка и у 4 (40%) лиц отмечены боли в горле после дозы 1 (Приложение 1). Важно отметить, что все повышения температуры тела, наблюдаемые в обеих тестируемых группах, были умеренными (от 37,0 до 37,5°C).

Наиболее частые нежелательные побочные явления, наблюдаемые после вакцинации, состояли в умеренных отклонениях лабораторных биохимических показателей крови, которые, однако, обычно были сопоставимы по частоте между вакцинной группой и группой плацебо. Исключение составили случаи умеренного повышения аланинаминотрансферазы (два случая, по одному после каждой дозы), билирубина и глюкозы (по одному случаю) в группе ЖГВ H2N2 после дозы 2 (Приложение 2). В плацебо-группе после дозы 1 регистрировали один умеренный случай повышения билирубина.

Таким образом, ЖГВ H2N2 была безвредна и хорошо переносилась здоровыми взрослыми добровольцами как при однократном, так и при двукратном введении.

5.5.2. Оценка приживляемости, трансмиссивности и генетической стабильности ЖГВ H2N2 на добровольцах

Для оценки приживляемости вакцинного вируса в верхних дыхательных путях волонтеров в течение 1 недели после каждой иммунизации проводили ежедневный забор мазков из носа и из зева с целью детекции вакцинного вируса. Наличие вируса определяли либо при помощи ПЦР, либо методом культивирования в РКЭ.

После первой иммунизации вирусная РНК была обнаружена в носовых мазках у 22 из 28 вакцинированных лиц на 1-й день после вакцинации, тогда как только 11 добровольцев были положительными на 2-й день, 5 на 3-й день, и 3 на 4-й день после первой дозы. Обнаружение вирусной РНК в мазках из зева было намного ниже: ни один образец не был положительным на 1-й день после вакцинации, а репликация вируса была обнаружена только у 3 пациентов на 2-й день, у одного из которых вирусная РНК продолжала детектироваться два дополнительных дня (Табл. 15). Вирусная РНК не обнаруживалась далее 4-го дня после первой вакцинации. После второй иммунизации вирус детектировался в мазках из носа у 21 из 27 добровольцев группы ЖГВ H2N2. Кроме того, в некоторых случаях вирусная РНК обнаруживалась в мазках из зева, хотя мазки из носа были отрицательными (Табл. 15). Примечательно, что лишь у трех добровольцев вирус был обнаружен на 2-й день после ревакцинации. В последующие дни вирусная РНК

не обнаруживалась ни у одного из вакцинированных лиц, указывая на более короткий период репликации вакцинного вируса после второй дозы по сравнению с первой.

Таблица 15. Выделение вакцинного вируса ЖГВ H2N2 от привитых волонтеров

День	Выделение в РКЭ, n (%)	Детекция вирусной РНК, n (%)	
		мазок из носа	мазок из зева
После дозы 1 (n=28)			
1	11 (39,3)	22 (78,6)	0 (0,0)
2	1 (3,6)	11 (39,3)	3 (10,7)
3	0 (0,0)	5 (17,9)	1 (3,6)
4	0 (0,0)	3 (10,7)	1 (3,6)
5	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
После дозы 2 (n=27)			
29 (1)*	8 (29,6)	20 (74,1)	2 (7,4)
30 (2)	0 (0,0)	2 (7,4)	1 (3,7)
31 (3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

*в скобках указан день после ревакцинации

Инфекционный вирус выделялся в РКЭ из мазков из носа и/или мазков из зева только у тех волонтеров, у которых вирусная РНК была обнаружена методом ПЦР. Большинство вирусных изолятов были выделены на 1-й день после вакцинации и ревакцинации (11 из 28 и 8 из 27 соответственно). Единственный вакцинный изолят был выделен на второй день после первой дозы, и при этом ни в одном из образцов жизнеспособный вирус не выделялся после 2-го дня после каждой из доз вакцины. Важно отметить, что ни у одного из добровольцев из группы плацебо не было обнаружено вакцинного вируса в верхних дыхательных путях ни методом культивирования в РКЭ, ни методом ПЦР, что свидетельствует об отсутствии трансмиссивности вакцинного вируса.

Суммарно в системе РКЭ было выделено 20 вакцинных изолятов. Молекулярно-генетический анализ показал, что все вирусы сохранили полный набор аттенуирующих мутаций в генах внутренних и неструктурных белков вируса гриппа. Кроме того, полноразмерное секвенирование генов поверхностных белков HA и NA не обнаружило появления спонтанных мутаций после репликации вируса в клетках человека, что указывает на высокую степень генетической стабильности вакцинного вируса 17/Кал/395.

5.5.3. Оценка иммуногенности ЖГВ H2N2 на добровольцах

Все отобранные для исследования добровольцы были серонегативными к исследуемому вирусу гриппа H2N2. Доля лиц, ответивших 4-кратным и более увеличением титров антител после иммунизации, варьировала в зависимости от используемого иммунологического теста. Наибольшее число сероконверсий было обнаружено в РТГА: 18,5%, 33,3% и 60,0% добровольцев ответили на ЖГВ H2N2 к 28, 56 и 112 дню, соответственно, тогда как лишь у двух (8,0%) добровольцев были обнаружены приросты сывороточных IgG антител в иммуноферментном анализе (ИФА) на 112 день исследования (Табл. 16). В реакции микронеutralизации было выявлено 29,6%, 44,4% и 44,0% сероконверсий у привитых добровольцев в дни 28, 56 и 112 соответственно. Кроме того, приросты сывороточных IgA антител наблюдались у 51,9% вакцинированных лиц. Важно отметить, что интраназальное введение ЖГВ H2N2 индуцировало локальные иммунные ответы антител у 63,0% добровольцев, у 5 из которых (18,5%) обнаруживались приросты IgA антител в назальных секретах, у 4 (14,8%) лиц – в слюне, и у 8 (29,6%) добровольцев зафиксированы ответы в обоих тестах (Табл. 16). Никаких иммунных ответов не наблюдалось в группе плацебо.

Таким образом, у большинства вакцинированных лиц (23 из 27, 85,2%) были зафиксированы приросты антител по какому-либо из использованных иммунологических тестов. Тем не менее, средние геометрические величины титров (СГТ) обнаруженных антител были относительно низкими. Так, СГТ нейтрализующих антител в вакцинной группе составляла всего 1:15 через 84 дня после второй вакцинации, а СГТ антигемагглютинирующих антител не превышала 1:10 (Табл. 17). Тем не менее, увеличение титров антител, выявленных в РТГА, РМН и ИФА (сывороточные IgA), было статистически значимым уже после первой дозы ЖГВ H2N2 ($p=0,028$ для РТГА, $p=0,0002$ для РМН и $p=0,019$ для сывороточных IgA антител). Вторая вакцинация привела к увеличению значений СГТ в 2,0-3,0 раза, за исключением сывороточных IgG антител, для которых значительное увеличение СГТ отмечено только через 84 дня после второй дозы ($p=0,019$, табл. 17). Примечательно, что все титры антител продолжали расти с течением времени, и СГТ к дню 112 были выше таковых через четыре недели после второй дозы, что указывает на продолжающееся развитие иммунных ответов после иммунизации ЖГВ H2N2. В таблице 18 приведены уровни различных антител у лиц, ответивших сероконверсиями в различных иммунологических реакциях. Данная выборка добровольцев демонстрирует высокую иммуногенность ЖГВ H2N2, поскольку приросты СГТ антител, выявляемых в различных тестах, варьируют от 4,0 до 6,8 – показатели, близкие к иммунизации сезонными гриппозными вакцинами.

Таблица 16. Число сероконверсий (≥ 4 -кратных приростов антител) у добровольцев, получивших ЖГВ H2N2 или препарат плацебо

Тест	Группа	После дозы 1 (день 28); ЖГВ: N=27 плацебо: N=9		После дозы 2 (день 56); ЖГВ: N=27 плацебо: N=7		После дозы 2 (день 112); ЖГВ: N=25 плацебо: N=7		Выявлено любым из методов	
		n (%)	95% CI	n (%)	95% CI	n (%)	95% CI	n (%)	95% CI
РТГА	ЖГВ H2N2	5 (18,5)	8,2–36,7	9 (33,3)	18,6–52,2	15 (60,0) [†]	40,7–76,6	16 (59,3)	40,7–75,5
	Плацебо	0	0,0–29,9	0	0,0–34,5	0	0,0–34,5	0	0,0–29,9
РМН	ЖГВ H2N2	8 (29,6)	15,9–48,5	12 (44,4) [†]	27,6–62,7	12 (48,0)	26,7–62,9	16 (59,3)	40,7–75,5
	Плацебо	0	0,0–29,9	0	0,0–34,5	0	0,0–34,5	0	0,0–29,9
ИФА – IgA в сыворотке	ЖГВ H2N2	2 (7,4)	2,1–23,4	14 (51,9) [†]	34,0–69,3	12 (48,0) [†]	30,0–66,5	14 (51,9)	34,0–69,3
	Плацебо	0	0,0–29,9	0	0,0–34,5	0	0,0–34,5	0	0,0–29,9
ИФА – IgG в сыворотке	ЖГВ H2N2	0	0,0–12,5	1 (3,7)	0,7–18,3	2 (8,0)	2,2–25,0	2 (7,4)	2,1–23,4
	Плацебо	0	0,0–29,9	0	0,0–34,5	0	0,0–34,5	0	0,0–29,9
ИФА – IgA в секретах носа	ЖГВ H2N2	6 (22,2)	10,6–40,8	11 (40,7)	24,5–59,3	н/д	н/д	13 (48,1)	30,7–66,0
	Плацебо	0	0,0–29,9	0	0,0–34,5	н/д	н/д	0	0,0–29,9
ИФА – IgA в слюне	ЖГВ H2N2	3 (11,1)	3,9–28,1	9 (33,3)	18,6–52,2	н/д	н/д	12 (44,4)	27,6–62,7
	Плацебо	0	0,0–29,9	0	0,0–34,5	н/д	н/д	0	0,0–29,9
Всего сероконверсий	ЖГВ H2N2	15 (55,6) [‡]	37,3–72,4	23 (85,2) [‡]	67,5–94,1	21 (84,0) [‡]	65,3–93,6	23 (85,2)	67,5–94,1
	Плацебо	0	0,0–29,9	0	0,0–34,5	0	0,0–34,5	0	0,0–29,9

CI, 95% доверительный интервал, рассчитанный по методу Wilson; н/д – не делали;

[†] доля лиц с сероконверсией антител в группе вакцинированных значительно выше, чем в группе плацебо ($p < 0.05$, Fisher exact test);

[‡] доля лиц с сероконверсией антител в группе вакцинированных значительно выше, чем в группе плацебо ($p < 0.005$, Fisher exact test)

Таблица 17. Средние геометрические величины титров (СГТ) сывороточных и секреторных антител у добровольцев, получивших ЖГВ Н2Н2 или препарат плацебо

Тест	Группа	СГТ				Кратность прироста СГТ*		
		День 0 ЖГВ: N=27 плацебо: N=9	День 28 ЖГВ: N=27 плацебо: N=9	День 56 ЖГВ: N=27 плацебо: N=7	День 112 ЖГВ: N=25 плацебо: N=7	День 28 / День 0	День 56 / День 0	День 112 / День 0
РТГА	ЖГВ Н2Н2	2.5	3.5	5.1	7.4	1.4 [†]	2.0 [‡]	3.0 [‡]
	Плацебо	2.5	2.5	3.0	2.8	1.0	1.2	1.1
РМН	ЖГВ Н2Н2	5.4	10.5	13.6	14.7	1.9 [‡]	2.5 [‡]	2.7 [‡]
	Плацебо	6.8	8.6	8.2	9.0	1.3	1.2	1.3
ИФА – IgA в сыворотке	ЖГВ Н2Н2	12.7	16.8	29.6	33.8	1.3 [†]	2.3 [‡]	2.4 [‡]
	Плацебо	13.7	16.0	14.5	13.1	1.2	0.9	0.8
ИФА – IgG в сыворотке	ЖГВ Н2Н2	10.9	11.8	11.8	14.3	1.1	1.1	1.3 [†]
	Плацебо	12.7	13.7	13.1	14.5	1.1	1.0	1.1
ИФА – IgA в секретах носа	ЖГВ Н2Н2	3.5	4.8	8.6	н/д	1.4	2.5 [†]	н/д
	Плацебо	10.9	6.9	8.8	н/д	0.6	1.0	н/д
ИФА – IgA в слюне	ЖГВ Н2Н2	3.1	3.3	6.7	н/д	1.1	2.2 [‡]	н/д
	Плацебо	3.7	3.2	4.4	н/д	0.9	1.2	н/д

*– кратность приростов СГТ антител рассчитаны только для лиц, доступных в указанные дни; н/д – не делали;

[†] СГТ антител после иммунизации значительно выше, чем СГТ до вакцинации (Wilcoxon Matched Pairs Test: p<0,05);

[‡] СГТ антител после иммунизации значительно выше, чем СГТ до вакцинации (Wilcoxon Matched Pairs Test: p<0,0005)

Таблица 18. СГТ сывороточных и секреторных антител у добровольцев, имеющих ≥ 4 -кратное увеличение титров антител после двух доз ЖГВ Н2Н2

Тест	n	СГТ после 2 дозы, День 56			прирост СГТ	n	СГТ после 2 дозы, День 112		
		День 0	День 56	СГТ			День 0	День 112	СГТ
РТГА	9	2.5	13.6	5.4	15	2.5	13.2	5.3	
РМН	12	5.0	20.0	4.0	12	5.0	20.0	4.0	
ИФА – IgA в сыворотке	14	8.8	41.0	4.7	12	9.0	47.9	5.3	
ИФА – IgA в секретах носа	13	1.9	12.9	6.8	н/д	н/д	н/д	н/д	
ИФА – IgA в слюне	12	3.6	14.3	4.0	н/д	н/д	н/д	н/д	

н/д, не делали.

С точки зрения анализа формирования полноценного поствакцинального клеточного иммунитета наиболее информативны данные об индукции Т-клеток иммунологической памяти, поскольку именно эти клетки определяют долговременную защиту от гриппа. По современным представлениям, Т-клетки иммунологической памяти делятся на два пула: центральные (Т_{cm}) и эффекторные (Т_{em}). Оба типа клеток формируют долгоживущую Т-клеточную память, но осуществляют это разными путями.

В таблице 19 приведены данные, отражающие продукцию разных субпопуляций вирусспецифических Т-клеток на иммунизацию ЖГВ H2N2 у добровольцев. На 6 день после первой иммунизации только у четырех человек (14,8%) отмечено увеличение уровня (%) CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, тогда как в отношении других субпопуляций Т-клеток конверсии отсутствовали. Через 28 дней после первой дозы вакцины количество конверсий тех или иных фенотипов Т-клеток составляло 7,4 – 11,1%. Спустя 28 дней после повторной иммунизации число конверсий изученных Т-клеток колебалось от 3,7 до 11,0%, а через 84 дня их число составило 4,0 – 36,0%.

Кумулятивные данные свидетельствуют, что после двукратной иммунизации число конверсий разных субпопуляций Т-клеток соответствовало 14,8 – 44,4%, а по совокупным данным о конверсиях тех же клеток их число составило в первой точке (6 дней после первой дозы) 11,1%, во второй (28 дней после первой дозы) – 22,2%, в третьей (28 дней после второй дозы) – 22,2% и в четвертой (84 дня после второй дозы) – 44,0%. Всего на двукратную иммунизацию кумулятивный Т-клеточный иммунный ответ зафиксирован у более чем половины привитых волонтеров (55,6%) (Табл. 19).

Суммарные данные по индивидуальным показателям иммунного ответа привитых волонтеров свидетельствуют, что абсолютное большинство лиц (93%) ответили на двукратную иммунизацию ЖГВ H2N2 тем или иным типом иммунного ответа, связанным с формированием В-клеточной (секреция антител) и Т-клеточной иммунологической памяти (Таблица 20).

Таблица 19. Т–клеточный иммунный ответ у волонтеров, привитых ЖГВ А(Н2N2)

Временные интервалы	Препарат	N	Число лиц с достоверным* увеличением уровня вирусспецифических клеток памяти						
			CD4+	CD4+ Tcm***	CD4+ Tem***	CD8+	CD8+ Tcm***	CD8+ Tem***	Всего
День 6 / День 0**	Вакцина	27	1 (3,7 %)	0	0	3 (11,1 %)	0	0	3 (11,1 %)
	Плацебо	10	0	0	0	0	0	0	0
День 28 / День 0**	Вакцина	27	2 (7,4 %)	2 (7,4 %)	3 (11,1 %)	3 (11,1 %)	2 (7,4 %)	3 (11,1 %)	6 (22,2 %)
	Плацебо	10	0	0	0	0	0	0	0
День 56 / День 0**	Вакцина	27	3 (11,1 %)	3 (11,1 %)	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	1 (3,7 %)	3 (11,1 %)	6 (22,2 %)
	Плацебо	7	0	0	0	0	0	0	0
День 112 / День 0**	Вакцина	25	5 (20,0 %)	1 (4,0 %)	2 (8,0 %)	3 (12,0 %)	3 (12,0 %)	9 (36,0 %)	11 (44,0 %)
	Плацебо	7	0	0	0	0	0	0	0
ВСЕГО	Вакцина	27	6 (22,2 %)	4 (14,8 %)	4 (14,8 %)	6 (22,2 %)	4 (14,8 %)	12 (44,4 %)	15 (55,6 %)
	Плацебо	10	0	0	0	0	0	0	0

* Достоверными считаются приросты, превышающие или равные среднему показателю по группе плацебо + 3 стандартных отклонения (SD).

** День 6 / День 0 – через 6 дней после вакцинации; День 28 / День 0 – через 28 дней после вакцинации; День 56 / День 0 – через 28 дней после ревакцинации;

День 112 / День 0 – через 84 дня после ревакцинации.

*** Tcm – Т–клетки центральной памяти; Tem – Т–клетки эффекторной памяти.

Таблица 20. Индивидуальные данные о наличии гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у волонтеров, привитых ЖГВ H2N2

ID#	Гуморальный (антитела) иммунный ответ							Т-клеточный иммунный ответ							Любой ответ
	РТГА	PMH	ИФА IgG	ИФА IgA	IgA назальн.	IgA слюна	любой	CD4+	CD8+	CD4+ Tcm	CD4+ Tem	CD8+ Tcm	CD8+ Tem	любой	
02	+	+		+	+		+								+
04		+			+	+	+					+	+	+	+
07	+	+		+		+	+	+	+			+	+	+	+
09									+					+	+
10	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11		+			+		+								+
14	+	+		+	+	+	+	+					+	+	+
15	+	+			+	+	+								+
18	+		+	+	+	+	+						+	+	+
21													+	+	+
23	+	+					+								+
25		+		+	+	+	+								+
26	+	+			+	+	+			+	+		+	+	+
27						+	+								+
31															
32	+	+	+	+	+		+								+
36	+	+		+			+								+
37	+			+			+								+
38	+	+		+			+	+		+				+	+
39	+			+	+		+						+	+	+
41		+					+				+		+	+	+
42				+	+		+	+		+			+	+	+
46	+	+					+		+		+	+	+	+	+
49	+			+	+	+	+	+	+				+	+	+
50	+			+		+	+		+					+	+
52															
54		+		+		+	+								+
Итого	16 (59.3%)	16 (59.3%)	2 (7.4%)	14 (51.9%)	13 (48.1%)	12 (44.4%)	23 (85.2%)	6 (22.2%)	6 (22.2%)	4 (14.8%)	4 (14.8%)	4 (14.8%)	12 (44.4%)	15 (55.6%)	25 (92.6%)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования было предложено два подхода к конструированию живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа А(Н2N2). С помощью данных подходов был успешно подготовлен ряд реассортантных вакцинных кандидатов из эпидемических вирусов, циркулировавших в человеческой популяции незадолго до вытеснения вирусов А(Н2N2) новым антигенным вариантом А(Н3N2). Полученные вакцинные штаммы А(Н2N2) которые были полностью охарактеризованы в системах *in vitro* и *in vivo*. Показана более высокая репродуктивная активность ЖГВ Н2N2, подготовленная на основе нового модифицированного донора аттенуации А/PR8/34/59/M2 (Н1N1) в системе РКЭ, по сравнению с аналогичной вакциной, подготовленной на классическом доноре аттенуации Лен/17. Эти данные свидетельствуют о перспективности использования нового донора аттенуации и в качестве донора высокой репродуктивности для подготовки вакцинных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины.

Интенсивные доклинические исследования, включающие оценку безвредности, иммуногенности, кросс-реактивности и способности обеспечивать перекрестную защиту лабораторных животных, позволили выбрать наиболее перспективный кандидат для проведения первой фазы клинических испытаний на волонтерах – ЖГВ из штамма А/17/Калифорния/66/395 (Н2N2).

Проведенные клинические испытания ЖГВ Н2N2 на добровольцах продемонстрировали хорошую переносимость вакцины при двукратном введении, способность реплицироваться в верхних дыхательных путях привитых, отсутствие передачи вируса невакцинированным лицам, а также ее генетическую стабильность. Изученная вакцина индуцировала иммунный ответ у большинства привитых волонтеров, хотя амплитуда гуморального иммунного ответа была достаточно низкой, что свойственно всем вакцинным штаммам, подготовленным из вирусов, с которыми привитые ранее не встречались, т.е. отсутствовало праймирование иммунной системы к данным антигенам. Однако среди представленных в литературе результатов клинических испытаний потенциально-пандемических вакцин подтипа Н2N2 полученные нами результаты указывают на высокую иммуногенность сконструированной ЖГВ Н2N2. Таким образом, в рамках настоящей работы были получены вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа А(Н2N2), которые, в случае возникновения пандемической ситуации, могут быть в кратчайшие сроки востребованы производством и использованы для защиты наиболее уязвимых групп населения в начале пандемической волны.

ГЛАВА 6 ПОДГОТОВКА, ДОКЛИНИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н7N9)

Вирусы гриппа Н7N9 относятся к наиболее вероятным возбудителям будущей пандемии, причем в циркуляции среди птиц присутствуют как низкопатогенные, так и высокопатогенные варианты данных вирусов. За сравнительно короткий период циркуляции вирусы Н7N9 претерпели достаточно серьезные эволюционные изменения, в связи с чем потребовалась разработка вакцинных штаммов ЖГВ против эволюционно-удаленных вирусов данного подтипа.

6.1 Подготовка вакцинного штамма ЖГВ из низкопатогенного вируса А(Н7N9) методом классической реассортации и изучение его биологических свойств

В настоящей работе методом классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах [1] был создан новый вакцинный штамм А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9). Данный штамм унаследовал поверхностные антигены от «дикого» вируса А/Ануи/1/2013 (Н7N9), а остальные шесть генов – от холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2). Поскольку исходный вирус Н7N9 является потенциально-пандемическим, работа по подготовке реассортантного вакцинного штамма проводилась в лаборатории повышенного уровня биобезопасности (BSL-3).

Секвенирование полного гена гемагглютинаина реассортантного штамма А/17/Ануи/2013/61 выявило две аминокислотные замены по сравнению с последовательностью вируса А/Ануи/1/2013 (Н7N9), доступной в базе данных GISAID: Asn-123-Asp и Asn-149-Asp, Н7 нумерация (или Asn-132-Asp и Asn-158-Asp по Н3 нумерации). Для того чтобы определить природу данных мутаций, т.е. являются ли они спонтанно возникшими в процессе реассортации, или они возникли в результате адаптации вируса к росту в развивающихся куриных эмбрионах, мы провели дополнительное секвенирование родительского вируса А/Ануи/1/2013 (Н7N9), имеющего различную пассажную историю: (а) вирус, прошедший 3, 4 или 5 пассажей в РКЭ (Е3, Е4 и Е5), (б) вирус, прошедший 3 пассажа в РКЭ, а затем один пассаж в культуре клеток MDCK (Е3М1). Электрофореграммы, полученные в результате секвенирования, показаны на рисунке 24. Интересно, что мутация в позиции 421 (Asn-123-Asp) возникала постепенно в процессе последовательного пассирования вируса в РКЭ, и после 4 пассажа оригинальная составляющая обнаруживалась лишь в малой части гетерогенной популяции (~5%), и совсем исчезала после 5 пассажа. Важно отметить, что один пассаж на культуре клеток млекопитающих (в частности, в культуре клеток MDCK) приводил к существенному восстановлению исходной популяции вируса, и гетерогенность в данном случае

наблюдалась на уровне 40%. Аналогичная ситуация наблюдалась в позиции 499: исходная составляющая 149-Asn обнаруживалась лишь у вируса, прошедшего пассаж на культуре клеток MDCK, тогда как все варианты, выращенные в РКЭ, содержали мутацию Asn-149-Asp, практически без примеси (Рис. 24). Полученные данные указывают на прямую зависимость между появлением мутаций Asn-123-Asp и Asn-149-Asp в гемагглютинине вируса A/Ануи/1/2013 (H7N9) и пассажами вируса в системе РКЭ, т.е. данные мутации являются адаптационными.

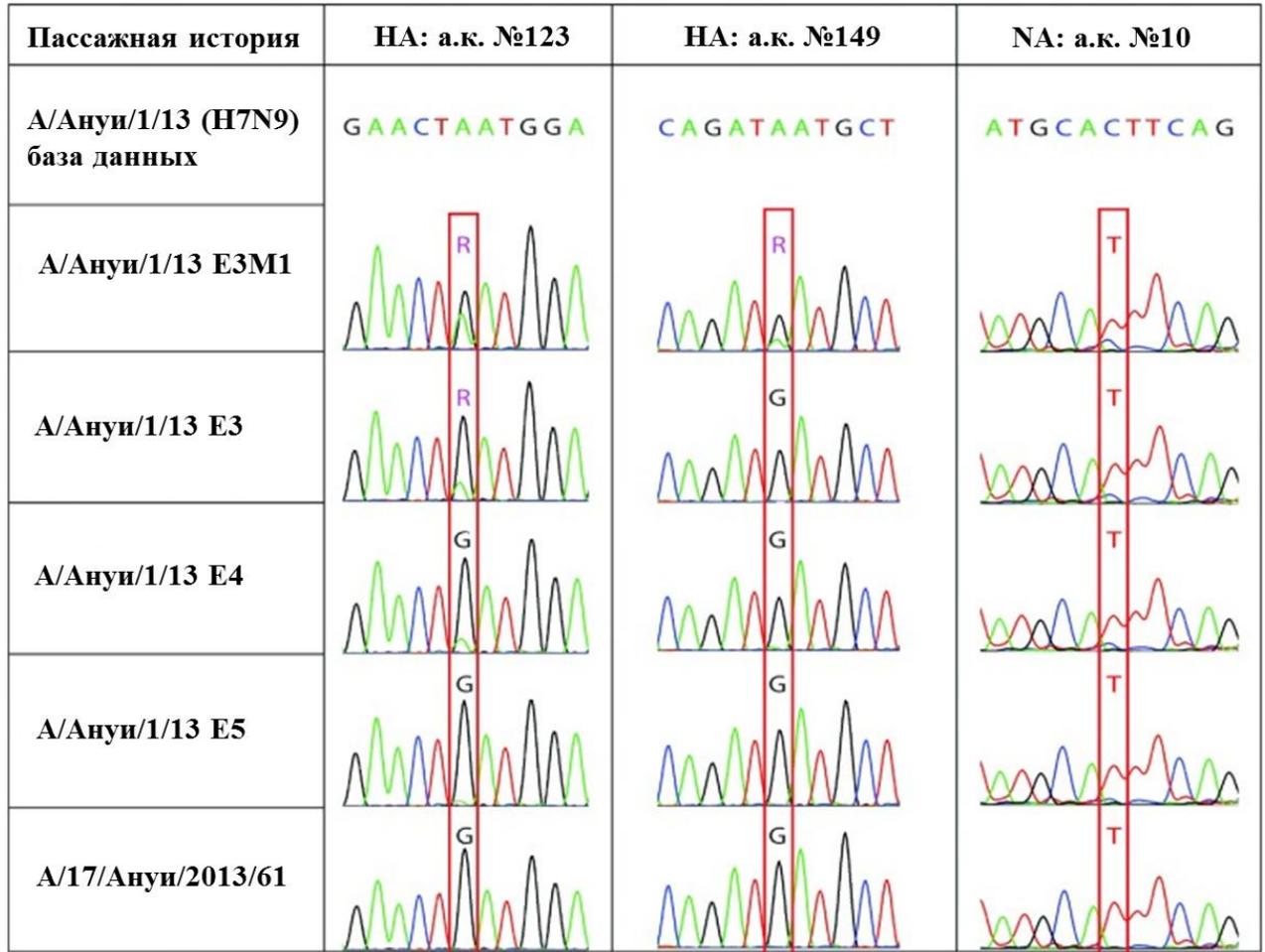


Рисунок 24. Мутации, возникающие в поверхностных антигенах вируса A/Ануи/1/2013 (H7N9) в результате адаптации к РКЭ. Указаны диаграммы секвенирующих реакций для генов гемагглютинина (нуклеотиды 421 и 499) и нейраминидазы (нуклеотид 29) вируса A/Ануи/1/2013 после ряда пассажей на РКЭ и одного пассажа на культуре клеток MDCK.

Секвенирование полного гена нейраминидазы реассортантного штамма A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) выявило одну аминокислотную замену, по сравнению с последовательностью «дикого» вируса A/Ануи/1/2013 (H7N9), доступной в базе данных GISAID: Thr-10-Phe. Данная мутация также является адаптационной, поскольку вариант вируса A/Ануи/1/2013, прошедший 5 пассажей в РКЭ, также содержал данную мутацию,

тогда как большая часть популяции вируса с пассажной историей E3 все еще содержала оригинальную аминокислоту Thr в этой позиции (Рис. 24). Таким образом, данная мутация в гене нейраминидазы, так же как и две мутации в гене гемагглютинина вируса А/Ануи/1/2013 (H7N9), являются неизбежными при подготовке вакцинного реассортанта методом классической реассортации в системе РКЭ. Важно отметить, что данные адаптационные изменения в молекуле гемагглютинина вируса А/Ануи/1/2013 (H7N9), связанные с адаптацией к клеткам куриных эмбрионов, были также описаны и в работах других авторов [107, 436].

В таблице 21 представлены показатели репродукции в РКЭ реассортантного вакцинного штамма А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) при разных температурах инкубации. Показано, что реассортант А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) проявлял высокую репродуктивную активность при оптимальной температуре инкубации 32°C. Подобно донорскому родительскому штамму А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), реассортантный вакцинный штамм А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) приобрел *ts*- и *ca*-фенотип. Он хорошо репродуцировался при пониженной до 26°C температуре и практически утратил способность к размножению при повышенной до 38-39°C температуры. Родительский вирус А/Ануи/1/2013 (H7N9), напротив, отличался температуроустойчивостью при 39°C и низкой репродукцией при 26°C.

Таблица 21. Репродуктивная активность реассортантного вакцинного штамма А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) и родительских вирусов в развивающихся куриных эмбрионах при различных температурах инкубации

Вирус	Инфекционная активность вирусов при указанной температуре, lg ЭИД ₅₀ /мл				Фенотип
	32°C	38°C	39°C	26°C	
А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	8.9±0.5	1.8±0.5	≤1.2	7.0±0.2	<i>ts, ca</i>
А/Ануи/1/2013 (H7N9)	9.0±0.6	9.0±0.5	8.2±0.4	3.5±0.8	<i>non-ts, non-ca</i>
А/17/Ануи/2013/61 (H7N9)	10.2±0.3	2.2±0.5	1.7±0.4	7.6±0.7	<i>ts, ca</i>

6.2 Оценка влияния мутаций в молекуле гемагглютинина вакцинного штамма ЖГВ А(Н7N9) на его основные биологические свойства

Несмотря на идентичность антигенных свойств реассортанта А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9) и родительского штамма А/Ануи/1/2013 (Н7N9), представлялось необходимым определить, какое влияние обнаруженные в молекуле гемагглютинина мутации могут оказывать на такие важные свойства вакцинного штамма, как его инфекционная активность, рецепторная специфичность, иммуногенность и защитная эффективность. Замена в нейраминидазе расположена в области трансмембранного домена и не связана с изменением антигенных свойств белка [38]. Напротив, замены в гемагглютинине расположены в области головки гемагглютинина: позиция 123 располагается в 120-петле рецептор-связывающего кармана [543], позиция 149 - в 150-петле, и входит в состав антигенного сайта В [176] (Рис. 25). По результатам анализа с использованием ESPript 3.0 (<http://endscript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) в молекулах НА разных подтипов вирусов гриппа в области, соответствующей 149 а/к позиции Н7, полипептидная цепь совершает поворот. Замены с подобной локализацией теоретически могут влиять на рецепторную специфичность, антигенные свойства и иммуногенность вакцинного штамма.

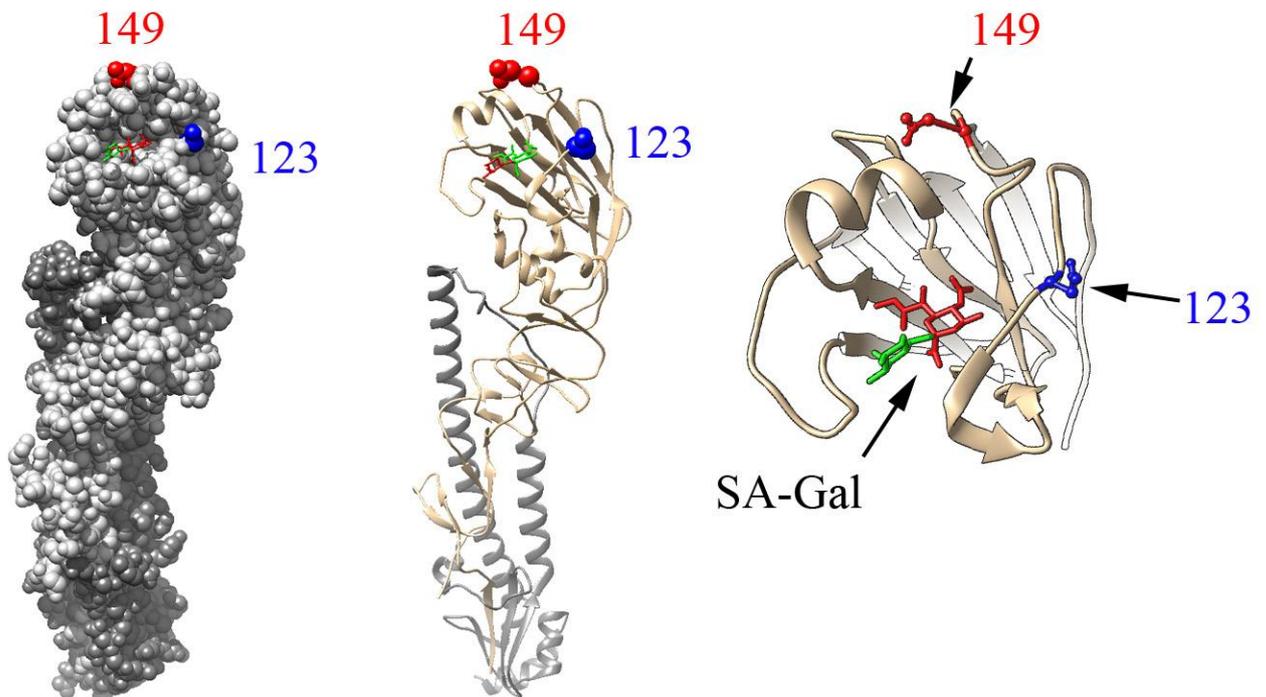


Рисунок 25. Расположение аминокислотных позиций 123 и 149 в гемагглютинине вируса гриппа Н7. Слева тример НА (Слева схематично показана поверхность мономера), в центре – схематичное изображение элементов структуры мономера, справа – крупное изображение рецептор-связывающего кармана с синтетическим аналогом человеческого рецептора вируса гриппа (SA-Gal). Выделены аминокислоты 123 и 149. Иллюстрация подготовлена на основе структуры PDBID 4BSE

Для оценки влияния данных мутаций на биологические свойства ЖГВ H7N9 методами геной инженерии были сконструированы два реассортантных вакцинных штамма H7N9, отличающиеся только по позициям 123 и 149 в молекуле HA (обозначенные как Anhui-123D/149D и Anhui-123N/149N). Кроме того, был сконструирован дополнительный вакцинный штамм на основе вируса A/Shanghai/1/2013 (H7N9), выделенного от человека одновременно с вирусом A/Ануи/1/2013, однако отличающийся набором мутаций в HA (Табл. 22). Поскольку у данного вируса мутации в HA также располагались в ключевых позициях, влияющих на рецепторную специфичность и антигенность вируса, представлялось интересным провести сравнительную оценку трех подготовленных нами холодоадаптированных реассортантов ЖГВ по фенотипическим признакам, показателям иммуногенности и защитной эффективности на модели мышей линии BALB/c. Стоит отметить, что нейраминидаза у всех штаммов была идентична (EPI439509), остальные 6 генов принадлежали донору аттенуации Лен/17.

Таблица 22. Отличия в последовательности гемагглютинина изученных штаммов вируса гриппа H7N9

HA	Номер позиции		Последовательность HA вирусов из базы данных				Последовательность HA вакцинных реассортантов					
			A/Ануи/1/2013 (EPI439507)		A/Шанхай/1/2013 (EPI744956)		Anhui-123D/149D		Anhui-123N/149N		Shanghai-RG	
	нукл	а/к	нукл	а/к	нукл	а/к	нукл	а/к	нукл	а/к	нукл	а/к
HA1	442	123	AAT	Asn	AAT	Asn	GAT	Asp	AAT	Asn	AAT	Asn
	457	128	GCA	Ala	TCA	Ser	GCA	Ala	GCA	Ala	TCA	Ser
	520	149	AAT	Asn	AAT	Asn	GAT	Asp	AAT	Asn	AAT	Asn
	569	165	AGC	Ser	AAC	Asn	AGC	Ser	AGC	Ser	AAC	Asn
	605	177	GTA	Val	GGA	Gly	GTA	Val	GTA	Val	GGA	Gly
	709	212	CCA	Pro	ACA	Thr	CCA	Pro	CCA	Pro	ACA	Thr
	725	217	CTA	Leu	CAA	Gln	CTA	Leu	CTA	Leu	CAA	Gln
	874	267	AAT	Asn	GAT	Asp	AAT	Asn	AAT	Asn	GAT	Asp
	895	274	CAT	His	TAT	Tyr	CAT	His	CAT	His	TAT	Tyr
HA2	1250	71	AAT	Asn	ACT	Thr	AAT	Asn	AAT	Asn	ACT	Thr
	1643	202	GTA	Val	GCA	Ala	GTA	Val	GTA	Val	GCA	Ala

6.2.1. Рецепторная специфичность вакцинных штаммов ЖГВ H7N9

Рецепторную специфичность вирусов оценивали в РГА с различными видами эритроцитов, содержащими $\alpha 2,6$ -, $\alpha 2,3$ -связанные сиаловые остатки, либо оба типа рецепторов. Исследование эффективности гемагглютинации штаммов с этими эритроцитами выявило сниженную способность штамма Anhui-123N/149N к связыванию с $\alpha 2,6$ -связанными остатками сиаловой кислоты. Штамм Anhui-123D/149D с одинаковой эффективностью агглютинировал эритроциты, содержащие как $\alpha 2,6$ -, так и $\alpha 2,3$ -связанные сиаловые остатки (Рис. 26А). Штамм Shanghai-RG не агглютинировал куриные эритроциты, обработанные экзосиалидазой, т.е. не обладал $\alpha 2,6$ рецепторной специфичностью. Эти данные указывают на то, что штамм Anhui-123D/149D, вероятно, будет более активно реплицироваться в верхних отделах респираторного тракта человека, чем другие штаммы ЖГВ H7N9, поскольку в них преимущественно представлены рецепторы $\alpha 2,6$ типа.

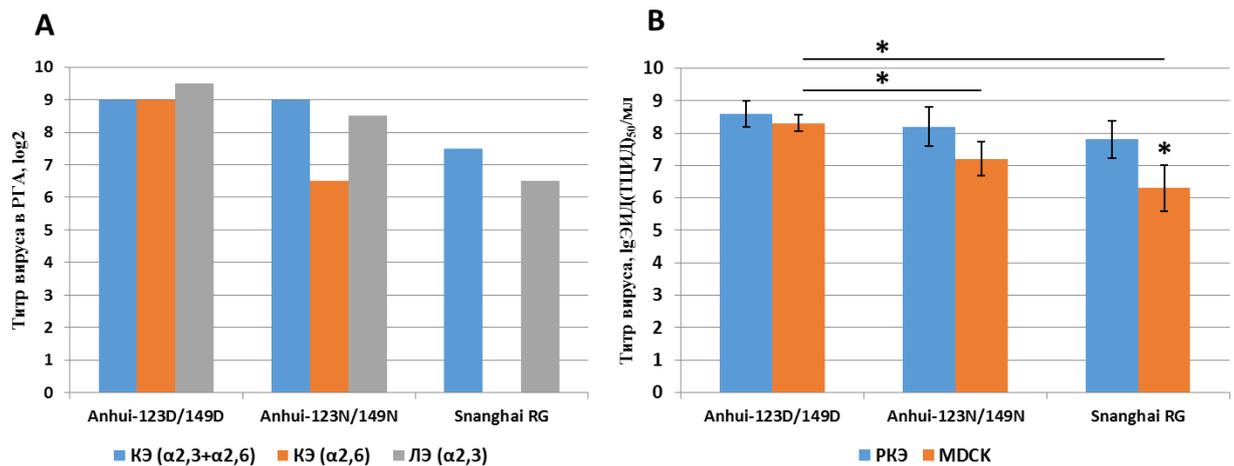


Рисунок 26. Фенотипические характеристики вакцинных штаммов H7N9 с отличиями в НА. **А.** Способность к связыванию с эритроцитами с разным набором сиалосодержащих молекул (КЭ ($\alpha 2,3+\alpha 2,6$) – куриные эритроциты, КЭ ($\alpha 2,6$) – модифицированные куриные эритроциты, ЛЭ ($\alpha 2,3$) – эритроциты лошади). **В.** репликация штаммов в РКЭ и культуре клеток MDCK. * $p < 0,05$ по сравнению с титром в РКЭ (критерий Манна-Уитни).

6.2.2. Инфекционная активность вакцинных штаммов ЖГВ H7N9 in vitro

Способность к репликации в РКЭ и культуре клеток MDCK у штамма Anhui-123D/149D не отличалась. Активность репликации штамма Anhui-123N/149N в РКЭ соответствовала вакцинному вирусу Anhui-123D/149D, однако титр вируса Anhui-123N/149N в культуре клеток был значительно ниже титра вируса Anhui-123D/149D. Штамм Shanghai-RG реплицировался в РКЭ на уровне, сопоставимом с двумя другими штаммами ЖГВ H7N9, тогда как в культуре клеток MDCK данный вирус размножался

хуже других вирусов; более того, инфекционный титр вируса в клетках был существенно ниже, чем титр в РКЭ ($p=0,023$) (Рис. 26В). Эти данные хорошо коррелируют с рецепторной специфичностью исследуемых вирусов и указывают на влияние аминокислотных замен в молекуле НА различные биологические свойства вакцинных штаммов ЖГВ H7N9.

6.2.3. Иммуногенность, кросс-реактивность и защитная эффективность вакцинных штаммов ЖГВ H7N9 для мышей линии BALB/c

Сравнительную оценку иммуногенности и защитной эффективности трех штаммов ЖГВ H7N9 проводили путем двукратной интраназальной иммунизации мышей линии BALB/c вакцинными вирусами в дозе $6,0 \text{ IgЭИД}_{50}$ с интервалом 21 день. Образцы сывороток крови забирали через 3 недели после второй дозы вакцины и оценивали титры антигемагглютинирующих антител к различным вариантам вируса H7N9, включая более поздний дрейфовый вариант A/Hong Kong/125/2017 (H7N9). Иммунизированных мышей на 42 день опыта подвергали челлендж-инфекции вирулентным вирусом A/Shanghai/2/2013-PR8 CDC-RG (реассортантный штамм, имеющий НА и NA гены от вируса A/Shanghai/2/2013, а шесть остальных генов от штамма A/PR8/34) и защитный эффект вакцинации оценивали по снижению вируса в легких мышей на 3 сутки после челленджа.

На третьи сутки после иммунизации мышей BALB/c штаммами Anhui-123D/149D, Anhui-123N/149N и Shanghai-RG у всех животных выявлена активная репликация вирусов в тканях носовых ходов, тогда как вирусы в легких практически не обнаруживались (Рис. 27).

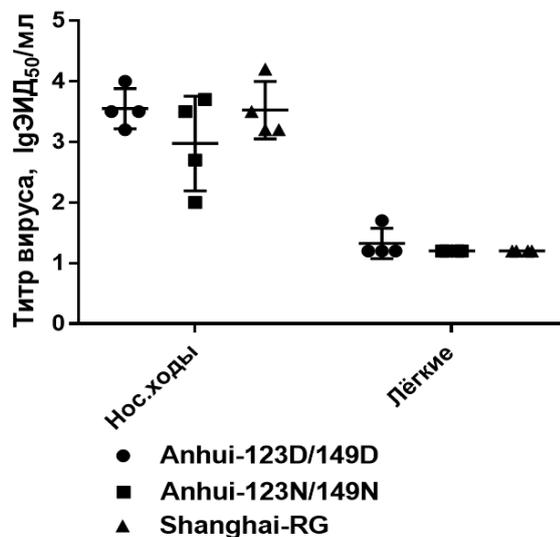


Рисунок 27. Репликация вакцинных штаммов в носовых ходах и в легких мышей на 3 сутки после вакцинации (точками показаны индивидуальные значения, чертой обозначено среднее значение).

После двукратной иммунизации у животных выявлялись достаточно высокие титры антигемагглютинирующих антител ко всем вирусным антигенам, при этом наиболее высокой иммуногенностью из трех исследованных штаммов обладал штамм Anhui-123D/149D, межгрупповые отличия были статистически достоверны (анализ Крускала-Уоллиса, $p < 0,05$) (Рис. 28). Сыворотки мышей, иммунизированных Anhui-123D/149D, с одинаковой интенсивностью подавляли агглютинацию эритроцитов вирусами Anhui-123D/149D и Anhui-123N/149N, что говорит о сохранении антигенных свойств штамма при появлении в молекуле НА адаптационных замен 123D/149D. Немаловажна способность антител, индуцируемых вакцинным штаммом Anhui-123D/149D, реагировать с дрейфовым вариантом вируса H7N9, выделенном в 2017 году.

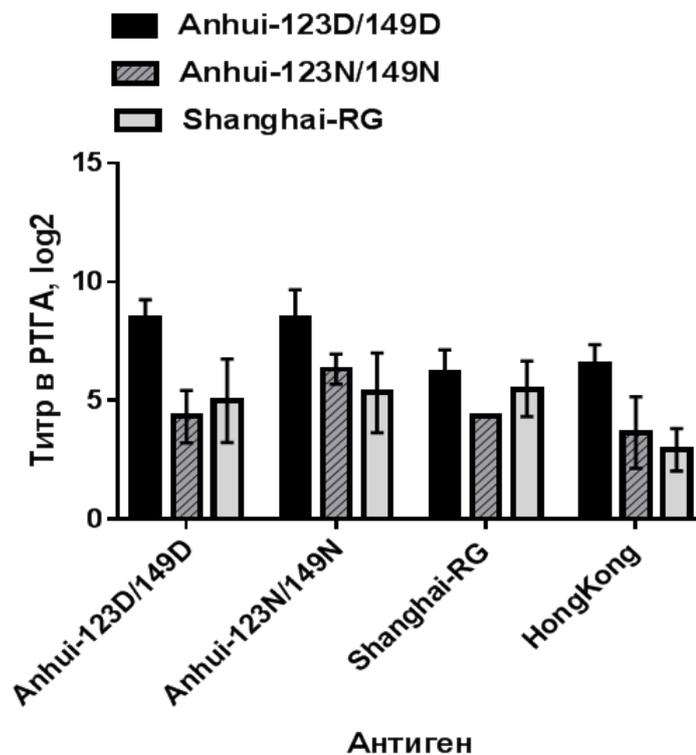


Рисунок 28. Титры антигемагглютинирующих антител к штаммам H7N9 на 21 сутки после второй иммунизации (данные в виде: средний титр в $\log_2 \pm$ стандартное отклонение).

Все исследованные штаммы ЖГВ H7N9 полностью защитили животных от заражения вирулентным вирусом Shanghai-PR8, тогда как в контрольной группе средний титр челлендж-вируса в легких составлял $6,53 \pm 0,47 \lg$ ЭИД₅₀/мл (Рис. 29).

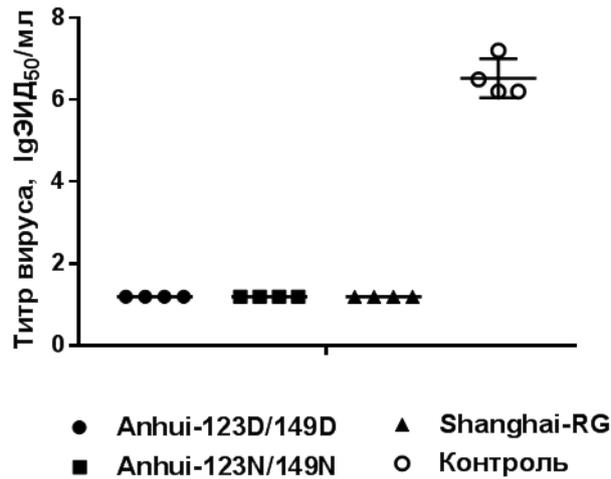


Рисунок 29. Титр вируса Shanghai-PR8 в легких иммунизированных и контрольных животных на 3 сутки после челленджа.

Суммарно, в проведенных экспериментах вариант штамма Anhui-123D-149D обладал более высоким сродством к $\alpha 2,6$ -рецепторам, по сравнению с другими изученными вариантами. Отсутствие антигенных отличий между вариантами 123D/149D и 123N/149N, полученное данным исследованием, совпадает с данными [107], а обнаруженная в эксперименте более высокая иммуногенность варианта 123D/149D является преимуществом при включении в состав ЖГВ. Anhui-123D-149D имеет двойную рецепторную специфичность, что позволяет ему эффективно реплицироваться в РКЭ, не изменяя антигенных свойств, а также стимулировать иммунный ответ при вакцинации.

Таким образом, вакцинный штамм A/17/Ануи/2013/61 (H7N9), полностью соответствующий по сиквенсу сконструированному вирусу Anhui-123D/149D, является наиболее перспективным для дальнейшего изучения в доклинических и клинических исследованиях.

6.3 Доклинические исследования вакцинного штамма A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) на модели хорьков

6.3.1. Оценка безвредности вакцинного штамма A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) на модели хорьков

Самки хорьков в возрасте 4-6 месяцев заражались интраназально вакцинным вирусом, взятым в дозе 10^7 ТЦИД₅₀, в объеме 0,5 мл. В качестве контрольных вирусов использовали родительские штаммы – A/Ануи/1/2013 (H7N9) и A/Ленинград/134/17/57 (H2N2 MDV). Для оценки степени аттенуации вакцинного штамма по три хорька из каждой группы подвергались эвтаназии на 4 сутки после заражения, а три оставшихся хорька эвтаназировали на 13 сутки после начала эксперимента.

Комплексные наблюдения (включая активность, чихание, летаргию, обонятельные и зрительные нарушения, диарею, неврологические симптомы и др) проводили за неделю до заражения и ежедневно после иммунизации. Температуру тела у всех животных измеряли при помощи имплантированных датчиков, которые считывают показания температуры тела каждые 30 минут. Уровни репликации вирусов в носовых смывах и мазках из зева определяли каждые 2 дня вплоть до 10 дня после заражения. Кроме того, определяли титр вируса в легких, трахее, носовых ходах, селезенке, мозговой ткани и кишечнике на 4 сутки после заражения.

На рисунках 30 и 31 приведены результаты выделения вирусов из носовых смывов, мазков из зева, а также из легких, трахеи, носовых ходов, селезенки, мозговой ткани и кишечника зараженных хорьков. У хорьков, зараженных «диким» вирусом H7N9 WT, высокие титры вируса обнаруживались как в носовых смывах, так и в мазке из зева, причем пик приходился на 2 сутки после заражения, а сам вирус обнаруживался вплоть до 10 суток после заражения (в мазке из зева). Вакцина ЖГВ H7N9 проявляла аттенуированный фенотип, поскольку репродукция вируса была отмечена только в верхних дыхательных путях: незначительные титры в носах только на 2 сутки после заражения, а в мазке из зева – в более высоком титре, но только до 4 суток после заражения. В контрольной группе H2N2 MDV низкие и средние титры вируса обнаруживались в носовых смывах и мазке из зева на протяжении 10 дней после заражения, что также указывает на аттенуацию (Рис. 30).

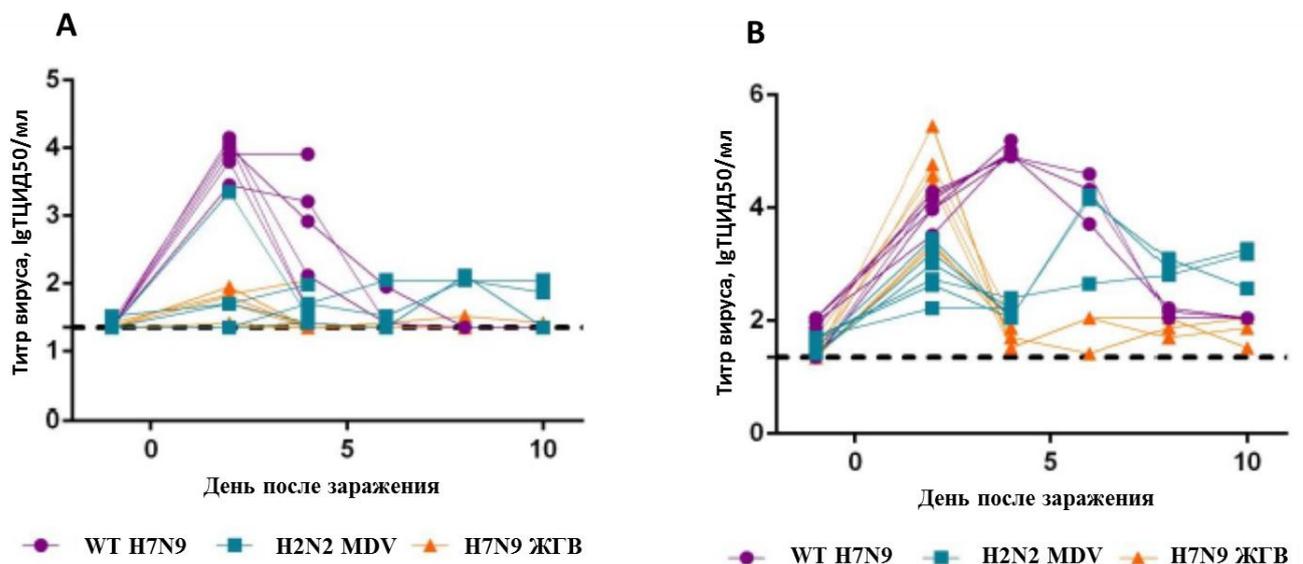


Рисунок 30. Динамика выделения инфекционного вируса в назальных смывах (А) и мазках и зева (В) хорьков, интраназально зараженных указанными штаммами.

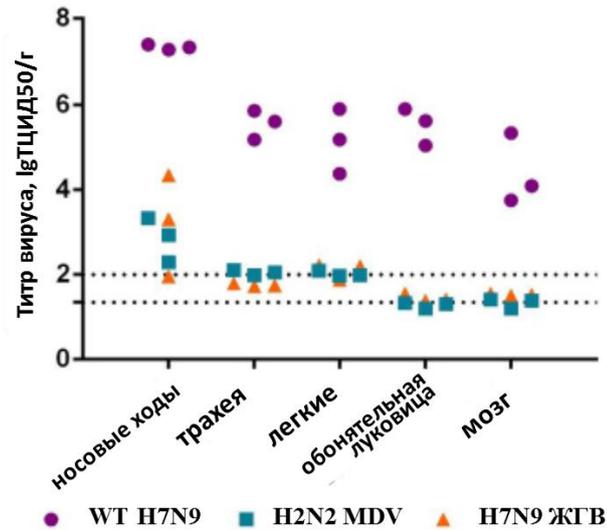
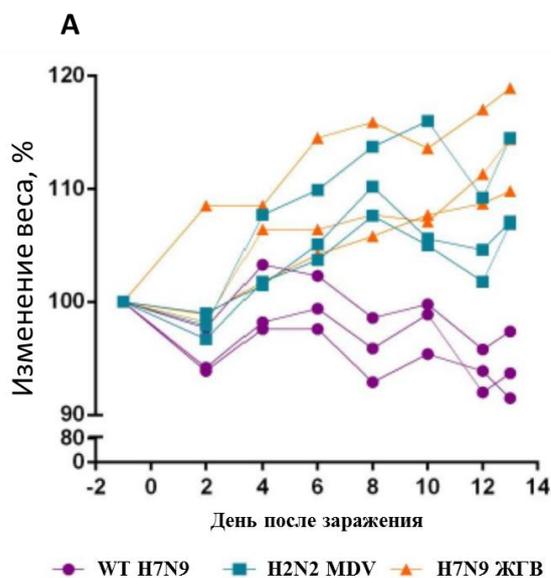


Рисунок 31. Выделение инфекционного вируса из органов хорьков на 4 сутки после интраназального заражения указанными штаммами.

На рисунке 32 приведена динамика изменения массы тела хорьков до заражения, и через каждые 2 дня после заражения. Хорьки, зараженные вирусом H7N9 WT, немного теряли в весе на протяжении всего периода наблюдения, при этом выздоровление не наступало к 13 суткам. В противоположность вирусу H7N9 WT, хорьки, зараженные холодаадаптированными вирусами ЖГВ H7N9 и H2N2 MDV, набирали в весе, что указывает на их аттенуированный фенотип. Показатель площадь под кривой (AUC) был ниже у хорьков группы H7N9 WT, по сравнению с двумя другими группами, однако из-за малой выборки достоверные различия в данном показателе между группами не выявлялись.



В

Группа	AUC (AU)	Макс. потеря веса, %
WT H7N9	1363 (29)	6,9 (2,4)
H2N2 MDV	1466 (40)	2,2 (1,2)
H7N9 ЖГВ	1497 (50)	1,5 (0,9)

Рисунок 32. Динамика изменения массы тела хорьков, интраназально зараженных указанными штаммами в дозе 10^7 ТЦИД₅₀.

Для статистической обработки показателей изменения температуры тела хорьков после заражения также использовали показатель AUC за период с 0 по 4 или с 0 по 13 сутки после начала эксперимента, относительно базового значения температуры. Кроме того, было учтено максимальное значение повышения температуры тела каждого животного за период с 0 по 4 сутки. Данные анализа представлены в таблице 23. Показано, что вирусы ЖГВ H7N9 и H2N2 MD статистически достоверно отличались от контрольной группы H7N9 WT и не вызывали лихорадки у зараженных животных.

Таблица 23. Анализ температуры тела хорьков после заражения исследуемыми вирусами

Группа	Вирус	Кол-во хорьков	Площадь под кривой (дни 0-4) ¹	Площадь под кривой (дни 0-13)	Максимальное повышение температуры (дни 0-4) ²
1a	H7N9 WT	5	3,7 ± 0,4		3,1 ± 0,2
1b		3		4,5 ± 1,6	
2a	H2N2 MD	5	0,3 ± 0,4*		1,4 ± 0,2*
2b		3		0,9 ± 1,3*	
3a	ЖГВ H7N9	5	0,7 ± 0,4*		1,6 ± 0,3*
3b		3		0,8 ± 1,7*	

¹Площадь под кривыми показателей датчиков температуры измерялась относительно базового значения температуры каждого животного и выражалась в виде среднего от всех животных в группе ± стандартное отклонение;

²Максимальное повышение температуры относительно базового значения температуры каждого животного, выраженное в виде среднего от всех животных в группе ± стандартное отклонение;

*достоверное отличие от контрольной группы №1 (p<0,05 по критерию Манна-Уитни).

На основании суммарных данных изучения репродукции вирусов в респираторных и системных органах, динамики изменения температуры тела и массы тела, изученных симптомов можно сделать заключение, что моновалентная ЖГВ H7N9 на основе донора аттенуации Лен/17 хорошо переносилась лабораторными животными и ее профиль репликации идентичен профилю репликации донора аттенуации. Таким образом, эксперименты на хорьках продемонстрировали безвредность и аттенуированный фенотип экспериментальной серии ЖГВ H7N9 из штамма A/17/Ануи/2013/61.

6.3.2. Оценка иммуногенности и защитной эффективности ЖГВ из штамма A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) на модели хорьков

Для оценки иммуногенности ЖГВ H7N9 проводили как однократную, так и двукратную иммунизацию хорьков путем интраназального заражения исследуемым вирусом, взятым в дозе 10⁷ ТЦИД₅₀, в объеме 0,5 мл. Как было показано в исследованиях

безвредности ЖГВ H7N9 на хорьках, на вторые сутки после заражения вакцинный вирус выделялся из мазков из зева в достаточно высоких титрах (Рис. 30). Однако после второй дозы (через 3 недели после первой дозы) вакцинный вирус у животных не обнаруживался, что указывает на нейтрализацию вируса антителами, выработанными на первичную иммунизацию. ЖГВ H7N9 индуцировала у хорьков высокие уровни сывороточных антигеммагглютинирующих, антинейраминидазных и вирус-нейтрализующих антител на 13, 20 и 23 сутки после первичной иммунизации, а также на 17 сутки после второй дозы вакцины (Рис. 33). На 7 сутки после иммунизации сывороточные антитела практически не обнаруживались, тогда как иммунный ответ достигал максимальных значений на 14 сутки (для антител, выявляемых в РТГА) и на 21 сутки (анти-NA и нейтрализующие антитела). Несмотря на повторную иммунизацию животных вакциной ЖГВ H7N9, уровни антигеммагглютинирующих и нейтрализующих антител незначительно снижались к 17 суткам после второй дозы, тогда как титры анти-NA антител увеличивались, хотя эти различия не были достоверными (Рис. 33).

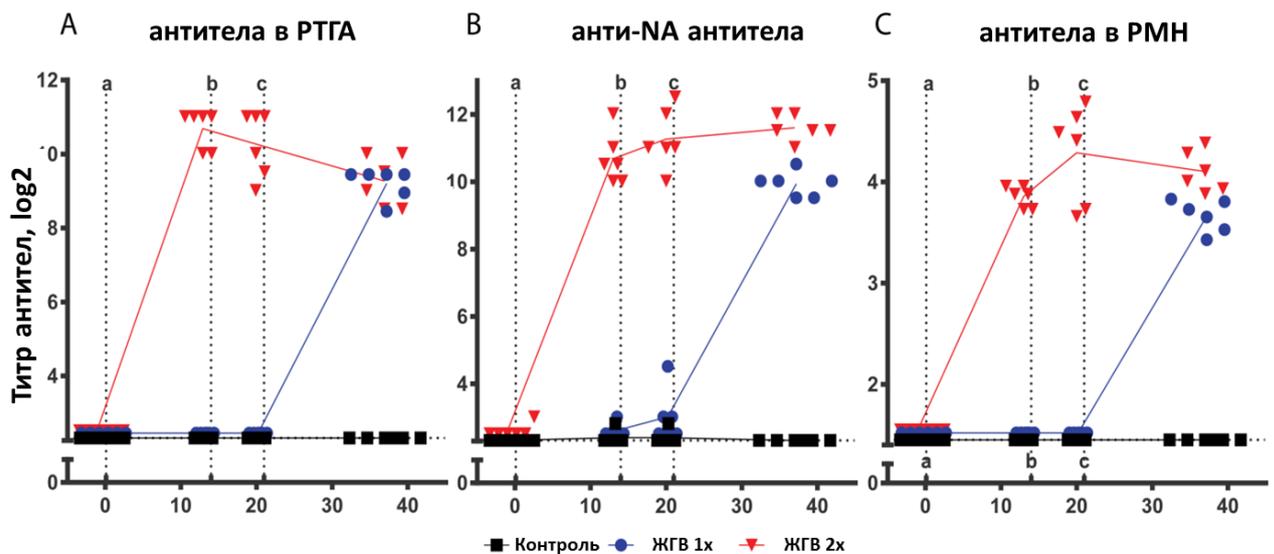


Рисунок 33. Уровни антигеммагглютинирующих (А), антинейраминидазных (В) и вирус-нейтрализующих (С) антител в сыворотках хорьков, иммунизированных однократно ЖГВ H7N9 (синие кружки), двукратно ЖГВ H7N9 (красные треугольники), или получивших препарат плацебо (черные квадраты). Титры анти-NA антител определили с использованием реассортантного штамма H6N9 (RN9/13-human). Вертикальные штрихованные линии означают: а. первая вакцинация при двукратном режиме 2хЖГВ; б. первая вакцинация при однократном режиме 1хЖГВ; с. вторая вакцинация при двукратном режиме 2хЖГВ.

Таким образом, ЖГВ H7N9 была высокоиммуногенна для хорьков, вызывала образование функциональных антител как к HA, так и к NA белку вируса, обладающих высоким уровнем вирус-нейтрализующей активности.

Поскольку при интраназальном способе заражения «дикий» вирус WT H7N9 вызывал у хорьков достаточно легкую форму заболевания [70, 564], далее для оценки защитного эффекта ЖГВ H7N9 использовали модель интратрахеального заражения хорьков вирусом гриппа. Предварительные эксперименты по поиску оптимальной дозы челлендж-вируса WT H7N9 на хорьках позволили выбрать дозу 10^7 TCID₅₀, которая стабильно вызывала тяжелую пневмонию у животных, что согласуется с ранее опубликованной работой [277]. Поскольку при такой модели заражения болезнь прогрессировала очень быстро, эксперимент прерывали на 3 сутки после челленджа, чтобы иметь возможность сравнить конечные параметры между исследуемыми группами.

Животные группы плацебо, зараженные интратрахеально челлендж-вирусом WT H7N9, проявляли признаки тяжелого заболевания уже на 2-3 сутки после заражения, становясь неактивными и переходя на преимущественно диафрагмальное дыхание. Три из 6 животных в группе пали до окончания эксперимента. В отличие от контрольной группы, животные, вакцинированные ЖГВ H7N9, практически не проявляли клинических симптомов заболевания, и ни один из хорьков не погиб от инфекции (Табл. 24).

Таблица 24. Клинические симптомы и выживаемость хорьков в течение 3 суток после заражения вирусом WT H7N9

Группа	Нарушение активности, баллы/число наблюдений (среднее)	Нарушение функции дыхания, баллы/число наблюдений (среднее)	Смертность (n/d.p.c.)
Плацебо	19/21 (0,90)	18/21 (0,86)	3/6 (1/2; 2/3)
ЖГВ H7N9 1х	6/24 (0,25)*	3/24 (0,13)*	0/6
ЖГВ H7N9 2х	4/24 (0,17)*	7/24 (0,29)*	0/6

* $p < 0.01$ по сравнению с группой плацебо;

Активность и функцию дыхания животных оценивали по следующей шкале: 0=активный; 1=активный при стимуляции; 2=неактивный и 3=летаргичный; 0=нормальное дыхание; 1=быстрое дыхание и 2=тяжелое, диафрагмальное дыхание. d.p.c. день после челленджа.

Менее чем через сутки после заражения у животных группы плацебо регистрировался серьезный подъем температуры тела, который продолжался в течение суток, после чего температура немного снижалась, и заново поднималась на следующие сутки (Рис. 34, А.1). В течение трех суток после челленджа температура тела контрольных животных превышала базовые значения в среднем на $\sim 1.2^\circ\text{C}$, при этом максимальные значения достигали 3°C выше нормы (Табл. 25). В группах хорьков, получивших одну или две дозы ЖГВ H7N9, регистрировался лишь легкий подъем температуры после челленджа (Рис. 34, А.2, А3). Вакцинация существенно снизила средний показатель повышения температуры тела на $0.7-0.8^\circ\text{C}$, при этом максимальный подъем температуры не превышал 1.6°C (Табл. 25). Животные из группы плацебо теряли 5-15% массы тела к третьему дню

после челленджа (Рис. 34, В), при этом среднее значение потери веса составило 8% (Табл. 25). Эти эффекты были значительно снижены ($p < 0.05$ для группы ЖГВ Н7N9 1х и $p < 0.01$ для группы ЖГВ Н7N9 2х) у вакцинированных животных (Табл. 25). Несколько хорьков, привитых ЖГВ Н7N9 однократно, начали терять вес к 3 дню после челленджа, тогда как вес хорьков, привитых двукратно, был стабилен (Рис. 34, В). Таким образом, иммунизация ЖГВ Н7N9 предотвращала развитие лихорадки и потерю веса у зараженных хорьков. Стратегия двукратной иммунизации представляется более эффективной в защите от инфекции вирусом WT Н7N9, чем однократная иммунизация, хотя эти различия не были достоверными.

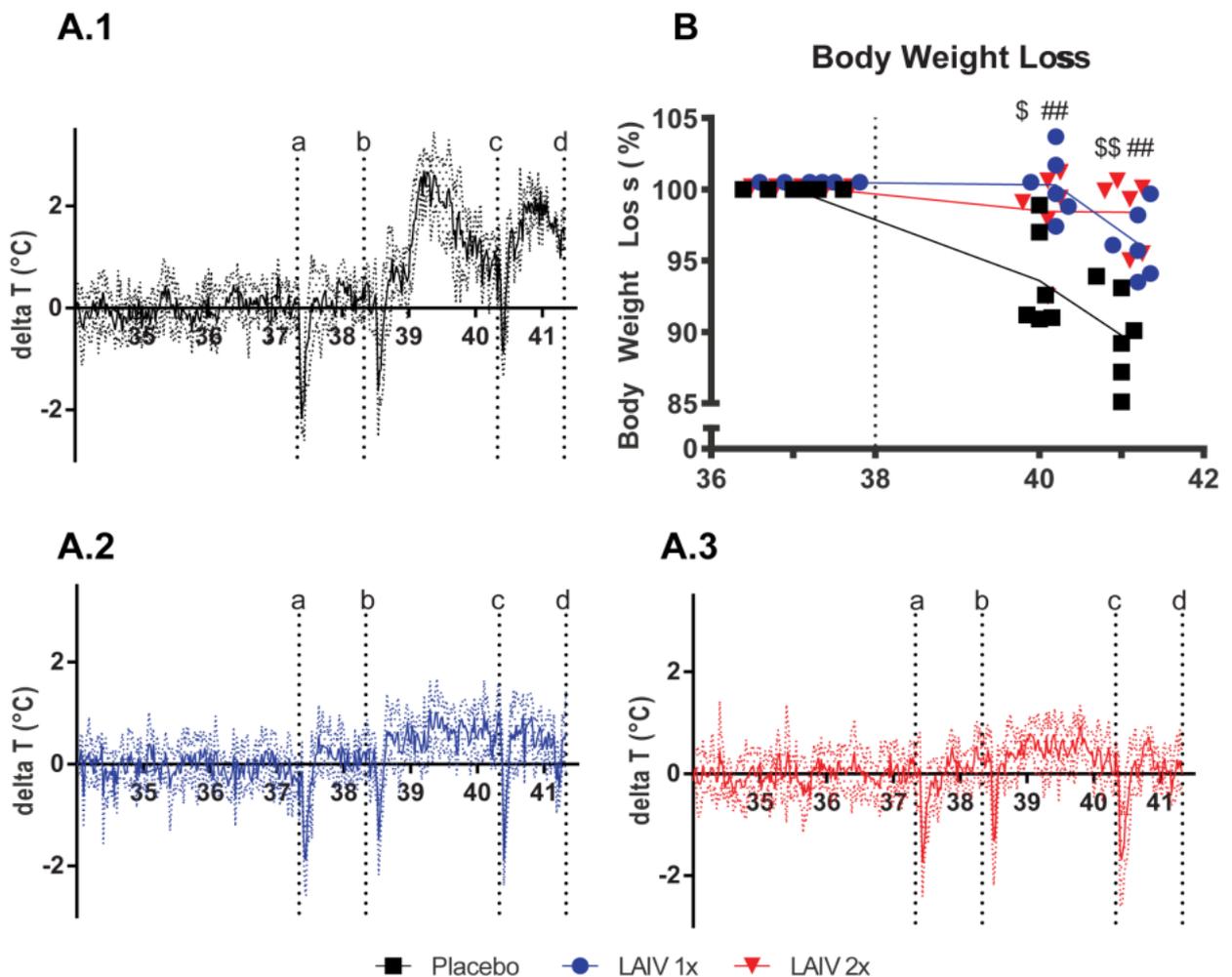


Рисунок 34. Динамика изменения температуры тела и веса хорьков после челленджа. А.1 плацебо; А.2 ЖГВ Н7N9 1х; А.3 ЖГВ Н7N9 2х. Вертикальные штрихованные линии обозначают процедуры, при которых у хорьков снижается температура тела: а. забор смывов и взвешивание до челленджа; б. челлендж; с. забор смывов и взвешивание; д. эвтаназия. Представлены изменения массы по отношению к базовому уровню (В). Плацебо (черные квадраты), ЖГВ Н7N9 1х (синие кружки), ЖГВ Н7N9 2х (красные треугольники). # или \$ $p < 0.05$; ## или \$\$ $p < 0.01$ обозначают различие ЖГВ Н7N9 1х и ЖГВ Н7N9 2х по отношению к плацебо, соответственно (критерий Манна-Уитни).

Таблица 25. Анализ температуры тела и веса хорьков после челленджа вирусом WT H7N9

Группа	Средние значения изменений		Максимальные значения изменений	
	ΔT ($^{\circ}C$) / n	Δ вес (%) / n	Max ΔT ($^{\circ}C$) / n	Max Δ вес (%) / n
Плацебо	1.21 (0.21) / 4	-8.1 (3.62) / 5	3,07 (0.29) / 5	-10.3 (3.78) / 5
ЖГВ H7N9 1x	0.47 (0.18)** / 6	-2.2 (2.21)* / 6	1,62 (0.24)** / 6	-4.3 (2.37)* / 6
ЖГВ H7N9 2x	0.37 (0.19)** / 6	-1.8 (2.68)** / 6	1,41 (0.27)** / 6	-2.6 (3.01)** / 6

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ обозначают отличие от группы плацебо (критерий Манна-Уитни).

После интратрахеального заражения вирус WT H7N9 реплицировался до высоких титров у животных группы плацебо как в глотке (на 2 и 3 сутки после челленджа), так и в трахее и тканях легких (3 день, Рис. 35). Как однократная, так и двукратная иммунизация индуцировала стерильный иммунитет, поскольку челлендж-вирус не обнаруживался в легких и трахее иммунизированных животных, и лишь у трех хорьков обнаруживался в незначительных титрах в мазке из зева (Рис. 35).

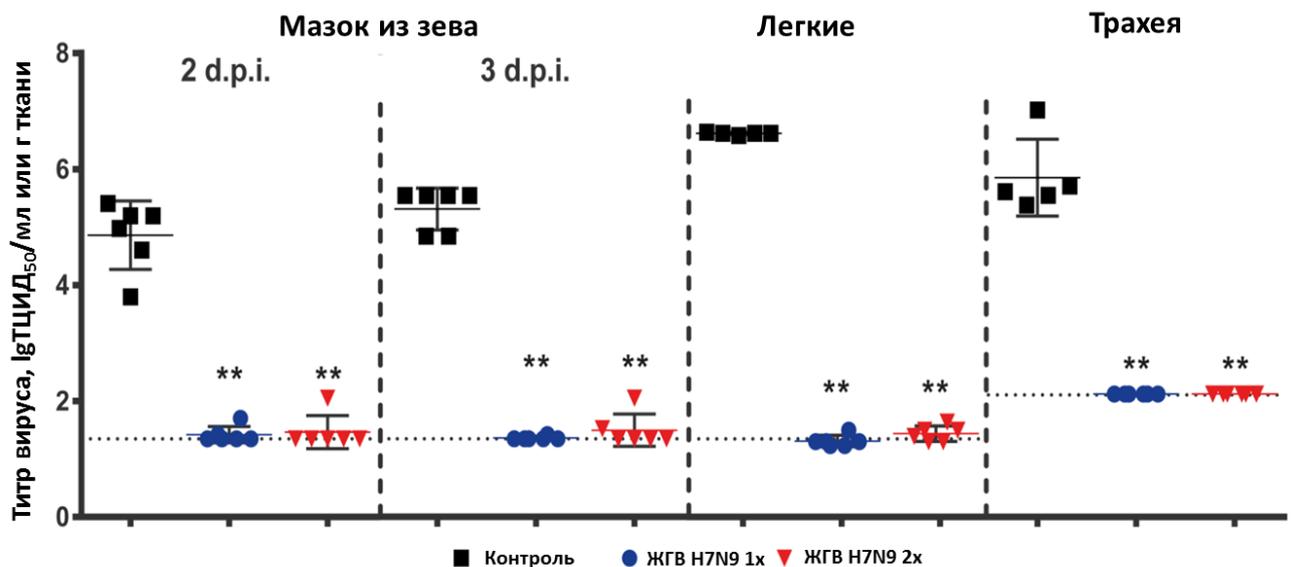


Рисунок 35. Размножение вируса WT H7N9 в респираторном тракте хорьков. Титры вируса в мазке из зева на 2 и 3 сутки после челленджа, а также в трахее и легких на 3 сутки после челленджа, в группе плацебо (черные квадраты), ЖГВ H7N9 1x (синие кружки) и ЖГВ H7N9 2x (красные треугольники). Пунктирной линией указаны уровни детекции вируса. ** $p < 0.01$ по сравнению с группой плацебо (критерий Манна-Уитни).

Оценка макро- и микроскопических изменений в легких иммунизированных и контрольных животных также указывают на защитный эффект вакцинации. Через три дня после заражения легкие 4 из 6 плацебо-иммунизированных хорьков были опухшими, выглядели опалесцирующими и имели темно-красные повреждения, которые в крайних случаях затрагивали практически все легкие (Рис. 36, А.1 и В). Один хорек группы плацебо имел относительно нормальный макроскопический вид легкого, и один хорек

имел умеренно пораженное легкое. Это различие может быть следствием времени, так как животные были умерщвлены на 3 сутки после заражения и тяжелая пневмония, возможно, еще не успела развиться до такой степени, чтобы быть макроскопически видимой. Несмотря на это, титры вируса в дыхательных путях этих двух животных были сопоставимы с макроскопически тяжело пораженными хорьками, что подтвердило успешную челлендж-инфекцию. Из-за наличия отека в легких вес легких увеличивался почти в три раза по сравнению с исходными данными (Рис. 36, С).

Макроскопические поражения легких, описанные для группы плацебо, отсутствовали у хорьков, привитых ЖГВ Н7N9 как однократно, так и двукратно. У вакцинированных животных были видны лишь несколько небольших пятен на поверхности легких (<10%) (Рис. 36, А.2, А.3 и В), а относительный вес легких был значительно ниже, чем у группы плацебо (Рис. 36, С).

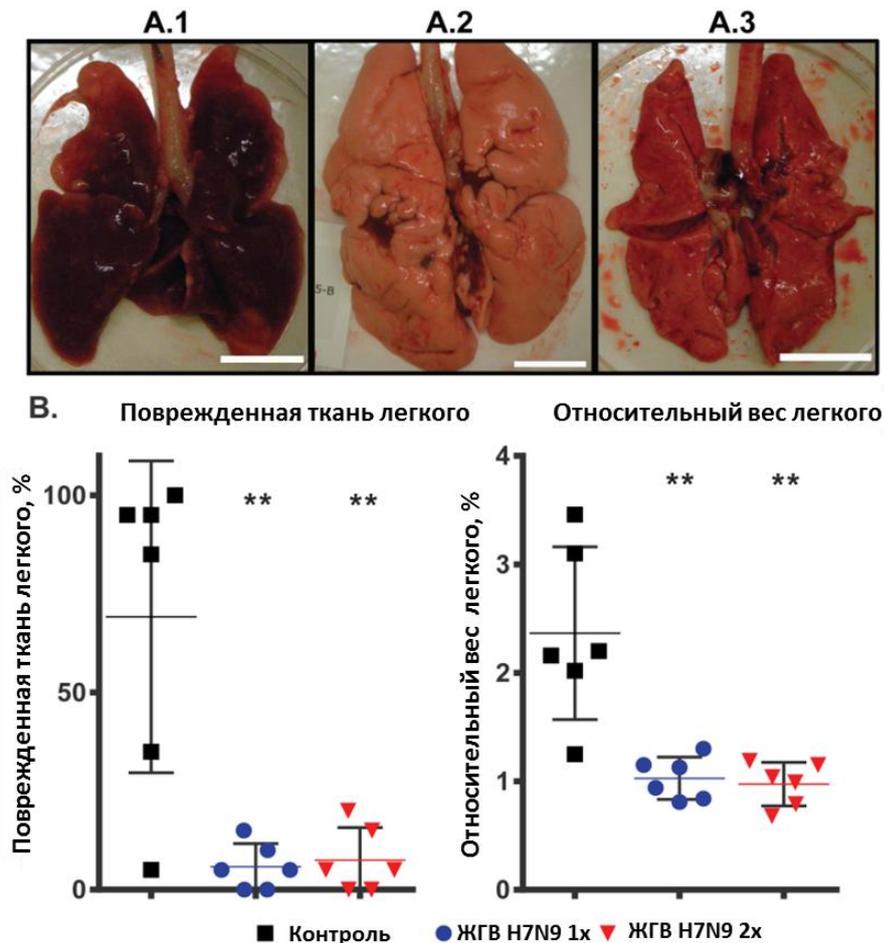


Рисунок 36. Поражение легких на макроскопическом уровне. Репрезентативные изображения легких (дорзальный вид) хорьков из группы плацебо (А.1), ЖГВ Н7N9 1x (А.2) и ЖГВ Н7N9 2x (А.3). Белая линия = 2 см. (В). Площадь поражения легких (темно-красный цвет). (С). Относительный вес легкого (RLW) рассчитывали как отношение (в %) веса легкого на 3 сутки после челленджа к весу тела на момент заражения. ** $p < 0,01$ по сравнению с плацебо (критерий Манна-Уитни).

Гистопатологический анализ легких показал, что после интратрахеального заражения вирусом WT H7N9 у 5 из 6 плацебо-вакцинированных хорьков развилась тяжелая легочная патология, характеризующаяся бронхопневмонией от умеренной до сильной и средней, интерстициальной и альвеолярной пневмонии (Рис. 37, А.1). Просветы бронхов на всем протяжении среза были заполнены экссудатом, а бронхиолы воспалены. Часто наблюдался некроз и слущивание бронхиолярного эпителия. Наблюдалась выраженная гиперемия, а альвеолярное пространство было отечным, заполнено фибрином и большими скоплениями полиморфноядерных лейкоцитов. Тяжесть и количественное выражение легочной патологии значительно уменьшались в группе хорьков, получивших одну дозу вакцины ЖГВ H7N9, и дополнительно уменьшались в группе, иммунизированной двукратно. Остаточная патология характеризовалась легким перибронхиолитом и периваскулитом, которые были менее выражены в группе ЖГВ H7N9 2х, чем в группе ЖГВ H7N9 1х (Рис. 37, А.1, А.2). Умеренная гипертрофия альвеолоцитов II типа наблюдалась в группе ЖГВ H7N9 1х и в меньшей степени в группе ЖГВ H7N9 2х. Общая патология выражалась в баллах (Рис. 37, В) и определялась на основании степени повреждения и воспаления и количества вовлеченной ткани, используя диапазон оценки от 0 (без aberrаций) до 5 (сильно поражены). Эти оценки показывают, что обе стратегии вакцинации значительно уменьшают патологию легких и что более эффективной является стратегия двукратной иммунизации, хотя достоверной разницы между вакцинными группами выявлено не было. Это также отражалось на пропорции пораженной ткани, которая значительно снижается по сравнению с хорьками, получившими препарат плацебо (Рис. 37, С).

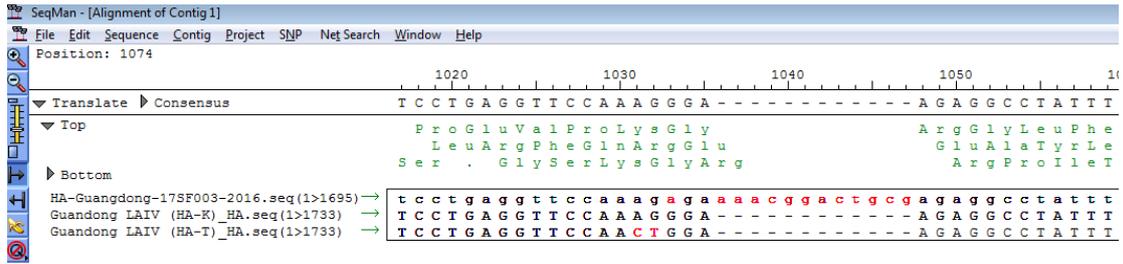
и NA вируса А/Гуандонг/17SF003/2016 (H7N9), при этом в молекуле гемагглютинина были удалены 4 основные аминокислоты из кливездж-сайта молекулы (Табл. 26). Плазмидные ДНК, кодирующие HA и NA гены вируса в составе вектора pUC19, были любезно предоставлены профессором Othmar Engelhardt, NIBSC (Великобритания). Для сборки вакцинного вируса на начальном этапе было проведено субклонирование генов вируса H7N9 в вектор для обратной генетики pCIPolISapIT путем амплификации генов с помощью универсальных праймеров [207] и последующим клонированием в указанный вектор по сайтам рестрикции SapI. Поскольку интактная нейраминидаза вируса А/Гуандонг/17SF003/2016 (H7N9) содержала маркер устойчивости к нейраминидазным ингибиторам (аминокислота лизин в позиции 292), субклонирование гена NA было совмещено с целенаправленным точечным мутагенезом, в результате которого была внесена мутация K292R. Мутагенез проводили путем перекрывающейся ПЦР с использованием праймеров (F: ACC TGC ACA TGC AGG GAC AAT TGG CAG; R: CCA ATT GTC CCT GCA TGT GCA GGT AAT C). Клонированные гены HA и NA (K292R) были полностью секвенированы для подтверждения идентичности их нуклеотидных последовательностей.

Таблица 26. Аминокислотная последовательность кливездж-сайта молекулы гемагглютинина вирусов гриппа А(H7N9)

Вирус	Аминокислотная последовательность кливездж-сайта
А/Ануи/1/2013	M K N V P E I P K - - - - G R ↓ G L F G A
А/Гуандонг/17SF003/2016	M K N V P E V P K R K R T A R ↓ G L F G A
А/Гуандонг/17SF003/2016 (ΔHA)	M K N V P E V P K - - - - G R ↓ G L F G A
А/17/Гуандонг/2016/62	M K N V P E V P K - - - - G R ↓ G L F G A

Путем трансфекции сертифицированной линии клеток Vero набором из восьми плазмид был получен вакцинный штамм А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9), содержащий модифицированные HA и NA гены вируса А/Гуандонг/17SF003/2016 и шесть остальных генов от донора аттенуации Лен/17. Инфекционный вирус далее накапливали в SPF развивающихся куриных эмбрионах и хранили в аликвотах при -70°C для дальнейших исследований. Полногеномное секвенирование подтвердило идентичность всех восьми генов вакцинного штамма исходным генам, закодированным в плазмидных ДНК. В частности, было подтверждено отсутствие четырех основных аминокислот в кливездж-сайте молекулы HA (Рис. 38А), а также наличие внесенной мутации K292R в молекуле NA (Рис. 38В).

A



B.

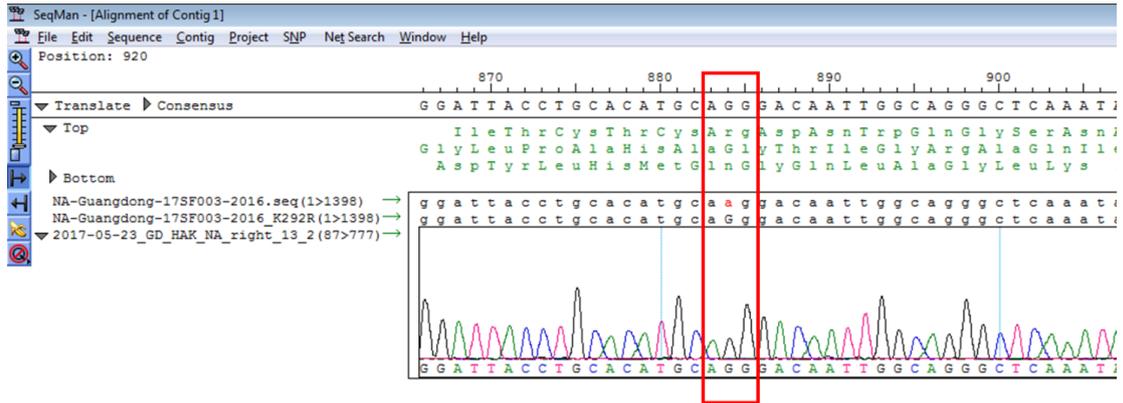


Рисунок 38. Результаты секвенирования генов HA (A) и NA (B) вакцинного штамма A/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) [обозначен на рисунке как Guangdong LAIV HA-K]. В рамке выделена позиция 292 молекулы нейраминидазы.

Важно отметить, что полученный генно-инженерным путем вакцинный штам A/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) активно реплицировался в развивающихся куриных эмбрионах и по фенотипическим характеристикам полностью соответствовал донору аттенуации Лен/17: штамм активно реплицировался при пониженной до 26°C температуре, но при этом слабо размножался при повышенных до 38-39°C температурах (рисунок 40).

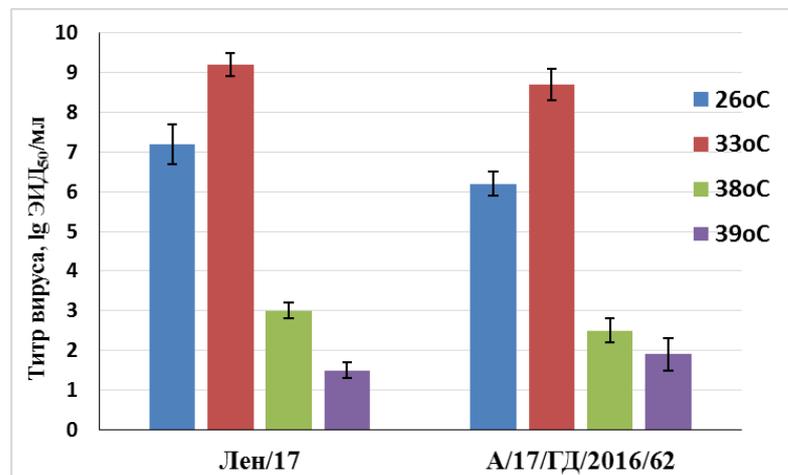


Рисунок 39. Инфекционная активность вакцинного штамма A/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) в РКЭ при различных температурах инкубации в сравнении с донором аттенуации Лен/17.

Доклинические исследования безвредности и иммуногенности вакцинного штамма А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) проводили на хорьках, для чего животных заражали интраназально вакцинным вирусом, взятым в дозе 10^7 ЭИД₅₀, в объеме 0,5 мл в каждую ноздрю. В качестве контроля служила группа интактных хорьков, которым вводили препарат плацебо (PBS). Для оценки степени аттенуации вакцинного штамма по три хорька из каждой группы подвергались эвтаназии на 3 сутки после заражения, а пять оставшихся хорьков использовали для повторной иммунизации аналогичным вирусом на 21 сутки эксперимента. Комплексные наблюдения (включая активность, чихание, летаргию, обонятельные и зрительные нарушения, диарею, неврологические симптомы и др) проводили за неделю до заражения и ежедневно в течение 3 недель после иммунизации. Температуру тела у всех животных измеряли при помощи имплантированных датчиков, которые считывают показания температуры тела каждые 30 минут. Уровни репликации вирусов в носовых смывах и на 1, 3 и 5 сутки после заражения. Кроме того, определяли титр вируса в легких на 3 сутки после заражения.

Вакцинный штамм А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) проявлял выраженный аттенуированный фенотип на модели хорьков: вирус выделялся в высоких титрах из верхних дыхательных путей вплоть до 5 суток после вакцинации, тогда как инфекционный вирус не детектировался в легких на 3 сутки после введения вакцины (Рис. 40). Однако после второй иммунизации вакцинный вирус у животных не обнаруживался, что указывает на нейтрализацию вируса антителами, выработанными на первичную иммунизацию.

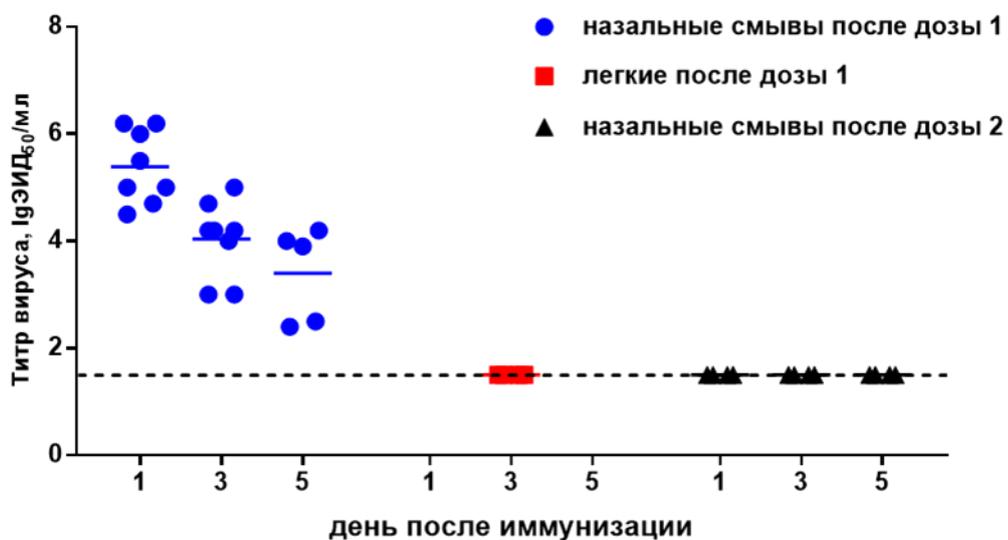


Рисунок 40. Выделение вакцинного вируса из верхних и нижних дыхательных путей хорьков, иммунизированных одной или двумя дозами ЖГВ из штамма А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9).

Оценка клинической картины у иммунизированных хорьков также не выявила симптомов заболевания после однократной вакцинации: животные не теряли в весе (Рис. 41), а максимальный подъем температуры тела не превышал $0,5^{\circ}\text{C}$ (Рис. 42). Полуколичественный анализ состояния легких и бронхиального дерева хорьков на 3 сутки после иммунизации не выявил значительных патологических отличий от контрольной группы (Табл. 27). Таким образом, вакцинный штамм, подготовленный методами обратной генетики из высокопатогенного вируса гриппа H7N9, был безвреден для хорьков при интраназальном введении.

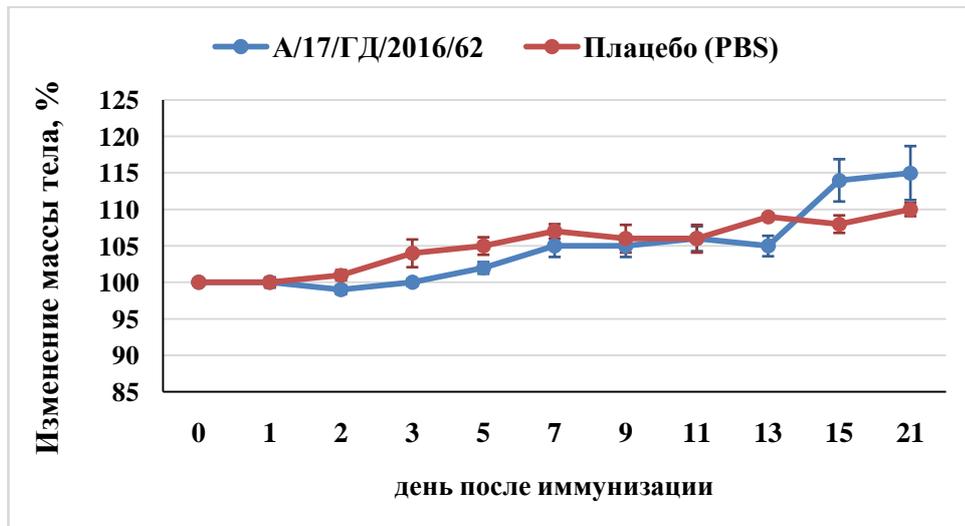


Рисунок 41. Изменение массы тела у хорьков, иммунизированных однократно ЖГВ А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9), в сравнении с животными группы плацебо.

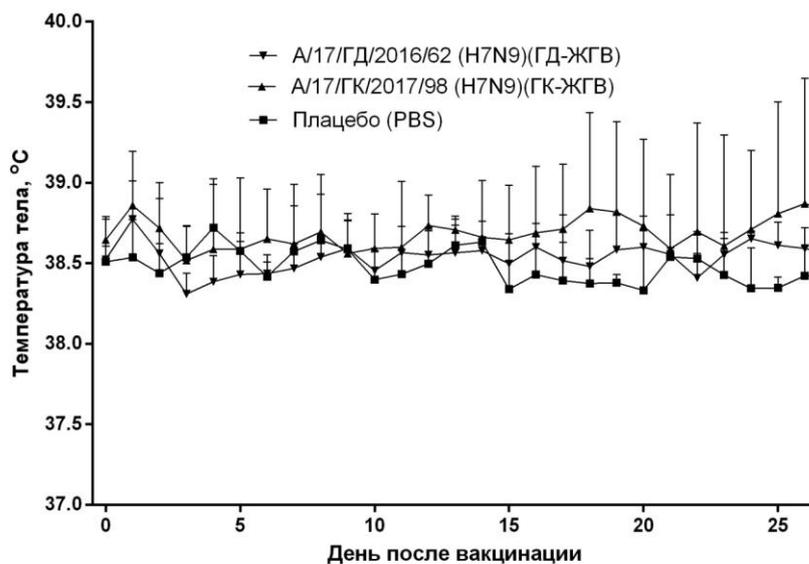


Рисунок 42. Изменение температуры тела у хорьков, иммунизированных однократно ЖГВ А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9), в сравнении с ЖГВ А/17/Гонконг/2017/98 (H7N9) и животными группы плацебо.

Таблица 27. Полуколичественный анализ состояния ткани легких и бронхиального дерева у самцов хорьков исследованных групп на 3-й день эксперимента (баллы).

Параметр оценки	А/17/Гуандонг/2016/62			Контроль		
	1.6	1.7	1.8	3.4	3.5	3.6
Экссудат в просвете легких	0	0	0	0	0	0
Гипертрофия эпителия бронхов	0	0	0	0	0	0
Гиперплазия эпителия бронхов	0	0	0	1	0	0
Некроз эпителия бронхов	0	0	0	0	0	0
Экссудат в просвете бронхиол	0	2	1	0	0	0
Гипертрофия бронхоальвеолярного эпителия	0	0	0	1	0	0
Гиперплазия бронхоальвеолярного эпителия	0	2	0	2	0	0
Некроз бронхоальвеолярного эпителия	0	0	0	0	0	0
Бронхит	0	1	0	0	0	0
Перибронхит	1	2	1	0	1	1
Бронхиолит	0	2	2	0	0	0
Перибронхиолит	0	1	1	1	0	1
Периваскулит	0	1	0	0	1	1
Васкулит	0	1	1	0	0	0
Интерстициальный инфильтрат	0	1	1	0	0	0
Альвеолит	0	1	1	0	0	0
Гиперемия альвеолярной перегородки	1	1	0	1	0	1
Альвеолярная эмфизема	1	0	0	0	0	0
Альвеолярные геморрагии	0	0	1	1	0	1
Сумма баллов по животному	3	15	9	7	2	5
Сумма баллов по группе	27			14		

Примечания: 0 – изменения отсутствуют, 1 балл – минимальные изменения, 2 балла – умеренно выраженные изменения, 3 балла - максимально выраженные изменения

Иммунный ответ на двукратную вакцинацию хорьков вакцинным штаммом А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) оценивали путем определения титров антигемагглютинирующих антител в сыворотках животных через 4 недели после каждой дозы, при этом в качестве антигенов использовали как гомологичный вирус А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9), так и дрейфовые варианты вируса H7N9 – А/17/Гонконг/2017/75108 и А/17/Ануи/2013/61 (все вирусы являются безвредными вакцинными реассортантами с формулой генома 6:2). Однократная иммунизация вакциной А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) вызывала образование высоких титров гомологичных и гетерологичных антител: СГТ гомологичных антител составила 1:160, а титры антител к дрейфовым вирусам составили 1:92-1:106 (Рис. 43). Повторная иммунизация приводила лишь к слабому увеличению титров антител в РТГА (прирост менее чем в 4 раза) со всеми исследуемыми антигенами, что указывает на становление полностью функционального защитного гуморального иммунного ответа уже после однократной иммунизации хорьков штаммом А/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9).

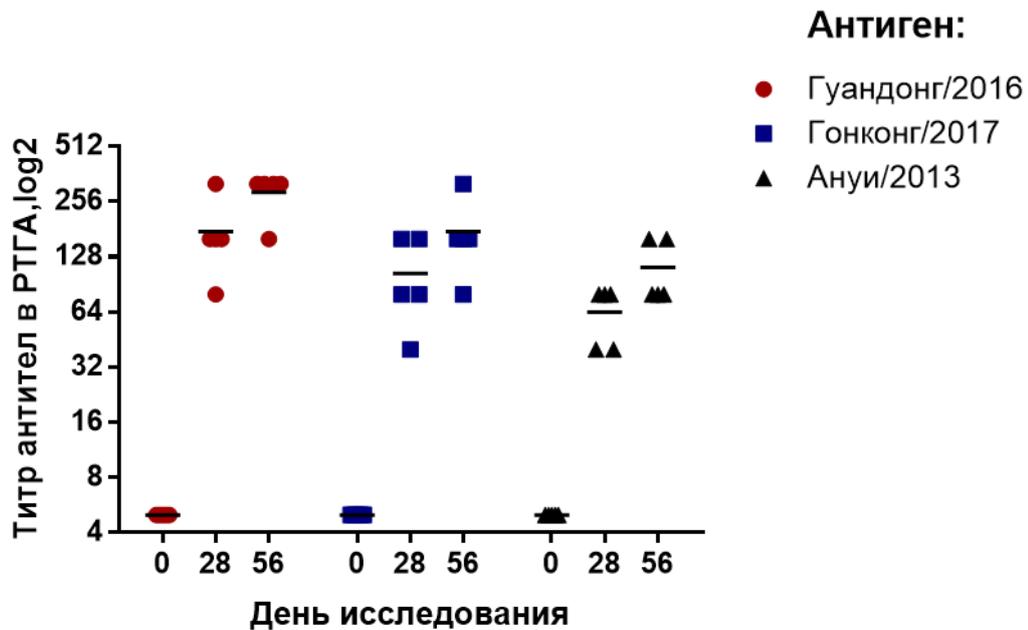


Рисунок 43. Иммуногенность и кросс-реактивность вакцинного штамма A/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) для хорьков. Титры антигемагглютинирующих антител оценивали в РТГА с указанными антигенами.

Поскольку эксперименты на хорьках проводились в лаборатории уровня биобезопасности BSL-2, не представлялось возможным оценить защитный эффект вакцинации в отношении высокопатогенного вируса гриппа A/Гуандонг/17SF003/2016 (H7N9). Однако, учитывая полное отсутствие репликации вакцинного штамма, подготовленного из этого вируса, после повторного введения вакцины, можно утверждать, что вырабатываемый иммунный ответ на ЖГВ из штамма A/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) обладает высоким защитным потенциалом.

Суммарно, сконструированный вакцинный штамм A/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) содержит делецию в полиосновном кливедж-сайте молекулы гемагглютинина, что делает его низкопатогенным для птиц, а также маркер чувствительности к нейраминидазным ингибиторам в молекуле NA. Вакцинный штамм обладает всеми свойствами, характеризующими реассортантные штаммы живой гриппозной вакцины, такими как *ts/ca* фенотипы, а также инфекционность, безвредность и иммуногенность для лабораторных животных. Результаты данных исследований явились основой для подготовки досяе для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах первой в своем роде ЖГВ, подготовленной методами генной инженерии из высокопатогенного вируса гриппа H7N9.

6.5 Клинические испытания живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемического вируса А(Н7N9) на добровольцах (I фаза)

Клинические испытания (фаза I) ЖГВ Н7N9, подготовленной из реассортантного штамма А/17/Ануи/2013/61, проводились на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ в 2014 г. и представляли собой двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование на 40 взрослых здоровых добровольцах обоего пола в возрасте от 19 до 49 лет (Табл. 28). В данных клинических испытаниях оценивалась безвредность, приживляемость, трансмиссивность и иммуногенность ЖГВ Н7N9 для взрослых здоровых лиц. Вакцину и препарат плацебо вводили интраназально в объеме 0,5 мл. Иммунизацию осуществляли на день 0 и день 28. Образцы крови забирали до вакцинации, а также в дни 6, 28 и 56 исследования. Кроме того, забор мазков для постановки ПЦР на наличие РНК вируса гриппа А и определения его подтипа осуществлялся на 0 день (до вакцинации), 1–6 дни исследования после вакцинации, 28 день (до ревакцинации), 29–34 дни исследования. Участники исследования находились в клинике в течение 6-7 суток после каждой вакцинации, и могли быть выписаны только при условии отсутствия вирусной РНК в мазках из носа/зева.

Таблица 28. Характеристики волонтеров, участвовавших в клинических испытаниях ЖГВ Н7N9

Группа	Число лиц	Возраст (лет)		Пол
		Средний арифметический	Диапазон	
Привитые ЖГВ Н2N2	30	27,6	19 – 49	Мужчины – 15 (50%) Женщины – 15 (50%)
Плацебо	10	27,2	19 – 46	Мужчины – 5 (50%) Женщины – 5 (50%)

6.5.1. Оценка реактогенности ЖГВ Н7N9 на добровольцах

Безвредность ЖГВ Н7N9 оценивали для всех волонтеров, получивших хотя бы одну дозу вакцины или препарата плацебо. Побочные явления, возникшие в течение 7 дней после каждой иммунизации, суммированы в Приложениях 3-4. В течение первых двух часов после введения каждой дозы не наблюдалось никаких нежелательных реакций. В течение первых семи дней после первой иммунизации у 19 (63,3%) лиц из вакцинной группы и 9 (90%) добровольцев из группы плацебо были зарегистрированы системные и локальные реакции на вакцинацию. Не наблюдалось значимых различий в побочных явлениях, регистрируемых в двух исследуемых группах добровольцев. Местные реакции были зарегистрированы у 12 (40,0%) лиц группы ЖГВ Н7N9 и 7 (70,0%) волонтеров, получавших плацебо. Наиболее частыми локальными симптомами были боли в горле и

заложенность носа. Системные реакции, в основном умеренное повышение температуры, были отмечены у 6 (20,0%) лиц вакцинной группы и 1 (10,0%) добровольца группы плацебо (Приложение 3). Через семь дней после введения дозы 2 в группе ЖГВ H7N9 наблюдалось четыре местных реакции (13,8%), а в группе плацебо реакций не было. В вакцинной группе всего было зарегистрировано пять системных реакций (17,2%) и четыре (40%) в группе плацебо. Все зарегистрированные реакции были оценены как умеренные и разрешались без каких-либо последствий. Нежелательные побочные явления после дозы 1 и дозы 2 были связаны с незначительными изменениями в анализах мочи и крови и были оценены как умеренные (Приложение 4). Во время исследования серьезных побочных явлений не наблюдалось ни в одной из групп, что указывает на безвредность и хорошую переносимость двух доз ЖГВ H7N9 для здоровых взрослых добровольцев.

6.5.2. Оценка приживляемости, трансмиссивности и генетической стабильности ЖГВ H7N9 на добровольцах

ЖГВ H7N9 обладала высокой инфекционной активностью для людей: после первой дозы вакцинный вирус был обнаружен у 93,3% вакцинированных лиц с помощью ПЦР, а жизнеспособный вирус был выделен в РКЭ от 60% привитых волонтеров, причем живой вирус выделялся вплоть до третьих суток после иммунизации (Табл. 29). После второй дозы вакцинный вирус выделялся слабее: только 60% волонтеров были положительными с использованием метода ПЦР, и только у 24% добровольцев выделился жизнеспособный вирус, причем все изоляты были получены на 1 день после ревакцинации. Эти данные указывают на то, что первая доза ЖГВ H7N9 обеспечивала частичную защиту от последующего заражения гомологичным вакцинным вирусом спустя 4 недели.

Суммарно от вакцинированных лиц было выделено 45 образцов вакцинных вирусов в разные дни после иммунизации. Все изоляты были генотипированы с использованием стратегии частичного секвенирования. Было показано, что все аттенуирующие мутации, свойственные донору аттенуации Лен17, сохранялись у всех выделенных вакцинных вирусов. Полноразмерное секвенирование генов NA и NA выявило одну аминокислотную замену (Leu-68-Phe) в субъединице NA2 у трех изолятов, выделенных от двух иммунизированных добровольцев, что указывает на адаптационную природу данной мутации. Никаких изменений в генах NA всех тестируемых изолятов не обнаружено. Важно отметить, что ни у одного из волонтеров группы плацебо не было обнаружено ни жизнеспособного вакцинного вируса, ни следов его генетического материала, что подтверждает отсутствие трансмиссивности вакцинного штамма ЖГВ H7N9 от привитых невакцинированным лицам.

Таблица 29. Выделение вакцинного вируса ЖГВ H7N9 от привитых волонтеров

День	Выделение в РКЭ, n (%)	Детекция вирусной РНК, n (%)
После дозы 1 (n=30)		
1	16 (53,3)	28 (93,3)
2	16 (53,3)	18 (60,0)
3	6 (20,0)	9 (30,0)
4	0 (0,0)	2 (6,7)
5	0 (0,0)	0 (0,0)
После дозы 2 (n=29)		
29 (1)*	7 (24,1)	17 (58,6)
30 (2)	0 (0,0)	9 (31,0)
31 (3)	0 (0,0)	6 (20,7)
32 (4)	0 (0,0)	6 (20,7)
33 (5)	0 (0,0)	0 (0,0)

*в скобках указан день после ревакцинации

6.5.3. Оценка иммуногенности ЖГВ H7N9 на добровольцах

Гуморальный иммунный ответ на вакцинацию ЖГВ H7N9, в первую очередь, оценивали в РТГА и РМН. Несмотря на то, что СГТ антигемагглютинирующих антител, а также уровни сероконверсий не были достоверно различны между вакцинной и контрольной группы после первой иммунизации, титры антител в РТГА в данной временной точке значительно увеличились в группе ЖГВ H7N9 ($p=0,0002$), но не группе плацебо ($p>0,05$, Табл. 30 и 31). Уровни нейтрализующих анти-H7N9 антител также значительно выросли в вакцинной группе после первой иммунизации, при этом сероконверсии детектировались практически у половины вакцинированных лиц, и кратность прироста СГТ антител составила 3,5 (Табл. 30 и 31). Вторая вакцинация ЖГВ H7N9 приводила к дальнейшему усилению иммунного ответа, что выражалось как в общем числе сероконверсий в РТГА и РМН, так и в увеличении титров антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител. Примечательно, что нейтрализующие антитела более чем трети вакцинированных (38%) достигали серопротективных уровней ($\geq 1:40$) уже после первой дозы, а после второй иммунизации данная группа добровольцев увеличилась до 58,6%.

Помимо РТГА и РМН, гуморальный иммунный ответ оценивали по увеличению титров сывороточных IgG и IgA антител, а также мукозальных IgA антител, выявляемых в носовых секретах и слюне с помощью ИФА. Уровни сывороточных IgG и IgA антител, а также IgA-антител в образцах слюны, значительно увеличились в группе ЖГВ H7N9 после первой дозы ($p=0,002$, $p=0,0013$ и $p=0,0028$ соответственно, Табл. 30).

Таблица 30. Число сероконверсий (≥ 4 -кратных приростов антител) у добровольцев, получивших ЖГВ H7N9 или препарат плацебо

Тест	Группа	После дозы 1 (день 28); ЖГВ: N=29 плацебо: N=10		После дозы 2 (день 56); ЖГВ: N=29 плацебо: N=10		Всего сероконверсий	
		n (%)	95% CI	n (%)	95% CI	n (%)	95% CI
		РТГА	ЖГВ H7N9	3 (10,3)	3,6–26,4	19 (65,5)[‡]	47,3–80,1
	Плацебо	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8
РМН	ЖГВ H7N9	14 (48,3)[†]	31,4–65,6	21 (72,4)[‡]	54,3–85,3	21 (72,4)[‡]	54,3–85,3
	Плацебо	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8
ИФА – IgA в сыворотке	ЖГВ H7N9	4 (13,8)	5,5–30,6	7 (24,1)	8,6–39,7	7 (24,1)	8,6–39,7
	Плацебо	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8
ИФА – IgG в сыворотке	ЖГВ H7N9	2 (6,9)	1,9–22,0	3 (10,3)	3,6–26,4	4 (13,8)	5,5–30,6
	Плацебо	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8
ИФА – IgA в секретах носа	ЖГВ H7N9	8 (27,6)	14,7–45,7	8 (27,6)	14,7–45,7	11 (37,9)[†]	22,7–56,0
	Плацебо	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8
ИФА – IgA в слюне	ЖГВ H7N9	7 (24,1)	8,6–39,7	8 (27,6)	14,7–45,7	10 (34,5)[†]	19,9–52,7
	Плацебо	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8
Всего сероконверсий	ЖГВ H7N9	22 (75,9)[‡]	57,9–87,8	25 (86,2)[‡]	69,4–94,5	27 (93,1)[‡]	78,0–98,1
	Плацебо	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8	0	0,0–27,8

CI, 95% доверительный интервал, рассчитанный по методу Wilson; н/д – не делали;

[†] доля лиц с сероконверсией антител в группе вакцинированных значительно выше, чем в группе плацебо ($p < 0.05$, Fisher exact test);

[‡] доля лиц с сероконверсией антител в группе вакцинированных значительно выше, чем в группе плацебо ($p < 0.001$, Fisher exact test)

Таблица 31. Средние геометрические титры (СГТ) сывороточных и секреторных антител у добровольцев, привитых ЖГВ Н7N9

Тест	Группа	СГТ антител			Кратность прироста СГТ	
		День 0 ЖГВ: N=29 плацебо: N=10	День 28 ЖГВ: N=29 плацебо: N=10	День 56 ЖГВ: N=29 плацебо: N=10	День 28 / День 0	День 56 / День 0
РТГА	ЖГВ Н7N9	3,0	5,1	10,2*	1,7[‡]	3,4[‡]
	Плацебо	3,3	3,8	3,5	1,2	1,1
РМН	ЖГВ Н7N9	5,1	17,7	27,3*	3,5[‡]	5,4[‡]
	Плацебо	5,4	6,6	5,4	1,2	1,0
ИФА – IgA в сыворотке	ЖГВ Н7N9	9,9	14,9	19,4	1,5[†]	2,0[‡]
	Плацебо	11,3	12,1	13,9	1,1	1,2
ИФА – IgG в сыворотке	ЖГВ Н7N9	5,3	7,4	8,0	1,4[†]	1,5[‡]
	Плацебо	7,5	6,5	7,5	0,9	1,0
ИФА – IgA в секретах носа	ЖГВ Н7N9	3,8	4,7	6,0	1,2	1,6
	Плацебо	3,2	3,5	3,2	1,1	1,0
ИФА – IgA в слюне	ЖГВ Н7N9	1,4	2,4	2,9	1,7[‡]	2,1[‡]
	Плацебо	2,5	2,8	2,1	1,1	0,8

[†] СГТ антител после иммунизации значительно выше, чем СГТ до вакцинации (Wilcoxon Matched Pairs Test: $p < 0,05$);

[‡] СГТ антител после иммунизации значительно выше, чем СГТ до вакцинации (Wilcoxon Matched Pairs Test: $p < 0,005$);

* СГТ антител в группе ЖГВ Н7N9 значительно выше, чем в группе плацебо в данной временной точке (критерий Манна-Уитни, $p < 0,001$)

Уровни данных антител еще больше увеличивались после второй дозы, а СГТ всех тестируемых антител, как сывороточных, так и секреторных, были значительно выше, чем исходные уровни. Как и ожидалось, в группе плацебо гуморальных иммунных ответов не было выявлено ни в одном из использованных иммунологических тестов (Табл. 30).

Т-клеточный иммунный ответ на вакцинацию оценивали с точки зрения увеличения уровней вирус-специфических CD4+ и CD8+ Т-клеток после введения исследуемой вакцины или плацебо по сравнению с исходными уровнями. Интересно, что у большинства добровольцев были обнаружены преобладающие кросс-реактивные вирус-специфические CD4+ и CD8+ Т-клетки с медианой 0,037% и 1,57%, соответственно (Рис. 44, день 0). CD4+ Т-клетки увеличились в 1,8 раз к 28 дню после первой дозы ЖГВ Н7Н9. Вторая доза вакцины еще больше увеличивала пропорцию данных клеток, и к 56 дню их уровень был в 2,3 раза выше, чем исходный уровень, хотя разница между 28 и 56 днем исследования не была статистически значимой (рис. 44А). В отличие от CD4+ Т-клеток, требовалось две дозы ЖГВ Н7Н9 для значительного увеличения вирус-специфических CD8+ Т-клеток (Рис. 44С). В группе плацебо не было зафиксировано достоверных увеличений уровней вирус-специфических CD4+ или CD8+ Т-клеток (Рис. 44В, D).

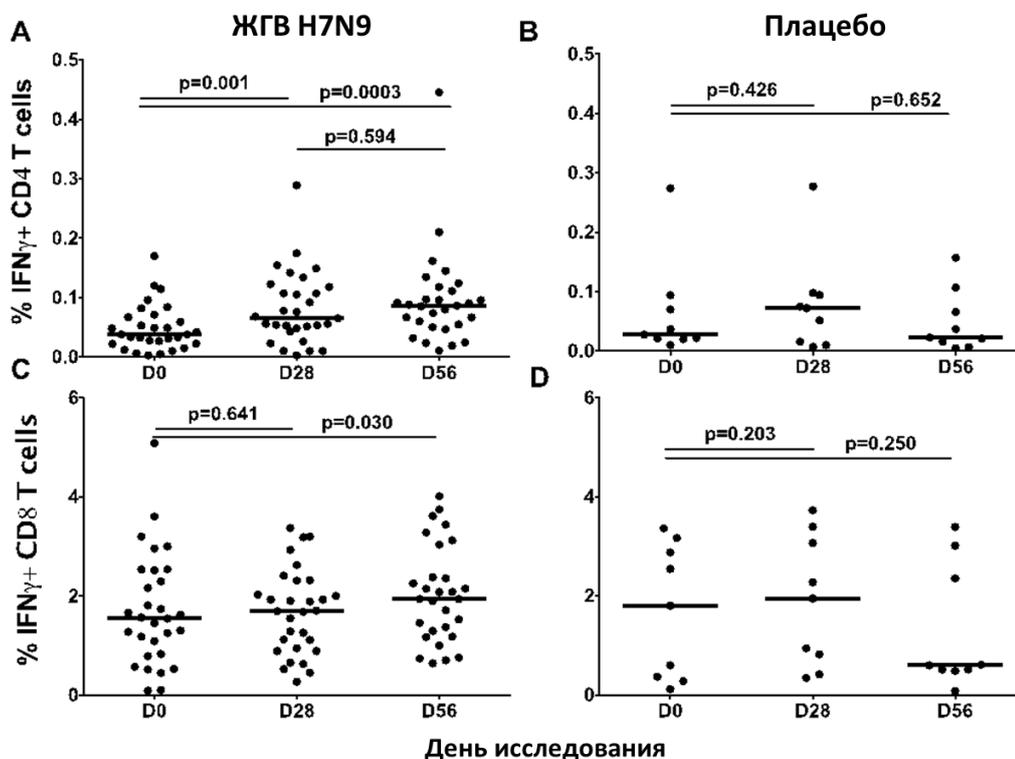


Рисунок 44. Т-клеточный иммунный ответ у волонтеров до и после двукратного введения ЖГВ Н7Н9 или плацебо. Процент вирус-специфических IFN γ -положительных CD4+ и CD8+ Т-клеток оценивали методом проточной цитометрии. Уровни Т-клеток в разных временных точках сравнивались с использованием теста Wilcoxon Matched Pairs test.

В таблице 32 приведены данные, отражающие продукцию разных субпопуляций вирусспецифических Т-клеток на иммунизацию ЖГВ H7N9 у добровольцев. На 6 день после первой иммунизации у 11 человек (36,7%) отмечено увеличение уровня (%) CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, причем у некоторых увеличение наблюдалось и в отношении других субпопуляций Т-клеток. Через 28 дней после первой дозы вакцины количество конверсий тех или иных фенотипов Т-клеток составляло 6,7 – 16,7%. Спустя 28 дней после повторной иммунизации число конверсий изученных Т-клеток колебалось от 6,9 до 34,5% (Табл. 32).

Таблица 32. Вирус-специфический Т-клеточный иммунный ответ волонтеров, двукратно привитых ЖГВ H7N9 или плацебо

Времен- ные интерва- лы	Препарат	n	Число лиц с достоверным* увеличением уровня вирусспецифических клеток памяти						Всего
			CD4 ⁺	CD4 ⁺ Tcm***	CD4 ⁺ Tem***	CD8 ⁺	CD8 ⁺ Tcm***	CD8 ⁺ Tem***	
День 6 / День 0**	ЖГВ H7N9	30	1 (3,3%)	1 (3,3%)	6 (20,0%)	4 (13,3%)	4 (13,3%)	4 (13,3%)	11 (36,7%)
	плацебо	9	0	0	0	0	0	0	0
День 28 / День 0**	ЖГВ H7N9	30	3 (10,0%)	5 (16,7%)	6 (20,0%)	2 (6,7%)	0	2 (6,7%)	9 (30,0%)
	плацебо	9	0	0	0	0	0	0	0
День 56 / День 0**	ЖГВ H7N9	29	6 (20,7%)	5 (17,2%)	10 (34,5%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)	14 (48,3%)
	плацебо	9	0	0	0	0	0	0	0
ВСЕГО	ЖГВ H7N9	30	7 (23,3%)	8 (26,7%)	12 (40,0%)	4 (13,3%)	5 (16,7%)	4 (13,3%)	16 (53,3%)
	плацебо	9	0	0	0	0	0	0	0

* Достоверными считаются приросты, превышающие или равные среднему показателю по группе плацебо + 3 стандартных отклонения (SD).

** День 6 / День 0 – через 6 дней после вакцинации; День 28 / День 0 – через 28 дней после вакцинации; День 56 / День 0 – через 28 дней после ревакцинации;

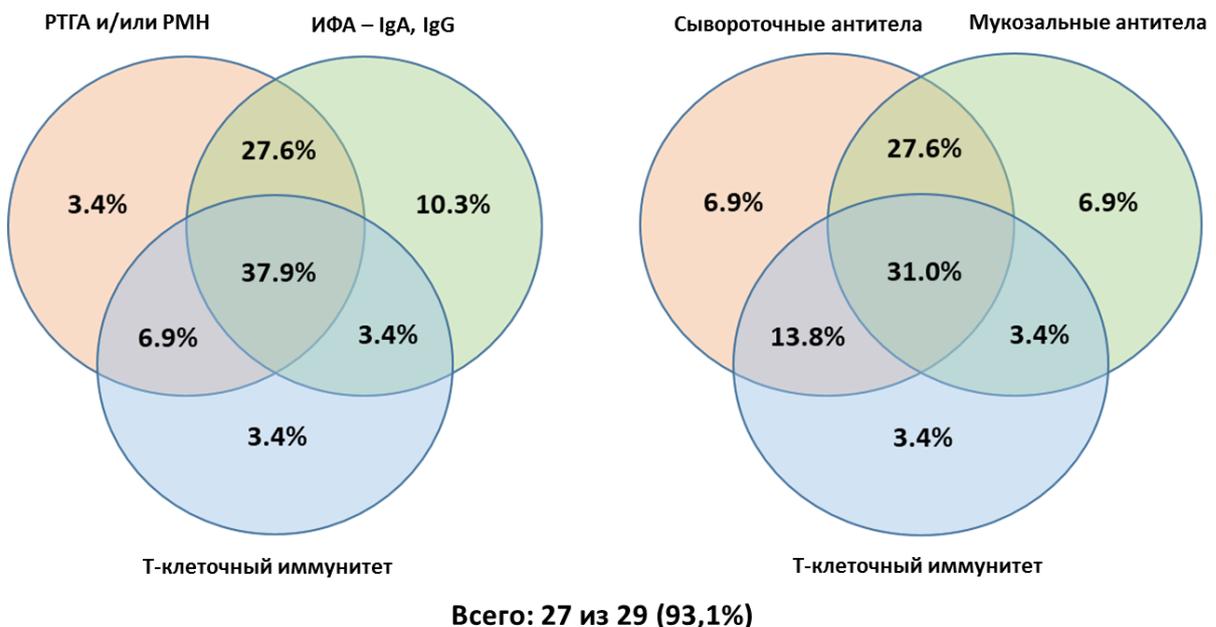
*** Tcm – Т-клетки центральной памяти; Tem – Т-клетки эффекторной памяти.

В целом, 27 из 29 (93,1%) вакцинированных добровольцев ответили на ЖГВ H7N9 по крайней мере в одном из использованных иммунологических тестов (Табл. 33).

Таблица 33. Суммарные данные по иммуногенности ЖГВ H7N9 (n=29)

Иммунологический тест	N (%) лиц с зафиксированным ответом	
	После дозы 1	После дозы 2
РТГА	3 (10,3)	19 (65,5)
PMH	14 (48,3)	21 (72,4)
ИФА – IgA в сыворотке	2 (6,9)	4 (13,8)
ИФА – IgG в сыворотке	4 (13,8)	7 (24,1)
ИФА – IgA в секретах носа	8 (27,6)	11 (37,9)
ИФА – IgA в слюне	7 (24,1)	9 (31,0)
CD4+ Т-клетки	3 (10,3)	6 (20,7)
CD8+ Т-клетки	2 (6,9)	2 (6,9)
CD4+ Т-клетки центральной памяти	4 (13,8)	5 (17,2)
CD4+ Т-клетки эффекторной памяти	5 (17,2)	11 (37,9)
CD8+ Т-клетки центральной памяти	0 (0,0)	2 (6,9)
CD8+ Т-клетки эффекторной памяти	2 (6,9)	2 (6,9)
Всего	25 (86,2)	27 (93,1)

Важно отметить, что большинство этих волонтеров имели иммунный ответ, детектируемый одновременно в нескольких тестах, и 31% лиц имели все три типа адаптивного иммунного ответа на вакцинацию: системный гуморальный, локальный гуморальный, а также клеточный ответ (рисунок 46), что указывает на высокую иммуногенность ЖГВ H7N9 для взрослых здоровых лиц.

**Рисунок 45.** Вклад различных звеньев иммунного ответа в иммуногенность ЖГВ из штамма A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) для взрослых здоровых добровольцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования методом классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах был получен вакцинный штамм А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9) против потенциально-пандемических вирусов гриппа А(Н7N9). Несмотря на наличие двух адаптационных мутаций в молекуле гемагглютинина, по антигенным свойствам вакцинный штамм был идентичен родительскому вирусу А/Ануи/1/2013 (Н7N9), а также обладал выраженной кросс-реактивностью по отношению к дрейфовым вариантам вирусов А(Н7N9) в экспериментах на мышах. Сконструированные генно-инженерными методами вакцинные штаммы ЖГВ Н7N9, имеющие аминокислотный состав молекулы НА аналогичный опубликованным в базе данных последовательностям, уступали указанному реассортанту в плане индукции перекрестно-реагирующих антигемагглютинирующих антител на модели BALB/c мышей, в связи с чем для дальнейших доклинических и клинических испытаний был выбран штамм А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9).

Эксперименты на хорьках подтвердили безвредность, иммуногенность и защитную эффективность вакцинного штамма А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9), как при двукратном, так и при однократном введении. При этом преимущество двукратной иммунизации перед однократной обнаруживалось только при детальном анализе гистопатологических изменений в тканях легких хорьков после челленджа вирулентным вирусом А/Ануи/1/2013 (Н7N9).

При двукратном режиме иммунизации ЖГВ из штамма А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9) была безвредна для взрослых здоровых добровольцев, при этом она активно реплицировалась в верхних дыхательных путях привитых, что привело к формированию мощного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа после вакцинации. Следует отметить, что ЖГВ Н7N9 индуцировала наивысшие показатели адаптивного иммунного ответа среди всех протестированных ранее живых вакцин против потенциально-пандемических вирусов гриппа, таких как Н5N2, Н7N3 и Н2N2. При этом подавляющее число добровольцев отвечало развитием иммунного ответа уже на первую дозу вакцины, что хорошо соотносится с данными, полученными на хорьках. Такая высокая инфекционная активность и иммуногенность ЖГВ Н7N9 может быть ассоциирована с наличием маркеров адаптации к клеткам млекопитающих в поверхностных белках вирусов Н7N9, что делает их наиболее вероятными кандидатами, способными вызвать следующую пандемию гриппа. В случае возникновения пандемии Н7N9 данный вакцинный штамм может быть востребован производством в кратчайшие сроки после объявления пандемии, что, в силу высокой степени кросс-реактивности штамма по

отношению к дрейфовым вариантам вируса H7N9, позволит обеспечить защиту уязвимых слоев населения в самом начале пандемической волны, пока не будет подготовлено и выпущено необходимое количество доз вакцины из циркулирующих вирусов.

Также в ходе настоящего исследования был сконструирован экспериментальный вакцинный штамм ЖГВ против высокопатогенного вируса гриппа H7N9, впервые обнаруженного в циркуляции в 2016 году. При этом в процессе конструирования был удален полиосновный кливедж-сайт молекулы гемагглютинаина, чтобы сделать вирус апатогенным, а также была внесена мутация в ген нейраминидазы, чтобы сделать вирус чувствительным к нейраминидазным ингибиторам. Вакцинный штамм обладал всеми полезными свойствами, характеризующими реассортантные штаммы живой гриппозной вакцины, и результаты данных исследований явились основой для подготовки досье для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах нового штамма ЖГВ против ВПВГ H7N9.

ГЛАВА 7 ПОДГОТОВКА И ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н5N1)

В настоящей работе методами обратной генетики были сконструированы и изучены на лабораторных животных два вакцинных штамма ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа Н5N1 двух генетических линий (клайд 1 и клайд 2.2.1) с использованием культуры клеток MDCK в качестве субстрата.

7.1 Получение и фенотипическая характеристика вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1)

Для подготовки вакцинных реассортантов для живой гриппозной вакцины против высокопатогенных вирусов гриппа птиц Н5N1 были выбраны два «диких» вируса, выделенных от инфицированных людей с летальным исходом: А/Вьетнам/1203/2004 [VN1203] и А/Египет/321/2007 [EG321], принадлежащие клайдам 1 и 2.2, соответственно. Данные вирусы существенно различаются по своим антигенным свойствам, поскольку практически не взаимодействовали с сыворотками хорьков в перекрестной РТГА [56]. Общепринятым подходом для ослабления вирулентных свойств высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) является удаление четырех основных аминокислот из кливедж-сайта молекулы НА [454]. Соответственно, сконструировать безопасные вакцинные штаммы, как для инактивированной, так и для живой гриппозной вакцины представляется возможным только при использовании методов геной инженерии и обратной генетики. В настоящей работе была использована разработанная обратно-генетическая система для отечественного донора аттенуации Лен/17 для подготовки реассортантных штаммов-кандидатов в ЖГВ Н5N1. Для этого дополнительно были получены плазмиды, несущие модифицированные гены НА вирусов VN1203 и EG321, у которых были удалены четыре основные аминокислоты аргинин и лизин, а также заменен один лизин на треонин в районе кливедж-сайта молекулы (Табл. 34).

Таблица 34. Аминокислотная последовательность кливедж-сайта молекулы гемагглютинаина вирусов гриппа А(Н5N1)

Вирус	Аминокислотная последовательность кливедж-сайта
А/Вьетнам/1203/2004	G L R N S P Q R E R R R K K R ↓ G L F G A
VN-Лен/17rg	G L R N S P Q R E - - - - T R ↓ G L F G A
VN-Лен/134rg	G L R N S P Q R E - - - - T R ↓ G L F G A
А/Египет/321/2007	G L R N S P Q G E R R R R K R ↓ G L F G A
EG-Лен/17rg	G L R N S P Q G E - - - - T R ↓ G L F G A

Путем трансфекции клеток 293Т наборами из восьми плазмид, несущих шесть генов внутренних белков донора аттенуации Лен/17, модифицированную молекулу НА и интактную молекулу NA, были получены два вакцинных реассортанта для ЖГВ: VN-Лен/17rg (H5N1) и EG-Лен/17rg (H5N1), антигенно специфичные вирусам VN1203 и EG321, соответственно (Табл. 35). Для дополнительно изучения влияния аттенуирующих мутаций донора Лен/17 на иммуногенность вакцинного штамма H5N1 был получен реассортантный штамм, несущий ΔНА и NA гены вируса VN1203, а шесть генов внутренних белков – от вируса Лен/134rg (Табл. 35).

Таблица 35. Состав генома реассортантных штаммов H5N1, использованных в данном исследовании

Реассортант	НА ген	NA ген	Гены внутренних белков
EG-Лен/17rg	EG321, ΔНА, клайд 2.2	EG321	Лен/17-rg
VN-Лен/17rg	VN1203, ΔНА, клайд 1	VN1203	Лен/17-rg
VN-Лен/134rg	VN1203, ΔНА, клайд 1	VN1203	Лен/134-rg

Все полученные реассортантные штаммы были полностью секвенированы, чтобы исключить возникновение спонтанных мутаций в их геноме. Необходимо отметить, что работа с вирусами, содержащими поверхностные антигены H5N1, проводилась в лаборатории повышенного уровня биобезопасности (BSL-3).

Поскольку модификация полиосновного кливедж-сайта высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 должна приводить в трипсин-зависимому расщеплению молекулы HA0 на две субъединицы HA1 и HA2, все вакцинные штаммы с модифицированным НА на начальном этапе проходят тестирование на способность образовывать бляшки на монослое клеток без добавления трипсина [518]. В настоящей работе была проведена оценка формирования бляшек на монослое клеток фибробластов куриных эмбрионов (ФКЭ), инкубированных при 35°C, как без ТРСК трипсина, так и в его присутствии (2 мкг/мл). Из таблицы 36 видно, что вакцинные реассортанты VN-Лен/17rg и EG-Лен/17rg были неспособны формировать четкие бляшки при отсутствии в агарозовом покрытии трипсина, тогда как при добавлении трипсина вирусы формировали четко различимые бляшки на высоких разведениях. В отличие от вакцинных реассортантов, «дикие» вирусы формировали крупные бляшки на монослое культуры клеток ФКЭ вне зависимости от наличия в покрытии ТРСК трипсина. Таким образом, вакцинные реассортанты VN1203-Лен/17rg и EG321-Лен/17rg схожи по свойствам с низкопатогенными вирусами гриппа.

Таблица 36. Оценка зависимости формирования бляшек на монослое клеток ФКЭ от наличия в агарозовом покрытии ТРСК трипсина

Вирус	Формирование бляшек на монослое клеток ФКЭ			
	Без ТРСК трипсина		В присутствии ТРСК трипсина	
	титр, БОЕ/мл	Размер бляшек, мм	титр, БОЕ/мл	Размер бляшек, мм
VN1203 WT	$10^{7,4}$	2,5-3,0	$10^{7,3}$	3,0-3,5
VN-Лен/17rg	$10^{3,0*}$	-	$10^{7,0}$	1,5-2,0
EG321 WT	$10^{7,1}$	2,0-3,0	$10^{7,0}$	2,5-3,0
EG-Лен/17rg	$10^{3,0*}$	-	$10^{7,4}$	1,5-2,0

*бляшки были едва различимы.

Оценку температурочувствительности реассортантных штаммов H5N1 проводили методом бляшкообразования в культуре клеток MDCK, инкубированных при оптимальной (33°C) и повышенных (37°C and 38°C) температурах. В качестве контрольных вирусов использовали донор аттенуации Лен/17-rg и его предшественник Лен/134-rg. Оба H5N1 вакцинных кандидата VN-Лен/17rg и EG-Лен/17rg размножались до высоких титров при оптимальной температуре, тогда как их титр при 38°C, и даже при 37°C значительно снижался (на 2,7-4,2 lgБОЕ). По признаку температурочувствительности оба вакцинных кандидата были идентичны аттенуированному родительскому штамму Лен/17-rg (Рис. 46). В отличие от вакцинных штаммов, экспериментальный реассортант VN-Лен/134rg имел одинаковые титры при всех исследованных температурах. Эти данные указывают на то, что *ts* фенотип реассортантных вирусов H5N1 четко соотносился с наследованием генов внутренних и неструктурных белков от Лен/17-rg или Лен/134-rg вирусов.

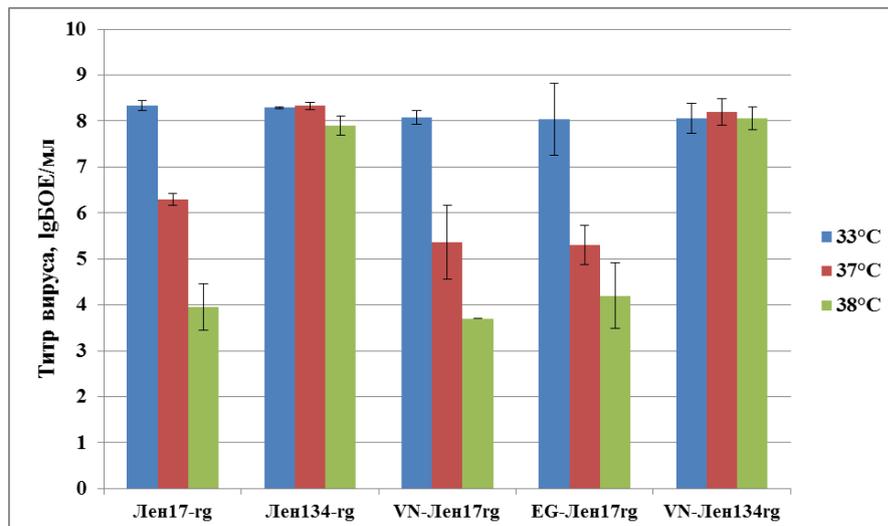


Рисунок 46. Репродукция реассортантных штаммов А(H5N1), а также контрольных вирусов Лен/17-rg и Лен/134-rg, в культуре клеток MDCK при различных температурах инкубации.

7.2 Изучение вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) на модели мышей

Поскольку вакцинные штаммы для отечественной живой гриппозной вакцины, несущие поверхностные антигены высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1), были созданы методами обратной генетики впервые, представлялось необходимым провести всестороннюю характеристику этих вирусов на различных моделях лабораторных животных.

7.2.1. Оценка аттенуации вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) на модели мышей

Оценку аттенуированного фенотипа реассортантных штаммов Н5N1 проводили на мышах линии BALB/c. В качестве контрольных вирусов были использованы донор аттенуации Лен/17-rg и его «дикий» предшественник Лен/134-rg. Таким образом, все вирусы, использованные в данной работе, были получены методами обратной генетики. Значение MID₅₀ двух вакцинных штаммов, VN-Лен/17rg и EG-Лен/17rg, было в среднем в 10 раз ниже, чем у донора аттенуации Лен/17-rg, указывая на то, что поверхностные антигены вирусов Н5N1 имеют преимущество перед антигенами вируса Н2N2 в плане развития продуктивной инфекции в верхних дыхательных путях мышей (Табл. 37). При этом MID₅₀ обоих вакцинных штаммов Н5N1, рассчитанная по обнаружению вируса в легких, значительно превышала дозу, рассчитанную по детекции вируса в носовых ходах, что говорит о предпочтительной репродукции вирусов в верхних дыхательных путях животных.

Таблица 37. Репродукция исследуемых вирусов в органах мышей линии BALB/c

Вирус	MID ₅₀ , IgБОЕ			Доза вируса ¹ , IgБОЕ	Титр вируса, IgБОЕ/мл (M±SD)					
					день 3			день 6		
	носы	легкие	итог		носы	легкие	мозг	носы	легкие	мозг
Лен/17-rg	3,50	≥5,5	3,50	5,98	3,4±0,2	2,0±0,1	<0,6	2,5±0,5	0,8±0,5	<0,6
Лен/134-rg	3,50	≥5,5	3,50	5,98	3,4±0,2	2,0±0,1	<0,6	2,5±0,5	0,8±0,5	<0,6
EG-Лен/17rg	3,37	2,62	2,62	5,10	3,8±0,4	3,1±0,2	<0,6	1,2±0,2	2,6±0,5	<0,6
VN-Лен/17rg	2,37	3,37	2,37	4,85	3,4±0,4	1,1±0,3	<0,6	3,1±0,9	0,7±0,3	<0,6
VN-Лен/134rg	2,62	0,83	0,83	3,31	2,5±1,8	5,1±0,2	<0,6	0,6±0,0	4,6±0,3	<0,6

¹доза вируса, равная 300 MID₅₀.

Заражение мышей вакцинными штаммами H5N1 в дозе 300 MID₅₀ показало аттенуированный фенотип, свойственный ХА вирусу Лен/17-rg, поскольку они активно репродуцировались в верхних дыхательных путях мышей, достигая титров 2,7-3,4 IgБОЕ/мл на 3 сутки после заражения, тогда как уровень их репродукции в легких не превышал 0,7-1,1 IgБОЕ/мл (Табл. 37). Примечательно, что через шесть дней после заражения вирус EG-Лен/17rg обнаруживался в носовых ходах мышей на очень низком уровне 0,9 IgБОЕ/мл, тогда как вирус VN-Лен/17rg продолжал размножаться до высоких титров 3,1 IgБОЕ/мл (p=0,02). Таким образом, сравнение трех вирусов, имеющих идентичные внутренние гены вируса Лен/17-rg и отличающихся источником НА и NA генов (т.е. вирусы Лен/17-rg, VN-Лен/17rg и EG-Лен/17rg), подтверждает влияние поверхностных генов на способности ХА вирусов заражать мышей.

Интересно, что химерный вирус VN-Лен/134rg, содержащий гены внутренних и неструктурных белков от «дикого» вируса Лен/134-rg, имел противоположный паттерн репликации в респираторном тракте мышей, по сравнению с ХА вирусами. Хотя у вируса VN-Лен/134rg был самый низкий показатель MID₅₀ (Табл. 37), животные, получившие 300 MID₅₀ вируса, показали наивысшие титры в легких как через 3, так и через 6 дней после заражения, тогда как репликация в верхних дыхательных путях была менее эффективной по сравнению с ХА вирусами (p=0,02 на 6 сутки). Эти данные также подтверждают, что мутации в шести генах внутренних и неструктурных белков донора аттенуации Лен/17 являются ответственными за аттенуированный фенотип вакцинных штаммов H5N1. С другой стороны, влияние поверхностных генов на репликацию вируса *in vivo* можно отметить из сравнения вирусов VN-Лен/134rg (H5N1) и Лен/134-rg (H2N2). Действительно, вирус с НА и NA птичьего происхождения реплицируется в 100 раз более эффективно в легких мышей, чем вирус с НА и NA человеческого происхождения, как на 3, так и на 6 сутки после заражения (Табл. 37). Важно отметить, что ни один из изученных вирусов не был обнаружен в тканях мозга мышей.

7.2.2. Оценка иммуногенности вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели мышей

Иммуногенность реассортантных штаммов H5N1 оценивали путем двукратной интраназальной иммунизации мышей исследуемыми вирусами, взятыми в дозе 300 MID₅₀. Однократная иммунизация вакцинными вирусами VN-Лен/17rg или EG-Лен/17rg не вызывала образование высоких титров сывороточных антител, выявляемых в РТГА (СГТ<20, 3,6-4,2 log₂), тогда как химерный вирус VN-Лен/134rg, не содержащий аттенуирующих мутаций во внутренних генах, был высокоиммуногенным даже после

одной дозы (СГТ>50 или 5,6 log₂; Рис. 47). Тем не менее, вторая интраназальная иммунизация мышей вакцинными вирусами H5N1 индуцировала сильный иммунный ответ, что подтверждается титрами антител в РТГА, приближающимися к 6,0 log₂ (VN-Лен/17rg) и 6,7 log₂ (EG-Лен/17rg). Эти данные указывают на необходимость бустерной иммунизации для выработки оптимального гуморального иммунного ответа у мышей. Интересно, что вакцинный вирус VN-Лен/17rg оказался более кросс-реактивным, чем штамм EG-Лен/17rg. Так, EG321-специфичные антитела были обнаружены даже после однократной иммунизации мышей вирусом VN-Лен/17rg (СГТ 3,2 log₂), а вторая доза приводила к индукции серопротективных уровней антител (>5.3 log₂). Напротив, вакцинный вирус EG-Лен/17rg не индуцировал VN1203-специфические антитела после первой иммунизации, а после второй дозы титры антител в РТГА повышались до 4,6 log₂, что было ниже уровня серопротекции. Примечательно, что сравнение реассортантных вирусов VN-Лен/17rg и VN-Лен/134rg, отличающихся содержанием аттенуирующих мутаций во внутренних генах, выявило значительную разницу в их иммуногенности. В то время как аттенуированный вакцинный штамм VN-Лен/17rg вызывал слабый ответ после однократной иммунизации (титр 3,6 log₂ с антигеном VN1203 и 3,2 log₂ с антигеном EG321), вирулентный вирус VN-Лен/134rg был высокоиммуногенным даже после однократной дозы (титр 5,7 log₂ с VN1203 антигеном и 4,9 log₂ с антигеном EG321, соответственно, p≤0,003). Дополнительная иммунизация мышей вирусом VN-Лен/134rg приводила к росту уровня антител до СГТ 123 (или 6,95 log₂) с гомологичным антигеном VN1203 и 80 (6,3 log₂) с гетерологичным антигеном EG321, при этом последний был сопоставим с уровнем СГТ антител, индуцируемых двумя дозами гомологичного вируса EG-Лен/17rg (Рис. 47).

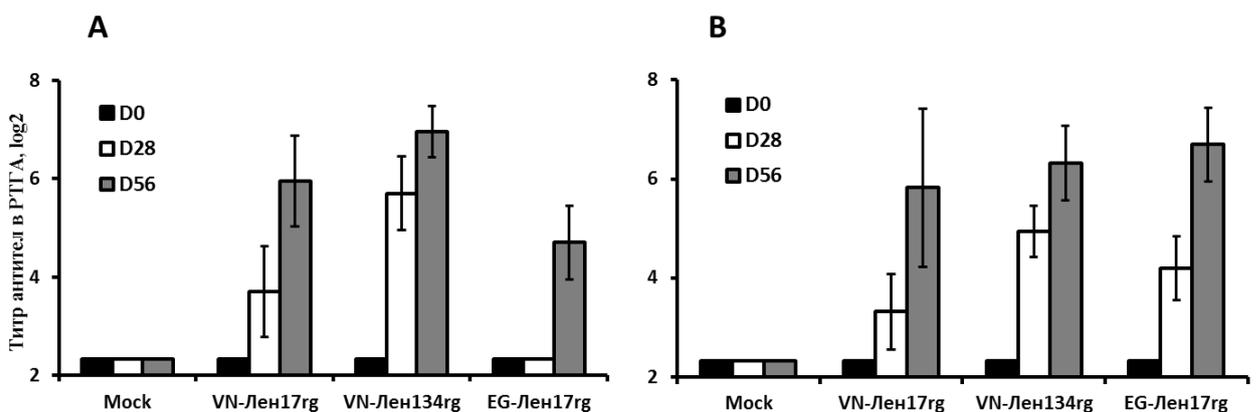


Рисунок 47. Уровни антигемагглютинирующих антител в сыворотках мышей, привитых двукратно реассортантными штаммами H5N1. Уровни антигемагглютинирующих антител выявляли в РТГА с цельными вирусами VN1203 (А) и EG321 (В) с использованием лошадиных эритроцитов. *p<0,05 по сравнению с однократной иммунизацией.

Оценка уровней сывороточных IgG антител к вирусам VN1203 и EG321 у мышей, иммунизированных вакцинными штаммами H5N1, выявили сопоставимые уровни титров гомологичных антител после первой вакцинации (8,8 и 9,1 log₂ в группе VN-Лен/17rg и EG-Лен/17rg, соответственно, Рис. 48). Уровни гетерологичных IgG антител после первой вакцинации также были одинаковы (9,6 log₂ для мышей, вакцинированных EG-Лен17rg, против VN1203 антигена и 9,5 log₂ для мышей, вакцинированных VN-Лен/17rg, против антигена EG321). Как и в РТГА, вирулентный вирус VN-Лен/134rg индуцировал гораздо более высокие титры IgG, выявляемые в ИФА, чем вирус VN-Лен/17rg, после однократной иммунизации ($p=0,001$, Рис. 48). Повторная иммунизация ХА вакцинными вирусами H5N1 значительно повышала уровни гомологичных и гетерологичных сывороточных IgG антител, тогда как вторая доза вирулентного штамма VN-Лен/134rg значительно повышала только уровни гомологичных антител, но не гетерологичных ($p=0,014$ и $p=0,56$, соответственно).

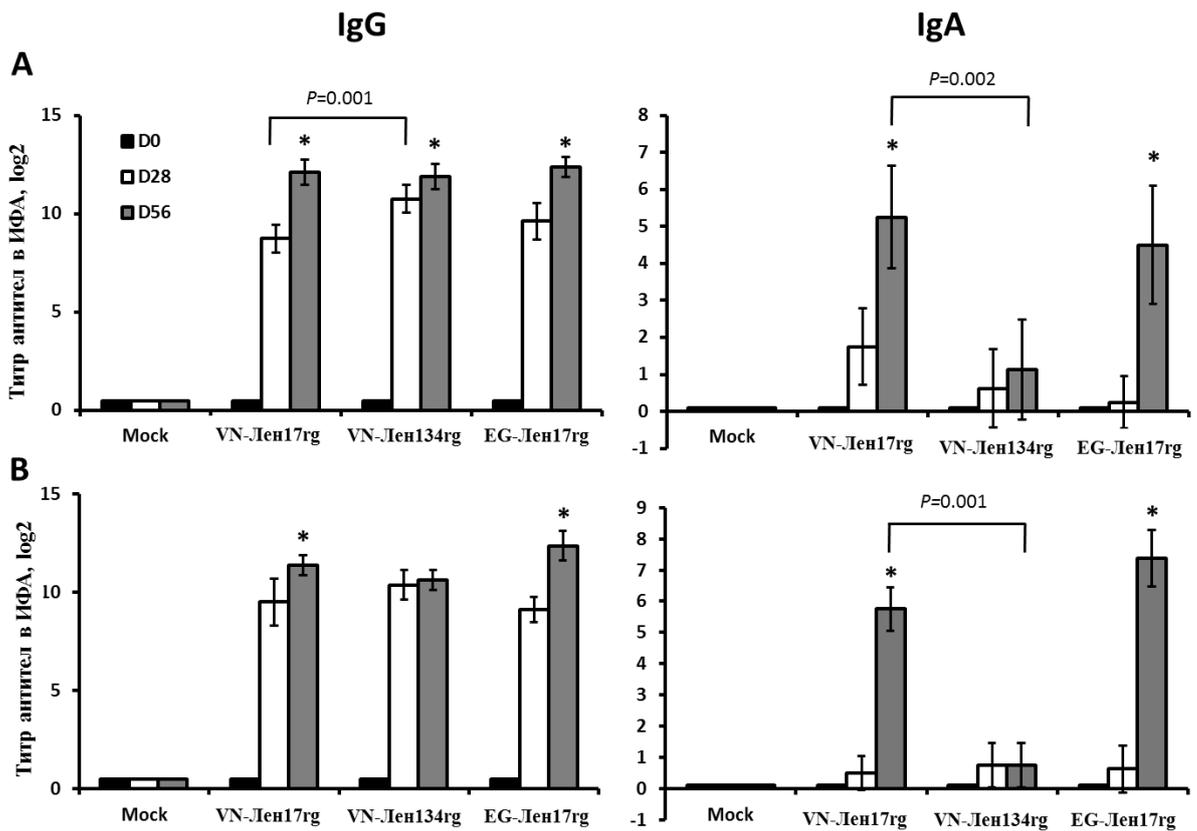


Рисунок 48. Уровни IgG антител в сыворотках мышей, привитых двукратно реассортантными штаммами H5N1. Уровни IgG антител выявляли в ИФА с цельными вирусами VN1203 (A) и EG321 (B) в качестве антигена. * $p<0,05$ по сравнению с однократной иммунизацией.

В отличие от IgG антител, холодоадаптированный вакцинный штамм VN-Лен/17rg индуцировал более высокие уровни IgA антител в сыворотках крови мышей, чем вирулентный штамм VN-Лен/134rg: титр IgA антител к вирусу VN1203 после двух вакцинаций штаммом VN-Лен/17rg достигали $5,3 \log_2$, тогда как уровни таких антител после двух доз вируса VN-Лен/134rg не превышали $2,0 \log_2$ ($p=0,002$). Такая же тенденция была отмечена для гетерологичных анти-EG321 IgA антител ($5,8 \log_2$ и $0,8 \log_2$ после двух доз вирусов VN-Лен/17rg и VN-Лен/134rg соответственно, $p=0,001$, Рис. 48). Две дозы другого ХА вакцинного вируса EG-Лен/17rg также были способны индуцировать высокие уровни IgA антител, как гомологичных, так и гетерологичных ($7,4 \log_2$ и $4,5 \log_2$, соответственно).

Данный эксперимент показал разнонаправленный характер модификации иммунного ответа у мышей при внесении в геном вакцинного штамма аттенуирующих мутаций от холодоадаптированного штамма Лен/17, тогда как ранее считалось, что при ослаблении вирулентных свойств вируса происходит только снижение его иммуногенных свойств.

7.2.3. Оценка защитной эффективности вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) на модели мышей

Для оценки защитной эффективности вакцинных штаммов Н5N1 как против гомологичного, так и против гетерологичного вируса Н5N1 мышей, иммунизированных двукратно исследуемыми реассортантными штаммами, заражали высокопатогенными вирусами VN1203 и EG321 в дозе 100 LD₅₀. Как показано на рисунке 460, мыши, вакцинированные кандидатными вакцинными штаммами VN-Лен/17rg и EG-Лен/17rg, а также контрольным реассортантным штаммом VN-Лен/134rg, были полностью защищены от размножения высокопатогенных вирусов как в респираторном тракте (носовые ходы, легкие), так и на системном уровне. Челлендж-вирусы не были обнаружены в каких-либо органах мышей, и ни в одной из вакцинированных групп не наблюдалось никаких клинических признаков инфекции, тогда как у мышей из группы плацебо вирусы обнаруживались в высоких титрах во всех изученных органах, что приводило к гибели мышей на 7-8 сутки после заражения (Рис. 50). Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности живых гриппозных вакцин, сконструированных на основе высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1), в отношении как гомологичных, так и антигенно-удаленных вирусов данного подтипа, и при этом такая защита хорошо коррелирует с перекрестно-реактивным гуморальным иммунным ответом мышей на вакцинацию (Рис. 47 и 48).

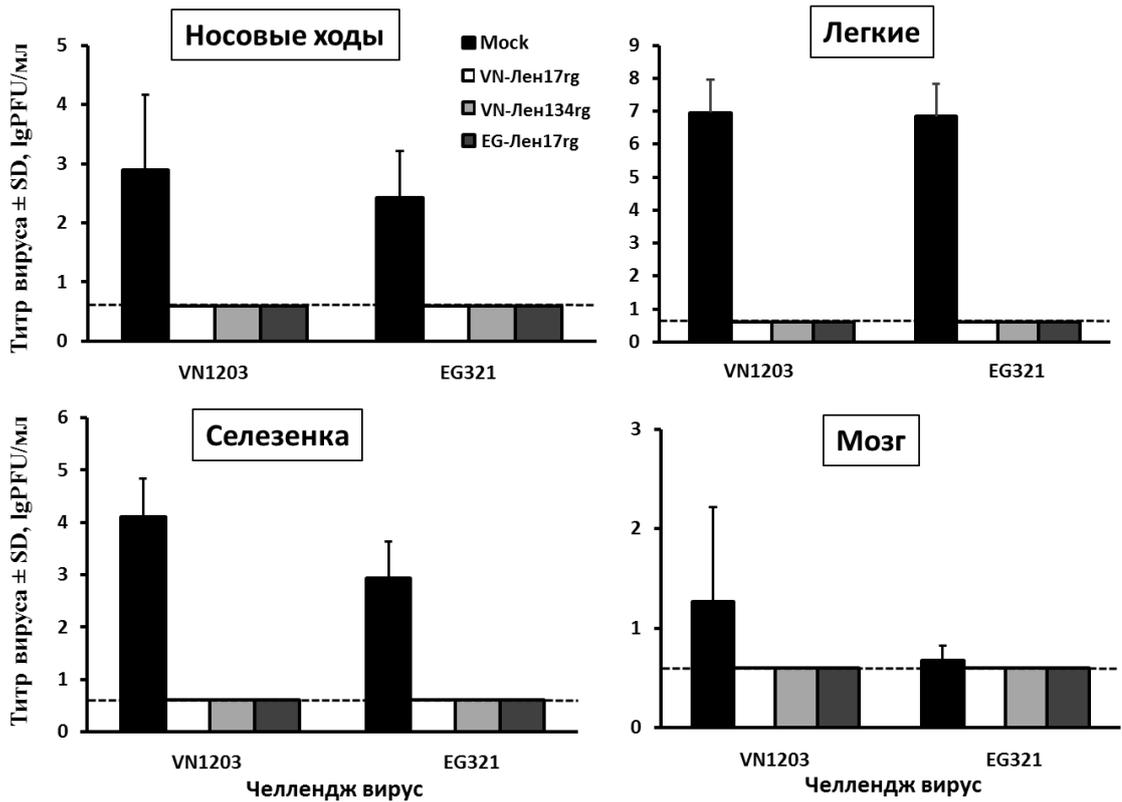


Рисунок 49. Титры гомологичных и гетерологичных высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) в органах иммунизированных и контрольных мышей на 3 сутки после челленджа. Уровень детекции (пунктирная линия) составил 0,6 IgBОЕ/мл.

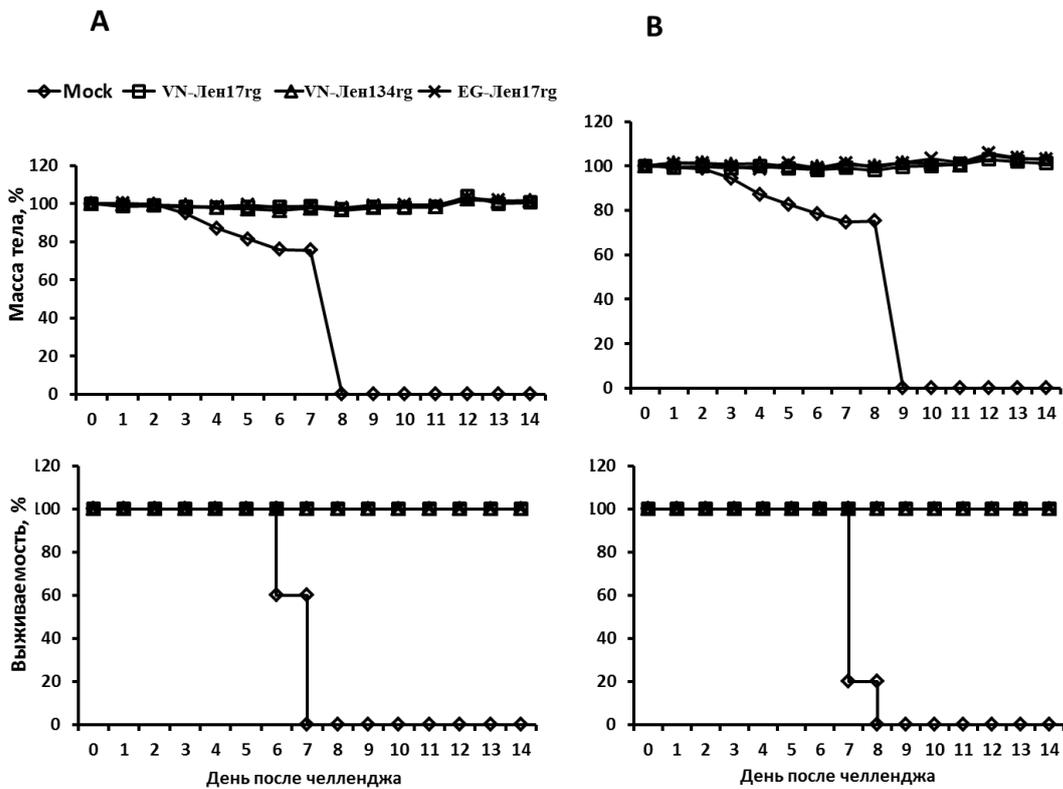


Рисунок 50. Потеря веса и выживаемость иммунизированных и контрольных мышей после челленджа гомологичным и гетерологичным высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1). (А) заражение вирусом VN1203. (В) заражение вирусом EG321.

7.3 Сравнительное изучение живой и инактивированной гриппозных вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) на модели хорьков

Поскольку хорьки являются наиболее пригодной моделью животных для изучения гриппозных вакцин [284, 311], представлялось важным всесторонне изучить новый реассортантный штамм для ЖГВ против высокопатогенных вирусов Н5N1 на этих животных. В данной главе также впервые проводилось сравнительное изучение иммуногенности и защитной эффективности экспериментальных серий живой и инактивированной вакцин, подготовленных из вакцинного реассортантного штамма VN-Лен/17rg (Н5N1), накопленного в линии клеток MDCK, адаптированной к росту в бессывороточной среде.

7.3.1. Оценка безвредности живой гриппозной вакцины против высокопатогенного вируса гриппа А(Н5N1) на модели хорьков

На начальном этапе проводили оценку безвредности вакцинного штамма VN-Лен/17rg для хорьков. Для этого 6 животных заражали интраназально вакцинным вирусом в дозе 10^6 ЭИД₅₀, и определяли титр вируса в носовых смывах трех животных на 1, 3, 5 и 7 сутки. Трех животных забивали на 3 сутки после заражения для оценки вирусной нагрузки в следующих органах: легкие, носовые ходы, селезенка, мозг. Кроме того, за животными велось наблюдение: измеряли вес, температуру и оценивали клинические проявления инфекции, выражаемые в индексе активности животных (1 балл, когда животное игривое без стимуляции, 2 балла – когда требуется стимуляция для проявления активности, и 3 балла, когда животное не игривое даже при внешней стимуляции). В качестве положительного контроля использовали группу хорьков, зараженных высокопатогенным вирусом VN1203 в дозе 10^5 ЭИД₅₀.

Вакцинный вирус VN-Лен/17rg выделялся только в верхних дыхательных путях хорьков, тогда как контрольный вирулентный вирус обнаруживался в высоких титрах во всех исследованных тканях, что приводило к проявлению выраженных клинических симптомов у животных, потребовавших проведения эвтаназии на 6 сутки исследования (Табл. 38). В отличие от вирулентного вируса, вакцинный реассортант VN-Лен/17rg вызывал лишь незначительную потерю веса и практически не сказывался на общем состоянии хорьков. Суммарно, представленные данные убедительно демонстрируют безвредность вакцинного штамма VN-Лен17rg для хорьков (Табл. 38).

Таблица 38. Аттенуированный фенотип вакцинного штамма VN-Лен/17rg (H5N1) для хорьков

Вирус	Макс. титр в назальных смывах ^a (lgЭИД ₅₀ /мл)	Активность, баллы ^b	Макс. Потеря веса, %	Титр вируса (lgЭИД ₅₀ /мл или г)			
				Легкие	Носовые ходы	Мозг	Селезенка
VN-Лен17rg	3,8±0,4	1,0	5,1±3,0	≤1,5	2,5±0,9	≤1,5	≤1,5
VN1203	5,5±0,0	2,4	15,0±0,2	4,0±1,3	5,1±0,8	4,8±2,2	2,0±0,9

^aПик вирусной нагрузки в назальных смывах рассчитан на 1 сутки для вакцинного вируса VN-Лен17rg и на 5 сутки для вирулентного вируса VN1203.

^bИндекс активности по [402, 566].

7.3.2. Оценка иммуногенности живой и инактивированной гриппозных вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели хорьков

Сравнительную оценку иммуногенности экспериментальных серий живой и инактивированной вакцин, подготовленных из вакцинного реассортантного штамма VN-Лен/17rg (H5N1), проводили на хорьках путем их двукратной интраназальной (для ЖГВ, доза 10⁷ ЭИД₅₀) и внутримышечной (для ИГВ, доза 15 мкг НА + адьювант АЮН) иммунизации с промежутком 21 день. Образцы назальных смывов и сывороток крови забирали до вакцинации (D0), через 3 недели после первой дозы (D21), и через 4 недели после второй дозы (D49).

Образцы сывороток крови анализировали на присутствие антигемагглютинирующих гомологичных антител к вирусу VN1203, а также гетерологичных антител к вирусу другого клэйда А/Египет/2321/2007 (H5N1) (клэйд 2.2.1). Однократная иммунизация как ЖГВ, так и ИГВ вызывала образование гомологичных антител, которые значительно повышались после повторной иммунизации. Титры антител контрольных животных оставались на базовом уровне в течение всего эксперимента (Рис. 51). В отличие от гомологичных антител, титры гетерологичных антител к вирусу EG2321 были минимальными в обеих вакцинных группах после однократной иммунизации, но увеличивались, по крайней мере, в 4 раза после второй дозы вакцины (Рис. 51). Как и ожидалось, по уровню сывороточных антигемагглютинирующих антител к обоим вирусам H5N1 инактивированная вакцина была более иммуногенна, чем живая.

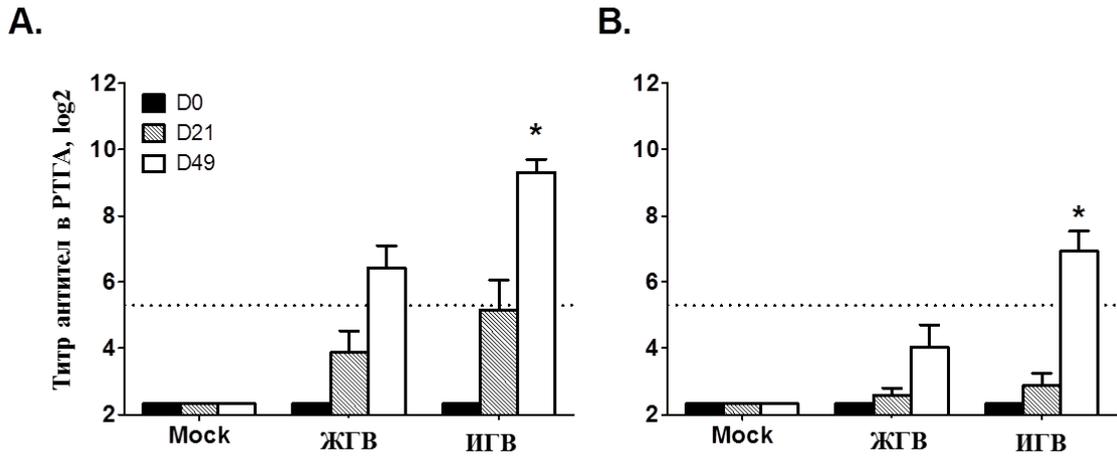


Рисунок 51. Уровни антигемагглютинирующих антител в сыворотках крови хорьков, привитых живой и инактивированной вакциной из реассортантного штамма VN-Лен/17rg (H5N1). Титры антител выявляли в РТГА к двум антигенам: VN1203 (А) и EG2321 (В). * $p < 0,05$ по сравнению с ЖГВ. Пунктирной линией обозначены серопротективные уровни антител ($>5,3 \log_2$).

Аналогично, сывороточные анти-VN1203 IgG и IgA антитела в сыворотках крови хорьков, привитых инактивированной вакциной, были значительно выше таковых после иммунизации живой вакциной, причем как после одной дозы, так и после двух доз ($p < 0,05$, Рис. 52А). Как и ожидалось, титры IgG и IgA антител у контрольной группы на 21 и 49 дни оставались на фоновых уровнях. В совокупности эти данные демонстрируют более выраженный гуморальный иммунный ответ как на гомологичные, так и на гетерологичные антигены H5N1, при иммунизации ИГВ по сравнению с ЖГВ.

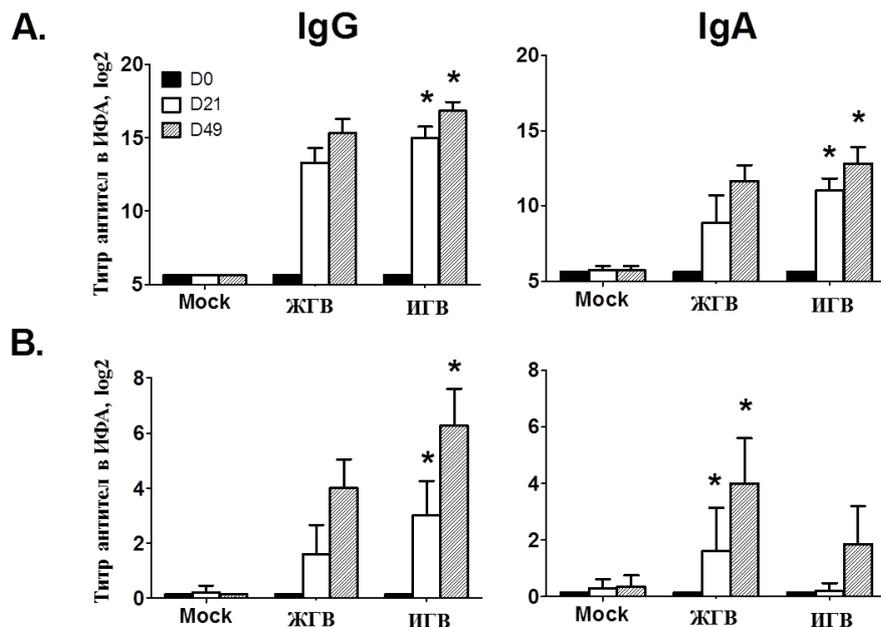


Рисунок 52. Уровни VN1203-специфичных IgG и IgA антител в сыворотках (А) и назальных смывах (В) хорьков, привитых живой и инактивированной вакциной из реассортантного штамма VN-Лен/17rg (H5N1). Титры антител выявляли в ИФА к цельному вирусу VN1203. * $p < 0,05$ по сравнению с ЖГВ или ИГВ.

Подобные результаты были получены и при анализе уровней VN1203-специфичных IgG антител в назальных смывах вакцинированных хорьков: титры антител на 21 и на 49 сутки у хорьков группы ИГВ превышали таковые у хорьков группы ЖГВ ($p < 0,05$, Рис. 52В). В отличие от IgG антител, локальные IgA антитела едва обнаруживались после однократной иммунизации ИГВ, тогда как одна доза ЖГВ стимулировала данные секреторные антитела на достаточно высоком уровне ($p < 0,05$, Рис. 52В). Несмотря на то, что вторая доза каждой из вакцин повышала уровни VN1203-специфичных локальных IgA антител, средний титр у реципиентов ЖГВ был значительно выше, чем у группы ИГВ. Индуцированные после двукратной иммунизации ИГВ титры секреторных IgA антител были сопоставимы с таковыми после одной дозы ЖГВ, что согласуется с более выраженной способностью ЖГВ индуцировать более мощный локальный IgA-ответ по сравнению с ИГВ (Рис. 52В).

7.3.3. Оценка защитной эффективности живой и инактивированной гриппозных вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) на модели хорьков

Для оценки защитной эффективности ЖГВ и ИГВ, подготовленных из реассортантного штамма VN-Лен/17rg (H5N1), двукратно иммунизированных хорьков заражали интраназально гомологичным высокопатогенным вирусом VN1203 (доза $10^{3,5}$ ЭИД₅₀) или гетерологичным высокопатогенным вирусом EG2321 (доза $10^{7,0}$ ЭИД₅₀) через 7 недель после второй дозы вакцины. Такие дозы челлендж-вирусов были определены в предварительном эксперименте как летальные для хорьков (данные не представлены). Защитный эффект вакцинации оценивали по снижению титров челлендж-вирусов в назальных смывах иммунизированных хорьков, по сравнению с группой плацебо, на 1, 3, 5 и 7 сутки после заражения. Кроме того, оценивали клинические симптомы заболевания, такие как подъем температуры, потеря веса, летаргия, неврологические симптомы и др.

После гомологичного заражения вирусом VN1203 у контрольных хорьков регистрировали повышение средней температуры до $40,2^{\circ}\text{C}$ (увеличение на $1,2^{\circ}\text{C}$ по сравнению с исходным уровнем), которая достигла максимума на 1 день после заражения. (Табл. 39). Кроме того, хорьки данной группы теряли в весе более 20%, выделяли вирус как минимум в течение 7 дней (средний титр $10^{5,0}$ ЭИД₅₀/мл) и проявляли признаки летаргии, анорексии, респираторного дистресс-синдрома и неврологической дисфункции, требуя эвтаназии всех шести хорьков на 7 день после заражения (Табл. 39). Напротив, хорьки, вакцинированные либо ЖГВ, либо ИГВ, не проявляли явных клинических признаков инфекции и дожили до конца экспериментального периода. Вирус не был

обнаружен в носовых смывах ни в одной из вакцинных групп, ни в один из временных промежутков (Рис. 53, Табл. 39).

Таблица 39. Защитный эффект вакцинации живой или инактивированной вакциной, подготовленной из реассортантного штамма VN-Лен/17rg (H5N1), при заражении хорьков гомологичным и гетерологичным высокопатогенным вирусом H5N1.

Вакцина	Макс. титр в назальных смывах (lgЭИД ₅₀ /мл)	Активность, баллы ^a	Клинические симптомы ^b					
			Макс. Темп-ра, °С	Макс. Потеря веса, %	Летаргия	Неврология	Респ. дистресс	Диарея
челлендж гомологичным вирусом VN1203								
ЖГВ	≤1.5 ^c	1.0	39.0 ± 0.4	2.5 ± 2.7	0/6	0/6	0/6	0/6
ИГВ	≤1.5	1.0	38.7 ± 0.6	4.0 ± 3.2	0/6	0/6	0/6	0/6
Mock	5.0	2.1	40.2 ± 0.8	22.3 ± 2.4	6/6	4/6	3/6	5/6
Челлендж гетерологичным вирусом EG2321								
ЖГВ	2.6	1.0	39.9 ± 0.2	4.7 ± 3.8	0/6	0/6	0/6	0/6
ИГВ	4.3	1.0	39.8 ± 0.4	8.0 ± 2.1	0/5	0/5	0/5	0/5
Mock	5.8	1.5	40.6 ± 0.5	17.3 ± 3.8	6/6	0/6	0/6	4/6

^aИндекс активности, 1 балл: животное игривое без стимуляции; 2 балла: требуется стимуляция для проявления активности; 3 балла: животное не игривое даже при внешней стимуляции.

^bКлинические симптомы наблюдали в течение 7 дней после челленджа.

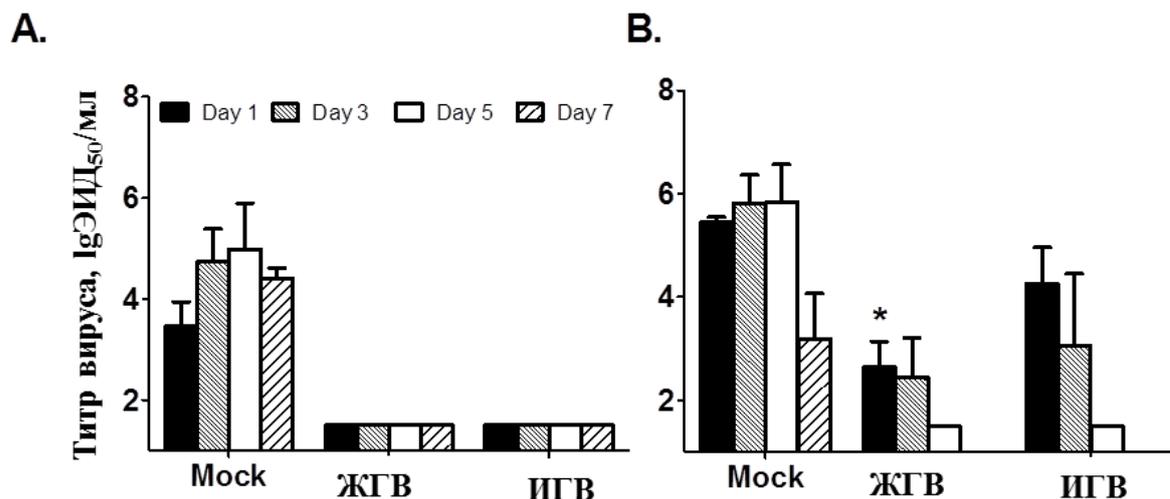


Рисунок 53. Титры гомологичных и гетерологичных высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) в назальных смывах иммунизированных и контрольных хорьков на 1, 3, 5 и 7 сутки после челленджа. А. Заражение гомологичным вирусом VN1203 (доза 10^{3.5} ЭИД₅₀). Б. Заражение гетерологичным вирусом EG2321 (доза 10^{7.0} ЭИД₅₀). Уровень детекции составил 1,2 lgЭИД₅₀/мл. *p<0,05 по сравнению с ИГВ.

После заражения гетерологичным вирусом EG2321 у контрольных хорьков регистрировали температурный всплеск, превышающий 40°C (увеличение на 1,6°C по сравнению с исходным уровнем) на 3 день инфекции. Животные демонстрировали значительную потерю веса (17%) на 8 день после челленджа, при этом три из шести хорьков данной группы требовали эвтаназии к 8 суткам из-за летаргии, анорексии и диареи (Табл. 39). В отличие от контрольных хорьков, вакцинированные животные обеих групп (ЖГВ и ИГВ) при гетерологическом заражении испытывали легкое повышение температуры на 3 сутки после челленджа (увеличение 0,9°C по сравнению с исходным уровнем) и умеренную потерю веса (<10%, Табл. 39). Хотя хорьки обеих вакцинных групп выделяли гетерологичный вирус в носовых смывах, их уровни были значительно ниже, чем в контрольной группе. Так, в группе ИГВ максимальный титр вируса составил $10^{4.3}$ ЭИД₅₀/мл, а в группе ЖГВ – $10^{2.6}$ ЭИД₅₀/мл, тогда как у контрольных животных вирус выделялся в значительно более высоком титре $10^{5.8}$ ЭИД₅₀/мл ($p < 0,05$, Рис. 53). Важно отметить, что титры гетерологичного челлендж-вируса в группе ЖГВ были снижены по сравнению с группой ИГВ как на 1, так и на 3 сутки после челленджа, при этом разница на 1 сутки была достоверной ($p < 0,05$, Рис. 53).

В обеих вакцинных группах гетерологичный вирус уже не обнаруживался к 5 суткам, тогда как контрольные животные выделяли вирус вплоть до 7 суток (Рис. 53). В совокупности эти результаты показывают, что ИГВ и ЖГВ из реассортантного штамма VN-Лен/17rg (H5N1) способны обеспечить полную защиту от гомологичного высокопатогенного вируса H5N1, при этом ЖГВ имеет преимущество перед ИГВ в плане защиты от заражения гетерологичным вирусом, и данная дополнительная защита коррелирует с усиленной индукцией перекрестно-реагирующих секреторных IgA антител после иммунизации.

7.4 Изучение патогенности живой гриппозной вакцины против высокопатогенного вируса гриппа А(H5N1) на курах

В настоящее время для всех гриппозных вакцин, подготовленных из высокопатогенных вирусов гриппа птиц, требуется проведение дополнительных тестов с целью подтверждения их безопасности для домашней птицы [518]. Данные предосторожности необходимы для исключения потенциальной опасности вакцинных вирусов для сельского хозяйства, в особенности при производстве вакцин на основе куриных эмбрионов. Современные требования включают тест на патогенность вируса при внутривенном введении, при этом индекс патогенности не может превышать значения 1,2 для вакцинных штаммов [365]. Кроме того, для живых гриппозных вакцин необходимо

продемонстрировать отсутствие способности активно реплицироваться в органах кур и, соответственно, выделяться в окружающую среду.

7.4.1. Оценка патогенности вакцинного штамма VN-Лен/17rg (H5N1) для кур при внутривенном введении

Группам из восьми 4-недельных цыплят Белый леггорн (SPF) вводили внутривенно вакцинный штамм VN-Лен/17rg (H5N1) или высокопатогенный вирус VN1203 в объеме 0,2 мл (разведение 1:10 вирусного стока) и наблюдали за животными в течение 14 дней. В вакцинной группе 8 из 8 цыплят оставались здоровыми в течение всего периода наблюдения, тогда как в контрольной группе 100% цыплят, зараженных высокопатогенным вирусом VN1203, погибли от инъекции, причем средняя продолжительность жизни цыплят составила всего 1,1 день (Табл. 40).

Таблица 40. Патогенность вирусов H5N1 для кур при внутривенном введении

Вирус	Заболеваемость	Смертность (продолжительность жизни)
VN-Лен/17rg (H5N1)	0/8	0/8
A/Вьетнам/1203/2004 (H5N1)	8/8	8/8 (1,1 день)*

*все погибшие животные демонстрировали признаки инфекции, свойственные высокопатогенным вирусам гриппа, включая закупорку легких с пневмонией, петехиальные кровоизлияния во внутренних органах и гребешках.

Таким образом, согласно классификации Всемирной организации по охране здоровья животных, вакцинный штамм VN-Лен/17rg (H5N1) является апатогенным для кур [365].

7.4.2. Оценка репликации вакцинного штамма VN-Лен/17rg (H5N1) в органах кур при интраназальном введении

Для оценки репродуктивной активности вакцинного вируса в респираторном тракте и кишечнике кур группы из восьми 4-недельных цыплят Белый леггорн (SPF) заражали интраназально вакцинным вирусом VN-Лен/17rg (H5N1) в дозе 10^6 ЭИД₅₀, в объеме 0,1 мл. Мазки из зева и клоаки собирали на 3 сутки после заражения. Кроме того, у двух цыплят дополнительно собирали внутренние органы на 3 сутки для определения наличия в них вируса гриппа. Титры вирусов в мазках и органах определяли с помощью заражения РКЭ, при этом уровень детекции для мазков составил 0,9 IgЭИД₅₀/мл, а для органов – 1,9 IgЭИД₅₀/г. Для подтверждения наличия продуктивной инфекции у кур собирали сыворотки крови на 14 сутки после заражения и наличие специфических антител определяли в РТГА. Группа из 8 цыплят, зараженных высокопатогенным вирусом

VN1203, служила в качестве положительного контроля. Вакцинный вирус VN-Лен/17rg (H5N1) не обнаруживался в образцах из трахеи и клоаки ни в одном из 8 опытных животных, тогда как в контрольной группе высокопатогенный вирус выделялся во всех образцах 100% животных (вирус выделяли у павших животных, не доживших до 3 суток эксперимента) (Табл. 41). У животных вакцинной группы вирус также не был обнаружен ни в одном из исследованных органов (почках, сердце, мозге, легком) на 3 сутки после заражения. Кроме того, анализ сывороток кур на 14 сутки эксперимента также не выявили образования специфических вирус H5N1 антител.

Таблица 41. Репликация вирусов H5N1 в органах кур при интраназальном введении

Вирус	Выделение вируса на 3 сутки		Серологическое подтверждение инфекции на 14 день
	Мазок из зева	Мазок из клоаки	
VN-Лен17rg (H5N1)	0/8	0/8	0/8
А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1)	8/8	8/8 [†]	н.д.*

[†]вирус выделялся у животных на момент смерти (1-2 сутки); *не делали, недостаточный срок для развития иммунитета в связи с ранней гибелью животных.

Таким образом, вакцинный вирус не размножается в органах кур до уровней, детектируемых при помощи вирусологических (день 3) и серологических (день 14) тестов. Отсутствие репликации вакцинного вируса VN-Лен/17rg (H5N1) у птиц указывает на то, что вероятность его реверсии к более вирулентной форме является крайне низкой. Отсутствие вируса в респираторных образцах и клоакальных выделениях указывают на то, что этот вирус не представляет собой какой-либо экологический риск при использовании в практике здравоохранения. Суммарно, полученные на курах данные позволили исключить вакцинный реассортант VN-Лен/17rg (H5N1) из списка опасных вирусов гриппа (Select Agent list), и с данным вирусом разрешена работа в лабораториях второго уровня биобезопасности (BSL-2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном разделе работы были впервые применены методы обратной генетики для конструирования вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа птиц подтипа А(H5N1), используя в качестве безопасной основы отечественный донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Детальное изучение полученных вакцинных штаммов против высокопатогенных вирусов двух различных клонированных в системах *in vitro* и

in vivo (на моделях мышей, хорьков и домашних кур) показало, что полученные генно-инженерными методами вакцинные штаммы ЖГВ обладают необходимым набором полезных признаков, свойственных классическим реассортантным штаммам для ЖГВ. Полученные штаммы были безвредны при интраназальном введении лабораторным животным, при этом эксперименты на мышах BALB/c и хорьках продемонстрировали высокую иммуногенность полученных вакцинных штаммов ЖГВ H5N1 и их способность обеспечивать защиту не только против гомологичного высокопатогенного вируса гриппа H5N1, но и против вирусов других генетических линий. Важным результатом данного раздела работы является доказательство более выраженной защиты, обеспечиваемой живой гриппозной вакциной, перед инактивированной, при заражении иммунизированных хорьков гетерологичным высокопатогенным вирусом гриппа H5N1. Данное преимущество ЖГВ будет иметь важное практическое значение в случае возникновения пандемии, вызванной вирусом H5N1, поскольку позволит обеспечить защиту населения на начальном этапе пандемии, пока не будут наработаны необходимые объемы вакцины из циркулирующих вирусов.

Суммарно, полученные в ходе исследований результаты явились основой для составления досье для проведения первой фазы клинических испытаний безвредности и иммуногенности ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 на добровольцах.

ГЛАВА 8 РАЗРАБОТКА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, ИНДУЦИРУЮЩЕЙ ШИРОКИЙ СПЕКТР ПЕРЕКРЕСТНО-РЕАГИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА

В данной главе приводятся экспериментальные свидетельства перспективности использования платформы живых гриппозных вакцин для конструирования генно-инженерными методами универсальной гриппозной вакцины нового поколения, эффективной в отношении широкого спектра вирусов гриппа типа А. При этом рассматриваются современные стратегии усиления перекрестно-реагирующего гуморального и Т-клеточного иммунитета.

8.1 Подходы к индукции кросс-реактивного гуморального иммунного ответа

Одной из перспективных мишеней для создания универсальных вакцин является консервативный участок молекулы гемагглютинина – домен HA2 (stalk–домен, «стебель», «ножка») [455]. Поскольку он сам по себе низкоиммуногенен, применяются различные стратегии к повышению его иммуногенности. До настоящего исследования создание подобных химерных конструкций на основе живого аттенуированного вируса с последующей интраназальной вакцинацией в литературе описано не было.

8.1.1. Конструирование живых гриппозных вакцин, экспрессирующих химерные молекулы гемагглютинина, и оценка их биологических свойств

В настоящем исследовании было сконструировано два набора вакцинных штаммов ЖГВ, содержащих химерные молекулы HA, один из которых содержал stalk-домен от HA вируса A/PR8/34 (H1N1), а второй – от пандемического вируса гриппа H1N1pdm09 (А/Калифорния/7/2009 или А/Южная Африка/3626/2013, имеющие гомологию 99% по аминокислотному составу HA). Вакцинные штаммы ЖГВ получали с помощью методов обратной генетики, при этом все вирусы содержали шесть генов внутренних и неструктурных белков от ХА донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

Конструирование химерных молекул HA проводили по схеме, представленной на рисунке 54. Химерные гены HA, содержащие stalk-домен вируса А/Калифорния/7/2009 и глобулярные домены вирусов А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) и А/дикая утка/Швеция/24/02 (H8N4), были химически синтезированы в Icahn School of Medicine at Mount Sinai (Нью-Йорк, США) с последующим субклонированием в векторы для обратной генетики. Дополнительные химерные HA, несущие stalk-домен вируса А/PR/8/34 или А/Южная Африка/3626/2013 и глобулярные домены вирусов А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) и А/перепел/Гонконг/G1/1997 (H9N2) были получены нами методами генной

инженерии. Для этого глобулярные домены НА (от 52 до 277 аминокислоты, НЗ нумерация) вирусов PR8 и А/Южная Африка/3626/2013 были удалены с помощью стратегии перекрывающейся ПЦР, при этом в данном положении вводился сайт рестрикции BsmBI. Затем участки НА с 52 по 277 а.к. вирусов H5N1 и H9N2 вставляли в подготовленные молекулы НА вирусов PR8 и А/Южная Африка/3626/2013 с использованием рестриктазы BsmBI. Все полученные сНА-конструкции были полностью секвенированы для подтверждения их нуклеотидной последовательности. Для получения контрольных реассортантных штаммов ЖГВ с классическими НА полноразмерные НА гены вирусов H5N1, H8N4 и H9N2 клонировали в векторы для обратной генетики из соответствующих вирусов гриппа дикого типа, с дополнительным удалением полиосновного кливедж-сайта молекулы НА H5N1 вируса.

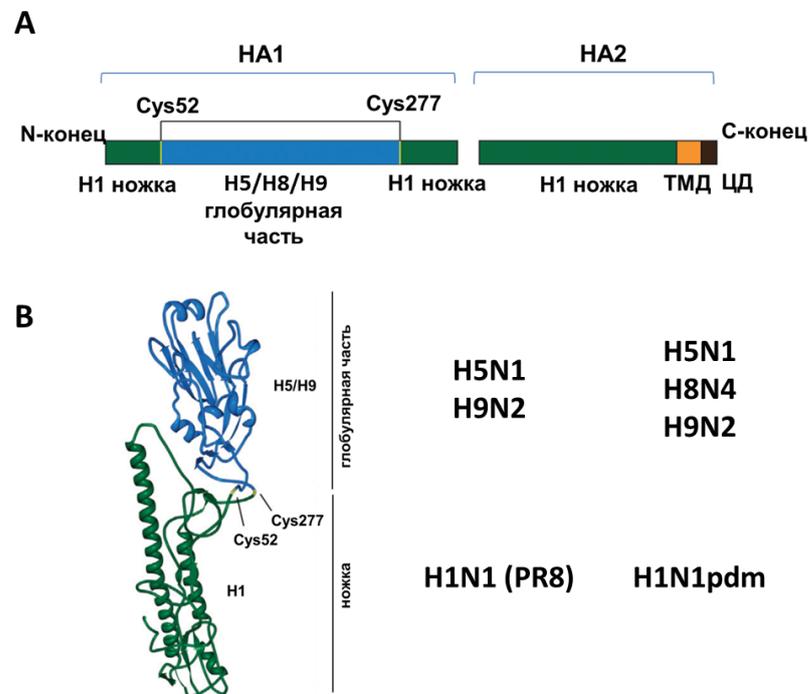


Рисунок 54. Схема химерной молекулы НА. ТМД – трансмембранный домен, ЦД – цитоплазматический домен. Нумерация цистеинов дана по НЗ. **А.** Доменная организация. **В.** Трехмерная модель.

Жизнеспособные вакцинные штаммы, содержащие химерные и классические НА, получали методом электропорации клеток Vero. Кроме того, в работе был использован контрольный вакцинный реассортантный штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2), подготовленный классической реассортацией в РКЭ [10]. Все вакцинные штаммы подвергались полногеномному секвенированию. Состав генома всех вакцинных реассортантов представлен в таблице 42.

Таблица 42. Состав генома использованных в работе реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ

Обозначение штамма	Источник поверхностных генов*		
	Глобулярный домен HA	stalk-домен HA	NA
H5N1 ЖГВ	H5N1	H5N1	H5N1
H9N2 ЖГВ	H9N2	H9N2	H9N2
H5N1 _p ЖГВ	H5N1	H5N1	pH1N1
H8N1 _p ЖГВ	H8N4	H8N4	pH1N1
H9N1 _p ЖГВ	H9N2	H9N2	pH1N1
cH5/1N1 ЖГВ	H5N1	PR8 (H1N1)	H5N1
cH9/1N2 ЖГВ	H9N2	PR8 (H1N1)	H2N2
cH5/1N1 _p ЖГВ	H5N1	pH1N1	pH1N1
cH8/1N1 _p ЖГВ	H8N4	pH1N1	pH1N1
cH9/1N1 _p ЖГВ	H9N2	pH1N1	pH1N1

*остальные шесть генов принадлежат донору аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2); N1_p: NA от пандемического вируса H1N1pdm.

Вирусологическую характеристику вакцинных штаммов с классическими и химерными молекулами HA проводили путем их титрования в РКЭ, инкубированных при различных температурах инкубации. Известно, что вакцинные штаммы ЖГВ характеризуются *ts/ca* фенотипом, т.е. они способны активно размножаться при пониженной до 26°C температуры, при этом их репликация при 38°C и выше значительно снижена по сравнению с вирусами дикого типа. Важно отметить, что замена HA в классических ЖГВ на химерные молекулы не влияла на *ts* фенотип вакцинных вирусов: все ЖГВ с химерными HA плохо размножались при высокой температуре в РКЭ (Табл. 43). Большинство ЖГВ с химерными HA также сохраняли *ca* фенотип, за исключением штамма cH5/1N1 ЖГВ, содержащего stalk-домен от вируса PR8. Этот вирус плохо репродуцировался при 26°C, а разница с титром при 33°C достигала 5,5 lgЭИД₅₀. Интересно, что аналогичный реассортант cH5/1N1_p ЖГВ, но содержащий stalk-домен от вируса H1N1pdm09, сохранил свой *ca* фенотип (разница в титрах вируса при 33 и 26°C не превышала 3,0 lgЭИД₅₀). Эти данные свидетельствуют о том, что чужеродный stalk-домен в молекуле HA вакцинного штамма ЖГВ может отрицательно влиять на холодадаптированный фенотип вируса, но этот эффект является штамм-специфичным, так как другой штамм, содержащий stalk-домен вируса PR8 (cH9/1N2), эффективно реплицировался при низких температурах в РКЭ (Табл. 43).

Таблица 43. Вирусологическая характеристика вакцинных штаммов ЖГВ, содержащих химерные и природные молекулы НА

Вакцинный вирус	Титр вируса в РКЭ, lgЭИД ₅₀ /мл			Фенотип	Титр вируса в клетках MDCK, lgТЦИД ₅₀ /мл
	33°C	38°C	26°C		
Штаммы ЖГВ с классическими молекулами НА					
H5N1	8.7±0.3	2.0±0.2	5.9±0.7	<i>ts/ca</i>	8.5±0.7
H9N2	9.5±0.3	2.2±0.2	7.7±0.6	<i>ts/ca</i>	9.1±0.5
H5N1 _p	8.9±0.4	2.1±0.1	6.8±0.1	<i>ts/ca</i>	7.5±0.6
H8N1 _p	8.6±0.4	1.4±0.2	6.2±0.4	<i>ts/ca</i>	6.9±0.8
H9N1 _p	8.9±0.3	1.5±0.3	7.3±0.5	<i>ts/ca</i>	7.9±0.1
Штаммы ЖГВ с химерными молекулами НА – stalk-домен от вируса PR8					
cH5/1N1	7.8±0.6	1.4±0.4	2.3±0.4	<i>ts/non-ca</i>	6.3±0.4 [†]
cH9/1N2	9.2±0.5	2.0±0.2	7.0±0.5	<i>ts/ca</i>	6.7±0.3 [†]
Штаммы ЖГВ с химерными молекулами НА – stalk-домен от вируса H1N1pdm					
cH5/1N1 _p	9.6±0.2	3.0±0.2	6.9±1.0	<i>ts/ca</i>	8.0±0.8
cH8/1N1 _p	8.2±0.4	2.7±0.3	5.7±0.8	<i>ts/ca</i>	6.2±0.8
cH9/1N1 _p	8.2±0.5	2.5±0.4	5.7±0.3	<i>ts/ca</i>	4.6±0.7 [†]

N1_p: НА от пандемического вируса H1N1pdm09; [†]p<0.05 по сравнению с контрольным штаммом ЖГВ, содержащим классический НА.

Немаловажно, что реассортантные штаммы с химерными НА сохраняли способность активно реплицироваться в РКЭ при оптимальных условиях: их титры при 33°C были сопоставимы с таковыми классических аналогов. В отличие от РКЭ, активность репродукции исследуемых штаммов ЖГВ в клетках MDCK значительно варьировалась. Так, оба вакцинных вируса, содержащих stalk-домен вируса PR8, а также штамм, содержащий stalk-домен вируса H1N1pdm09, а глобулярную часть от вируса H9N2 (сH9/1N1_p ЖГВ), имели сниженные на 2,2-3,3 lgТЦИД₅₀ титры в клетках по сравнению с их аналогами, содержащими природные НА (Табл. 43). Эти результаты показывают, что включение нерелевантного stalk-домена в молекулы гемагглютинина вирусов H5N1 или H9N2 может снижать способность вирусов к репликации в клетках млекопитающих, не влияя при этом на активность репродукции в РКЭ. Примечательно, что негативный эффект stalk-домена вируса H1N1pdm был также штамм-специфичным, поскольку реассортантные штаммы cH5/1N1_p и cH8/1N1_p ЖГВ имели титры в клетках MDCK, сопоставимые с соответствующими контрольными вакцинными штаммами H5N1_p и H8N1_p ЖГВ. Поскольку титры вакцинных вирусов в клетках MDCK значительно варьировали между исследуемыми вакцинными штаммами, дозы вирусов для дальнейших экспериментов на животных рассчитывались, исходя из титров вирусов в РКЭ.

8.1.2. Оценка иммуногенности и защитной эффективности живых гриппозных вакцин, экспрессирующих химерные молекулы гемагглютинина, на модели мышей линии C57BL/6J

На начальном этапе изучения вакцинных штаммов ЖГВ с различными конструкциями гемагглютинина был проведен эксперимент по оценке прямой защиты мышей линии C57BL/6J от различных подтипов вируса гриппа А в результате последовательной иммунизации животных двумя дозами вакцин, экспрессирующих как нативные, так и химерные НА (Рис. 55). В данном эксперименте сравнивались штаммы ЖГВ подтипов H5N1 и H9N2, у которых stalk-домен был заменен на таковой вируса PR8. Сравнение защитной эффективности иммунизации вакцинными штаммами, содержащими химерные НА, с защитным эффектом после иммунизации классическими ЖГВ позволит выявить роль stalk-домена в перекрестной защите от гетерологичных вирусов гриппа.

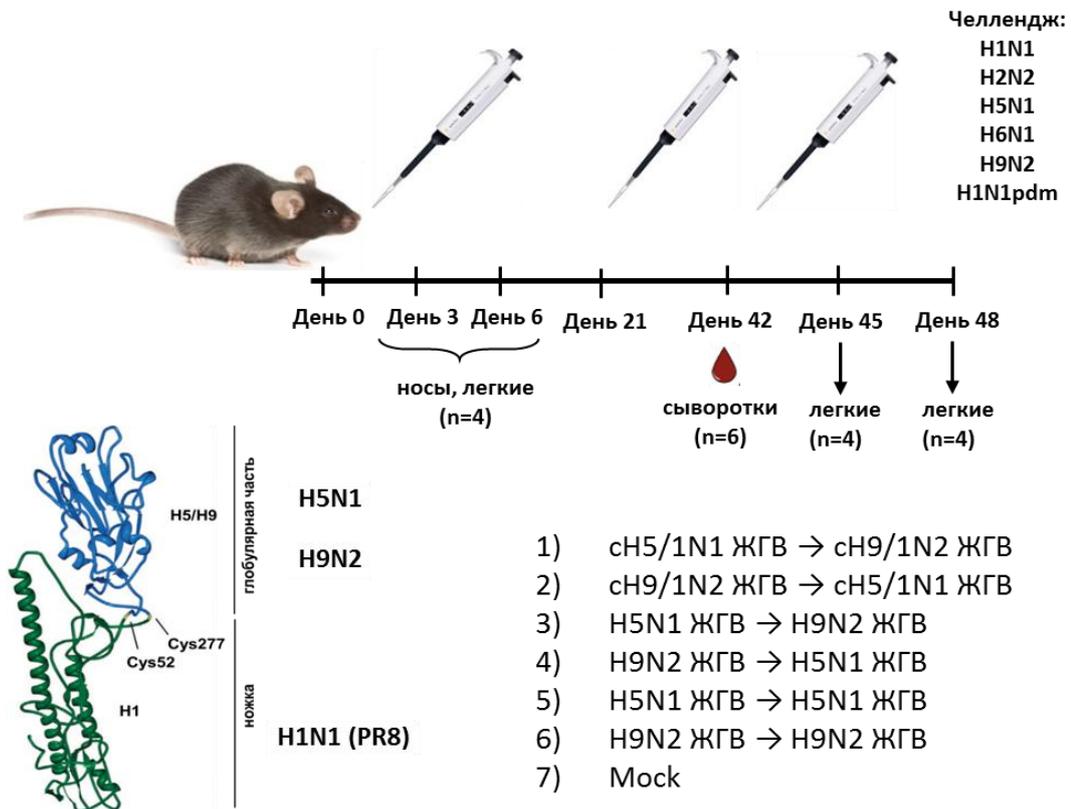


Рисунок 55. Схема эксперимента по оценке прямой защиты мышей линии C57BL/6J при помощи последовательной иммунизации вакцинными штаммами ЖГВ, экспрессирующими химерные и классические молекулы НА.

В первую очередь была оценена активность репликации исследуемых вакцинных штаммов в респираторном тракте мышей. Животных заражали интраназально вакцинными вирусами в дозе 10^7 ЭИД₅₀ (предварительный эксперимент с заражающей дозой 10^6 ЭИД₅₀ показал очень слабый уровень репликации вакцинных штаммов с

химерными НА в верхних дыхательных путях мышей). Было показано, что вакцинные вирусы, содержащие химерные НА, в целом размножались в верхних дыхательных путях мышей хуже контрольных вирусов, содержащих природные НА. Хотя эта разница для вирусов подтипа H5N1 не достигала статистической значимости ($p=0,083$, Рис. 56), для вирусов подтипа H9N2 эта разница была более выраженной и статистически достоверной на обеих временных точках ($p=0,021$ и $0,047$ для 3 и 6 суток, соответственно). Важно отметить, что репликация всех исследованных штаммов ЖГВ в легких была ограничена и не превышала $1,7 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, что подтверждает их аттенуированный фенотип.

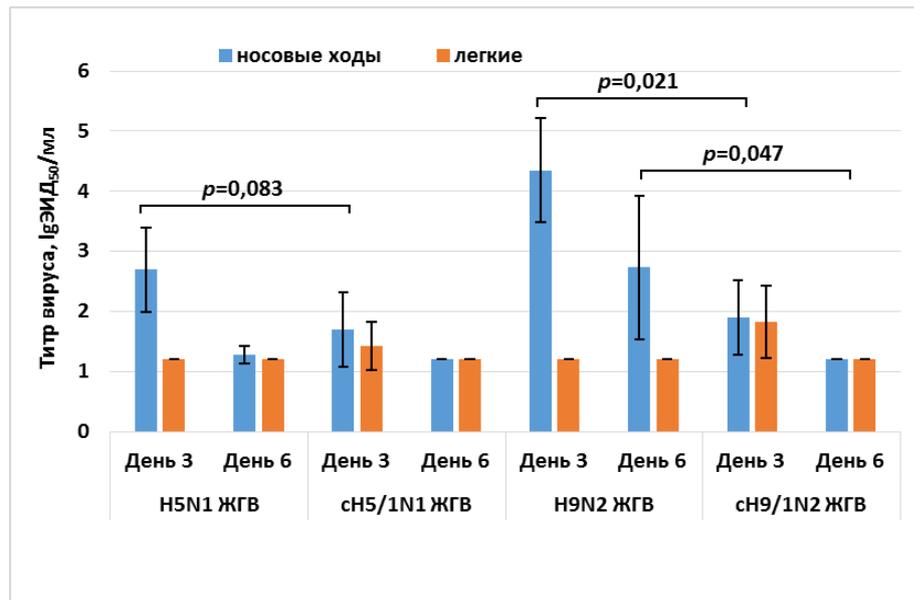


Рисунок 56. Репликация вакцинных штаммов ЖГВ в респираторном тракте мышей линии C57BL/6J. Указаны достоверные различия между сравниваемыми группами (тест Манна-Уитни).

Несмотря на сниженную инфекционную активность вакцинных вирусов с химерными НА, последовательная иммунизация штаммами сH5/1N1 ЖГВ и сH9/1N2 ЖГВ в обеих комбинациях приводила к индукции существенных уровней гуморального иммунного ответа, сопоставимого с таковым после иммунизации классическими ЖГВ. Так, определение уровней антигемагглютинирующих антител против панели вирусов гриппа А различных подтипов выявило высокие титры антител к вирусу H5N1 во всех вакцинных группах, кроме H9N2+H9N2 (Рис. 57). Эти данные свидетельствуют о продуктивной инфекции, вызванной исследуемыми вакцинными штаммами, при этом мыши, иммунизированные дважды классическим вариантом ЖГВ H5N1, имели достоверно более высокие титры анти-H5 антител, по сравнению с другими опытными группами. Ни в одной из экспериментальных групп не было обнаружено антигемагглютинирующих антител к вирусам H1N1 и H6N1, тогда как при использовании

в качестве антигенов вирусов H2N2 и H9N2 антитела выявлялись в сыворотках не только привитых мышей, но также и у животных группы плацебо, что указывает на неспецифическое ингибирование данных вирусов сыворотками C57BL/6J мышей (Рис. 57). Интересно, что уровни выявленных анти-H2N2 и анти-H9N2 антител в вакцинных группах (кроме H9N2+H9N2) достоверно не отличались от группы плацебо, даже несмотря на использование cH9/1N2 или H9N2 ЖГВ в качестве одной из вакцинных доз. Эти данные свидетельствуют о преимущественном формировании антител к глобулярному домену вируса H5N1, но не к остальным изученным вирусам.

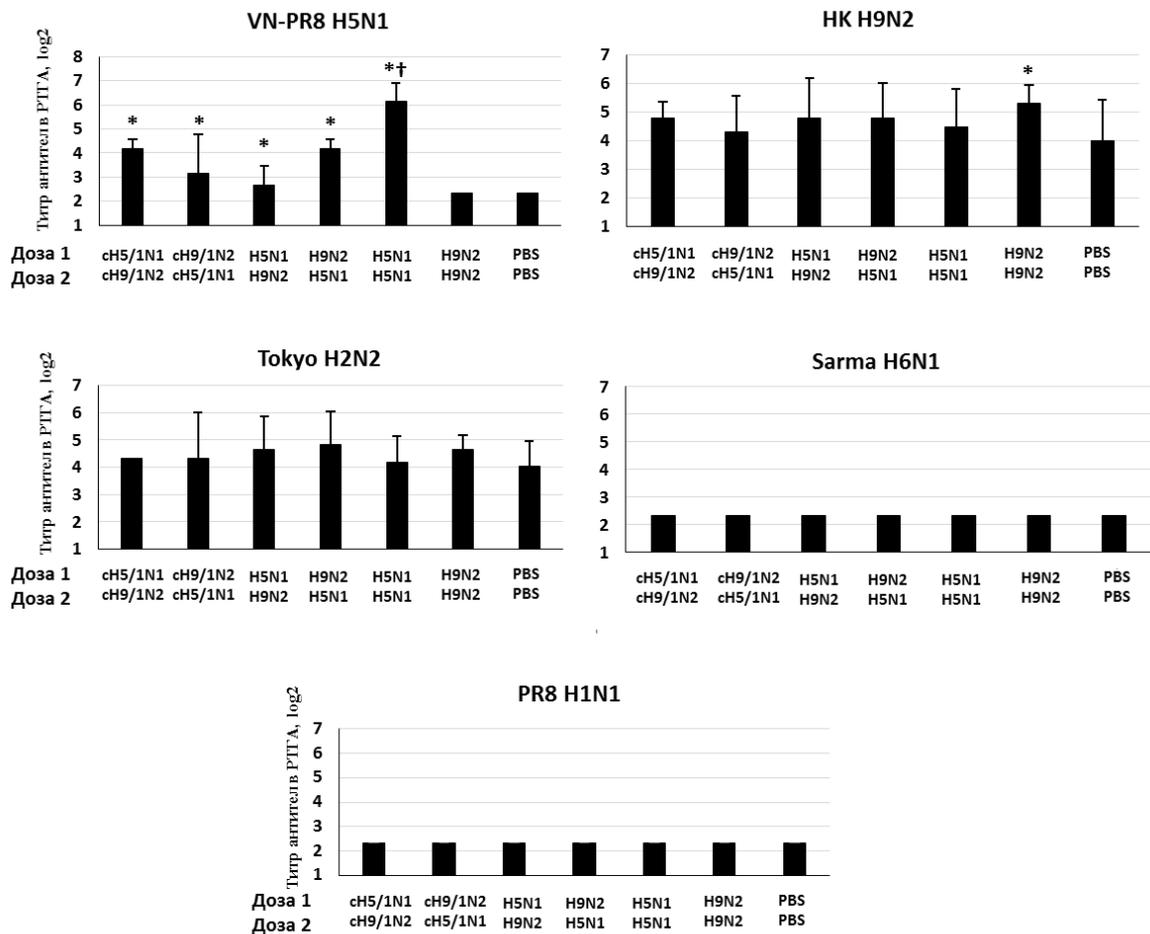


Рисунок 57. Титры антигемагглютинирующих антител в сыворотках привитых мышей в РТГА с указанными антигенами. * $p < 0,05$ по сравнению с Моск (критерий Манна-Уитни). † $p < 0,005$ по сравнению с остальными вакцинными группами.

В отличие от РТГА, в ИФА выявлялись кросс-реактивные сывороточные IgG антитела, способные распознавать все исследованные вирусы, использованные в качестве цельновирионных антигенов. В целом, титры IgG антител были схожи между вакцинными группами, хотя для некоторых антигенов наблюдались достоверные различия между сравниваемыми группами мышей, привитых последовательно вакцинными штаммами,

содержащими химерные или природные НА. Так, у мышей, иммунизированных сН9/1N2 и сН5/1N1 ЖГВ, вырабатывались более высокие титры IgG антител к вирусу Токуо H2N2, чем у мышей, получивших аналогичные ЖГВ с классическими НА (Рис. 58, $p=0,006$). Также ЖГВ с химерными НА индуцировали более высокие уровни анти-H6N1 IgG антител, чем классические ЖГВ (сравнение групп сН5/1N1+сН9/1N2 и H5N1+H9N2, $p=0,029$, Рис.58). Такие высокие уровни IgG антител к широкому кругу вирусов гриппа различных подтипов, детектируемые во всех вакцинных группах, указывают на то, что данные антитела могут реагировать не только с молекулой НА вирусов, но также и с другими белками вирионов, такими как NA и NP. Примечательно, что, несмотря на слабый уровень репликации вакцинных вирусов с химерными молекулами НА в респираторном тракте мышей, уровни вырабатываемых антител не только не уступали классическим вариантам ЖГВ, но зачастую превосходили их.

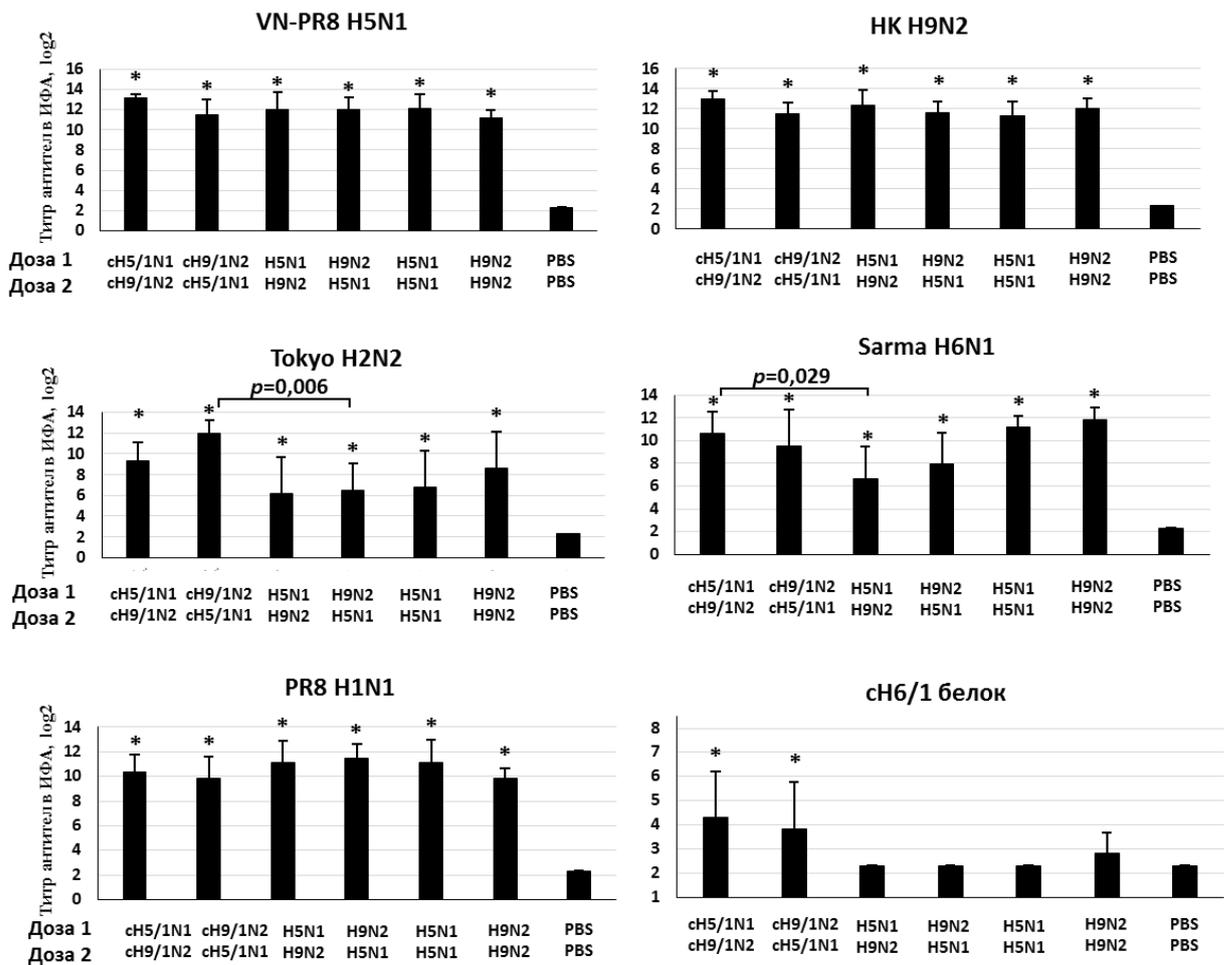


Рисунок 58. Титры IgG антител в сыворотках привитых мышей в ИФА с указанными антигенами. * $p < 0,05$ по сравнению с Моск (критерий Манна-Уитни).

В данном эксперименте также в качестве антигена был использован рекомбинантный белок сН6/1, содержащий stalk-домен вируса PR8, а глобулярный домен – от вируса Н6N1. При использовании такого белка в качестве подложки для ИФА исключается связывание сывороточных антител, реагирующих с другими белками вирусов гриппа, оставляя только анти-НА антитела. Среди всех исследованных групп иммунизированных мышей достоверное повышение антител, реагирующих с рекомбинантным белком, было зарегистрировано только в двух группах, привитых двумя дозами вакцин сН5/1N1 и сН9/1N2 ЖГВ в обеих комбинациях ($p=0,028$, Рис. 58). Поскольку антигемагглютинирующих антител к вирусу Н6N1 в сыворотках мышей выявлено не было (Рис. 58), обнаруженные IgG антитела связываются с иными участками молекулы гемагглютинина, вдали от рецептор-связывающей области глобулярного домена. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что иммунизация гетерологичными ЖГВ может приводить к индукции детектируемых уровней анти-stalk антител только в том случае, если stalk-домены этих вакцинных штаммов являются идентичными.

Защитный эффект различных режимов вакцинации оценивали по снижению титров вирулентных вирусов в легких мышей на 3 и 6 сутки после челленджа. Для этого иммунизированных животных заражали шестью вирусами гриппа различных подтипов – как гомологичных (H5N1, H9N2), так и гетерологичных (H1N1, H2N2, H6N1, H1N1pdm09). Как и ожидалось, все схемы, включающие вакцинный вирус подтипа H5N1, обеспечили значительную защиту от гомологичного челленджа. И хотя на 3 сутки животные, привитые только вакциной H9N2, имели значительные титры вируса H5N1 в легких, к 6 суткам данный вирус полностью выводился из организма животных (Рис. 59А). Защита от вируса H9N2 была менее выраженной, хотя разница с контрольной группой была значительной для всех групп ЖГВ, как на 3, так и на 6 сутки (Рис. 59В). При этом степень защиты от вируса H9N2 не зависела от того, получали мыши вакцину данного подтипа или нет. Тем не менее, лишь в группе H5N1+H5N1 к шестым суткам вирус H9N2 все еще детектировался на уровне $3,0 \text{ IgTЦИД}_{50}/\text{мл}$, тогда как в остальных группах данный вирус уже не обнаруживался в данной временной точке (Рис.59В).

Интересно, что все иммунизированные мыши были полностью защищены от заражения гетерологичными вирусами H2N2 и H6N1 (Рис. 59С,Д). Эти данные показывают, что защита, скорее всего, была опосредована Т-клеточным иммунитетом, поскольку ЖГВ, как известно, являются хорошими индукторами этого фактора иммунного ответа. Кроме того, кросс-реактивные IgG-антитела, распознающие вирусы H2N2 и H6N1 (Рис.58), могли сыграть определенную роль в защите мышей от инфекции.

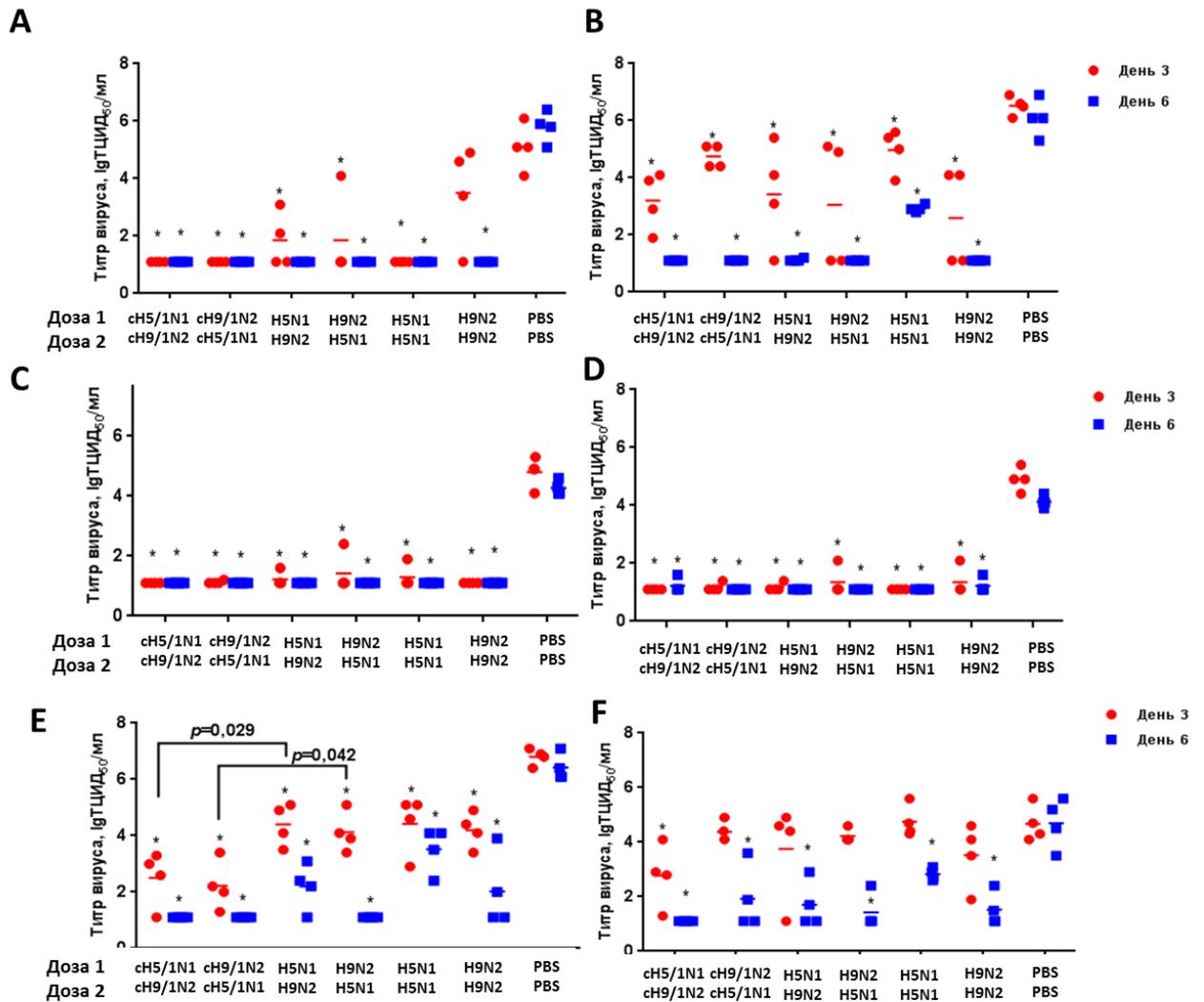


Рисунок 59. Титры вирусов в легких иммунизированных мышей на 3 и 6 сутки после челленджа. (А) VN-PR8 H5N1; (В) НК H9N2; (С) Tokyo H2N2; (Д) Sarma H6N1; (Е) PR8 H1N1; (Ф) A/Mississippi/10/2013 (pH1N1). * $p < 0,05$ по сравнению с Mock (критерий Манна-Уитни).

Поскольку все мыши были одинаково защищены от гетерологичных вирусов H2N2 и H6N1, невозможно было определить вклад stalk-специфичных антител в защиту. Напротив, титры вируса PR8 H1N1 в легких на 3-й день после челленджа значительно различались между группами мышей, последовательно иммунизированных ЖГВ с химерными или природными гемагглютинидами H5 и H9 (сH5/1N1+сH9/1N2 против H5N1+H9N2, $p=0,029$; сH9/1N2+сH5/1N1 против H9N2+H5N1, $p=0,042$, Рис.59Е). Следует отметить, что все вакцинные группы имели значительно меньшие титры в легких в оба момента времени по сравнению с группой плацебо, скорее всего, вследствие индукции Т-клеточного ответа.

Более выраженная кросс-протективная активность ЖГВ, экспрессирующих химерные НА, была также отмечена при заражении иммунизированных мышей

пандемическим вирусом H1N1pdm09. Несмотря на то, что челлендж-вирус выделялся из легких мышей всех исследуемых групп, только в группе cH5/1N1+cH9/1N2 титр на 3 сутки был значительно снижен по сравнению с группой плацебо (Рис. 59F). Тем не менее, данный защитный эффект отсутствовал в группе cH9/1N2+cH5/1N1, что может указывать на влияние последовательности введения вакцинных вирусов различных подтипов. Выявление зависимости интенсивности индукции кросс-реактивных анти-stalk антител от того, в какой последовательности происходит иммунизация, требует дальнейших детальных исследований. Однако из полученных в данном эксперименте результатов можно сделать однозначный вывод, что модификация вакцинных штаммов ЖГВ путем замены уникальных stalk-доменов вирусов различных подтипов на идентичный домен одного из вирусов приводит к усиленной выработке кросс-реактивных антител, которые обеспечивают более выраженную защиту от гетерологичных вирусов гриппа. Соответственно, такие модифицированные штаммы ЖГВ являются перспективными кандидатами в универсальную гриппозную вакцину.

8.1.3. Оценка иммуногенности и защитной эффективности живых гриппозных вакцин, экспрессирующих химерные молекулы гемагглютинаина, на модели мышей линии BALB/c

Чтобы исключить влияние Т-клеточного иммунитета на защиту мышей от гетерологичных вирусов гриппа, мы провели дополнительный эксперимент, используя стратегию пассивной иммунизации, при которой сыворотки иммунных мышей вводятся внутривенно наивным животным, после чего животных заражают вирулентными вирусами гриппа, а защитный эффект сывороточных антител определяется по снижению интенсивности репликации вирусов в легких. Для усиления выработки гуморального кросс-реактивного иммунитета использовали схему трехкратной вакцинации, когда мышам линии BALB/c последовательно вводили вакцинные реассортантные штаммы ЖГВ, содержащие гемагглютинины с антигенно нерелевантными глобулярными доменами (от вирусов H5N1, H8N4 и H9N2), но при этом идентичными stalk-доменами вируса H1N1pdm09 (Рис. 60). Контрольная группа получала три дозы соответствующих штаммов ЖГВ, содержащих природные молекулы HA (также из вирусов H5N1, H8N4 и H9N2), тогда как третья группа ЖГВ получала три дозы одной и той же вакцины H5N1 ЖГВ. Важно отметить, что все вакцинные штаммы ЖГВ в этом эксперименте содержали одинаковые молекулы NA от вируса H1N1pdm09, чтобы исключить различное влияние антинейраминидазных антител в защите от инфекции.

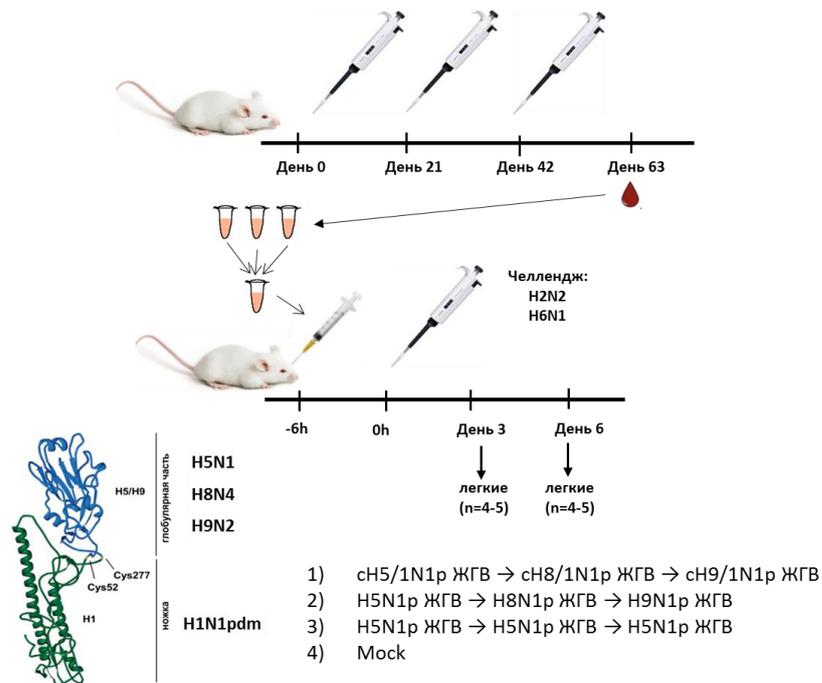


Рисунок 60. Схема эксперимента по оценке индукции кросс-реактивных антител вакцинными штаммами ЖГВ, экспрессирующими химерные и классические молекулы НА, с использованием пассивной иммунизации мышей линии BALB/c.

Как и в предыдущем эксперименте, штаммы ЖГВ, экспрессирующие химерные молекулы НА, реплицировались в дыхательных путях мышей хуже, чем их природные аналоги. Хотя для ЖГВ сН5/1N1р и сН9/1N1р эта разница не достигала статистической значимости, для сН8/1N1р ЖГВ это снижение было значительным как для верхних, так и для нижних дыхательных путей (Рис.61). Примечательно, что не было никакой корреляции между способностью вакцинных штаммов ЖГВ реплицироваться в культуре клеток млекопитающих (MDCK) и их инфекционностью для мышей: у сН9/1N1р ЖГВ были самые низкие титры в клетках MDCK, тогда как штамм сН8/1N1р ЖГВ имел схожие титры *in vitro* с соответствующим штаммом Н8N1р ЖГВ (Табл. 43).

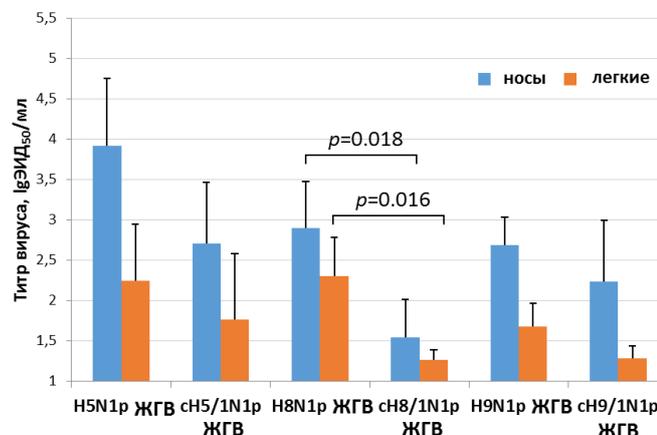


Рисунок 61. Репликация вакцинных штаммов ЖГВ в респираторном тракте мышей линии BALB/c. Указаны достоверные различия между сравниваемыми группами (тест Манна-Уитни).

Три последовательные иммунизации в каждой из вакцинных групп привели к выработке мощного противовирусного гуморального иммунного ответа. Сывороточные IgG антитела, специфичные цельному вирусу H5N1, были обнаружены в высоких титрах во всех трех группах ЖГВ, что указывает на успешность иммунизации (Рис. 62). В отличие от первого эксперимента, в данном опыте были определены кросс-реактивные антитела не к цельным вирусным антигенам, а к рекомбинантным белкам НА. Как и ожидалось, не было обнаружено ответа на белок Н3, который является представителем НА группы 2, тогда как гемагглютинины вакцинных штаммов H5N1, H8N4 и H9N2 принадлежат первой группе НА. Титры анти-Н9 антител были обнаружены только в тех группах, которые получали либо сН9/1N1р, либо Н9N1р ЖГВ. Важно отметить, что у группы мышей, привитых ЖГВ с химерными НА, обнаруживались значительно более высокие титры IgG антител против химерного белка сН6/1 по сравнению с двумя другими вакцинными группами, что указывает на индукцию анти-stalk антител в первой группе. Кроме того, уровни IgG антител против Н2 и Н6 белков были также значительно выше в группе химерных ЖГВ, чем у мышей, привитых классическими вариантами вакцины (Рис. 62). Эти результаты позволяют предположить, что последовательная иммунизация вакцинными штаммами ЖГВ, имеющими идентичные stalk-домены гемагглютинина, индуцирует выраженный кросс-реактивный гуморальный иммунный ответ, нацеленный на консервативную часть молекулы НА вируса гриппа.

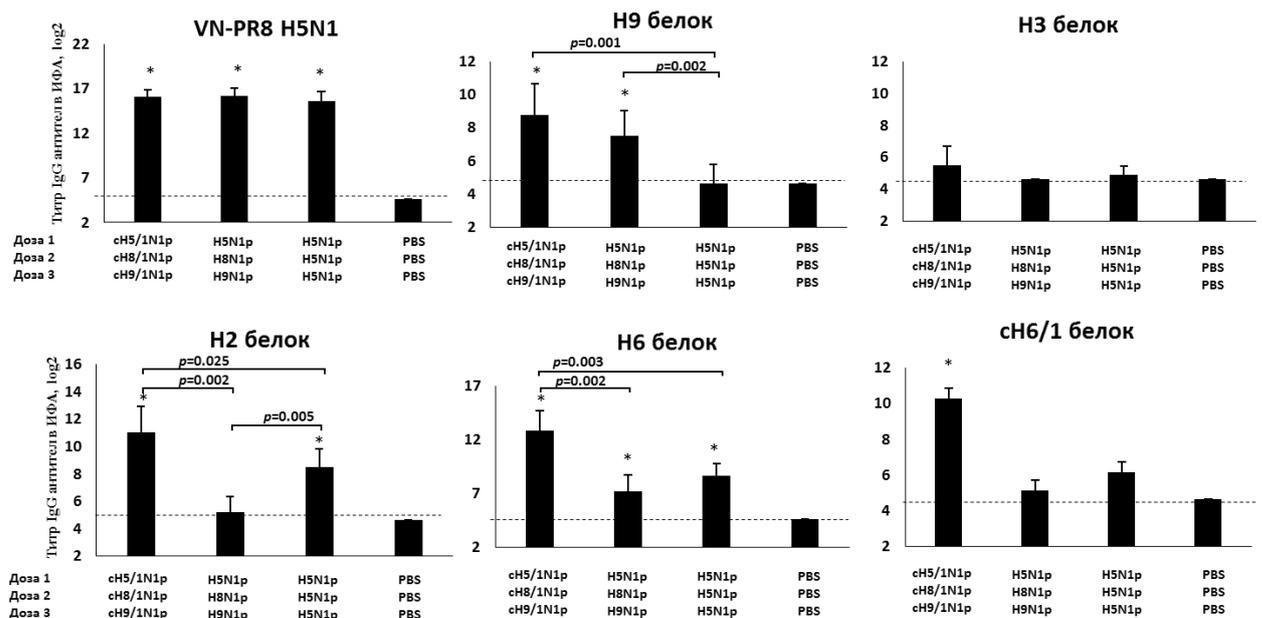


Рисунок 62. Титры IgG антител в сыворотках привитых мышей в ИФА с указанными антигенами. * $p < 0,05$ по сравнению с Моск (критерий Манна-Уитни).

Для оценки защитного эффекта обнаруженных антител пулированную сыворотку от иммунизированных мышей вводили внутривенно наивным животным посредством ретро-орбитальной инъекции (100 мкл). Контрольная группа получала эквивалентное количество сывороток от неиммунизированных мышей BALB/c. Через 6 часов после пассивной иммунизации мышей заражали интраназально гетерологичными вирусами подтипов H2N2 и H6N1. Поскольку данные вирусы не вызывают летальной инфекции у мышей, в опыте не оценивали выживаемость и потерю веса животных после челленджа. Т.к. вирусы активно реплицируются в нижних дыхательных путях животных, защитный эффект вакцинации оценивали по снижению титров в легких опытных мышей по сравнению с контрольными. Предварительные эксперименты показали, что значение МИД₅₀ для вирусов H2N2 и H6N1 у мышей BALB/c составляет приблизительно 3,0 IgЭИД₅₀. Введение пассивно-иммунизированным мышам вирулентного вируса H6N1 в дозе 10 МИД₅₀ (10⁴ ЭИД₅₀) выявило значительные различия в уровне защищенности мышей: на 3 и 6 день после заражения вирус едва обнаруживался в легких мышей, которые получали сыворотку из группы ЖГВ с химерными HA, тогда как такой эффект не наблюдался для сывороток мышей, иммунизированных классическими ЖГВ, ни в гетерологичной (H5N1p+H8N1p+H9N1p), ни в гомологичной (H5N1p+H5N1p+H5N1p) группе (Рис. 63А). Однако когда вирус H6N1 вводился в более высокой дозе 1000 МИД₅₀ (10⁶ ЭИД₅₀), все пассивно иммунизированные мыши имели сопоставимые титры вируса в легких на 3-й день, которые не отличались от таковых группы плацебо. Эти данные указывают на то, что пассивно перенесенное количество антител было недостаточным для выведения высокой дозы вируса из легких к третьему дню. Тем не менее, на шестой день после заражения значительное снижение титров вируса H6N1 в легких отмечалось в группе мышей, получивших сыворотки от первой группы по сравнению с группой плацебо (p=0,018). Напротив, снижение вирусных титров в других группах ЖГВ не было значимым в этот момент времени (Рис. 63В).

Интересно, что заражение пассивно-иммунизированных мышей низкой дозой вируса H2N2 (10⁴ ЭИД₅₀) не выявило значительных различий между опытными группами в титрах вируса на 3-й день после заражения, хотя было отмечено снижение для групп ЖГВ по сравнению с группой плацебо. Аналогично результатам, полученным для вируса H6N1, эффект пассивной иммунизации на клиренс вируса отмечался на 6-й день после заражения: сыворотки от мышей, иммунизированных химерными ЖГВ, снижали титр вируса в легких на 1,3 IgЭИД₅₀ по сравнению с контрольной группой (p=0,018), в то время как другие пассивно-иммунизированные мыши не были защищены (Рис. 63С). Хотя пассивно перенесенный иммунитет не был стерилизующим, в отличие от прямой защиты

мышей, последовательно вакцинированных двумя дозами ЖГВ, снижение вирусной нагрузки в легких мышей после челленджа является дополнительным свидетельством индукции кросс-реактивных антител в результате иммунизации живыми гриппозными вакцинами, экспрессирующими химерные молекулы гемагглютинаина.

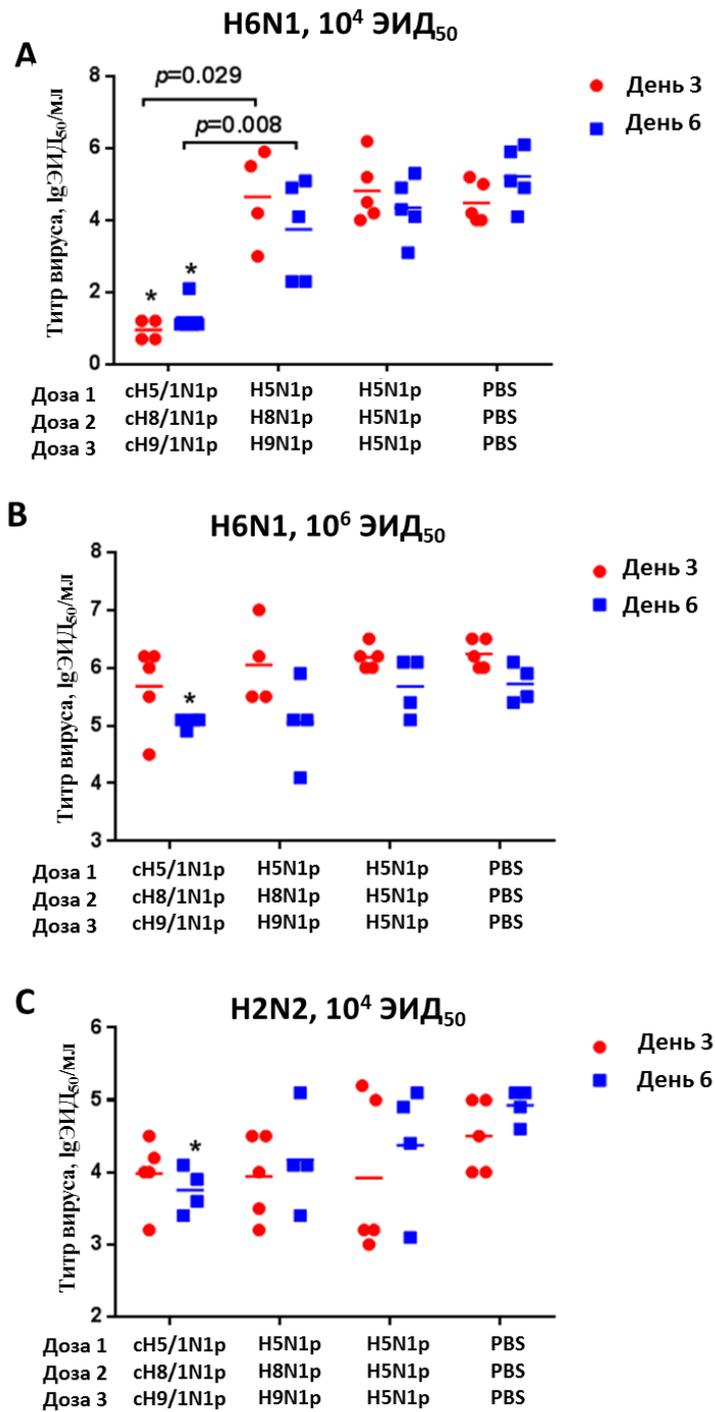


Рисунок 63. Титры вирусов в легких пассивно иммунизированных BALB/c мышей на 3 и 6 сутки после челленджа. (А) Заражение вирусом А/серебристая чайка/Сарма/51/2006 (H6N1) в дозе 4.0 lgЭИД₅₀. (В) Заражение вирусом А/серебристая чайка/Сарма/51/2006 (H6N1) в дозе 6.0 lgЭИД₅₀. (С) Заражение вирусом А/Токио/3/67 (H2N2) в дозе 4.0 lgЭИД₅₀. Указаны достоверные отличия между исследуемыми группами (критерий Манна-Уитни).

8.2 Подходы к индукции перекрестно-реагирующего Т-клеточного иммунитета

Еще одним перспективным направлением создания универсальных гриппозных вакцин является индукция вирус-специфических цитотоксических Т лимфоцитов (ЦТЛ), нацеленных на консервативные участки внутренних белков вириона, главным образом нуклеопротеина [357]. Современные вакцинные штаммы ЖГВ имеют формулу генома 6:2, т.е. два гена, кодирующие поверхностные антигены гемагглютинин и нейраминидазу, передаются от циркулирующего эпидемического вируса, а шесть генов, кодирующие внутренние белки вириона (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) – от холодаадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Ранее было показано, что NP белок подвержен существенному антигенному дрейфу [77, 406, 477], и, соответственно, современные вирусы гриппа значительно отличаются по аминокислотной последовательности NP белка от донора аттенуации, который был получен из вируса, изолированного еще в 1957 году. В настоящем разделе исследования был проведен тщательный анализ консервации Т-клеточных эпитопов, расположенных в нуклеопротеине донора аттенуации, среди современных циркулирующих вирусах гриппа, а также предложены способы оптимизации индуцируемого при помощи ЖГВ ЦТЛ-иммунного ответа.

8.2.1. Анализ консервации CD8+ Т-клеточных эпитопов в нуклеопротеине донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и современных циркулирующих вирусов H1N1 и H3N2.

Нами был проведен сравнительный анализ *in silico* молекулярной эволюции ЦТЛ-иммуноэпитопов нуклеопротеина современных циркулирующих вирусов гриппа А (H1N1pdm09 и H3N2) в сравнении с донором аттенуации Лен/17 с целью обоснования необходимости обновления (актуализации) антигенного состава NP вакцинного вируса. Для этого были использованы математические модели предсказания иммуногенности эпитопов NP и анализ их консервации среди актуальных циркулирующих вирусов гриппа А в The immune epitope database 3.0 (IEDB) [499]. На Рисунке 64 представлен алгоритм проведения данного анализа.



Рисунок 64. Алгоритм проведения *in silico* анализа консервации (консервативности) иммуногенных Т-клеточных МНС-I эпитопов нуклеопротеина в актуальных циркулирующих штаммах вируса гриппа А. NCBI IVSD - NCBI Influenza Virus Sequence Database, IEDB - The immune epitope database

При поиске Т-клеточных эпитопов в последовательности нуклеопротеина вируса гриппа Лен/17 было выявлено 210 9-мерных пептидов связывающихся с HLA класса I. Около половины эпитопов (103/210) были уникальными и связывались с молекулами HLA не более одного супертипа. После объединения общих эпитопов для нескольких HLA-супертипов были получены 138 уникальных пептидных последовательностей. Далее список из 138 эпитопов был ограничен теми, которые проходили проверку теста предсказания иммуногенности Т-клеточных эпитопов. Доля иммуногенных эпитопов составила 49% (68/138). Для исключения эпитопов с высоким риском протеолиза при протеасомном процессинге нуклеопротеина из 68 были отобраны эпитопы не более чем с 1 предсказанным сайтом протеолиза. Доля эпитопов нуклеопротеина Лен/17, прошедших эту проверку, составила 26% (18/68). Таким образом, были отобраны 18 из 210 эпитопов, которые отвечали критериям ЦТЛ-иммуногенности.

При анализе консервации эпитопов, позволяющем оценить частоты встречаемости эпитопов NP Лен/17 среди актуальных вирусов гриппа А, было установлено, что лишь 8 из 18 отобранных эпитопов (44,4%) были высококонсервативны и не содержали escape-мутаций в 90% и более штаммах вируса гриппа А (Табл. 44). Остальные 10 иммуногенных эпитопов встречались лишь у 4-33% современных циркулирующих вирусов гриппа А.

Таким образом, с помощью моделей *in silico* было предсказано наличие иммуногенных Т-клеточных эпитопов в NP донора аттенуации Лен/17, презентруемых в составе молекул МНС класса I. При анализе консервации показано, что больше половины этих эпитопов подвержены escape-мутации у подавляющего числа современных вирусов гриппа А подтипов H1N1pdm09 и H3N2, циркулирующих с 2009 года.

Таблица 44. Консервативность ЦТЛ-эпитопов нуклеопротеина донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) по отношению к современным штаммам вирусов гриппа А (H1N1pdm09 и H3N2)

Эпитопы NP вируса гриппа А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)				Консервация Т-клеточных эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А 2009-2014 гг, %	Предсказание Т-клеточной иммуногенности эпитопа, баллы	Кол-во вероятных сайтов протеолиза
№ эпитопа	Позиция на транскрипте NP	Связывающий эпитоп HLA-супертип	Аминокислотная последовательность			
84, 136	198-206	A24, B27	KRGINDRNF	98,6%	0,20	1
177	199-207	B58	RGINDRNF	98,6%	0,17	1
31	200-208	A3	GINDRNFWR	98,4%	0,29	1
141	174-182	B27	RRSGAAGAA	98,4%	0,11	1
38	317-325	A3	RPNENPAHK	97,9%	0,13	1
138, 142	245-253	B27, B39	SRNPGNAEI	97,8%	0,11	1
52	66-74	A3	MVLSAFDER	97,4%	0,06	1
11	250-258	A1	NAEIEDLIF	92,9%	0,35	1
167	114-122	B44	EEIRRIWRQ	33,0%	0,49	1
50, 165	23-31	A3, B44	TEIRASVGK	27,7%	0,03	1
100	439-447	A26	DMRAEIIRM	27,6%	0,42	0
51	438-446	A3	SDMRAEIIR	27,6%	0,32	1
49	30-38	A3	GKMIDGIGR	27,0%	0,26	1
119	276-284	B8	LPACVYGPA	5,8%	0,02	1
159	17-25	B44	GERQNATEI	4,9%	0,02	1
145	125-133	B39	NGDDATAGL	4,4%	0,16	1
89, 206	211-219	A26, B62	NGRKTRIAIY	4,2%	0,02	1
134	213-221	B27	RKTRIAIYER	4,0%	0,29	1

Другими словами, ЦТЛ-иммунный ответ на вакцинные штаммы ЖГВ, содержащие ген NP от вируса Лен/17, может быть направлен на 8 из 18 эпитопов (или на 2 из 7 эпитопов с уровнем предсказанной иммуногенности выше 0,2) против актуальных вирусов гриппа А. Это может привести к сниженной эффективности вирус-специфического ЦТЛ-иммунитета при инфицировании этими вирусами, т.е. вакцинные штаммы с формулой генома 6:2 не могут индуцировать полноценную иммунологическую память к иммунодоминантным эпитопам NP современных циркулирующих вирусов гриппа типа А.

Преодолеть данную проблему можно путем включения в геном вакцинного штамма NP гена от современного эпидемического вируса, т.е. создавая вакцинные штаммы с формулой генома 5:3. Для подтверждения данной гипотезы необходимо было сконструировать пары реассортантных вакцинных штаммов, отличающихся только по NP гену, унаследованному либо от донора аттенуации (формула генома 6:2), либо от актуального циркулирующего вируса (т.е. формула генома 5:3), и всесторонне изучить их свойства *in vitro* и на различных моделях лабораторных животных.

8.2.2. Сравнительная оценка ростовых характеристик вакцинных штаммов ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 *in vitro*.

В настоящем исследовании был сконструирован ряд реассортантных вакцинных штаммов, отличающихся только по NP гену. В качестве источников HA и NA генов были использованы различные штаммы актуальных вирусов гриппа H1N1pdm09, H3N2 и H7N9:

1. А/Техас/50/2012 (H3N2);
2. А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2);
3. А/Гонконг/4801/2014 (H3N2);
4. А/Миссисипи/10/2013 (H1N1pdm09)
5. А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1pdm09);
6. А/Ануи/1/2013 (H7N9).

Все сконструированные вирусы с формулой генома 5:3 активно размножались в развивающихся куриных эмбрионах, при этом сохраняя температурочувствительный фенотип, свойственный их 6:2 аналогам (Табл. 45). Холодоадаптированный фенотип также сохранялся у подавляющего большинства сконструированных вакцинных вирусов, за исключением ЖГВ на основе вируса А/Миссисипи/10/2013 (H1N1), причем слабая активность репродукции при пониженной температуре была свойственна как 6:2, так и 5:3 реассортанту. Реассортанты 6:2 и 5:3, подготовленные на основе эпидемического вируса А/Миссисипи/10/2013 (H1N1pdm09), были также неспособны реплицироваться в клетках MDCK и в носовых ходах мышей. Даже внесение в гемагглютинин А/Миссисипи/10/2013 точечных мутаций D222G/R223Q, ассоциированных с переключением рецепторной специфичности пандемического штамма H1N1pdm09 с $\alpha_{2,3}$ на двойственную ($\alpha_{2,3}/\alpha_{2,6}$), не привело к их успешной адаптации к клеткам млекопитающих (данные не представлены). В отличие от вакцинных штаммов на основе вируса А/Миссисипи/10/2013, другая пара штаммов ЖГВ, сконструированная на основе вируса А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1pdm09), была способна размножаться в культуре клеток MDCK, вероятно, ввиду наличия мутации D127E в первой субъединице молекулы

гемагглютинина, отвечающей за активную репродукцию вирусов H1N1pdm09 в респираторном тракте мышей [430]. Данная пара вакцинных вирусов была способна инфицировать культуру клеток MDCK, при этом 5:3 реассортант уступал своему 6:2 аналогу по активности репликации в данной системе (Табл. 45).

Таблица 45. Вирусологическая характеристика вакцинных штаммов ЖГВ с формулами генома 6:2 или 5:3

Вакцинный штамм ЖГВ*	Титр вируса в РКЭ, IgЭИД ₅₀ /мл			Фенотип	Титр вируса в клетках MDCK, IgГЦИД ₅₀ /мл
	33°C	38°C	26°C		
Вирусы подтипа А(Н3N2)					
Texas 6:2	9,2±0,5	2,2±0,7	7,0±1,3	<i>ts/ca</i>	5,5±0,7
Texas 5:3	8,1±0,4	1,8±0,3	6,1±0,5	<i>ts/ca</i>	4,2±0,5 [†]
Switz 6:2	8,1±0,7	1,7±0,4	6,1±0,4	<i>ts/ca</i>	5,2±0,7
Switz 5:3	7,8±0,5	1,8±0,3	5,2±0,7	<i>ts/ca</i>	4,8±0,6
HK 6:2	7,9±0,4	1,8±0,5	5,5±0,5	<i>ts/ca</i>	6,2±0,3
HK 5:3	7,5±0,3	1,5±0,3	5,4±0,7	<i>ts/ca</i>	5,0±0,3 [†]
Вирусы подтипа А(Н1N1)					
Miss 6:2	8,1±0,4	≤1,5	4,1±0,2	<i>ts/non-ca</i>	3,5±0,8
Miss 5:3	7,9±0,2	≤1,5	2,1±0,1 [†]	<i>ts/non-ca</i>	3,1±0,0
S.A. 6:2	9,0±0,3	1,5±0,3	6,2±0,3	<i>ts/ca</i>	6,3±0,7
S.A. 5:3	7,9±0,2 [†]	1,7±0,7	4,9 [†] ±0,7	<i>ts/ca</i>	5,1±0,4 [†]
Вирусы подтипа А(Н7N9)					
Anhui 6:2	9,6±0,4	1,7±0,8	7,8±0,8	<i>ts/ca</i>	8,2±0,5
Anhui 5:3	9,7±0,3	2,6±0,7	6,7±0,5	<i>ts/ca</i>	7,8±0,8

*родительские вирусы дикого типа: Texas: А/Техас/50/2012 (H3N2); Switz: А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2); HK: А/Гонконг/4801/2014 (H3N2); Miss: А/Миссисипи/10/2013 (H1N1pdm09); S.A.: А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1pdm09); Anhui: А/Ануи/1/2013 (H7N9); [†]p<0.05 по сравнению с соответствующей ЖГВ 6:2.

Вирусы подтипа H3N2, независимо от их состава генома, достаточно плохо размножались в клетках MDCK, а также не реплицировались в респираторном тракте мышей (данные не представлены), поэтому не представлялось возможным провести сравнительную оценку их иммуногенности и защитной эффективности на мышах.

Несмотря на небольшие различия в репликации 6:2 и 5:3 реассортантов подтипов H7N9 и H1N1pdm09 в культуре клеток MDCK, в респираторном тракте мышей данные

пары вирусов размножались на одинаковом уровне (Рис. 65). Таким образом, для сравнительного изучения иммуногенности и защитной эффективности 6:2 и 5:3 реассортантов на модели мышей C57BL/6J были выбраны штаммы, подготовленные на основе вирусов А/Анзи/1/2013 (H7N9) и А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1pdm09).

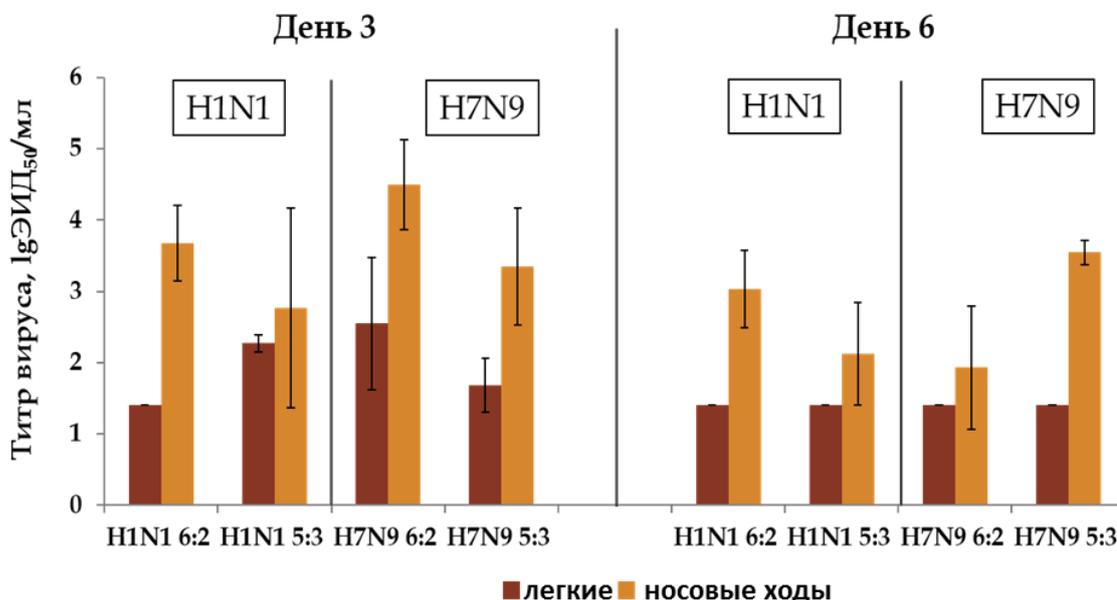


Рисунок 65. Титры вирусов в верхних и нижних дыхательных путях мышей C57BL/6J на 3 и 6 сутки после заражения. Заражение вакцинными кандидатами 6:2 и 5:3 подтипов H1N1pdm09 и H7N9.

8.2.3. Сравнительная оценка иммуногенности для мышей реассортантных штаммов ЖГВ H1N1pdm09 и H7N9 с формулами генома 6:2 и 5:3.

Иммунизация мышей двумя дозами ЖГВ H7N9 6:2 и H7N9 5:3 приводила к выработке высоких уровней антигемагглютинирующих и IgG антител в сыворотках крови, а также секреторных IgA антител в бронхоальвеолярном лаваже (Рис. 66). Уровни антител, выявляемые в РТГА, были сопоставимы между двумя вакцинными вирусами, тогда как при оценке IgG и IgA антител были обнаружены некоторые отличия: при использовании в качестве антигена H7N9 6:2 реассортанта более высокие уровни антител выявлялись у мышей, вакцинированных этим же штаммом, тогда как при использовании в качестве антигена H7N9 5:3 реассортанта, наоборот, выявлялись более высокие уровни антител в группе мышей, иммунизированных H7N9 5:3 вирусом. Поскольку оба штамма отличались только NP антигеном, можно предположить, что иммуноферментный анализ выявляет популяцию анти-NP антител, которые также могут формироваться в ответ на введение живого вируса гриппа. Поскольку в настоящем исследовании не был использован чистый белок NP в качестве подложки в ИФА, оценить вклад

непосредственно анти-NP антител в защитную эффективность ЖГВ не представлялось возможным. Однако имеющиеся в литературе данные указывают на то, что защитный эффект анти-NP антител у C57BL/6J мышей наблюдается только при наличии очень высоких концентраций таких антител в сыворотке крови [282].

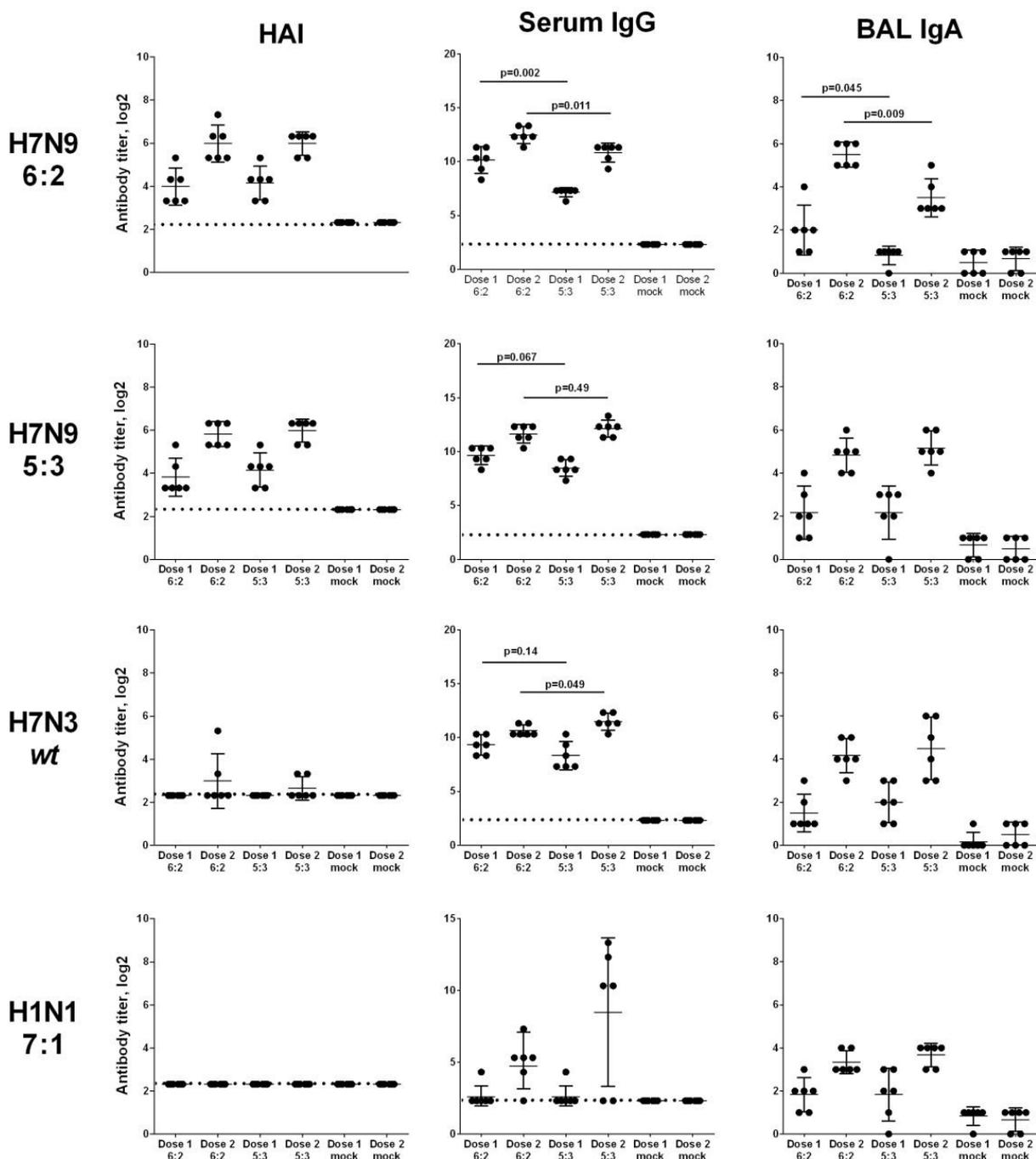


Рисунок 66. Гуморальный иммунный ответ у мышей C57BL/6, иммунизированных вакцинами штаммами H7N9 6:2 и H7N9 5:3. Слева отмечены вирусы, использованные в качестве антигенов. H7N3 wt: A/mallard/Нидерланды/12/00 (H7N3). H1N1 7:1 – реассортантный штамм, унаследовавший NP ген от вируса H7N9, а остальные 7 генов – от PR8.

Основной задачей данного исследования было определение влияния NP гена на индукцию эпитоп-специфичного ЦТЛ-иммунного ответа у мышей. Для этого спленоциты иммунизированных мышей стимулировали различными комбинациями синтезированных пептидов, соответствующих предсказанным ЦТЛ-эпитопам. Как видно из Рисунка 67, после второй иммунизации уровни ЦТЛ, отвечающих на стимуляцию предсказанными эпитопами NP299, NP330 и NP373, не превышали таковых у контрольных мышей группы плацебо, что указывает на низкую иммуногенность предсказанных ЦТЛ-эпитопов для мышей C57BL/6J.

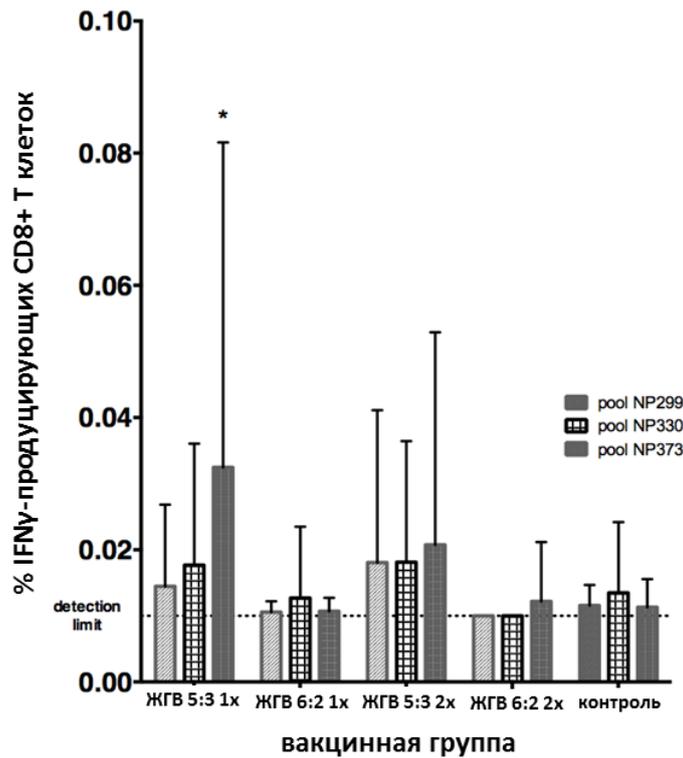


Рисунок 67. Эпитоп-специфический ЦТЛ-иммунный ответ у мышей C57BL/6J, иммунизированных однократно (1x) и двукратно (2x) вакцинными штаммами H7N9 6:2 и H7N9 5:3.

Поскольку уровни CD8+ Т-лимфоцитов, стимулированных цельными вирусами H7N9 6:2 и H7N9 5:3, значительно превышали показатели контрольной группы, как после первой, так и после второй дозы (Рис. 68А), можно предположить, что данные ЦТЛ направлены на определенные вирусные эпитопы, которые доминируют в Т-клеточном ответе у мышей. Данные других авторов указывают на то, что ЦТЛ ответ на первичную иммунизацию вирусом A/PR8/34 (H1N1) был направлен в основном на эпитопы PA₂₂₄ и NP₃₆₆, тогда как анти-NP₃₆₆ ЦТЛ превалировали (до 80%) при повторной иммунизации [76, 481]. Мы оценили уровни ЦТЛ, отвечающих на стимуляцию пептидами NP₃₆₆ вирусов

Лен/17 и H7N9, и подтвердили иммунодоминантность данных пептидов (Рис. 68В). Важно отметить, что вакцинный штамм H7N9 5:3 индуцировал преимущественно ЦТЛ, специфичные современному эпитопу NP₃₆₆, тогда как H7N9 6:2 индуцировал высокие уровни ЦТЛ к устаревшему эпитопу NP₃₆₆ вируса Лен/17, который эволюционировал среди циркулирующих вирусов гриппа. Данные результаты указывают на то, что вакцинные штаммы ЖГВ с классической формулой генома 6:2 могут индуцировать значительный Т-клеточный иммунный ответ к нерелевантному эпитопу NP₃₆₆ Лен/17, излишне нагружая иммунную систему привитых.

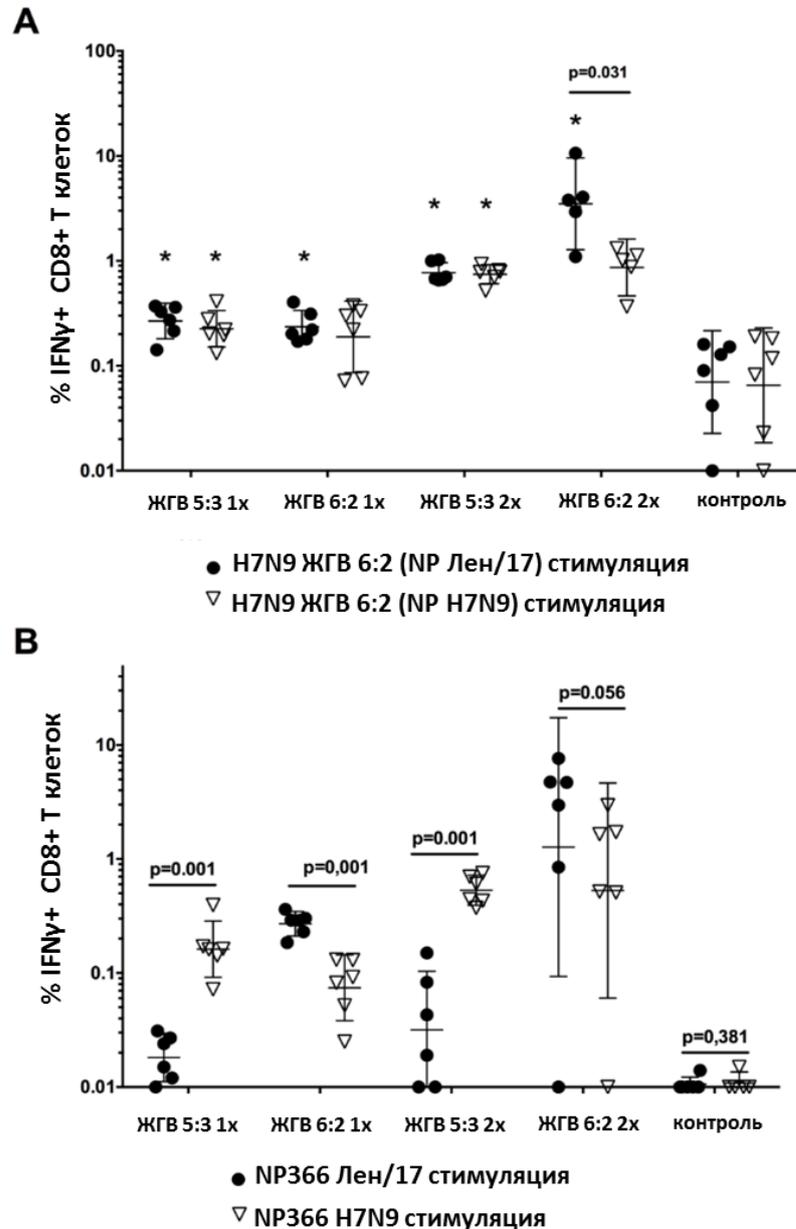


Рисунок 68. Уровни вирус/пептид-специфических CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов после однократной (1x) и двукратной (2x) иммунизации C57BL/6J мышью вакцинными штаммами ЖГВ H7N9 6:2 и H7N9 5:3. **А.** уровни вирус-специфических ЦТЛ. **В.** Уровни NP366-специфических ЦТЛ.

Проведенный анализ цитотоксической активности ЦТЛ *in vivo* подтвердил данные по *in vitro* стимуляции спленоцитов иммунизированных мышей пептидами NP₃₆₆. При нагрузке клеток-мишеней устаревшим NP₃₆₆ эпитопом их гибель была достоверно выше при введении мышам, привитым вакциной H7N9 6:2, чем у группы H7N9 5:3 (Рис. 69А). И наоборот, уровни спленоцитов мышей, нагруженных пептидом NP₃₆₆ вируса H7N9, достоверно снижались при введении мышам, привитым вирусом H7N9 5:3, по сравнению с группой контроля, тогда как у мышей, привитых H7N9 6:2, эти уровни оставались прежними (Рис. 69В).

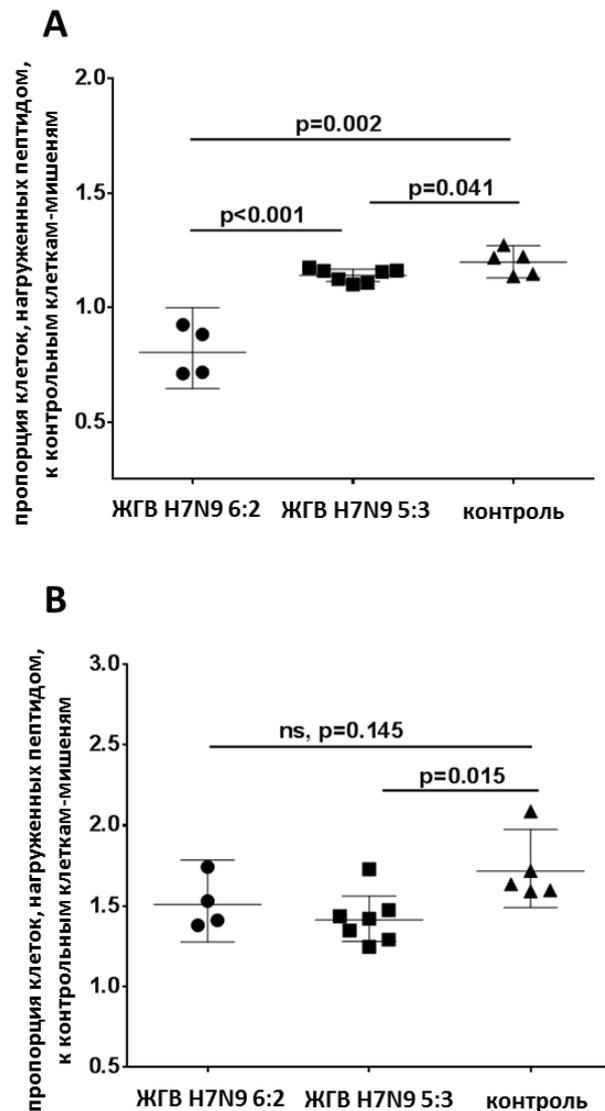


Рисунок 69. *In vivo* цитотоксическая активность лимфоцитов у мышей, вакцинных штаммами ЖГВ H7N9 6:2 и H7N9 5:3. **А.** Выживаемость клеток-мишеней, нагруженных NP₃₆₆ Лен/17 эпитопом. **В.** Выживаемость клеток-мишеней, нагруженных NP₃₆₆ H7N9 эпитопом. ns – не достоверно ($p>0,05$).

Данные по *in vivo* цитотоксической активности ЦТЛ иммунизированных мышей хорошо коррелировали с защитой животных от заражения гетерологичными вирусами гриппа (Рис. 70). Если при челлендже гомологичным вирулентным вирусом H7N9 все иммунизированные мыши были полностью защищены (Рис. 70А), то при челлендже вирусом H7N3 wt, а также реассортантным штаммом H1N1 7:1, содержащим NP от вируса H7N9, титры вирусов в легких на 3 сутки после заражения достоверно снижались по сравнению с группой плацебо только у мышей, привитых вакциной H7N9 5:3 (Рис. 70В,С).

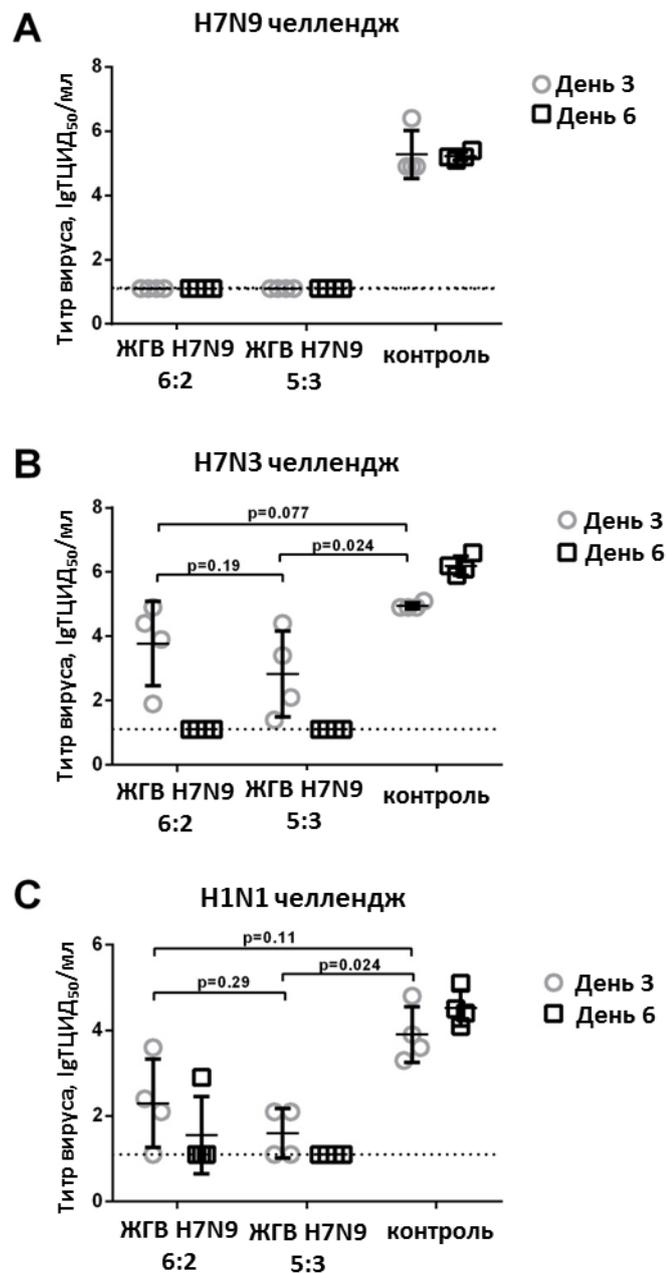


Рисунок 70. Титры вирусов в легких мышей, иммунизированных штаммами H7N9 6:2 и H7N9 5:3, после экспериментального заражения вирулентными вирусами гриппа. H7N3: А/дикая утка/Нидерланды/12/00 (H7N3). H1N1 – реассортантный штамм, унаследовавший NP ген от вируса H7N9, а остальные 7 генов – от А/PR8/34 (H1N1).

Сконструированные на основе вируса А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) вакцинные штаммы H1N1 ЖГВ 6:2 и H1N1 ЖГВ 5:3 были также изучены на мышях линии C57BL/6J. Двукратная иммунизация мышей приводила к формированию высоких уровней антигемагглютинирующих и IgG антител в сыворотках крови животных, при этом уровни антител были сопоставимы между двумя вакцинными штаммами (Рис. 71).

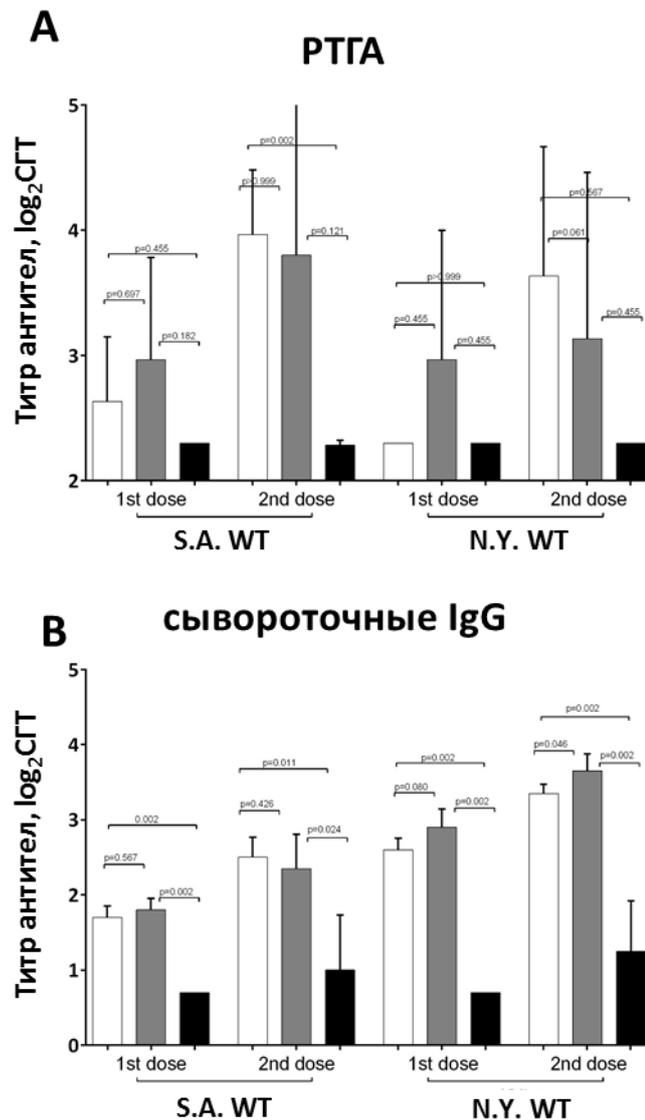


Рисунок 71. Титры антигемагглютинирующих (А) и IgG (В) антител в сыворотках крови мышей C57BL/6J, иммунизированных вакцинными штаммами H1N1 ЖГВ 6:2 и H1N1 ЖГВ 5:3, после первой и второй иммунизации. Белые столбики: H1N1 ЖГВ 6:2; серые столбики: H1N1 ЖГВ 5:3; черные столбики: контроль. Антигены: S.A. WT – А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09; NY WT: А/Нью Йорк/61/15 (H1N1)pdm09.

В предыдущем опыте с вирусами H7N9 работа с исходным вирулентным штаммом была затруднена ввиду необходимости использования лаборатории повышенного уровня биобезопасности (BSL-3). Со штаммами H1N1 данная проблема отсутствовала, поэтому стало возможным оценить формирование Т-клеточного иммунного ответа на цельный

эпидемический вирус, что более полно отражает реальную ситуацию в клинической практике. Интересно, что оценка Т-клеточного иммунного ответа у мышей выявила существенные различия между вакцинными штаммами с различной формулой генома: цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты, специфические вирусу А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09, достигали достоверно более высоких уровней после вакцинации H1N1 ЖГВ 5:3, чем H1N1 ЖГВ 6:2 (Рис. 72).

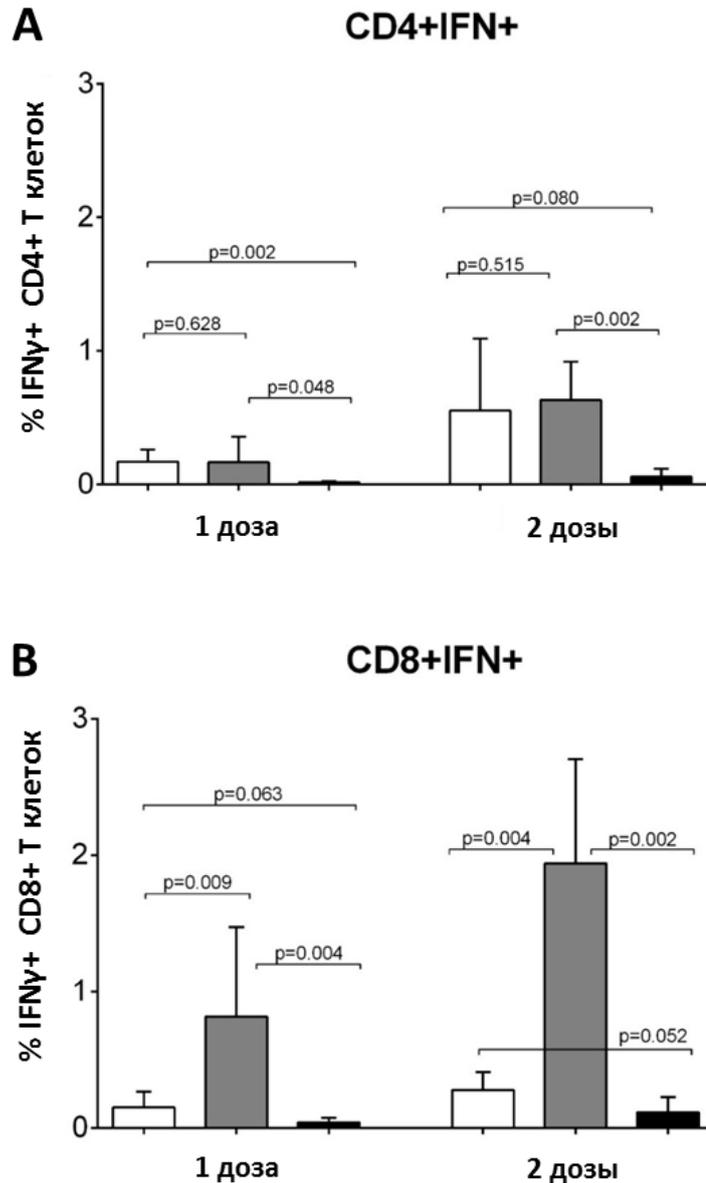


Рисунок 72. Уровни вирусспецифических CD4+ (A) и CD8+ (B) Т-лимфоцитов после иммунизации C57BL/6J мышей вакцинными штаммами H1N1 ЖГВ 6:2 и H1N1 ЖГВ 5:3. Белые столбики: H1N1 ЖГВ 6:2; серые столбики: H1N1 ЖГВ 5:3; черные столбики: контроль.

Кроме того, анализ цитотоксической активности ЦТЛ *in vivo* подтвердил эти данные. При стимуляции спленоцитов вирусом А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09 гибель клеток-мишеней была достоверно выше при введении мышам, привитым H1N1 ЖГВ 5:3, чем H1N1 ЖГВ 6:2 (Рис. 73).

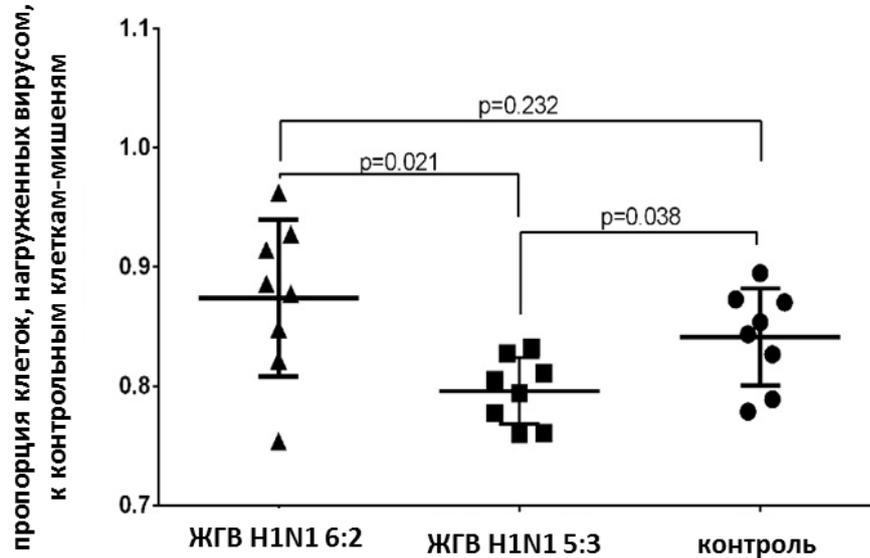


Рисунок 73. *In vivo* цитотоксическая активность CD8+ Т-лимфоцитов мышей, вакцинных штаммами H1N1 ЖГВ 6:2 и H1N1 ЖГВ 5:3.

Данные по ЦТЛ-иммунному ответу коррелировали с кросс-протективностью H1N1 вакцин. Штамм H1N1 ЖГВ 5:3 защищал иммунизированных мышей от гетерологичных вирусов А/Нью Йорк/61/15 (H1N1) и А/PR/8 7:1 rg (NP-SA) (H1N1) лучше, чем H1N1 ЖГВ 6:2 (Табл. 46).

Таблица 46. Защитная эффективность вакцинных штаммов H1N1 ЖГВ 6:2 и H1N1 ЖГВ 5:3

Вакцина	Челлендж вирус								
	А/Южная Африка/3626/ 2013 (H1N1)			А/Нью Йорк/61/15 (H1N1)			А/PR/8 7:1 rg (NP-SA) (H1N1)		
	Кол-во погубло/общ. число	% макс. потери веса	Титр вируса в легких, IgEID ₅₀ /мл	Кол-во погубло/общ. число	% макс. потери веса	Титр вируса в легких, IgЭИД ₅₀ /мл	Кол-во погубло/общ. число	% макс. потери веса	Титр вируса в легких, IgЭИД ₅₀ /мл
H1N1 ЖГВ 6:2	0/6	18.3	5.7±0.5*	0/6	5.9	4.6±0.7	0/6	9.0	3.2±0.4*
H1N1 ЖГВ 5:3	0/6	2.8	5.3±0.7*	0/6	2.8	3.8±0.4*	0/6	3.3	1.8±0.4*
контроль	5/6	26.9	7.2±0.3	6/6	13.8	5.8±0.3	2/6	3.6	5.8±1.4

* - достоверное различие, по сравнению с контролем (p<0,05)

8.2.4. Сравнительная оценка безвредности, иммуногенности и защитной эффективности реассортантных штаммов ЖГВ H3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3 на модели хорьков.

Как известно, современные вирусы H3N2 слабо реплицируются в респираторном тракте мышей, поэтому не представлялось возможным охарактеризовать сконструированные пары вакцинных штаммов ЖГВ H3N2 на этих животных. В рамках доклинических исследований вакцинных штаммов ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 были проведены исследования безвредности, иммуногенности и защитной эффективности ЖГВ H3N2 6:2 и 5:3 на хорьках.

В настоящей работе были проведены два последовательных испытания на хорьках: FER-16-09 и FER-17-01 (Рис. 74). Первый эксперимент был призван оценить влияние нуклеопротеина эпидемических вирусов гриппа H3N2 на безвредность, инфекционную активность и иммуногенность вакцинных штаммов ЖГВ для хорьков. Целью второго эксперимента была более детальная сравнительная характеристика иммуногенности и кросс-протективности одной пары ЖГВ H3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3.

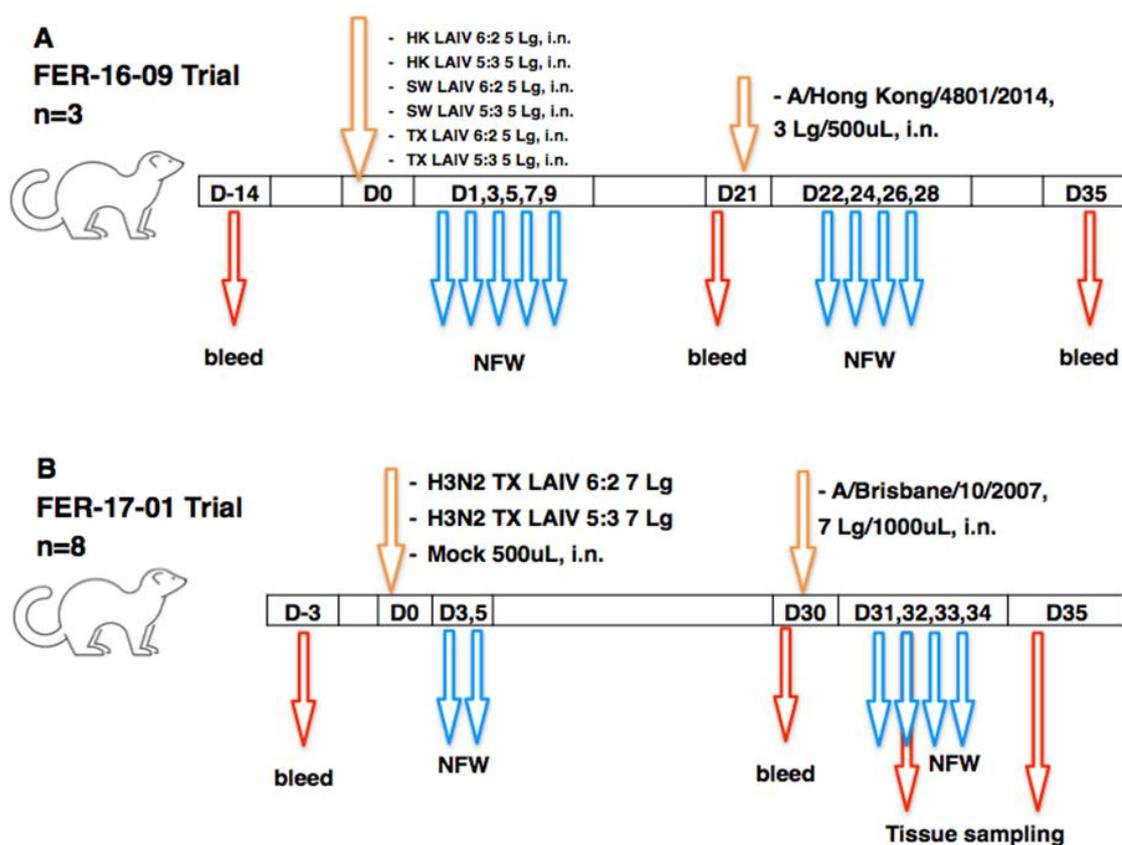


Рисунок 74. Дизайн испытаний ЖГВ H3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3 на хорьках FER-16-09 (A) и FER-17-01 (B). TX: A/Техас/50/2012 (H3N2); SW: A/Швейцария/9715293/2013 (H3N2); НК: A/Гонконг/4801/2014 (H3N2); Взятие образцов сыворотки крови и носовых смывов отмечено красными и синими стрелками соответственно. Образы тканей дыхательных путей и легких были отобраны на 2 и 5 сутки после челленджа в испытаниях FER-17-01.

В первом опыте шесть групп хорьков (по 3 животных в группе) заражались интраназально тремя парами вакцинных штаммов ЖГВ H3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3, подготовленных из вирусов разных лет выделения: А/Техас/50/2012, А/Швейцария/9715293/2013 и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), в дозе 10^5 ЭИД₅₀ (Рис. 74А). После вакцинации у большинства животных исследуемые вакцинные вирусы репродуцировались в верхних дыхательных путях, причем вирусная РНК обнаруживалась в образцах смывов ВДП вплоть до 9-й дня после вакцинации, достигая пика в дни 3-7 (Табл. 47). Вакцинные штаммы с обеими формулами генома размножались в ВДП хорьков на одинаковых уровнях для всех трех вирусов H3N2. Тем не менее, у хорьков, вакцинированных ЖГВ SW 6:2 и TX 6:2, вакцинный вирус выделялся на 1 день дольше, чем у хорьков, вакцинированных соответствующими штаммами ЖГВ с формулой генома 5:3 (Табл. 47). Инфекционный вирус был обнаружен только в тех образцах назальных смывов, которые имели большое количество копий вирусной РНК. В одном из трех хорьков, зараженных вакцинными вирусами ЖГВ SW 6:2 и ЖГВ TX 5:3, вирус не обнаруживался ни вирусологическими, ни молекулярно-генетическими методами (Табл. 47). Эти хорьки оставались серонегативными до конца эксперимента и были исключены из дальнейшего иммунологического анализа. У экспериментальных животных после вакцинации как 6:2, так и 5:3 ЖГВ не развивалось клинических симптомов гриппозной инфекции (Табл. 47), что подтверждает их аттенуацию для хорьков.

На 21 сутки после иммунизации хорьков заражали эпидемическим вирусом А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), взятым в дозе $3,0 \log \text{ЭИД}_{50}/0,5$. Важно отметить, что как гомологичные штаммы ЖГВ, приготовленные из вируса А/Гонконг/4801/2014, так и две другие пары вакцинных вирусов, практически полностью защищали животных от репродукции челлендж-вируса в верхних дыхательных путях, тогда как в группе плацебо вирус размножался до высоких титров (Табл. 48). Ввиду отсутствия репликации «дикого» вируса в респираторном тракте иммунизированных хорьков, было невозможно оценить различия в защитной эффективности ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 для хорьков.

Таблица 47. Показатели безвредности и инфекционной активности ЖГВ H3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3 на хорьках

ЖГВ	Детекция вируса методом ПЦР, lg копий/мл [†]					Детекция вируса методом ViroSpot, lgГЦИД ₅₀ /мл [†]				Макс. ΔT, °C, M±SD	Макс. потеря веса, %, M±SD
	1	3	5	7	9	1	3	5	7		
НК 5:3	6,99	8,74	8,11	7,61	4,68	<1,5	4,00	4,11	<1,5	0,90 ±0,62	1,0±1,4
НК 6:2	6,97	8,23	7,51	7,38	<3,86 [‡]	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	1,23 ±0,15	0,3±0,6
Switz 5:3	7,48	7,77	6,85	5,85	<3,86 [‡]	4,59	<1,5	<1,5	<1,5	1,47 ±0,25	1,3±2,3
Switz 6:2	7,36	8,26	7,04	7,26	4,51	5,04	4,60	<1,5	<1,5	2,17 ±0,74	2,5±0,7
Texas 5:3	7,79	8,94	7,89	7,23	<3,86	4,26	4,18	<1,5	4,15	0,93 ±0,21	1,0±1,4
Texas 6:2	6,76	8,11	7,58	7,81	5,30	4,20	<1,5	<1,5	4,60	1,47 ±0,35	1,3±0,6

[†]указано среднее геометрическое значение на группу (2-3 хорька);

[‡]уровень детекции методом ПЦР;

Таблица 48. Показатели защитной эффективности ЖГВ H3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3 против эпидемического вируса А/Гонконг/4801/2014 (H3N2)

ЖГВ	Детекция вируса методом ПЦР, lg копий/мл [†]				Детекция вируса методом ViroSpot, lgТЦИД ₅₀ /мл [†]				Макс. ΔТ, °С, М±SD	Макс. потеря веса, %, М±SD
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 1	День 2	День 3	День 4		
НК 5:3	<3,86 [‡]	<3,86	<3,86	<3,86	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	1,20 ±0,44	-7,5±2,1
НК 6:2	<3,86	<3,86	<3,86	<3,86	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	1,97 ±0,87	-6,0±2,0
Switz 5:3	5,79	<3,86	<3,86	<3,86	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	0,53 ±1,19	1,3±4,0
Switz 6:2	<3,86	<3,86	<3,86	<3,86	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	1,70 ±0,35	1,0±1,4
Texas 5:3	<3,86	<3,86	<3,86	<3,86	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	1,70 ±0,26	0,0±4,2
Texas 6:2	4,15	<3,86	<3,86	<3,86	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	1,30 ±0,35	-1,3±6,8
Mock	6,38	8,2	7,23	7,58	<1,5	5,40	4,43	4,99	0,17 ±0,29	3,0±0,0

[†]указано среднее геометрическое значение на группу (2-3 хорька);

[‡]уровень детекции методом ПЦР;

Иммуногенность ЖГВ H3N2 для хорьков оценивали в тестах РТГА и РМН на 21 день после вакцинации. Нейтрализующие антитела в сыворотках крови иммунизированных животных выявляли ко всей панели использованных вакцинных штаммов ЖГВ H3N2. Было показано, что вакцинные штаммы как с формулой генома 6:2, так и с формулой генома 5:3, индуцировали высокие уровни нейтрализующих антител к гомологичным вирусам, использованным для иммунизации (Рис. 75). Однако в плане индукции кросс-реактивных антител исследуемые вакцинные штаммы значительно варьировали. Так, вакцинация с помощью ЖГВ НК 5:3 не вызывала образование кросс-реактивных антител к другим вирусам (Рис. 75А). Вакцинация ЖГВ НК 6:2 индуцировала антитела, которые перекрестно нейтрализовали ЖГВ ТХ, но не ЖГВ SW вирус (Рис. 75С). Иммунизация вакцинными штаммами, подготовленными из вирусов SW и ТХ, индуцировала кросс-нейтрализующие антитела друг к другу, но не к вирусу НК (Рис. 75В,С).

Анализ сывороток иммунизированных хорьков в РТГА показал сходные паттерны, с высокими гомологичными титрами антител и кросс-реактивностью, вызванной вакцинацией ЖГВ SW и ТХ (Рис. 75). При этом не было обнаружено существенных различий в титрах антигемагглютинирующих антител между животными, вакцинированными ЖГВ H3N2 с формулами генома 5:3 и 6:2 ни для одной из пар ЖГВ. Мы также оценили уровни перекрестно-реагирующих антител к ранее циркулировавшим вирусам H3N2, таким как А/Перт/16/2009, А/Бризбен/10/07 и А/Панама/2007/99. ЖГВ 6:2 и 5:3 из штамма ТХ генерировали кросс-реактивные антигемагглютинирующие антитела против вируса А/Перт/09 (Рис. 75Е), тогда как ЖГВ из штаммов НК и SW данных антител не образовывали. Ни у одного из животных не развилось кросс-реактивных антител к вирусам А/Бризбен/10/07 и А/Panama/2007/99, что указывает на высокую степень эволюционной изменчивости эпидемических вирусов H3N2. С практической точки зрения это может приводить к снижению защитной эффективности гриппозных вакцин, индуцирующих преимущественно гуморальный иммунный ответ к переменным участкам гемагглютинина, и, соответственно, актуальным остается вопрос создания вакцин, направленных на выработку кросс-реактивных факторов иммунного ответа, способных защищать от дрейфовых вариантов вирусов гриппа. К сожалению, в настоящем исследовании не представлялось возможным проанализировать Т-клеточный иммунный ответ хорьков на вакцинацию ЖГВ с различной формулой генома, однако важным результатом данной работы явилось доказательство безвредности, высокой репродуктивной активности и иммуногенности для хорьков живых гриппозных вакцин, содержащих дополнительный ген NP от эпидемического родительского вируса.

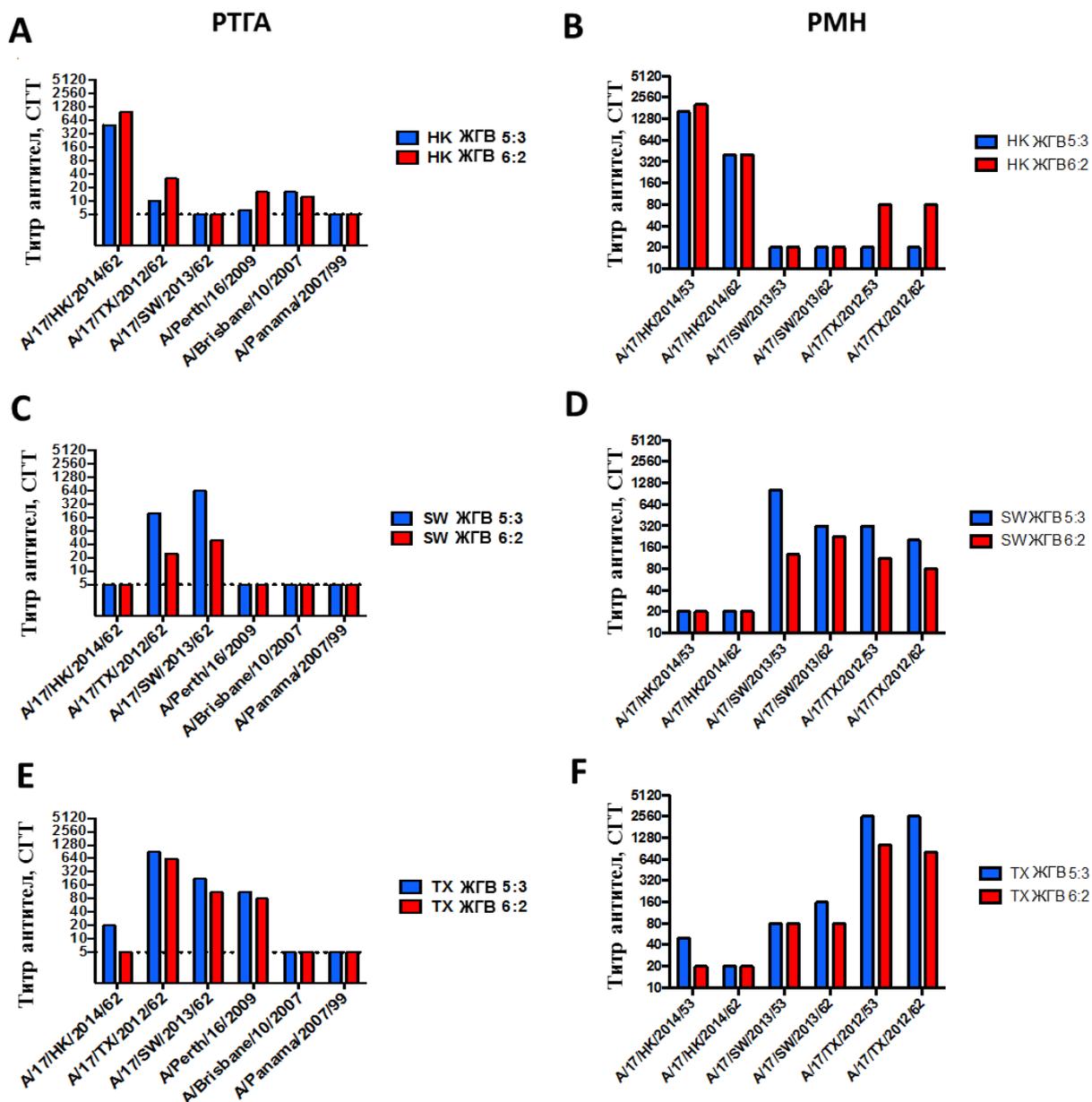


Рисунок 75. Титры антигеммагглюнирующих и нейтрализующих сывороточных антител в испытании FER-16-09. Сыворотки крови через 21 день после иммунизации хорьков ЖГВ НК (А, В), SW (С, D) и TX (Е, F) были собраны и протестированы в РТГА и РМН. TX: А/Техас/50/2012 (Н3N2); SW: А/Швейцария/9715293/2013 (Н3N2); НК: А/Гонконг/4801/2014 (Н3N2). Группы вакцинации ЖГВ 5:3, ЖГВ 6:2 отображены синим и красным цветом соответственно

Чтобы более тщательно сравнить кросс-протективную активность ЖГВ Н3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3, группы из восьми хорьков были иммунизированы парой вакцинных штаммов ЖГВ TX 6:2 и ЖГВ TX 5:3, взятыми в более высокой дозе 7,0 IgТЦИД₅₀, после чего животных подвергали челлендж-инфекции гетерологичным вирусом А/Бризбен/10/07 (Н3N2), взятым в аналогичной высокой дозе 7,0 IgТЦИД₅₀ (Рис. 74В).

У всех иммунизированных хорьков вакцинные вирусы активно размножались в носовых ходах, что было подтверждено детекцией вируса методом ПЦР в образцах

назальных смывов на 3 и 5 сутки после вакцинации (Рис. 76). Важно отметить, что динамика репродукции вируса в верхних дыхательных путях была одинаковой для штаммов ЖГВ ТХ 6:2 и ЖГВ ТХ 5:3. Несмотря на более высокую дозу иммунизации, ни один из животных не показал клинических признаков заболевания после вакцинации (данные не представлены).

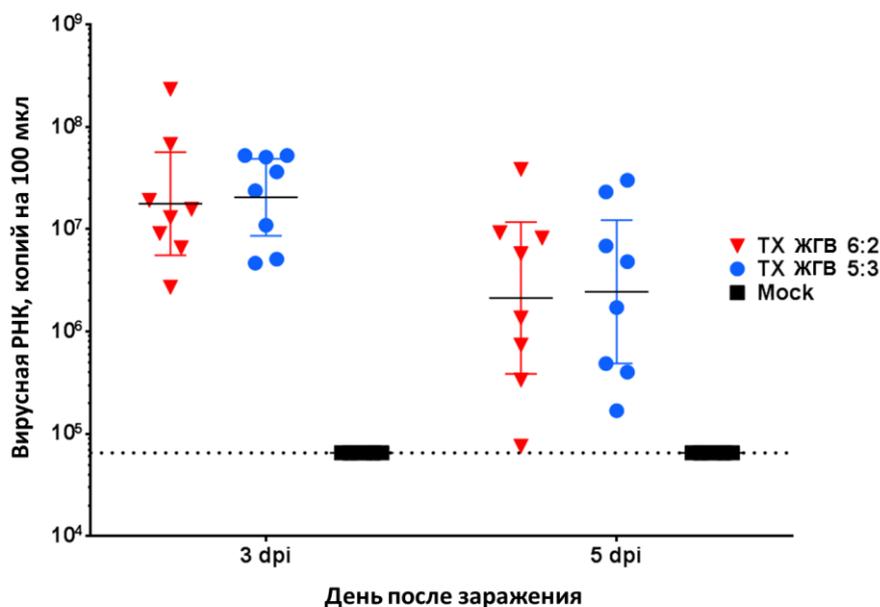


Рисунок 76. Репродукция вакцинных штаммов в дыхательных путях хорьков в испытании FER-17-01. Группы из 8 хорьков были иммунизированы интраназально 7 lgЭИД₅₀/500 мкл ТХ ЖГВ 6:2 (красный), ТХ ЖГВ 5:3 (синий) или Mock (черный) на день 0. В выбранные дни после вакцинации уровни вРНК в носовых смывах были установлены с помощью RT-qPCR.

Высокие уровни гомологичных антигемагглютинирующих антител были обнаружены на 30-й день после однократной иммунизации. Обе вакцины индуцировали антитела, перекрестно-реагирующие с вирусами А/Швейцария/9715293/2013, А/Перт/16/2009 и, в меньшей степени, с вирусом А/Гонконг/4801/2014 (H3N2). Не было различий между вариантами ЖГВ ТХ 6:2 и ЖГВ ТХ 5:3 в гуморальном иммунном ответе к любому из протестированных антигенов. (Рис. 77).

После вакцинации кросс-реактивные антитела к вирусу А/Бризбен/10/07 (H3N2) в сыворотках хорьков практически не обнаруживались в РТГА (Рис. 77), что сводило к минимуму вклад антигемагглютинирующих антител в защиту от заражения гетерологичным вирусом. Тем не менее, ввиду высокой степени родства NP-белковых последовательностей вирусов А/Texas/50/2012 и А/Бризбен/10/07 мы предположили, что при иммунизации вакцинными штаммами с формулами генома 6:2 и 5:3 могут наблюдаться различия в степени защиты от гетерологичного вируса.

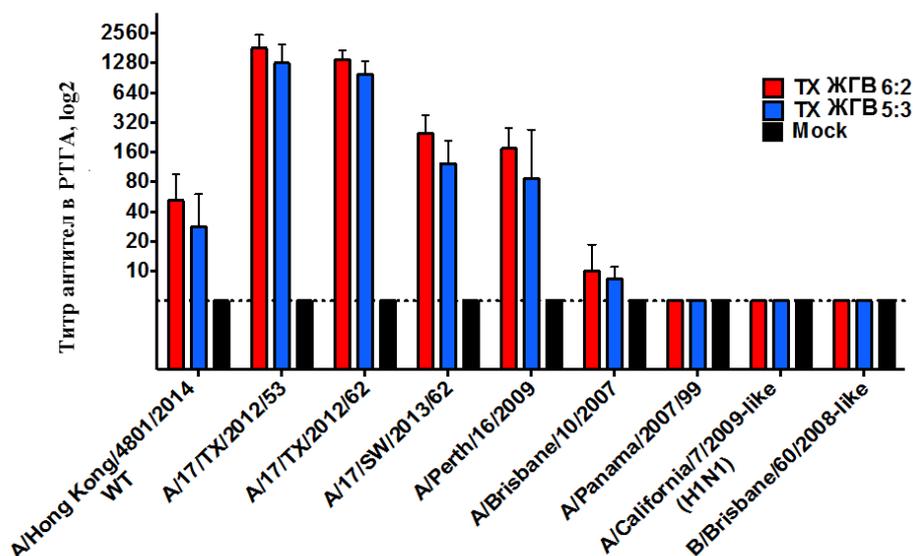


Рисунок 77. Титры антигемагглюнирующих сывороточных антител через 30 дней после иммунизации хорьков ЖГВ H3N2 TX в испытании FER-17-01. Столбцы и усы отображают СГТ и 95% ДИ

Для оценки кросс-протективности ЖГВ TX 6:2 и ЖГВ TX 5:3 все иммунизированные животные были инфицированы интраназально высокой дозой гетерологичного вируса дикого типа А/Бризбен/10/07 (H3N2), чтобы обеспечить активную репликацию челлендж-вируса в респираторном тракте хорьков. Челлендж-вирус эффективно реплицировался в верхних дыхательных путях контрольных животных на протяжении как минимум 4 дней после заражения (Рис. 78). В обеих вакцинных группах вирулентный вирус выделялся в значительно меньших титрах по сравнению с контрольной группой, при этом вирус практически исчезал к 4 суткам после заражения.

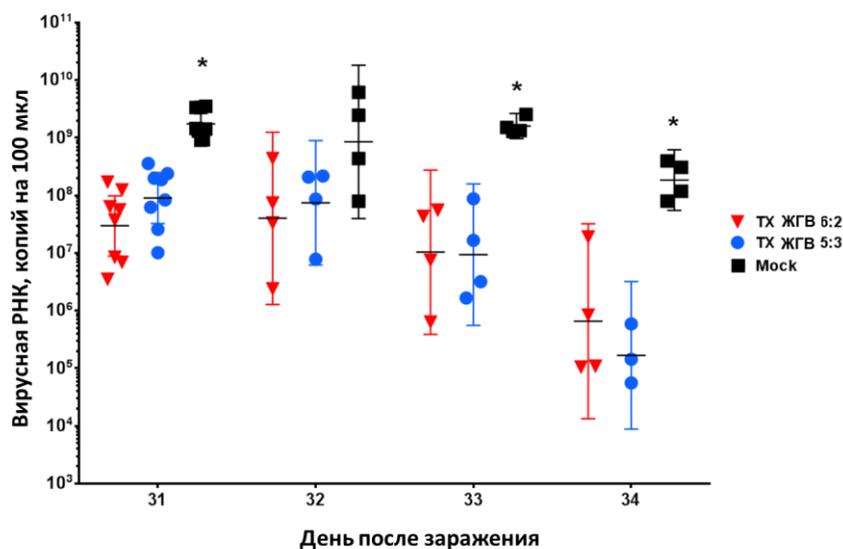


Рисунок 78. Детекция челлендж-вируса А/Бризбен/10/07 (H3N2) в назальных смывах иммунизированных и контрольных хорьков в испытании FER-17-01. *означает значимые отличия от вакцинных групп ($p < 0,05$).

Оценка репликации челлендж-вируса в тканях хорьков на 32 и 35 сутки исследования (2 и 5 день после заражения) показала, что вирус А/Бризбен/10/07 был способен реплицироваться только в носовых ходах хорьков, но не размножался в тканях легких (Рис. 79). В обеих группах ЖГВ были обнаружены значительно более низкие титры в носовых тканях на 32-й день (через 2 дня после заражения) по сравнению с контрольной группой (Рис. 79). На 32-й день все хорьки, иммунизированные ЖГВ ТХ 5:3, и только 50% (2 из 4) вакцинированных ЖГВ ТХ 6:2 были полностью защищены от репликации вирулентного вируса в носовых ходах. К 35-му дню (через 5 дней после заражения) инфекционный вирус также не обнаруживался в группе ЖГВ ТХ 5:3, тогда как один из четырех хорьков в группе ЖГВ ТХ 6:2 все еще имел инфекционный вирус в тканях носа (Рис. 79).

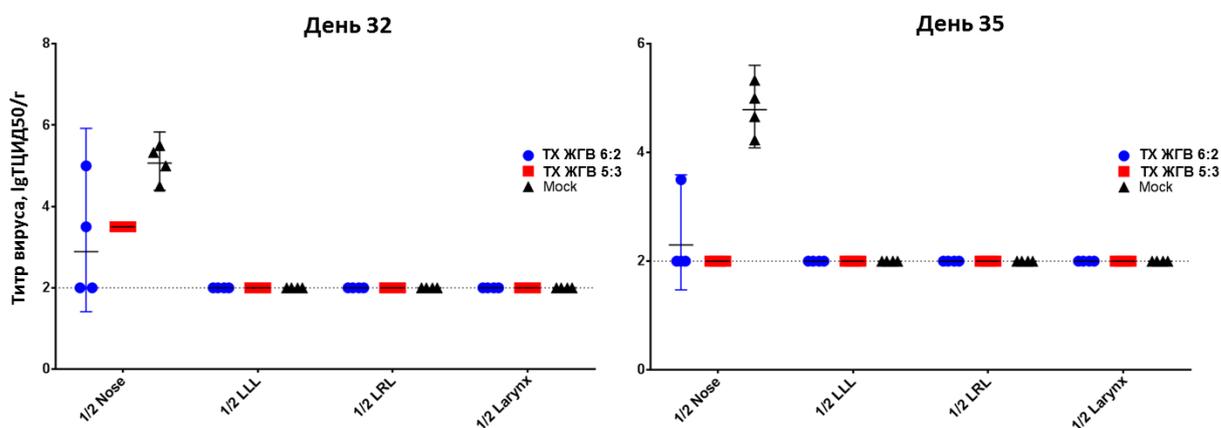


Рисунок 79. Репродукция челлендж-вируса А/Бризбен/10/07 (H3N2) в тканях верхних и нижних дыхательных путей иммунизированных и контрольных хорьков в испытании FER-17-01.

Эти результаты свидетельствуют о том, что вакцина ЖГВ ТХ 5:3 столь же эффективна, как и ЖГВ ТХ 6:2 в плане индукции кросс-протективного иммунитета против гетерологичного вируса H3N2. Несмотря на то, что достоверных различий между группами ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3 зарегистрировано не было, была выявлена тенденция к усилению защитного эффекта вакцинации при включении в состав ЖГВ NP гена от эпидемического родителя, и вполне вероятно, что при использовании большего числа животных в каждой группе можно было бы зафиксировать более значимые различия между вакцинами группами. Мониторинг клинических признаков заболевания не показал значительных потерь веса или повышения температуры у контрольных животных, поэтому данный параметр не мог быть учтен для оценки защитной эффективности вакцин.

Полученные на модели хорьков данные подтвердили безвредность, иммуногенность и защитную эффективность 5:3 реассортантных штаммов ЖГВ подтипа H3N2 не только против гомологичных вирусов, но также и против дрейфовых вариантов H3N2, что указывает на перспективность дальнейшего изучения ЖГВ с формулой генома 5:3 в клинических испытаниях на волонтерах.

8.2.5. Оценка кросс-реактивности Т-клеток человека к различным эпитопам нуклеопротеина *in vitro*

В описанных выше экспериментах на мышах было продемонстрировано преимущество ЖГВ с формулой генома 5:3 (содержащих дополнительный NP ген от эпидемического родителя) перед классическими ЖГВ с формулой генома 6:2 в плане индукции функционального CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа против современных циркулирующих вирусов, причем эти данные были получены для двух различных подтипов вирусов гриппа А: H1N1pdm09 и H7N9. В обоих случаях иммунодоминантный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп для мышей линии C57BL/6J (NP₃₆₆₋₃₇₄) различался между нуклеопротеинами Лен/17 и «дикими» вирусами H1N1 или H7N9, которые могли повлиять на эффективность ЦТЛ-ответа. Несмотря на доказательства влияния изменения CD8⁺ Т-клеточного эпитопа NP белка на клиренс вируса в мышинной модели вакцинации, оставалось неясным, будут ли эти изменения влиять на ЦТЛ-иммунный ответ людей. Поэтому мы провели оценку кросс-реактивности человеческих Т-клеточных культур к различным эпитопам нуклеопротеина, отличающихся между вирусами Лен/17 и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) в экспериментах *in vitro*. Штамм H3N2 был выбран в силу более активной антигенной изменчивости данных вирусов по сравнению с вирусами H1N1pdm09, в результате чего именно вирусы H3N2 приходится обновлять в составе гриппозных вакци практически ежегодно.

На начальном этапе был произведен поиск экспериментально-установленных МНС-I-рестрицированных эпитопов нуклеопротеина вируса гриппа А с помощью онлайн базы данных иммуоэпитопов (iedb.com) [499]. Данные были отфильтрованы по ключам: Organism: Influenza A virus (ID:11320, influenza A) AND Antigen: Nucleoprotein [P03466] (Nucleoprotein Influenza A virus) AND MHC Restriction Type: Class I AND Host: Homo sapiens (human) AND Disease: Any AND Reference: Any. Из 209 было отфильтровано и нанесено на карту нуклеопротеина 96 эпитопов, подтвержденных как минимум двумя независимыми исследованиями. Среди них 28 эпитопов (около 30% от подтвержденных эпитопов) были диверсифицированы между нуклеопротеинами Лен/17 и НК (Табл. 49).

Таблица 49. Различие экспериментальных HLA-I-рестрицированных эпитопов нуклеопротеина между вирусами гриппа А H2N2 А/Ленинград/134/17/57 (Лен/17) и H3N2 А/Гонконг/4801/2014 (HK).

Позиция а.к.	Лен/17	HK	Последовательность эпитопа у Лен/17	Последовательность эпитопа у HK	Сайт протеолиза (а.к. в эпитопе)	EpitopeID	HLA рестрикция
18	E	D	GERQDATEI	<u>G</u> DRQDATEI		19421	B*18:01 B*40:02 B*45:01
52	Y	H	CTELKLSDY	CTELKLS <u>D</u> H	HK-/Len+(9)	7136	A*01:01 A1
52	Y	H	KLSDYEGRL	KLSD <u>H</u> EGRL		32157	A*02:01
65	K	R	RMVLSAFDER	<u>K</u> MVLSAFDER		97614	A3
98	K	R	KTGGPIYRR	KTGGPIY <u>K</u> R		33682	A68
146	T	A	HSNLNDTTY	HSNLND <u>A</u> TY		24819	A*01:01 A*26:01 A*30:02
146	T	A	DTTYQRTRALVR	<u>D</u> ATYQRTRALVR		181194	A*68:01
186	V	I	STLPRRSGAAGAAVKGV	STLPRRSGAAGAAVKGI		97664	class I
197	I	V	MVMELIRMI	MVMELIR <u>M</u> V	HK+/Len-(9)	42974	A*02:01
217	I	S	NGRKTRIAYERMCNILKG	NGRKTR <u>S</u> AYERMCNILKG	HK-/Len+(7)	145915	B*15:01
217	I	S	IAYERMCNILKGKFQATAA	<u>S</u> AYERMCNILKGKFQATAA	HK-/Len+(1)	145824	B*15:01
239	M	V	KFQATAAQRAMMDQVRESR	KFQATAAQRAM <u>V</u> DQVRESR	HK+/Len-(14,15)	97417	class I
280	V	A	KSCLPACVY	KSCLPAC <u>A</u> Y	HK+/Len-(4,6)	33285	A*01:01 A*30:02
280	V	A	CLPACVYGP	CLPAC <u>A</u> YGP	HK+/Len-(2,4)	6615	A*02:01 A*02:02 A*02:03 A*02:06 A*68:02
334	N	H	QLVWMACNSAA	QLVWMA <u>C</u> HSAA		97583	A2
343	V	L	FEDLRVSSF	FEDLR <u>L</u> LSF		97298	B44
344	S	L	FEDLRVSSF	FEDLR <u>L</u> LSF		97298	B44
353	I	S	AFEDLRVSSFIRGTVKI	AFEDLR <u>L</u> LSFIRGTVKS	Hk-/Len+(17)	97180	class I
373	T	N	TMESSTLEL	<u>N</u> MGSSTLEL	Hk-/Len+(2)	3078	A*02:01
375	E	G	TMESSTLEL	<u>N</u> MGSSTLEL	Hk-/Len+(2)	3078	A*02:01
384	R	G	ELRSRYWAI	ELRS <u>G</u> YWAI		13263	B*08:01 B8
384	R	G	SRYWAIRTR	<u>S</u> GYWAIRTR		60867	A*02:01 B*27:05 B*27:09 B27 B8
406	I	T	GQISVQPTFS	<u>G</u> QTSVQPTFS		145805	B*15:01
421	D	E	LPFDKPTIM	LPF <u>E</u> KSTIM		38466	B*07:02 B*35:01
423	P	S	LPFDKPTIM	LPF <u>E</u> KSTIM		38466	B*07:02 B*35:01
421	D	E	PFDKPTIMAAF	<u>P</u> FEKSTIMAAF	HK-/Len+(10,11)	176373 E3D S5P	
423	P	S	PFDKPTIMAAF	<u>P</u> FEKSTIMAAF	HK-/Len+(10,11)	176373 E3D S5P	
459	Q	R	FQGRGVFEL	<u>F</u> RGRGVFEL		144292	A*02:01 A*02:02 A*02:03 A*02:06

Таким образом, было установлено, что большинство аминокислотных замен (около 75%) между нуклеопротеинами Лен/17 и НК было локализовано в структуре МНС-I-рестрицированных эпитопов (Табл. 49).

Для исследования кросс-реактивности *in vitro* с человеческими CD8⁺ Т клетками нами были выбраны две пары иммунодоминантных HLA-A*01:01-рестрицированных NP₄₄₋₅₂ (Лен/17: STELKLSDY, НК: STELKLSDH) и HLA-B*35:01-рестрицированных NP₄₁₈₋₄₂₆ (Лен/17: PFDKPTIMAAF, НК: PFEKSTIMAAF) эпитопов в связи с их высокой иммуногенностью [179, 390, 490]. Была собрана коллекция первичных клеток крови HLA-совместимых доноров (Табл. 50).

Таблица 50. Список доноров крови для исследования кросс-реактивности CD8⁺ Т-клеток *in vitro*

Аллель	Код донора	HLA-A	HLA-B	HLA-C
A*01:01	BP65	01:01	08:01, 50:01	
A*01:01	BP67	01:01, 66:01	40:01, 41:02	
A*01:01	BP80	01:01, 11:01	08:01, 55:01	03:03, 07:01
A*01:01	BP84	01:01, 30:02	18:01	05:01, 12:03
B*35:01	BP25	01:01, 03:01	35:01, 57:01	
B*35:01	BP75	03:01	18:01, 35:01	04:01, 07:01

Образцы крови были получены из Банка крови Австралийского Красного Креста (ARCBS, Victoria, Australia). HLA-генотипирование было произведено в Викторианском центре Трансплантации и Иммуногенетики.

Мононуклеары периферической крови были простимулированы 5:3 и 6:2 вариантами НЗН2 ЖГВ и культивировались в течении 10 дней *in vitro* для получения эпитоп-специфичных CD8⁺ Т клеток. Для ре-стимуляции Т клеток использовались HLA-трансгенные С1R-A01 и С1R-B35 культуры клеток, которые были инфицированы вакцинными вирусами для ЖГВ или нагружены антигенными пептидами NP₄₄₋₅₂ или NP₄₁₈₋₄₂₆. В ходе экспансии *in vitro* были получены культуры с высоким содержанием вирус-специфических Т клеток в образцах большинства доноров (Рис. 80). Далее, была оценена перекрестная реактивность NP₄₄₋₅₂-специфичных CD8⁺ Т клеток в культурах HLA-A*01:01-положительных доноров и NP₄₁₈₋₄₂₆-специфичных CD8⁺ Т клеток HLA-B*35:01-положительных доноров к вариантным пептидам нуклеопротеинов Лен/17 и НК (Рис. 81).

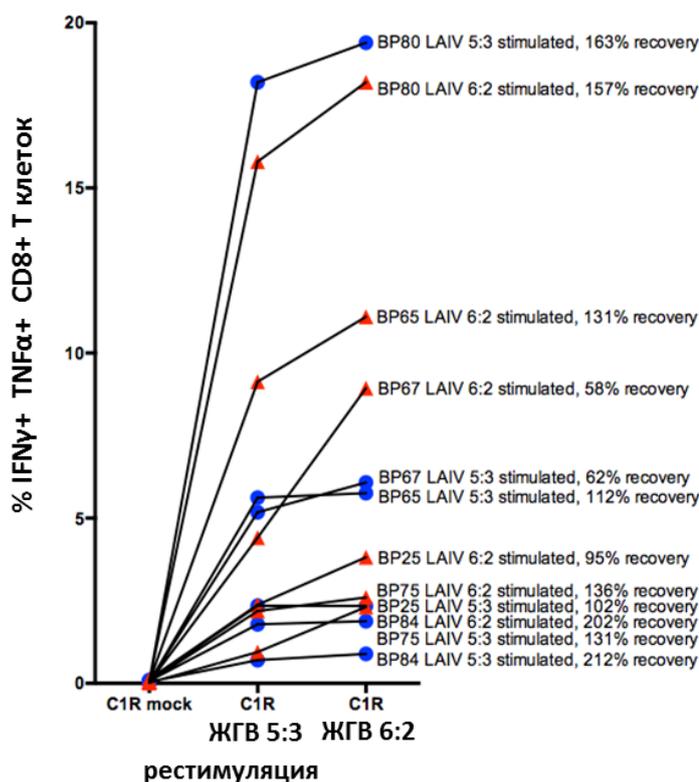


Рисунок 80. Эффективность экспансии мононуклеаров Т клеток HLA-A*01:01 и HLA-B*35:01 доноров через 10 дней после *in vitro* стимуляции 6:2 and 5:3 вариантами H3N2 ЖГВ. Культуры были ре-стимулированы HLA-совместимыми C1R клетками, предварительно инъецированными вакцинными вирусами или Моск.

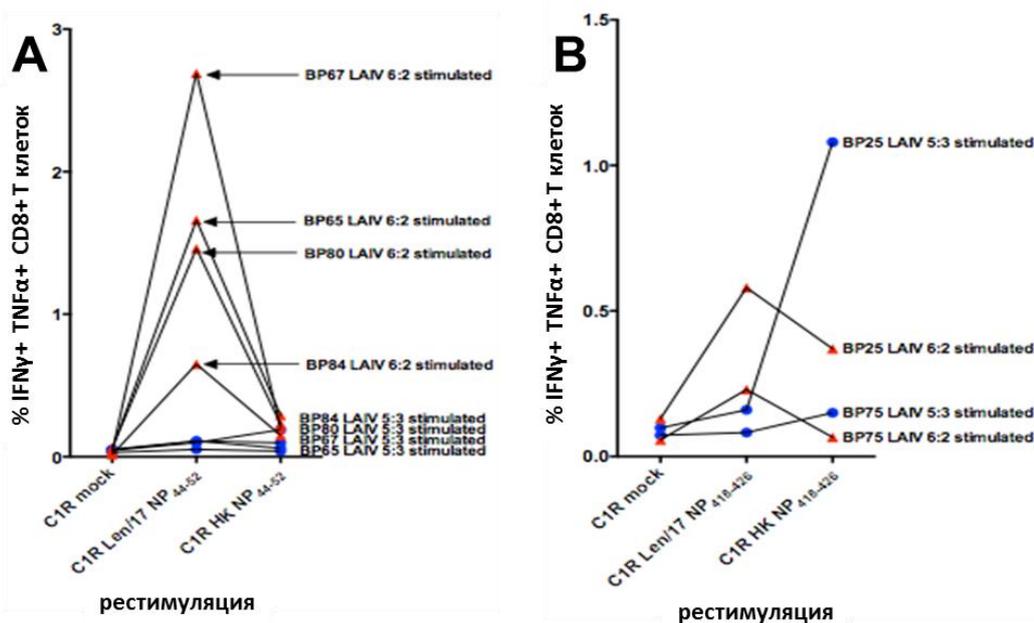


Рисунок 81. Перекрестная реактивность эпитоп-специфичных Т клеток против вариантных пептидов Лен/17 и НК нуклеопротеинов вакцинных штаммов для ЖГВ. Мононуклеары периферической крови HLA-A*01:01 (А) и HLA-B*35:01 (В) доноров были простимулированы в течении 10 дней *in vitro* 6:2 (красный) и 5:3 (синий) вариантами H3N2 ЖГВ. Культуры были ре-стимулированы HLA-совместимыми C1R клетками, предварительно нагруженными NP₄₄₋₅₂ или NP₄₁₈₋₄₂₆ пептидами Лен/17 или НК. В качестве контроля использовали интактные культуры C1R (Моск).

Дополнительно, для экспериментального обоснования необходимости актуализации состава ЦТЛ-эпитопов нуклеопротеина вакцинных штаммов ЖГВ использовали мононуклеары периферической крови волонтеров, принимавших участие в первой фазе клинических испытаний ЖГВ подтипа H7N3 и H5N2 в 2011 и 2013 годах. Вакцинные штаммы содержали NP ген донора аттенуации Лен/17, что теоретически должно приводить к формированию ЦТЛ-иммунного ответа на устаревший NP. Мы провели оценку кросс-реактивности индуцируемых после вакцинации CD8+ Т-лимфоцитов путем стимулирования *in vitro* МПК пептидами NP₃₃₀₋₃₃₈ А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09 и NP₃₃₀₋₃₃₈ Лен/17 (H2N2). В данном случае современный вирус H1N1pdm09 имеет замену в данном пептиде N334H по сравнению с донором аттенуации (WMACNSAAF на WMACHNSAAF). При сравнительном анализе уровней эпитоп-специфичных Т клеток до и после вакцинации было показано, что вакцинация ЖГВ, содержащей нуклеопротеин Лен/17, приводила к снижению уровня Т клеток, распознающих NP₃₃₀₋₃₃₈ А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09, и повышало уровни Т клеток, распознающий NP₃₃₀₋₃₃₈ Лен/17 (Рис. 82).

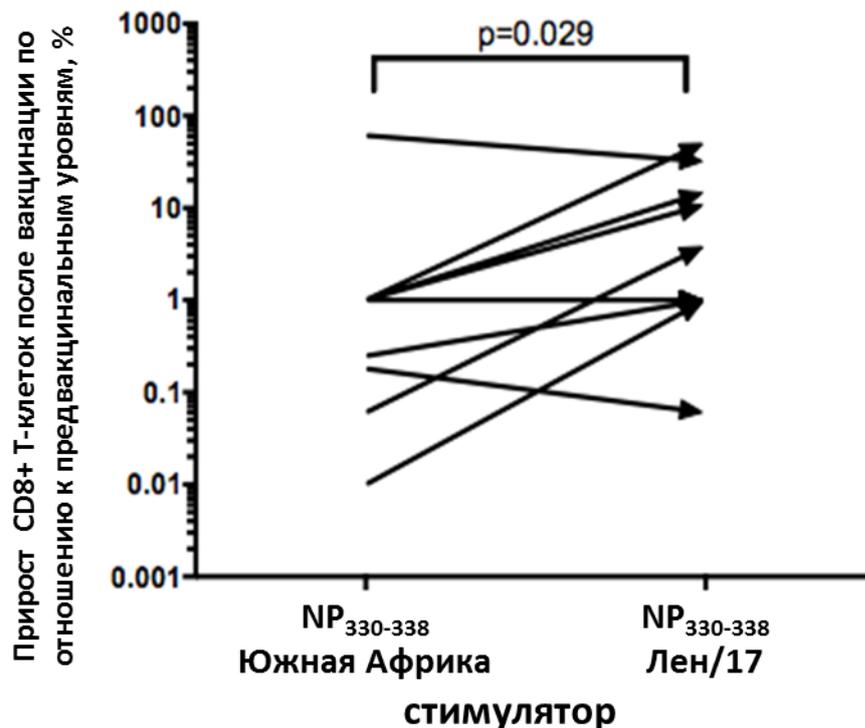


Рисунок 82. Влияние вакцинации ЖГВ на уровни ЦТЛ, распознающих NP₃₃₀₋₃₃₈ А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) и NP₃₃₀₋₃₃₈ А/Ленинград/17 (H2N2). Представлено соотношение к исходным уровням эпитоп-специфичных Т клеток после двукратной вакцинации ЖГВ (нуклеопротеин А/Ленинград/17). Точное значение p для двустороннего t -теста соотношений.

Данные последовательности имеют различие в 5 аминокислоте, что может привести к нарушению распознавания рМНС комплекса Т-клеточным рецептором цитотоксических лимфоцитов. Таким образом, стимуляция иммунной системы людей вирусами, несущими устаревшие нуклеопротеины, может снижать эффективность индукции перекрестного Т-клеточного иммунитета к современным вирусам. Полученные данные подтверждают необходимость актуализации Т-клеточных эпитопов нуклеопротеина вируса гриппа в составе современных гриппозных вакцин с целью усиления их кросс-протективности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей главе были предложены стратегии для усиления индукции перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа на иммунизацию живыми гриппозными вакцинами, используя самые современные генно-инженерные и иммуногенетические подходы. В частности, была опробована перспективная стратегия усиленной индукции кросс-реактивных антител, нацеленных на консервативный участок молекулы гемагглютинина, путем конструирования вакцинных штаммов ЖГВ, несущих химерные молекулы НА. Такие химерные НА содержат идентичный stalk-домен от вируса H1N1, а глобулярные части – от различных антигенно-неродственных вирусов гриппа (H5N1, H8N4, H9N2). Последовательная иммунизация животных такими модифицированными ЖГВ приводила к активной выработке антител, нацеленных на stalk-домен, что, в свою очередь, усиливало защиту иммунизированных животных от дрейфовых вариантов вируса гриппа, а также от вирусов гриппа А других подтипов. Ранее такая стратегия индукции stalk-реактивных антител была опробована на платформах инактивированных, рекомбинантных белковых, векторных и ДНК-вакцин, однако в данном исследовании впервые была продемонстрирована перспективность использования живых вакцин как основы для создания универсальной гриппозной вакцины.

Другим подходом к оптимизации современных живых гриппозных вакцин, впервые предложенным в данном исследовании, является повышение кросс-реактивности ЦТЛ-иммунного ответа на вакцинацию. Сравнительный иммуноэпитопный анализ масштабной выборки современных циркулирующих вирусов гриппа А и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 показал значительные отличия в составе иммунодоминантных ЦТЛ-эпитопов молекулы нуклеопротеина – основной мишени для развития Т-клеточного ответа на вакцинацию. Более детальное изучение определенных диверсифицированных ЦТЛ-эпитопов на культурах мононуклеаров периферической крови человека показало, что классические ЖГВ с формулой генома 6:2 индуцируют мощный Т-клеточный иммунный

ответ на устаревшие эпитопы NP, который излишне нагружает иммунную систему человека, но при этом может быть не оптимальным против современных вирусов гриппа. Полученные данные свидетельствуют о необходимости актуализации Т-клеточных эпитопов нуклеопротеина вируса гриппа в составе современных гриппозных вакцин с целью усиления их кросс-протективности.

Нами был предложен наиболее простой подход к усилению индукции релевантного ЦТЛ-иммунного ответа на ЖГВ: конструирование вакцинных штаммов с формулой генома 5:3, т.е. включение в состав вакцинных реассортантов NP гена от современного циркулирующего вируса. Усиление ЦТЛ-иммунного ответа и, как следствие, улучшение способности вакцин с формулой генома 5:3 защищать от гетерологичных вирусов гриппа, было продемонстрировано на модели мышей как для сезонных вирусов гриппа H1N1pdm09, так и для потенциально-пандемического вируса подтипа H7N9. Проведенные доклинические исследования на модели хорьков ряда вакцинных штаммов ЖГВ подтипа H3N2 с формулой генома 5:3 подтвердили безопасность и высокую иммуногенность модифицированных вакцинных вирусов, что является основанием для проведения на следующем этапе клинических испытаний данных вакцин на добровольцах. Стоит отметить, что данная стратегия инкорпорирования NP гена от эпидемического вируса в состав вакцинных реассортантов является универсальной и может быть распространена на инактивированные гриппозные вакцины, которые в настоящее время готовят на основе высокорепродуктивного вируса A/PR8/34 (H1N1), выделенного более 80 лет назад, и ЦТЛ эпитопы которого также существенно устарели. Такой подход хоть и не позволяет сконструировать один универсальный вакцинный штамм, способный защитить привитых от различных подтипов вируса гриппа А, однако он очень прост в исполнении и может применяться уже в настоящее время для подготовки более кросс-реактивных живых и инактивированных гриппозных вакцин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании проводилась оптимизация свойств отечественной живой гриппозной вакцины, используя самые современные представления о природе вирусов гриппа, молекулярных механизмов, лежащих в основе их эволюционной изменчивости, а также особенностях развития адаптивного иммунного ответа на инфекцию и иммунизацию гриппозными вакцинами. При этом оптимизация ЖГВ проводилась одновременно по двум направлениям:

(1) конструирование вакцинных штаммов ЖГВ против наиболее вероятных возбудителей следующих пандемий: зоонозных вирусов гриппа H7N9 и H5N1 [100], а также вирусов гриппа человека H2N2, не циркулировавших среди людей с 1968 года, но постоянно присутствующих в природном резервуаре [340].

(2) расширение спектра защитного действия сезонных и пандемических штаммов ЖГВ с целью создания универсальной гриппозной вакцины нового поколения.

Поскольку большинство лицензированных в настоящее время противогриппозных вакцин индуцирует узкоспецифический иммунный ответ к сезонным вирусам гриппа, население остается практически беззащитным перед угрозой возникновения новых пандемических вариантов вирусов гриппа. Комплексный подход, использованный в настоящей работе, был призван обеспечить готовность отечественной системы здравоохранения к надвигающейся пандемии гриппа.

Идея использования в качестве основы для конструирования гриппозных вакцин нового поколения ХА штаммов для живой гриппозной вакцины базируется на ряде основополагающих факторов. Во-первых, безопасность отечественной ЖГВ подтверждена многочисленными данными как при изучении вакцины в контролируемых клинических исследованиях, так и многолетним опытом ее применения в практике здравоохранения [12]. Во-вторых, иммунизация ЖГВ вызывает образование всех звеньев адаптивного иммунного ответа, наиболее значимым из которых является мукозальный IgA-опосредованный иммунитет во входных воротах инфекции [61, 423, 469, 476]. В-третьих, безболезненный интраназальный способ введения не требует наличия высококвалифицированного медицинского персонала для массовой иммунизации населения. Наконец, производство живых вакцин экономически целесообразно, а производственные мощности за последние 10 лет значительно выросли, включая введение в строй новых производств в развивающихся странах с высокой плотностью населения [422].

При производстве гриппозных вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа встал вопрос о целесообразности разработки единого универсального донора аттенуации и высокой репродуктивности с целью скорейшей наработки

максимального количества доз как живой, так и инактивированной вакцины, используя для производства один реассортантный вакцинный штамм. В данном случае отечественные производители не будут зависеть от поставок высокопродуктивных реассортантов для производства ИГВ из-за рубежа. Разработанный в настоящем исследовании такой донорский штамм, A/PR8/59/M2 (H1N1), отвечает всем требованиям, предъявляемым как к донорам аттенуации для ЖГВ, так и к донорам высокой урожайности для ИГВ. Поскольку новый ХА донор был получен из высокорепродуктивного вируса A/PR8/34, он сохранил способность активно репродуцироваться в РКЭ – основном субстрате для наработки гриппозных вакцин, а имеющийся опыт клинического применения ЖГВ из ХА штамма-предшественника A/PR8/59/1 (H1N1) [2], а также наличие аттенуирующих мутаций во всех генах внутренних и неструктурных белков вируса, гарантируют его безвредность и генетическую стабильность при иммунизации людей. Введенные в ходе проделанной работы мутации в М2 белок вируса обеспечили чувствительность вакцинных штаммов к химиопрепаратам адамантанового ряда, что, в свою очередь, дополнительно гарантирует безопасность применения ЖГВ на основе нового донора для массовой иммунизации населения.

Аттенуированный фенотип высокоурожайного донора 59/M2 также позволит полностью обезопасить персонал при производстве ИГВ из высокопатогенных вирусов гриппа, поскольку при использовании классического донора PR8 штаммы могут сохранять остаточную вирулентность. Такие опасения высказывались и ранее, поэтому американской компанией MedImmune было предложено использовать для производства ИГВ против потенциально-пандемических вирусов реассортантные штаммы на основе модифицированного вируса PR8, в геном которого точечным мутагенезом вводились аттенуирующие мутации от донора аттенуации А/АА [240].

Важно отметить, что наличие в коллекции доноров аттенуации для отечественной ЖГВ холодоадаптированного донора подтипа H1N1 значительно облегчило подготовку вакцинных штаммов для ЖГВ подтипа H2N2, поскольку с использованием классического донора аттенуации Лен/17, имеющего тот же подтип, возникли методические трудности на этапе селекции реассортантов с использованием анти-Лен/17 гипериммунной сыворотки. Вакцинные штаммы ЖГВ H2N2 против вирусов разных генетических линий, циркулирующих в конце пандемического цикла H2N2, подготовленные с использованием нового донора 59/M2, проявляли все необходимые признаки, свойственные ХА вакцинным штаммам живой гриппозной вакцины – они обладали *ts/ca* фенотипами, были безвредны для животных и индуцировали кросс-протективный иммунный ответ после

интраназального введения. Важным свойством данных штаммов явилась их высокая урожайность – вирусы накапливались в РКЭ с более высокой скоростью и достигали более высоких титров (как инфекционных, так и гемагглютинирующих), чем аналогичные штаммы ЖГВ H2N2, содержащие гены внутренних белков от классического донора Лен/17. ЖГВ и ИГВ из экспериментальных вакцинных штаммов на основе нового донора 59/M2 далее планируется изучить в клинических испытаниях на добровольцах, результаты которых укажут на целесообразность лицензирования данной вакцины и ее применения в практике здравоохранения.

Необходимо отметить, что для получения ЖГВ H2N2 на основе донора Лен/17 потребовалась модификация процедуры реассортации, поскольку, как отмечалось выше, эпидемические вирусы H2N2 подавлялись гипериммунной сывороткой к донору аттенуации. Стратегия использования в качестве источника генов донора Лен/17 вакцинного штамма для сезонной ЖГВ подтипа H1N1 оказалась перспективной, однако препятствием для использования коммерческих штаммов ЖГВ H1N1 явилось обнаружение дополнительных аттенуирующих мутаций в генах внутренних белков вируса, свойственных более аттенуированному варианту Лен/47. Это обстоятельство косвенно подтверждает обнаруженную ранее гетерогенность популяции донора Лен/17 [25]. В связи с высокой вероятностью того, что дополнительные мутации будут негативно сказываться на иммуногенных и защитных свойствах вакцины, необходимо пристально мониторить аминокислотный состав всех генов вакцинных вирусов, что легко реализуется с использованием современных методов генетического анализа. Таким образом, в настоящем исследовании был подготовлен новый вакцинный штамм ЖГВ H1N1 на основе донора Лен/17, который далее использовался в качестве источника шести генов негликозилированных белков для подготовки штаммов ЖГВ подтипа H2N2.

Немаловажным аспектом подготовки вакцинных штаммов против потенциально-пандемических вирусов гриппа H2N2 является выбор исходного штамма – источника поверхностных антигенов вакцинного вируса. Поскольку большинство изолируемых от птиц вирусов с гемагглютинином H2 антигенно схожи с вирусами, выделенными в 1957 году [312, 431, 432], многие исследователи готовят вакцины на основе вируса A/Сингапур/1/57 (H2N2) [4, 197]. В случае появления в циркуляции вирусов, антигенно родственными штаммам начала пандемического цикла H2N2, в качестве резервной вакцины могут выступать ЖГВ из ХА доноров аттенуации Лен/17 и А/АА, и если для Лен/17 имеются обширные свидетельства безопасности, иммуногенности и эффективности ЖГВ для людей, то американский штамм, ранее не используемый в качестве вакцины, прошел дополнительные ограниченные клинические наблюдения на

добровольцах. К удивлению авторов, несмотря на оптимистичные результаты изучения ХА вируса А/АА на различных животных моделях [102], приживляемость и иммуногенность для людей, рожденных после 1968 г, оказались гораздо ниже ожидаемых уровней [471]. Авторы предположили, что интенсивное пассирование вируса А/АА в клетках фибробластов куриных эмбрионов и РКЭ снизило способность вируса инфицировать клетки назального эпителия людей. И для преодоления данного барьера ученые предложили использовать для подготовки ЖГВ H2N2 в качестве источников поверхностных антигенов NA и NA вирусы, выделенные от людей и прошедшие ограниченное число пассажей в РКЭ [471].

Именно эта стратегия была использована в нашем исследовании: для подготовки вакцинных кандидатов ЖГВ H2N2 были отобраны два штамма H2N2, выделенные от людей в конце периода циркуляции данных вирусов, и которые существенно отличаются друг от друга по антигенным свойствам [294]. Оба вакцинных штамма ЖГВ H2N2 на основе донора Лен/17 прошли полный цикл доклинических исследований, подтвердивших их безвредность, способность реплицироваться в ВДП лабораторных животных, а также иммуногенность и защитную эффективность.

Интенсивные исследования на хорьках выявили преимущества в иммуногенности и защитной эффективности вакцинного штамма, подготовленного на основе вируса А/Калифорния/1/66, по сравнению с вакцинным штаммом к вирусу другой генетической линии H2N2: А/Токио/3/67. Вакцинный штамм 17/Кал/395 стимулировал более высокие уровни кросс-реактивных антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител после однократной иммунизации хорьков, чем штамм 17/Ток/326, и, как следствие, обеспечивал защиту животных от заражения не только гомологичным вирусом Кал/66, но и гетерологичным штаммом Ток/67.

Проведенное дополнительное исследование нейраминидазной активности вакцинных штаммов ЖГВ H2N2 выявило существенные различия между вакцинными вирусами: активность NA штамма 17/Кал/395 была значительно выше таковой вируса 17/Ток/326. Поскольку известно, что ферментативная активность нейраминидазы отражает нативную конформацию данного белка и его способность индуцировать антитела, подавляющие активность NA [465, 501], можно предположить, что более активная функция нейраминидазы штамма 17/Кал/395 способствовала повышенной иммуногенности данной вакцины на модели хорьков.

Важно также отметить, что ЖГВ из штамма 17/Кал/395 индуцировала у хорьков наивысшие уровни антинейраминидазных антител среди всех исследованных ХА штаммов H2N2. В последние годы появилось множество свидетельств о положительной

корреляции уровней анти-NA антител и защитой людей от заражения вирулентными вирусами гриппа [118, 332]. Потенциальным объяснением вклада активности NA в иммуногенность ЖГВ может быть более активная и/или продолжительная репликация вакцинного вируса в респираторном тракте животных, что приводит к образованию более мощного кросс-реактивного гуморального иммунного ответа на вакцинацию. Однако данная гипотеза требует дальнейшего детального изучения, поскольку в наших экспериментах не удалось выявить значительных отличий в репликации вакцинных штаммов H2N2 в ВДП хорьков, ввиду недостаточного количества животных, а также временных точек забора материала для исследования. Тем не менее, обнаруженная в настоящей работе взаимосвязь между активностью NA вакцинного штамма и его кросс-протективностью должна учитываться в будущем при дизайне высокоиммуногенных живых гриппозных вакцин.

Важным результатом настоящей работы явилась апробация сконструированной ЖГВ H2N2 из штамма 17/Кал/395 на здоровых взрослых добровольцах 18-40 лет. Поскольку вакцина была подготовлена из вируса, изолированного от человека, вакцинный вирус активно реплицировался в верхних дыхательных путях людей: 22 из 28 (78,6%) и 20 из 27 (74,1%) добровольцев выделяли вирус после первой и второй дозы вакцины, соответственно, а у некоторых лиц вирус детектировался вплоть до 4 суток после иммунизации. Эти данные превосходили результаты выделения вакцинных вирусов при изучении других пандемических ЖГВ на добровольцах, которые обнаруживались только на 1 и 2 день после вакцинации [114, 416, 418]. Анализ изолятов, полученных от привитых ЖГВ H2N2 добровольцев, подтвердил генетическую стабильность ЖГВ, а отсутствие выделения вирусов от лиц группы плацебо указывает на отсутствие трансмиссивности ЖГВ H2N2 среди людей. Отсутствие трансмиссии вакцинных штаммов ЖГВ было показано ранее, и не только для потенциально пандемических вариантов, но также и для сезонной ЖГВ. Насколько нам известно, до настоящего времени были зарегистрированы лишь единичные случаи передачи вакцинных вирусов ЖГВ типа В от привитых невакцинированным детям [322, 497].

Оценка безвредности ЖГВ H2N2 показала, что вакцина была безопасной и хорошо переносилась волонтерами, не вызывая серьезных побочных эффектов или тяжелой реактогенности. Несколько умеренных побочных явлений наблюдались одинаково часто в вакцинной и контрольной группах. Аналогичные наблюдения были сделаны в клинических испытаниях отечественной ЖГВ против потенциально пандемических вирусов H5N2 и H7N3, где несколько зарегистрированных локальных и системных реакций были короткими по длительности и не сопровождались никакими последствиями

[415, 416, 418]. Следует отметить, что несколько ранних клинических исследований пандемических ЖГВ на основе донора А/АА не включали группу плацебо, и поэтому все нежелательные явления (у 20-40% привитых) были отнесены к вакцин-индуцированным [114].

Ранее было показано, что титры антигемагглютинирующих антител не обязательно отражают способность гриппозных вакцин защищать от сезонного и пандемического гриппа [82, 278, 363]. Это в особенности касается детей младшего возраста, для которых не установлено ни одного фактора иммунитета, напрямую коррелирующего с защитой от вирусов гриппа [74]. Несколько исследований выявили роль мукозальных IgA антител и Т-клеточного ответа в защите детей при помощи ЖГВ [44, 150]. В этой связи ВОЗ рекомендовала оценивать иммунные ответы на ЖГВ с использованием широкого спектра иммунологических тестов, таких как РТГА, РМН, ИФА для определения уровней локальных IgA антител в секретах верхних дыхательных путей, а также оценка клеточных иммунных реакций, с особым вниманием к вирус-специфическим В- и Т-клеткам памяти [173]. Используя такой комплексный подход, было показано, что подавляющее большинство привитых лиц (92,6%) ответили на введение ЖГВ H2N2 в одном или нескольких тестах, включая 85,2% лиц с приростами антител и 55,6% волонтеров с Т-клеточным ответом.

Следует отметить, что было обнаружено только четыре добровольца без приростов сывороточных и/или мукозальных антител, и именно у этих лиц не выделялся вакцинный вирус из верхних дыхательных путей. Напротив, все 24 волонтера с детектируемой репликацией вакцинного штамма ответили в одном или сразу нескольких тестах выявления вирус-специфических антител. Эти данные свидетельствуют о сильной корреляции между репликацией вируса в верхних дыхательных путях и приростом уровней антител, что не было бы обнаружено, если бы измерялись только уровни антигемагглютинирующих антител в РТГА.

Хотя доля лиц с ≥ 4 -кратным увеличением титров антител была относительно высокой, титры антител после двух доз ЖГВ H2N2 оставались значительно ниже, чем у сезонных ЖГВ. Аналогичные результаты были получены в клинических испытаниях пандемических вариантов ЖГВ подтипов H7N3 и H5N2. Потенциальным объяснением этого является отсутствие предсуществующего иммунитета к пандемическим вирусам, тогда как сезонные вакцины могут выступать в качестве бустерных вакцин с учетом наличия В-клеток памяти у большинства людей, образующихся в результате многократных инфекций и иммунизаций. Аналогично представленным результатам,

пандемическая инактивированная вакцина H2N2 также продемонстрировала заметно сниженную иммуногенность по сравнению с сезонным ИГВ [197].

Несмотря на то, что иммунный ответ на пандемические ЖГВ был достаточно слабым, в ряде работ последних лет показано, что они праймируют иммунную систему людей для развития мощного гуморального иммунного ответа после однократного введения бустерной дозы ИГВ [55, 381, 419, 447, 472]. Во всех этих исследованиях добровольцы, практически не ответившие на введение ЖГВ приростом антител в РТГА и РМН, отвечали ускоренной выработкой высоких уровней кросс-реактивных антител после одной дозы ИГВ, введенной через несколько лет после первичной иммунизации. Вполне вероятно, что подобные бустерные реакции могут наблюдаться после естественного заражения вирусами дикого типа. Поскольку подготовленная в настоящем исследовании ЖГВ H2N2 из штамма 17/Кал/395 сама по себе способна индуцировать значительные иммунные ответы у добровольцев после первичной иммунизации, ее следует рассматривать как оптимальный вариант для праймирования населения, в случае, если вирусы гриппа H2N2 вновь появятся в циркуляции среди людей.

При подготовке вакцинного штамма ЖГВ против потенциально пандемического вируса гриппа H7N9, выделенного в 2013 году, возникли некоторые осложнения в связи с тем, что исходная популяция вируса A/Ануи/1/2013 была достаточно гетерогенна [107, 436], а последовательности генов, кодирующих HA и NA белки клинического изолята, представленного в базе данных, отражали лишь одну из этих популяций. В результате полученный классической реассортацией в РКЭ вакцинный штамм ЖГВ A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) отличался по двум позициям в молекуле HA от вируса, представленного в базе данных: N123D и N149D. Поскольку последовательность клинического изолята рассматривается в качестве референсной при подготовке вакцинных штаммов, любые отклонения в HA и NA вакцинного штамма требуют дополнительных исследований свойств штамма, прежде всего антигенных и иммуногенных. В настоящем исследовании был проведен всесторонний анализ вакцинных штаммов ЖГВ H7N9, отличающихся по позициям 123 и 149 молекулы HA, *in vitro* и *in vivo*, в результате которого было показано преимущество варианта 123D/149D перед штаммом 123N/149N в плане сродства к рецепторам $\alpha 2,6$ типа, активности репликации в клетках млекопитающих, иммуногенности и кросс-реактивности гуморального иммунного ответа. Отсутствие антигенных отличий вариантов вируса 123D/149D и 123N/149N, а также более высокая урожайность варианта 123D/149D, совпадает с данными американских авторов [107]. Таким образом, было показано, что

штамм А/17/Ануи/2013/61 (т.е. вариант 123D/149D) является оптимальным для дальнейшего изучения в доклинических и клинических исследованиях.

Оценка безопасности ЖГВ Н7N9 из штамма 2013 года на модели хорьков показала, что, как и другие ХА вакцинные штаммы, данная вакцина была безвредна при интраназальном введении: животные не проявляли клинических признаков заболевания, а инфекционный вирус выделялся только из ВДП, но не из легких. В отличие от исследования вакцинных штаммов ЖГВ Н2N2, в экспериментах на хорьках оценивалась сравнительная иммуногенность и защитная эффективность ЖГВ Н7N9 после однократной и двукратной иммунизации. Важно отметить, что уже одна доза ЖГВ Н7N9 была способна индуцировать высокие титры функциональных анти-НА и анти-НА антител, выявляемых в РТГА, РМН и реакции ингибирования нейраминидазной активности. Вторая иммунизация не приводила к существенному увеличению титров данных антител, и при этом вакцинный вирус не выделялся от привитых хорьков, что указывает на защитную функцию антител, образованных после первичной иммунизации.

Также стоит отметить, что защитную эффективность ЖГВ Н7N9 оценивали путем интратрахеального заражения животных вирулентным вирусом А/Ануи/1/2013 (Н7N9). Данный путь введения вируса был выбран в связи с тем, что при интраназальном заражении у наивных хорьков развивалось достаточно умеренное заболевание с небольшим подъемом температуры и не очень значительной потерей веса. Это было показано как в наших исследованиях безопасности ЖГВ Н7N9, так и в работах других авторов [70, 564]. При использовании же интратрахеального пути введения челлендж-вируса у животных развивалось тяжелое заболевание, сопровождаемое серьезной бронхопневмонией, в результате которого хорьки погибали на 3-4 сутки после заражения [277]. При использовании такой модели заражения вакцинированные ЖГВ Н7N9 животные были полностью защищены от клинических проявлений заболевания, а также от размножения вирулентного вируса в верхних и нижних отделах респираторного тракта хорьков, причем преимущество двукратной иммунизации перед однократной было выявлено только при детальном анализе гистопатологических изменений в тканях легких хорьков после челленджа вирулентным вирусом.

Как и в случае с ЖГВ Н2N2, ЖГВ из штамма А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9) была изучена в первой фазе клинических испытаний на взрослых здоровых добровольцах. Вакцина при двукратном введении хорошо переносилась и не вызывала никаких серьезных побочных явлений, что согласуется с другими испытаниями ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа [416].

Поскольку вирусы H7N9 первой волны циркуляции характеризовались множественными маркерами адаптации к клеткам млекопитающих [200], ожидалось, что ЖГВ H7N9 будет лучше реплицироваться в верхних дыхательных путях неиммунных добровольцев, чем другие вакцинные кандидаты подтипа H7. Действительно, у 60% и 24% лиц, иммунизированных ЖГВ H7N9, обнаруживался инфекционный вирус после первой и второй дозы вакцины, соответственно, со средней продолжительностью выделения 2 суток. Эти результаты идут вразрез с данными других клинических испытаний живых вакцин подтипа H7, где жизнеспособный вирус выделялся культуральными методами только после первой дозы на уровне от 13 до 24% [55, 418, 447, 470]. Важно отметить, что, несмотря на высокий уровень репликации, вакцинный вирус H7N9 не передавался от вакцинированных лиц к их близким непривитым контактам, что дополнительно свидетельствует о безопасном профиле тестируемой вакцины.

Как отмечалось выше, для адекватной оценки иммуногенности живых вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа необходимо использовать расширенный набор иммунологических тестов, что и было осуществлено в испытаниях ЖГВ H7N9 на добровольцах. В отличие от других ЖГВ против потенциально пандемических вариантов, ЖГВ H7N9 приводила к значительному увеличению уровней сывороточных (оцениваемых в РТГА, РМН, ИФА-IgA, ИФА-IgG) и мукозальных IgA антител уже после однократной иммунизации. Кроме того, существенная пропорция привитых достигала титров 1:40 и выше нейтрализующих антител на данной временной точке. Вторая доза ЖГВ H7N9 дополнительно усиливала гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет, в результате чего общая доля ответивших на вакцинацию волонтеров достигала 93%. Что более важно, индуцированные ответы были высокого качества, поскольку большинство испытуемых достигли титров антител в РТГА и/или РМН 1:40 и выше, и многие из них также показали значительное увеличение пропорций вирус-специфических CD4⁺ Т-клеток, уровни которых, как известно, положительно коррелируют с защитой людей от заражения вирусами гриппа дикого типа [529, 555]. Суммарно, данные, полученные при изучении ЖГВ H7N9 на добровольцах, представляют собой наилучшие показатели из всех ранее протестированных живых вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа [114, 416].

Предыдущие исследования показали, что вакцинный кандидат ЖГВ H7N3, подготовленный на основе донора аттенуации Лен/17 [398], приводил к образованию антител, которые были способны перекрестно реагировать с новыми вирусами H7N9, как на модели животных, так и в клинических наблюдениях [94, 417]. Однако ЖГВ H7N3 очень слабо реплицировалась в ВДП привитых, а титры антигемагглютинирующих и

нейтрализующих антител после двукратной иммунизации были достаточно низкими. Несмотря на значительные пропорции лиц с сероконверсиями, ни у кого индуцируемые антитела не достигали титра 1:40 [418]. Иммунитет, выработанный после первичной иммунизации с помощью ЖГВ H7N3, может быть достаточным для индукции В-клеток иммунологической памяти, что приведет к быстрому образованию высоких уровней антител после введения субоптимальной дозы ИГВ несколько месяцев или лет спустя [55, 381, 419, 447, 472]. В случае же с ЖГВ H7N9, индуцированный первичный иммунный ответ сам по себе способен защищать привитых от заражения вирулентным вирусом в начале пандемии H7N9, поскольку уже после первой дозы вакцины были обнаружены высокие уровни вирус-нейтрализующих антител и специфичных к вирусу CD4+ Т-клеток. В случае преодоления вирусами H7N9 межвидового барьера вакцинный штамм A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) может быть востребован производством в кратчайшие сроки после объявления пандемии, что, в силу высокой степени кросс-реактивности штамма по отношению к дрейфовым вариантам вируса H7N9, позволит обеспечить защиту уязвимых слоев населения в самом начале пандемической волны, пока не будет подготовлено и выпущено необходимое количество доз вакцины из циркулирующих вирусов.

Также в ходе настоящего исследования был сконструирован экспериментальный вакцинный штамм ЖГВ против высокопатогенного вируса гриппа H7N9, впервые обнаруженного в циркуляции в 2016 году [298, 388, 460, 520]. При этом в процессе конструирования был удален полиосновный кливедж-сайт молекулы гемагглютинаина, чтобы сделать вирус апатогенным, а также была внесена мутация K292R в молекулу нейраминидазы, чтобы сделать вирус чувствительным к нейраминидазным ингибиторам. ЖГВ из штамма A/17/Гуандонг/2016/62 (H7N9) была изучена в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (на модели хорьков), которые показали, что вакцинный штамм обладает всеми полезными свойствами, характеризующими реассортантные штаммы ЖГВ, и результаты данных исследований явились основой для подготовки досье для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах нового штамма ЖГВ против ВПВГ H7N9.

Возможность получения вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа появилась благодаря разработанной в настоящем исследовании обратнo-генетической системе для отечественного донора аттенуации Лен/17. Необходимость разработки такой системы возникла еще в конце 1990-х, когда остро встал вопрос о подготовке вакцинных штаммов против новых высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1. Поскольку данные вирусы вызывали гибель куриных эмбрионов, не представлялось возможным готовить вакцинные штаммы методом классической реассортации в РКЭ. Для подготовки вакцинных штаммов из ВПВГ необходима

целенаправленная модификация их молекулы гемагглютинина [461], что не представлялось возможным сделать традиционными вирусологическими методами.

На начальном этапе для подготовки вакцинных штаммов ЖГВ против ВПВГ H5N1 ученые использовали метод реассортации с антигенно-родственным низкопатогенным вирусом гриппа, имеющим гемагглютинин H5. Так была подготовлена первая отечественная ЖГВ H5N2 из вируса А/утка/Потсдам/1402-6/86 (H5N2), которая хорошо себя проявила в доклинических исследованиях [128], а также в I-II фазах клинических испытаний на добровольцах [415]. Позже, для подготовки более актуальных вакцинных штаммов против вирусов H5N1 была предложена стратегия скрещивания в РКЭ донора аттенуации с реассортантным вакцинным штаммом для инактивированной вакцины. Данная стратегия была успешно апробирована для подготовки ряда вакцинных штаммов против вирусов H5N1 различных клейдов [285]; ЖГВ из одного из этих штаммов также была изучена в клинических испытаниях на добровольцах [416].

Однако, во-первых, с использованием данного подхода удавалось получать лишь реассортанты с формулой генома 7:1, а не 6:2 [262, 285], а, во-вторых, такой способ существенно замедляет процесс подготовки вакцинных штаммов для ЖГВ, поскольку для каждого нового рекомендованного вируса необходимо будет сначала получить реассортантный штамм для ИГВ, и лишь потом приступать к подготовке штамма для ЖГВ. В связи с этим потребовалась разработка обратно-генетической системы для отечественного донора аттенуации Лен/17 с целью своевременной подготовки вакцинных реассортантов ЖГВ против любых высоковирулентных вирусов гриппа генно-инженерными методами.

В настоящем исследовании были клонированы все гены донора аттенуации Лен/17 в векторы для обратной генетики вирусов гриппа, а полученный в результате трансфекции чувствительных клеток вирус Лен/17-rg был идентичен исходному штамму Лен/17, как по способности репродуцироваться в РКЭ и культуре клеток MDCK при различных температурах инкубации, так и по уровню репликации в респираторном тракте BALB/с мышей.

С использованием данной системы были успешно сконструированы экспериментальные вакцинные штаммы против высокопатогенных вирусов H5N1 двух клейдов: А/Вьетнам/1203/2004 (клейд 1) и А/Египет/321/2007 (клейд 2.2.1). Важно отметить, что при использовании методов обратной генетики вакцинные штаммы с необходимой формулой генома 6:2 получались без каких-либо методических трудностей, в отличие от подготовки вакцинных штаммов H5N1 методом классической реассортации в РКЭ. Можно предположить, что активность нейраминидазы донора Лен/17 превосходит

таковую вирусом H5N1, и в процессе реассортации и последующей селекции преимущество получают вирусы, содержащие NA от донора аттенуации.

Генно-инженерные вакцинные штаммы VN-Лен/17гг и EG-Лен/17гг проявляли *ts/ca/att* фенотипы, свойственные донору аттенуации Лен/17, имели трипсин-зависимый фенотип при репликации в культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов, а также были безвредны для кур при интраназальном и внутривенном введении. Таким образом, вакцинные штаммы ЖГВ против ВПВГ H5N1, полученные методами обратной генетики, продемонстрировали профиль безвредности, сходный с вакцинными штаммами против сезонных вирусов гриппа. Аналогичные результаты были получены американскими авторами при конструировании вакцинных штаммов ЖГВ на основе донора аттенуации A/AA [461].

Детальное изучение иммуногенных и защитных свойств сконструированных в данной работе вакцинных штаммов VN-Лен/17гг и EG-Лен/17гг на мышах линии BALB/c выявило высокую иммуногенность обеих вакцинных вирусов при двукратном введении, причем индуцируемые антитела обладали выраженными кросс-реактивными свойствами. Как результат – ЖГВ H5N1 из штамма одного клэйда полностью защищала животных от челленджа высокопатогенным вирусом другого клэйда. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами оценки кросс-протективных свойств вакцинного штамма ЖГВ, подготовленного из низкопатогенного вируса H5N2 [128, 303].

В экспериментах на хорьках сравнивалась иммуногенность и защитная эффективность живой и инактивированной вакцин H5N1, подготовленных из реассортантного штамма VN-Лен/17гг. В предварительных экспериментах была показана необходимость двукратной иммунизации хорьков ЖГВ H5N1 для индукции существенных титров антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител, что существенно отличается от результатов изучения ЖГВ подтипов H2N2 и H7N9 на этой животной модели.

Такие различия могут быть обусловлены тем, что вирусы гриппа птиц и человека имеют различную рецепторную специфичность молекул гемагглютинина: если птичьих вирусы предпочтительно взаимодействуют с сиаловыми кислотами, связанными с галактозой типом связи $\alpha 2,3$, то вирусы гриппа человека (H1, H2 и H3), присоединяются к сиаловой кислоте, соединенной с галактозой $\alpha 2,6$ типом связи [157, 164, 318, 407]. Вирусы H5N1 связываются исключительно с рецепторами $\alpha 2,3$ -типа, то вирусы H7N9 характеризуются двойной рецепторной специфичностью [438, 565], что может обуславливать более активную репликацию последних в верхних дыхательных путях хорьков. Действительно, в наших экспериментах вакцинный вирус H5N1 выделялся из

ВДП хорьков в значительно более низких титрах, чем оба вакцинных штамма H7N9 против вирусов 2013 и 2016 годов выделения.

Тем не менее, двукратная иммунизация хорьков живой и инактивированной вакцинами H5N1 индуцировала значительные титры сывороточных антител, выявляемых в РТГА и ИФА, как к гомологичному вирусу А/Вьетнам/1203/2004 (клайд 1), так и к гетерологичному штамму А/Египет/321/2007 (клайд 2.2.1). В обеих группах животные были полностью защищены от репликации в респираторном тракте гомологичного вирулентного вируса А/Вьетнам/1203/2004. Несмотря на то, что уровни сывороточных антител, индуцируемых у хорьков ИГВ H5N1, были значительно выше таковых в группе ЖГВ H5N1, животные, привитые живой вакциной, были лучше защищены от заражения гетерологичным высокопатогенным вирусом А/Египет/321/2007, чем животные группы ИГВ. При этом данная дополнительная защита хорошо коррелирует с усиленной индукцией перекрестно-реагирующих секреторных IgA антител после иммунизации живой вакциной.

Имуноглобулины класса А являются основными антителами, связанными с иммунной системой слизистой оболочки, и имеют решающее значение для защиты верхних дыхательных путей от вирусной инфекции [401, 475]. Как естественная инфекция, так и вакцинация ЖГВ, индуцируют долгоживущий IgA-опосредованный иммунный ответ, который локально индуцируется после повторного воздействия вирусного антигена и включает как штамм-специфические, так и перекрестно-реагирующие антитела [121, 475, 538]. Такая стимуляция антител, в частности перекрестно-реактивных IgA, после вторичного воздействия вируса может более эффективно ингибировать прикрепление вируса к поверхностям слизистой оболочки дыхательных путей [475]. IgA антитела могут также функционировать внутриклеточно, нейтрализуя вирус в инфицированных эпителиальных клетках, связываясь с вирусными белками, в частности с перекрестно-реактивными эпитопами, что приводит к снижению вирусной нагрузки и сокращению периода вирусывыделения [283, 323].

Важно отметить, что вакцинные штаммы ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1 были подготовлены в настоящем исследовании с использованием сертифицированной линии клеток MDCK в качестве субстрата. Вакцинные штаммы были способны реплицироваться в данной культуре клеток до высоких титров, что является очень важным показателем для наработки достаточного количества доз вакцины в случае наступления пандемии H5N1.

Разработанная в ходе представленной работы обратно-генетическая система для донора аттенуации Лен/17 позволила не только конструировать вакцинные штаммы ЖГВ

против вирусов гриппа А любых подтипов, но также открыла возможность изучения роли точечных мутаций, свойственных донору Лен/17, в проявлении его биологических свойств. Соответственно, фундаментальной составляющей данной работы явилось изучение молекулярных основ температурочувствительности, аттенуации и генетической стабильности вакцинных штаммов для отечественной живой гриппозной вакцины.

Впервые на новом методическом уровне удалось установить степень влияния различных мутаций на *ts* фенотип донора аттенуации Лен/17. Так, по данному показателю *ts* мутации расположились следующим образом: PB2(V478L) > PB1(K265N) > PB1(V591I) > NS2(M100I). Полученные данные полностью согласуются с ранее опубликованными работами, в которых была показана ведущая роль мутантного гена PB2 в проявлении *ts* фенотипа вакцинных штаммов отечественной ЖГВ [261, 266]. И если ранее не представлялось возможным выявить индивидуальную роль двух мутаций в гене PB1 вируса Лен/17, то в настоящем исследовании было показано, что мутация в позиции 265 вносит более существенный вклад в становлении *ts* фенотипа вируса, по сравнению с позицией 591. Кроме того, впервые была установлена минорная роль мутации в белке NS2 в становлении *ts* фенотипа вакцинного вируса. Вероятно, роль данной мутации ранее не была выявлена ввиду использования других критериев оценки *ts* фенотипа в ранних исследованиях. Так, изначально *ts* фенотип мутантных вирусов оценивался путем сравнения активности репликации вирусов в РКЭ при 33°C и 40°C [266], а позднее – в культуре клеток MDCK при 33°C и 37°C [263]. В наших же исследованиях роль мутации в NS2 белке была выявлена только при сравнении эффективности бляшкообразования мутантного вируса в клетках MDCK при 33°C и 38°C, но не при 37°C.

Наиболее важным результатом данного раздела работы явилось определение условий для полного восстановления дикого фенотипа вируса: для этого требовалась одновременная реверсия всех четырех вышеупомянутых *ts* мутаций. Эти данные указывают на высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин, поскольку случайная реверсия четырех мутаций в процессе репликации вакцинных штаммов в ВДП привитых представляется крайне маловероятной.

Следует также отметить, что в работе [266] при изучении роли отдельных генов донора Лен/17 в проявлении его *ts* фенотипа не определяли принадлежность HA и NA генов у реассортантов между вирусами Лен/17 и Лен/134, тогда как литературные данные указывают на определенный вклад мутаций в поверхностных антигенах вирусов гриппа в становлении их *ts* фенотипа [83, 347, 483]. Действительно, в ходе выполнения настоящей работы было показано, что для восстановления «дикого» фенотипа вируса Лен/134 требовалась реверсия не только мутаций в генах внутренних белков вируса Лен/17, но

также и восстановление мутаций в генах поверхностных белков HA и NA. В результате, для получения обратно-генетической копии вируса Лен/134 потребовалось внесение 14 мутаций в геном донора Лен/17.

В настоящей работе также впервые была установлена противоположная роль мутаций в генах PA и M донора Лен/17 – мутантные вирусы Лен/134-mut, содержащие мутации только в этих генах, формировали более крупные и четкие бляшки при 38°C (и при 37°C для вируса саМ), чем контрольный вирус Лен/134-rg. Эта особенность может указывать на ускоренную репликацию вирусов, содержащих мутации в PA и M генах донора Лен/17, позволяющую за тот же промежуток времени лизировать большее количество окружающих клеток в монослое. На основании данных результатов можно сделать вывод о компенсаторном, взаимозависимом действии аттенуирующих и «усиливающих» мутаций донора Лен/17, в результате чего вирус обладает не только полезными признаками температурочувствительности и аттенуации, но и сохраняет способность активно репродуцироваться как в РКЭ, так и в культуре клеток млекопитающих.

Чтобы определить, могут ли *ts* мутации донора Лен/17 передавать *ts* фенотип в генетически удаленный вирус, были сконструированы мутантные варианты вируса PR8, содержащие различные комбинации описанных *ts* мутаций. То, что введение определенных аминокислотных замен в полимеразные гены штамма PR8 приводило к утрате «дикого» фенотипа вируса, подтверждает предположение о том, что эти мутации действуют согласованно во взаимозависимом режиме. В отличие от полимеразных генов, мутация в гене NS донора Лен/17 не влияла на *ts* фенотип вируса PR8, указывая на то, что данная мутация может играть лишь вспомогательную роль в проявлении этого признака.

Аналогичные исследования были ранее проведены для американского донора аттенуации А/Энн Арбор/6/60. *Ts* фенотип этого штамма был связан с пятью *ts* локусами, распределенными в трех белках: PB1 (E391, G581, T661), PB2 (S265) и NP (G34) [237, 240]. Как и в наших исследованиях, данные мутации имели универсальный характер и приносили *ts* фенотип в генетически удаленный вирус PR8 [240]. Тот факт, что оба ХА штамма имеют самые сильные детерминанты температурочувствительности в полимеразных белках, указывает на критическую роль этих мутаций в изменении активности вирусной полимеразы при инкубации в непермиссивных условиях. Исследования на животных подтвердили участие этих пяти мутаций в обеспечении аттенуированного фенотипа ХА вакцинных штаммов ЖГВ FluMist [236]. Эксперименты с минигеномом вируса гриппа продемонстрировали сниженную полимеразную активность донора А/АА температуре 39°C [240], однако более обстоятельное исследование

молекулярных механизмов, вовлеченных в поддержание *ts* фенотипа вируса, не выявило нарушений в способности полимеразы транскрибировать вирусную мРНК и синтезировать белки при непермиссивной температуре [101]. Вероятнее, взаимодействие полимеразных белков с некими клеточными факторами может играть решающую роль в неспособности мутантных вирусов эффективно репродуцироваться при высоких температурах. Как было показано для донора А/АА, *ts* мутации в гене РВ1 значительно нарушали ядерно-цитоплазматический экспорт вирусной РНК при повышенных температурах, что требует взаимодействия с клеточными факторами, такими, как Hsp70 [101]. Кроме того, в непермиссивных условиях существенно снижается количество инкорпорированного в вирионы матриксного белка М1, что приводит к формированию вирусных частиц нарушенной морфологии [101].

Для отечественного донора аттенуации Лен/17 еще предстоит выяснить точные молекулярно-клеточные механизмы, участвующие в манифестации его температурочувствительного фенотипа, при этом коллекция мутантных штаммов, полученных при выполнении настоящего исследования, значительно упростит эту задачу. Однако в исследованиях китайских авторов, где мутации от доноров Лен/17 и А/АА вносились в геном вируса PR8, было показано, что наличие этих замен приводило к существенному снижению активности полимеразного комплекса вирусов при 37-39°C, что сопровождалось снижением уровней мРНК, vРНК и сРНК вирусных генов в зараженных клетках MDCK при этих температурах [195]. Интересно, что экспрессия вирусных РНК при 30°C была существенно выше у мутантных вирусов, чем у исходного штамма PR8. Также в этой работе, согласуясь с данными нашего исследования, было показано, что мутации в генах РВ2 и РВ1 вируса PR8 приводили к его аттенуации для мышей, но при этом сохранялась способность вируса индуцировать Т-клеточный иммунный ответ у этих животных после иммунизации [195].

Сконструированные в ходе настоящего исследования вакцинные штаммы ЖГВ против наиболее вероятных возбудителей будущих пандемий представляют собой штаммоспецифический подход и будут способствовать сохранению здоровья населения, если пандемический вирус будет антигенно схож с данными вирусами. Однако, как показала пандемия 2009 года, такие предсказания не всегда оправданы, и требуются принципиально новые подходы к созданию вакцин, способных обеспечить защиту от сезонных и вновь возникающих пандемических штаммов. На протяжении последних двух десятилетий в мире ведутся активные исследования по созданию универсальной гриппозной вакцины, индуцирующей долговременный иммунный ответ широкого спектра действия [78, 194, 373, 391].

В настоящее время на различных стадиях доклинических и, в некоторых случаях клинических, исследований находится ряд разработок, общим принципом которых является перенаправление адаптивного иммунного ответа с иммунодоминантных гипервариабельных на низкоиммуногенные высококонсервативные участки вирусных белков [78, 342, 496]. Одним из многообещающих подходов, разрабатываемых в последние 5 лет, является направленная индукция кросс-реактивных антител, нацеленных на консервативный stalk-домен молекулы НА, путем конструирования химерных молекул НА, которые содержат идентичные stalk-домены, а глобулярные вариабельные домены – от генетически удаленных вирусов различных подтипов. Такая стратегия уже была успешно апробирована на разнообразных вакцинных платформах [271, 275, 427], и в настоящем исследовании нами была предпринята попытка использования ХА вакцинных штаммов ЖГВ для конструирования подобного рода экспериментальных вакцин.

На начальном этапе исследования было оценено влияние сконструированных химерных молекул НА на фенотипические свойства штаммов ЖГВ. По сравнению с вакцинными штаммами, несущими интактные молекулы НА, были обнаружены некоторые случаи снижения способности экспериментальных штаммов с химерными НА репродуцироваться в РКЭ при пониженной температуре, т.е. экспрессия химерного НА может влиять на *sa* фенотип вируса. Следует отметить, что потеря *sa* фенотипа не влияет на безопасность ЖГВ, поскольку аттенуация вакцинных вирусов напрямую связана с их *ts* фенотипом, который сохранялся у всех сконструированных штаммов [39, 308, 507].

В настоящей работе были проведены два независимых эксперимента, в одном из которых оценивался прямой защитный эффект двукратной иммунизации мышей вакцинными штаммами с химерными НА, а во втором была использована стратегия пассивной иммунизации, при которой наивным животным вводилась сыворотка мышей, привитых различными вакцинными вариантами ЖГВ. Важно отметить, что в обоих экспериментах значительные титры сывороточных анти-stalk IgG антител индуцировались только в тех группах мышей, которые были последовательно проиммунизированы ЖГВ с химерными НА. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что последовательная иммунизация с помощью ЖГВ, содержащих идентичные stalk-домены, вызывает более высокие уровни перекрестно-реактивных антител, чем вакцинация с помощью классических ЖГВ. Аналогичные результаты на мышах были получены и другими авторами, с использованием другой вакцинной платформы (вектор VSV), где последовательная вакцинация сНА-конструкциями была также более иммуногенной, чем последовательная гетерологичная вакцинация природными НА [427].

Поскольку в первом эксперименте на мышах оценивали прямой эффект вакцинации, то, помимо НА-специфических антител, в защите могли участвовать также анти-НА антитела и вирус-специфические Т клетки. Результаты наших исследований подтвердили многочисленные данные о том, что ЖГВ могут обеспечивать гетеросубтипическую защиту, так как практически во всех вакцинных группах наблюдали снижение титров гетерологичных челлендж-вирусов в легких зараженных мышей. Тем не менее, несмотря на индукцию всех звеньев адаптивного иммунного ответа, мыши, иммунизированные ЖГВ с химерными молекулами НА, были лучше защищены от вирусов PR8 (H1N1) и H1N1pdm09, чем мыши, получившие аналогичные классические ЖГВ. Эти данные указывают на то, что индуцируемые stalk-реактивные антитела действительно усиливают кросс-протективную активность ЖГВ. К сожалению, в данном эксперименте челлендж-вирусы вводились в одной заражающей дозе, и некоторые вирусы (H2N2, H6N1) обнаруживались в легких мышей всех экспериментальных групп в очень низких титрах, тем самым не позволяя выявить различия в кросс-протективности вакцин между группами. Можно предположить, что при использовании более высоких заражающих доз эти различия могли бы быть зафиксированы.

Второй эксперимент на мышах показал, что усиленная кросс-протективность сНА-содержащих ЖГВ была опосредована антителами, поскольку мыши, пассивно-иммунизированные сывороткой мышей этой вакцинной группы, были лучше защищены от заражения гетерологичными вирусами, чем мыши, получившие сыворотку от иммунных мышей контрольных групп. В данном эксперименте защитная эффективность пассивно перенесенных антител в отношении вируса H2N2 была несколько ниже, чем в отношении вируса H6N1. Объяснением данному феномену может служить тот факт, что вирусы подтипа H2 являются менее доступными мишенями для антител, специфичных stalk-домену. Например, прототипные моноклональные антитела CR6261 и F10 имеют относительно слабую нейтрализующую активность против некоторых штаммов H2 [116].

Следует отметить, что в наших исследованиях не оценивалась функциональная активность stalk-реактивных антител, однако полученные данные о снижении титров вируса на 6-й день, а не на 3-й день, соответствуют результатам других исследований, где защитный эффект пассивно перенесенных сывороточных антител был наиболее выражен на 6-9 дни после заражения, что, скорее всего, связано с участием данного пула антител в антителозависимой клеточной цитотоксичности [139, 223, 314].

Ранее способность ЖГВ с химерной молекулой сН8/1 праймировать животных для развития мощного кросс-реактивного иммунного ответа после бустирующей дозы инактивированной вакцины (также содержащей химерный НА, сН5/1) была

продемонстрирована в экспериментах на хорьках [343]. При этом хорьков сначала праймировали нерелевантной гриппозной вакциной, содержащей глобулярный домен НА от вируса гриппа типа В, а stalk-домен от вируса H1N1pdm09. В наших же экспериментах использовался «непраймированный» дизайн – т.е. для иммунизации ЖГВ использовались наивные животные. Несмотря на то, что «праймированный» дизайн более точно отражает реальную ситуацию в человеческой популяции, использование непраймированных животных в нашем исследовании ответило на несколько важных вопросов, касающихся создания полноценного функционального кросс-протективного иммунитета после двух доз вакцины у наивных животных, что указывает на то, что аналогичный эффект можно ожидать после одной дозы сНА-содержащей ЖГВ у праймированных лиц, или после двух-трех доз сНА-ЖГВ у детей, не обладающих предсуществующим иммунитетом. Действительно, в целом ряде исследований была обнаружена индукция антител к stalk-домену НА у лиц, ранее подвергшихся воздействию сезонной инфекции или вакцинации, после однократной дозы гриппозной вакцины, содержащей антигенно-удаленный глобулярный домен НА, но достаточно близкий по антигенности stalk-домен (т.е. пандемические или потенциально-пандемические штаммы) [138, 301, 330, 345, 451]. Основываясь на наших данных, можно предположить, что индукция stalk-реактивных антител в этих испытаниях на людях могла бы быть еще более выражена, если бы в вакцинах против (пред)пандемических вирусов содержались химерные НА, несущие новые глобулярные домены, а stalk-домены были бы идентичны ранее циркулировавшим сезонным вирусам гриппа.

Вторым направлением усиления кросс-протективных свойств живых гриппозных вакцин, реализованном в данном исследовании, являлась оптимизация индукции Т-клеточного ответа, главным образом цитотоксического CD8+-опосредованного. Этот тип иммунитета ограничивает количество инфицированных клеток и снижает выход инфекционных вирусов, но при этом не препятствует распространению свободных вирионов [225]. ЦТЛ-иммунитет нацелен на ряд внутренних белков вируса гриппа, преимущественно М1 и NP [104, 178]. Эти белки относительно консервативны в результате функциональных ограничений их аминокислотных последовательностей, поэтому ЦТЛ-иммунитет против них является перекрестно-реактивным между различными подтипами вирусов гриппа [406, 429]. Тем не менее, существуют работы, указывающие на то, что ЦТЛ-эпитопы NP белка вирусов гриппа А также подвергаются селективному давлению со стороны иммунной системы человека [309]. В другом исследовании было показано формирование ЦТЛ эскейп-мутантов вирусов гриппа в

организме иммунокомпрометированного пациента с персистентной гриппозной инфекцией [491].

Поскольку вакцинные штаммы лицензированной ЖГВ имеют формулу генома 6:2, т.е. источником NP гена является вирус, выделенный в 1957 году, встал вопрос о соответствии состава ЦТЛ-эпитопов в NP белке донора аттенуации Лен/17 и современных циркулирующих вирусов H1N1 и H3N2. Иммуноэпитопный анализ, проведенный в данной работе, показал, что лишь 44% ЦТЛ-эпитопов донора аттенуации Лен/17 на 100% сохранились в циркулирующих вирусах H1N1pdm09 и H3N2. Детальное сравнение экспериментально-установленных ЦТЛ-эпитопов нуклеопротеина донора Лен/17 и вируса А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) показало, что 28 из 96 иммуногенных эпитопов в данном белке имели отличия между вирусами. Другими словами, высока вероятность того, что ЦТЛ-иммунный ответ, выработанный на введение классической ЖГВ, будет недостаточно хорошо распознавать эпитопы, экспонируемые на клетках, зараженных современными вирусами гриппа, и, как следствие, защита будет ослабленной.

Действительно, детальное изучение определенных диверсифицированных ЦТЛ-эпитопов на культурах мононуклеаров периферической крови человека показало, что классические ЖГВ с формулой генома 6:2 индуцируют мощный Т-клеточный иммунный ответ на устаревшие эпитопы NP, но при этом данные Т-лимфоциты уже были не способны распознавать эпитопы современных вирусов. При этом были проведены два типа экспериментов, в одном из которых МПК доноров стимулировали *in vitro* вакцинными штаммами ЖГВ, после чего оценивали кросс-реактивность Т-клеток к эпитопам современных и устаревших вирусов. Во втором эксперименте использовали МПК волонтеров, принимавших участие в первой фазе клинических испытаний ЖГВ подтипов H7N3 и H5N2 в 2011 и 2013 годах. Вакцинные штаммы содержали NP ген донора аттенуации Лен/17, что теоретически должно приводить к формированию ЦТЛ-иммунного ответа на устаревший NP. В обоих исследованиях было убедительно доказано, что стимуляция иммунной системы людей вирусами, несущими устаревшие нуклеопротеины, может снижать эффективность индукции перекрестного Т-клеточного иммунитета к современным вирусам. Полученные данные подтверждают необходимость актуализации Т-клеточных эпитопов нуклеопротеина вируса гриппа в составе современных гриппозных вакцин с целью усиления их кросс-протективности.

Актуализировать эпитопный состав нуклеопротеина в составе живых гриппозных вакцин можно как минимум двумя способами: (i) провести направленный мутагенез молекулы NP донора Лен/17 с целью внесения основных эпитопов современных вирусов гриппа, и (ii) включение в состав вакцинного штамма ЖГВ NP гена от эпидемического

вируса гриппа. Второй способ является предпочтительным, поскольку более прост в исполнении, а также ввиду наличия полного состава ЦТЛ-эпитопов NP белка эпидемического штамма, против которого конструируется вакцинный штамм. Следует отметить, что, согласно Фармакопейной статье на живую гриппозную вакцину (ФСП 42-0504-4097-04), допускается включение в состав вакцинных штаммов ЖГВ третьего гена от эпидемического родительского вируса. А ввиду того, что NP ген донора Лен/17 не отвечает за аттенуирующие свойства вируса, его замена на более современный аналог не должна сказаться на безвредности вакцины для людей.

В настоящем исследовании было проведено детальное сравнение ряда 6:2 и 5:3 реассортантных штаммов ЖГВ, подготовленных как из сезонных вирусов гриппа H1N1pdm09 и H3N2, так и из потенциально-пандемических вирусов H7N9 на животных моделях (мыши, хорьки). Было показано, что внесение NP гена от актуального штамма практически не сказывалось на ростовых характеристиках вакцинных вирусов, как в системе *in vitro*, так и в респираторном тракте лабораторных животных. Вакцинные штаммы с формулой генома 5:3 индуцировали высокие уровни сывороточных антител, сопоставимые с таковыми классических 6:2 реассортантов. При этом на мышинной модели было продемонстрировано четкое преимущество ЖГВ 5:3 перед ЖГВ 6:2 в плане индукции функционального перекрестно-реагирующего ЦТЛ-иммунного ответа, в результате чего животные, привитые ЖГВ 5:3, были лучше защищены от заражения гетерологичными штаммами, чем животные, получавшие классические ЖГВ с формулой генома 6:2.

В экспериментах на хорьках нам не удалось выявить достоверных отличий в способности ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3 индуцировать Т-клеточный ответ и защищать животных от гетерологичного вируса гриппа, ввиду отсутствия четких критериев оценки Т-клеточного ответа для данных животных, а также из-за ограниченного количества хорьков в каждой группе. Тем не менее, проведенные исследования безопасности, иммуногенности и защитной эффективности ЖГВ H3N2 с формулами генома 6:2 и 5:3 на модели хорьков являются основанием для проведения сравнительных клинических испытаний данных вакцин на добровольцах.

Результаты наших исследований могут также служить основанием для усиления эффективности инактивированных противогриппозных вакцин. В последние годы в многочисленных исследованиях было продемонстрировано формирование функциональных вирус-специфичных CD8+ и CD4+ Т-клеток после интраназальной и внутримышечной иммунизации ИГВ [45, 252, 506]. Кроме того, активно развивается направление целенаправленной индукции Т-клеточного иммунитета путем

интраназальной иммунизации ИГВ в комплексе со специфическими адьювантами [62, 110, 334]. Если такая мукозальная ИГВ будет подготовлена из штамма на основе устаревшего высокорепродуктивного вируса PR8, выделенного в 1934 году, весьма велика вероятность того, что индуцированный ЦТЛ-иммунный ответ уже будет не способен защищать от современных циркулирующих вирусов. Таким образом, рекомендуется конструировать реассортантные штаммы для ИГВ также с включением NP гена от актуального родительского вируса.

В заключении стоит отметить, что предложенные в данной работе два способа расширения спектра действия адаптивного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на иммунизацию живой гриппозной вакциной могут быть скомбинированы. Как упоминалось выше, ЦТЛ-иммунный ответ не является стерильным, поэтому Т-клетки, образуемые в ходе последовательной иммунизации живыми вакцинами, экспрессирующими химерные молекулы НА, не будут препятствовать продуктивной вирусной инфекции после каждой последующей дозы ЖГВ. Соответственно, стратегия иммунизации людей модифицированными ЖГВ, содержащими химерные НА и актуальный NP, представляется весьма перспективной для формирования адаптивного иммунного ответа широкого спектра действия, способного защитить привитых не только от дрейфовых сезонных вирусов гриппа, но также и от вновь возникающих пандемических вариантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых будет способствовать повышению эффективности современных живых гриппозных вакцин. Для достижения этих целей были использованы два основных подхода: (1) подготовка безопасных и эффективных ЖГВ против наиболее опасных потенциально-пандемических вирусов гриппа и (2) разработка подходов к конструированию универсальной ЖГВ, т.е. вакцины, обеспечивающей защиту одновременно против широкого спектра вирусов гриппа А различных подтипов.

При решении поставленных в настоящем исследовании задач был получен ряд научных данных фундаментального характера. В частности, оценен вклад индивидуальных мутаций в генах донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 в проявление таких его биологических свойств, как температурочувствительность и безвредность для лабораторных животных. Представленные в работе данные о необходимости реверсии четырех *ts* мутаций в вакцинном штамме ЖГВ для полного восстановления дикого фенотипа вируса указывают на высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин, поскольку одновременная реверсия четырех мутаций, ответственных за *ts* фенотип вакцинного вируса, представляется крайне маловероятной. Кроме того, впервые доказан универсальный характер *ts* мутаций донора аттенуации Лен/17: при внесении данных мутаций в генетически удаленный вирус гриппа он приобретает температурочувствительный и аттенуированный фенотипы. Эти данные могут быть в дальнейшем использованы для рационального дизайна вакцинных штаммов на основе различных эпидемических и потенциально-пандемических вирусов гриппа А.

По результатам диссертационного исследования сделан ряд практических рекомендаций. В частности, при подготовке вакцинных штаммов ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа следует обращать пристальное внимание на такие важные свойства поверхностных антигенов вируса, как средство молекулы гемагглютинина к рецепторам клеток млекопитающих ($\alpha 2,6$), а также активность нейраминидазы, и при необходимости оптимизировать их аминокислотный состав для индукции мощного гуморального иммунного ответа на вакцинацию.

Большую практическую ценность представляет создание и проведение полного цикла доклинических и клинических исследований кандидатных вакцинных штаммов против потенциально-пандемических вирусов гриппа подтипов H2N2 и H7N9, которые дополнили Национальную коллекцию вакцинных штаммов для производства пандемических вакцин. Вакцинные штаммы, сконструированные на основе

высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9 методами генной инженерии, детально охарактеризованы в доклинических исследованиях, что явилось основанием для проведения первой фазы клинических испытаний на волонтерах экспериментальных серий ЖГВ из данных штаммов. В случае возникновения пандемии подготовленные в данном исследовании экспериментальные вакцины будут в кратчайшие сроки переданы на производство, что позволит наработать необходимые объемы вакцины и привить наиболее уязвимые контингенты уже в первые месяцы пандемии.

В настоящем исследовании была продемонстрирована принципиальная возможность целенаправленной модификации генома вакцинных штаммов ЖГВ с целью усиления ее кросс-протективных свойств. Так, были впервые предложены оригинальные способы индукции перекрестно-реагирующего гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, которые открывают перспективы конструирования универсальной гриппозной вакцины, способной обеспечить защиту от различных подтипов вируса гриппа А. Успешная апробация такой системы в клинических испытаниях позволит защитить население от любого вновь возникшего вируса гриппа, в случае, если соответствующий вакцинный кандидат не был подготовлен заблаговременно. Кроме того, разработанная в данном исследовании система для целенаправленного получения вакцинных штаммов ЖГВ с любыми заранее заданными свойствами позволит конструировать рекомбинантные векторные вакцины на платформе живых гриппозных вакцин для защиты населения от различных вирусных и бактериальных инфекций.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ.

Сконструированная в настоящем исследовании панель мутантных вирусов гриппа, содержащих различные комбинации мутаций, специфические донорам аттенуации Лен/17 и 59/M2, открывают перспективы дальнейшего изучения точных молекулярно-клеточных механизмов, вовлеченных в проявление их температурочувствительного и аттенуированного фенотипов.

Разработка системы получения аттенуированных вакцинных штаммов ЖГВ методами генной инженерии открыла перспективы для конструирования различных рекомбинантных векторных вакцин, используя вакцинные штаммы для отечественной ЖГВ в качестве вирусных векторов. Такая система адресной доставки целевых иммуногенных эпитопов в клетки респираторного тракта привитых имеет особые преимущества при дизайне векторных вакцин против различных возбудителей острых респираторных вирусных инфекций, против которых в настоящее время не существует

лицензированных вакцин (респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирусы парагриппа, аденовирусы, коронавирусы, риновирусы и др.).

Планируется проведение сравнительных клинических испытаний ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 с целью выявления различий в индукции Т-клеточного иммунного ответа после вакцинации. Результаты таких сравнительных испытаний могут послужить основой для внесения изменений в настоящие рекомендации по составу вакцинных штаммов для сезонной ЖГВ, а именно включение в состав современных вакцинных штаммов NP гена от актуального родительского вируса.

Далее планируется провести на модели хорьков всестороннюю характеристику экспериментальных штаммов универсальной живой гриппозной вакцины, объединяющих два подхода к усиленной индукции перекрестно-реагирующего В- и Т-клеточного иммунного ответа, а именно содержащих в своем составе химерные молекулы гемагглютинина и нуклеопротеин от современного эпидемического вируса гриппа. В перспективе планируется расширить методологические основы конструирования универсальной живой гриппозной вакцины путем направленной индукции факторов адаптивного иммунного ответа на различные консервативные белки вирусов гриппа А и В.

ВЫВОДЫ

1. Разработан альтернативный холодоадаптированный донор аттенуации A/PR8/59/M2 (H1N1), обладающий чувствительностью к препаратам адамантанового ряда. Данный штамм может быть использован не только как донор аттенуации для подготовки живых гриппозных вакцин, но и как донор высокой урожайности для подготовки вакцинных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины типа А.
2. На новом методическом уровне подтверждена ключевая роль мутаций в полимеразных генах PB2 и PB1 в формировании температурочувствительного и аттенуированного фенотипа донора аттенуации А/Ленинград/134/15/57 (H2N2). Мутация K265N в PB1 белке вносит более выраженный вклад, чем мутация V591I, в становление *ts/att* фенотипов. Для полного восстановления дикого фенотипа у вакцинного штамма ЖГВ требуется одновременная реверсия четырех мутаций: V478L в PB2 белке, K265N и V591I в PB1 белке и M100I в NS2. Это определяет высокую степень генетической стабильности вакцинных штаммов ЖГВ.
3. Мутации в полимеразных генах PB2 и PB1 донора аттенуации А/Ленинград/134/15/57 (H2N2) имеют универсальный характер, т.е. их внесение в геном антигенно удаленного вирулентного вируса гриппа приводит к формированию температурочувствительного и аттенуированного фенотипов.
4. Предложены и успешно апробированы новые подходы к получению реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа А(H2N2). Вакцинные штаммы могут быть получены на базе альтернативного донора аттенуации A/PR8/59/M2 (H1N1), а также с использованием промежуточного реассортантного вакцинного штамма подтипа А(H1N1) в качестве источника генов, кодирующих внутренние и неструктурные белки донора аттенуации А/Ленинград/134/15/57 (H2N2).
5. Вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины, полученные методами обратной генетики, обладают всеми необходимыми признаками, свойственными классическим реассортантным вакцинным штаммам ЖГВ. Генно-инженерные вакцинные штаммы против высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9 безвредны, иммуногенны и кросс-реактивны в экспериментах на животных.
6. Мутации N123D и N149D в молекуле гемагглютиниона вакцинного штамма ЖГВ H7N9 усиливают его иммуногенные свойства. Вакцина, подготовленная из штамма А/17/Ануи/2013/61 (H7N9), индуцировала наивысшие показатели адаптивного

иммунного ответа людей среди всех протестированных ранее живых вакцин против потенциально-пандемических вирусов гриппа.

7. Вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины с классической формулой генома 6:2 индуцируют преимущественно ЦТЛ-иммунный ответ к нерелевантным эпитопам нуклеопротеина, отсутствующим в современных циркулирующих вирусах, что может снижать эффективность вакцины. Включение в состав вакцинного штамма NP гена от эпидемического родительского вируса успешно решает указанную проблему.
8. Последовательная иммунизация живыми гриппозными вакцинами, содержащими химерные молекулы гемагглютинина (stalk-домен от вируса H1N1, а переменные глобулярные домены от антигенно-неродственных вирусов H5N1, H8N4 и H9N2), индуцирует кросс-реактивные антитела, обеспечивающие гетеросубтипическую защиту привитых.
9. Включение в состав вакцинных штаммов ЖГВ химерных молекул гемагглютинина, а также NP гена от современного вируса гриппа, является перспективной стратегией для создания универсальной живой гриппозной вакцины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

59/1	Холодоадаптированный вакцинный штамм A/PR/8/59/1 (H1N1)
caA/AA	Холодоадаптированный донор аттенуации A/Ann Arbor/6/60 (H2N2)
ABSL-3	Виварий 3-го уровня биобезопасности (animal biosafety level 3)
ADCC	Антителозависимая клеточная цитотоксичность (antibody dependent cellular cytotoxicity)
B/AA	Холодоадаптированный донор аттенуации B/Ann Arbor/1/66
BSA	Бычий сывороточный альбумин (Bovine serum albumin)
BSL-3	Лаборатория 3-го уровня биобезопасности (biosafety level 3)
CDC	Центр по контролю за заболеваемости США (Centers for Disease Control and Prevention)
ca	Холодоадаптированный (cold adapted)
cHA	Химерная молекула HA (chimeric HA)
COBRA	Computationally optimized broadly protective antigen – оптимизированный по составу кросс-реактивных эпитопов антиген
HA	Гемагглютинин
IEDB	База данных иммуноэпитопов (Immune epitope database)
IFN γ	Интерферон γ
IgA/IgG	Иммуноглобулины класса A/G
IRAT	Алгоритм предсказания пандемического риска вирусов гриппа (Influenza risk assessment tool)
M1	Матриксный белок 1 вируса гриппа
M2	Матриксный белок 2 вируса гриппа (ионный канал)
MDCK	Культура клеток почки собаки (Madin-Darby canine kidney cells)
MDV	Донор аттенуации (Master donor virus)
MHC	Главный комплекс гистосовместимости (Major histocompatibility complex)
MID ₅₀	50%-ная мышьяная инфекционная доза (Mouse infectious dose)
MLD ₅₀	50%-ная летальная инфекционная доза (Mouse lethal dose)
NA	Нейраминидаза
NP	Нуклеопротеин
NS1	Неструктурный белок 1 вируса гриппа
NS2/NEP	Неструктурный белок 2 вируса гриппа/белок ядерного экспорта (nuclear export protein)
OD	Optical density (оптическая плотность)
PA	Белок полимеразного комплекса (polymerase acid)
PB1	Белок полимеразного комплекса (polymerase basic 1)
PB2	Белок полимеразного комплекса (polymerase basic 2)
PBS	Фосфатно-солевой буфер (phosphate buffer saline)
PR8	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)
qRT-PCR	Количественная ОТ-ПЦР
RBS	Рецептор-связывающий сайт (Receptor binding site)

RDE	Receptod restroying enzyme (рецептор-разрушающий фермент)
RLW	Относительный вес легкого (relative lung weight)
SII	Сывороточный институт Индии (Serum Institute of India)
Tcm	Центральные Т-клетки памяти (central memory)
Tem	Эффекторные Т-клетки памяти (effector memory)
TPСК	Трипсин, обработанный N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
ts	Температурочувствительный (temperature sensitive)
VLP	Вирусоподобная частица (Virus-like particle)
АЕ	Агглютинирующие единицы
БАЛ	Бронхоальвеолярный лаваж
БОЕ	Бляшкообразующие единицы
ВДП	Верхние дыхательные пути
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВПВГ	Высокопатогенный вирус гриппа
ДИ	Доверительный интервал
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖГВ	Живая гриппозная вакцина
ИГВ	Инактивированная гриппозная вакцина
ИФА	Иммуноферментный анализ
Лен/17	Холодоадаптированный донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)
Лен/134	Эпидемический штамм А/Ленинград/134/57 (H2N2)
МПК	Мононуклеары периферической крови
ОГР	Одногенный реассортант
ОП	Оптическая плотность
ОТ-ПЦР	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РГА	Реакция гемагглютинации
РИНА	Реакция ингибирования нейраминидазной активности
РКЭ	Развивающиеся куриные эмбрионы
РМН	Реакция микронейтрализации
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РНП	рибонуклеопротеин
РТГА	Реакция торможения гемагглютинации
СГТ	Среднегеометрические титры
СНЯ	Серьезные нежелательные явления
ТЦИД ₅₀	50%-ная тканевая цитопатическая инфекционная доза
ФКЭ	Культура клеток фибробластов куриных эмбрионов
ХА	Холодоадаптированный
ЦТЛ	Цитотоксические Т-лимфоциты
ЭИД ₅₀	50%-ная эмбриональная инфекционная доза

Приложение 1 Нежелательные явления (НЯ) в течение 2-х часов и 7 дней после введения первой и второй дозы вакцины ЖГВ H2N2

Реакции	После дозы 1 n; % (95% CI)		После дозы 2 n; % (95% CI)	
	Вакцина N=28	Плацебо N=10	Вакцина N=28	Плацебо N=10
В течение 2 часов после введения вакцины	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Предвиденные реакции				
Местные реакции	4; 14,3 (5,7; 31,5)	2; 20,0 (5,7; 51,0)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Системные реакции	13; 46,4 (29,5; 64,2)	4; 40,0 (16,8; 68,7)	9; 32,1 (17,9; 50,7)	2; 20,0 (5,7; 51,0)
Всего	13; 46,4 (29,5; 64,2)	5; 50,0 (23,7; 76,3)	9; 32,1 (17,9; 50,7)	2; 20,0 (5,7; 51,0)
Предвиденные местные реакции				
Сухость в носу	4; 14,3 (5,7; 31,5)	2; 20,0 (5,7; 51,0)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Предвиденные системные реакции				
Усталость/недомогание	1; 3,6 (0,6; 17,7)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Головная боль	2; 7,1 (2,0; 22,6)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	2; 7,1 (2,0; 22,6)	1; 10,0 (1,8; 40,4)
Боль в горле	3; 10,7 (3,7; 27,2)	4; 40,0 (16,8; 68,7)	5; 17,9 (7,9; 35,6)	1; 10,0 (1,8; 40,4)
Рвота	1; 3,6 (0,6; 17,7)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Температура	12; 42,9 (26,5; 60,9)	1; 10,0 (1,8; 40,4)	4; 14,3 (5,7; 31,5)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Нежелательные явления				
Степень – легкая	22; 78,6 (60,5; 89,8)	9; 90,0 (59,6; 98,2)	25; 89,3 (72,8; 96,3)	7; 70,0 (39,7; 89,2)
Степень – умеренная	1; 3,6 (0,6; 17,7)	1; 10,0 (1,8; 40,4)	3; 10,7 (3,7; 27,2)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Степень – тяжелая	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Всего НЯ	22; 78,6 (60,5; 89,8)	9; 90,0 (59,6; 98,2)	25; 89,3 (72,8; 96,3)	7; 70,0 (39,7; 89,2)
Всего реакций на вакцину	16; 57,1 (39,1; 73,5)	5; 50,0 (23,7; 76,3)	19; 67,9 (49,3; 82,1)	4; 40,0 (16,8; 68,7)
Серьезные НЯ	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)

CI, 95% confidence interval (%)

Приложение 2. Непредвиденные нежелательные явления в течение 7 дней после введения первой и второй дозы вакцины ЖГВ Н2N2 (лабораторные показатели)

Реакции	После дозы 1 n; % (95% CI)		После дозы 2 n; % (95% CI)	
	Вакцина N=28	Плацебо N=10	Вакцина N= 28	Плацебо N=10
Заложенность уха	1; 3,6 (0,6; 17,7)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Усталость	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	1; 3,6 (0,6; 17,7)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Лихорадка	2; 7,1 (2,0; 22,6)	1; 10,0 (1,8; 40,4)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Периодонтит	1; 3,6 (0,6; 17,7)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Повышение уровня АЛТ	1; 3,6 (0,6; 17,7)*	0; 0,0 (0,0; 27,8)	3; 10,7 (3,7; 27,2)*	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Повышение уровня ААТ	1; 3,6 (0,6; 17,7)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	2; 7,1 (2,0; 22,6)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Повышение уровня бикарбоната	3; 10,7 (3,7; 27,2)	2; 20,0 (5,7; 51,0)	2; 7,1 (2,0; 22,6)	0; 0,0 (0,0; 27,8)
Повышение уровня билирубина	2; 7,1 (2,0; 22,6)	1; 10,0 (1,8; 40,4)*	2; 7,1 (2,0; 22,6)*	1; 10,0 (1,8; 40,4)
Повышение уровня глюкозы	1; 3,6 (0,6; 17,7)	1; 10,0 (1,8; 40,4)	3; 10,7 (3,7; 27,2)*	1; 10,0 (1,8; 40,4)
Повышение уровня кальция	2; 7,1 (2,0; 22,6)	0; 0,0 (0,0; 27,8)	2; 7,1 (2,0; 22,6)	1; 10,0 (1,8; 40,4)
Увеличение количества лимфоцитов	12; 42,9 (26,5; 60,9)	1; 10,0 (1,8; 40,4)	19; 67,9 (49,3; 82,1)	6; 60 (31,3; 83,2)
Увеличение количества моноцитов	5; 17,9 (7,9; 35,6)	1; 10,0 (1,8; 40,4)	6; 21,4 (10,2; 39,5)	1; 10,0 (1,8; 40,4)
Уменьшение количества нейтрофилов	9; 32,1 (17,9; 50,7)	5; 50,0 (23,7; 76,3)	10; 35,7 (20,7; 54,2)	4; 40,0 (16,8; 68,7)
Повышение СОЭ	4; 14,3 (5,7; 31,5)	1; 10,0 (1,8; 40,4)	0; 0,0 (0,0; 12,1)	0; 0,0 (0,0; 27,8)

*умеренный уровень у одного добровольца

Приложение 3. Предвиденные нежелательные явления (НЯ) в течение 2-х часов и 7 дней после введения первой и второй дозы вакцины ЖГВ Н7N9

	Степень тяжести	После дозы 1				После дозы 2			
		Вакцина (N=30)		Плацебо (N=10)		Вакцина (N=29)		Плацебо (N=10)	
		n (%**)	95% CI	n (%**)	95% CI	n (%**)	95% CI	n (%**)	95% CI
Реакции в течение 2-х часов после введения вакцины		0 (0,0)	0,0-11,6	0 (0,0)	0,0-30,8	0 (0,0)	0,0-11,9	0 (0,0)	0,0-30,8
Любая предвиденная местная или системная реакция*		19 (63,3)	43,9-80,1	9 (90,0)	55,5-99,7	9 (31,0)	15,3-50,8	4 (40,0)	12,2-73,8
Местные реакции*		12 (40,0)	22,7-59,4	7 (70,0)	34,8-93,3	4 (13,8)	3,9-31,7	0 (0,0)	0,0-30,8
Катаральный назофарингит	легкая	3 (10,0)	2,1-26,5	2 (20,0)	2,5-55,6	1 (3,4)	0,1-17,8	0 (0,0)	0,0-30,8
Сухость в носу	легкая	1 (3,3)	0,1-17,2	1 (10,0)	0,3-44,5	0 (0,0)	0,0-11,9	0 (0,0)	0,0-30,8
Заложенность носа	легкая	4 (13,3)	3,8-30,7	1 (10,0)	0,3-44,5	2 (6,9)	0,8-22,8	0 (0,0)	0,0-30,8
Першение в горле	легкая	0 (0,0)	0,0-11,6	1 (10,0)	0,3-44,5	0 (0,0)	0,0-11,9	0 (0,0)	0,0-30,8
Носовое кровотечение	легкая	1 (3,3)	0,1-17,2	1 (10,0)	0,3-44,5	1 (3,4)	0,1-17,8	0 (0,0)	0,0-30,8
Серозные выделения из носа	легкая	2 (6,7)	0,8-22,1	1 (10,0)	0,3-44,5	0 (0,0)	0,0-11,9	0 (0,0)	0,0-30,8
насморк	легкая	1 (3,3)	0,1-17,2	0 (0,0)	0,0-30,8	0 (0,0)	0,0-11,9	0 (0,0)	0,0-30,8
Системные реакции*		7 (23,3)	9,9-42,3	2 (20,0)	2,5-55,6	5 (17,2)	5,8-35,8	4 (40,0)	12,2-73,8
Боль в горле	легкая	1 (3,3)	0,1-17,2	0 (0,0)	0,0-30,8	1 (3,4)	0,1-17,8	1 (10,0)	0,3-44,5
Температура	легкая	6 (20,0)	7,7-38,6	1 (10,0)	0,3-44,5	3 (10,3)	2,2-27,4	1 (10,0)	0,3-44,5
Головокружение	легкая	0 (0,0)	0,0-11,6	1 (10,0)	0,3-44,5	0 (0,0)	0,0-11,9	0 (0,0)	0,0-30,8
Головная боль	легкая	0 (0,0)	0,0-11,6	0 (0,0)	0,0-30,8	1 (3,4)	0,1-17,8	1 (10,0)	0,3-44,5
Непродуктивный кашель	легкая	0 (0,0)	0,0-11,6	0 (0,0)	0,0-30,8	0 (0,0)	0,0-11,9	1 (10,0)	0,3-44,5
Любое серьезное НЯ		0		0		0		0	
CI = confidence interval (%)									
* Добровольцы, имеющие более чем одну реакцию, представлены один раз.									
** Процент рассчитан от общего количества добровольцев в группе.									

Приложение 4. Непредвиденные нежелательные явления в течение 7 дней после введения первой и второй дозы вакцины ЖГВ H7N9 (лабораторные показатели)

	Степень тяжести	После дозы 1				После дозы 2			
		Вакцина (N=30)		Плацебо (N=10)		Вакцина (N=29)		Плацебо (N=10)	
		n (%**)	95% CI	n (%**)	95% CI	n (%**)	95% CI	n (%**)	95% CI
Любые непредвиденные нежелательные явления*		4 (13,3)	3,8–30,7	1 (10,0)	0,3–44,5	1 (3,4)	0,1–17,8	1 (10,0)	0,3–44,5
<i>Биохимический анализ крови</i>									
Повышение уровня билирубина	легкая	1 (3,3)	0,1–17,2	0 (0,0)	0,0–30,8	0 (0,0)	0,0–11,9	0 (0,0)	0,0–30,8
<i>Клинический анализ крови</i>									
Увеличение количества моноцитов	легкая	2 (6,6)	0,8–22,1	0 (0,0)	0,0–30,8	0 (0,0)	0,0–11,9	0 (0,0)	0,0–30,8
Увеличение количества эозинофилов	легкая	1 (3,3)	0,1–17,2	0 (0,0)	0,0–30,8	0 (0,0)	0,0–11,9	0 (0,0)	0,0–30,8
Увеличение количества лимфоцитов	легкая	1 (3,3)	0,1–17,2	2 (20,0)	2,5–55,6	0 (0,0)	0,0–11,9	0 (0,0)	0,0–30,8
Уменьшение количества нейтрофилов	легкая	2 (6,6)	0,8–22,1	0 (0,0)	0,0–30,8	0 (0,0)	0,0–11,9	0 (0,0)	0,0–30,8
Повышение СОЭ	легкая	2 (6,6)	0,8–22,1	0 (0,0)	0,0–30,8	0 (0,0)	0,0–11,9	0 (0,0)	0,0–30,8
<i>Анализ мочи</i>									
Следы белка	легкая			0 (0,0)	0,0–30,8	1 (3,4)	0,1–17,8	1 (10,0)	0,3–44,5
Любые серьезные нежелательные явления		0		0		0		0	
CI = confidence interval (%)									
* Добровольцы, имеющие более чем одну реакцию, представлены один раз.									
** Процент рассчитан от общего количества добровольцев в группе.									

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа.// Вопросы вирусологии. – 1977. – № 4. – с. 387-395.
2. Александрова Г.И.,Климов А.И. Живая вакцина против гриппа // М.:Наука. – 1994. – 151 с.
3. Александрова Г.И., Микуцкая Б.А., Сиротенко Е.А., др. и. Итоги изучения специализированного варианта живой гриппозной вакцины для иммунизации детей дошкольного и младшего школьного возраста.// Вестник АМН СССР. – 1968. – № 9. – с. 41-45.
4. Видяева И.Г., Потапчук М.В., Репко И.А., Петров С.В., Цыбалова Л.М. Высокорепродуктивные аттенуированные реассортанты H2N2 и H7N9 на основе донора А/Гонконг/1/68/162/35// Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61. – № 6. – с. 257-262.
5. 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. – 1984. – Т. 29. – № 1. – с. 28-31.
6. Гендон Ю.З. Вакцина Ваксигрип для профилактики гриппа (обзор литературы)// Вакцинация. – 2000. – Т. 5. – № 11. – с. 1-12.
7. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Акопова Н.К., Ахматова Н.К., Коптяева И.Б. Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа.// Вопросы вирусологии. – 2013. – V. 58. – № 1. – р. 11-17.
8. Григорьева Е.П., Дешева Ю.А., Донина 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. – 2002. – Т. 47. – № 4. – с. 24-27.
9. Дешева Ю.А. Пути усовершенствования живой гриппозной вакцины и тактики ее применения при подготовке к пандемии.// Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Научно-исследовательский институт гриппа. Санкт-Петербург. – 2009.
10. Дешева Ю.А., Смолоногина Т.С., Руденко Л.Г. Доклиническое изучение реассортантного вакцинного штамма вируса гриппа А/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2)// Вопросы вирусологии. – 2015. – Т. 60. – № 4. – с. 40-44.
11. Дешева Ю.А., Смолоногина Т.С., Руденко Л.Г. Биологические и защитные свойства сывороточных антител к нейраминидазе вируса гриппа.// Медицинский Академический Журнал. – 2015. – Т. 15. – № 2. – с. 35-44.
12. 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. – 2013. – Т. 71. – № 4. – с. 67-73.
13. Егоров А.Ю. Проблема создания универсальной противогриппозной вакцины.// Microbiology Independent Research Journal. – 2016. – Т. 3. – № 1. – с. 1-12.
14. Егоров А.Ю.,Лисовская К.В. Высокорепродуктивные температурочувствительные рекомбинанты вируса гриппа А.// Новое в эпидемиологии и профилактике вирусных инфекций. - Л. . – 1986. – с. 117-124.
15. Иванников Ю.Г., Маринич И.Г., Кондратьев В.А., Статистический анализ многолетнего отечественного опыта изучения эффективности живых гриппозных

- вакцин., В сб.: Иммунология и специфическая профилактика гриппа у детей. 1971. с. 75-92.
16. Исакова И.Н., Киселева И.В., Ларионова Н.В., Олейник Е.С., Руденко Л.Г. Лабораторные маркеры аттенуации штаммов живой гриппозной вакцины.// Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52. – № 4. – с. 22-26.
 17. Каширина О.С., Васильев Ю.М. Иммуногенность и защитный эффект живых холодоадаптированных вакцин против гриппа В при интраназальной иммунизации мышей.// Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 83. – № 4. – с. 80-85.
 18. Киселева И.В., Александрова Г.И., Руденко Л.Г., Климов А.И. Штамм вируса гриппа А/17/Новая Каледония/99/145(Н1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых.// Патент РФ №2183672. Дата регистрации: 08.12.2000. – 2002.
 19. Ларионова Н.В. Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте. // Автореферат дис. ... доктора биологических наук / Науч.-исслед. ин-т гриппа. Санкт-Петербург. – 2017.
 20. 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. – 2011. – Т. 65. – № 3. – с. 48-52.
 21. Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Терехов А.В., Лисовская К.В., Аكوпова И.И. Холодоадаптированный штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) - перспективный штамм-донор аттенуации для получения живых гриппозных вакцин.// ЖМЭИ. – 2015. № 5. – с. 27-32.
 22. 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., Рябичева Т.Г., Киселева И.В., Ларионова Н.В., Руденко Л.Г. Разработка опытно-промышленной технологии производства живой культуральной вакцины против пандемического гриппа.// Биотехнология. – 2013. – № 6. – с. 23-34.
 23. 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, опубли. Бюлл. №11 от 19.04.2017. – 2017.
 24. Потапчук М.В., Репко И.А., Сергеева М.В., Коротков А.В., Комиссаров А.Б., Сандыбаев Н.Т., Червякова О.В., Хайруллин Б.М., Цыбалова Л.М. Характеристика реассортантных штаммов вируса гриппа на основе нового донора А/Hongkong/1/68/162/35(H3N2)// Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57. – № 6. – с. 42-46.
 25. Руденко Л.Г., Е.П. Г., Александрова Г.И., Киселева И.В., Климов А.И., Ларионова Л.М. Генетический и фенотипический анализ гетерогенной популяции холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и реассортантных гриппозных вакцинных штаммов, подготовленных на его основе// Вопросы вирусологии. – 2005. – Т. 50. – № 2. – с. 14-18.
 26. Сергеева М.В., Кузнецов В.В., Касьяненко М.А., Шалджян А.А., Репко И.А., Потапчук М.В., Романова Ю.Р., Цыбалова Л.М. Иммунизация живым аттенуированным вирусом гриппа А/Н5N1 защищает морских свинок от реинфекции// Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 6. – с. 36-39.
 27. Слепушкин А.Н., Элленгорн Н.С., Руссина А.Е., Виткина Б.С., Бобылева Т.К., Гринеберг И.Э., Тарасов А.А., Жданов В.М. Оценка эффективности массовых прививок против гриппа. Сообщение II.// ЖМЭИ. – 1968. – Т. 45. – № 10. – с. 26-32.

28. Сперанская А.С., Мельникова Н.В., Беленикин М.С., Дмитриев А.А., Опарина Н.Ю., Кудрявцева А.В. Генетическое разнообразие и эволюция вируса гриппа С// Генетика. – 2012. – Т. 48. – № 7. – с. 797-805.
29. Сычев И.А., Смолоногина Т.С., Копейкин П.М., Дешева Ю.А., Руденко Л.Г. Молекулярные основы кросс-реактивности антител против нейраминидазы вируса гриппа разных подтипов.// Медицинский Академический Журнал. – 2016. – Т. 16. – № 4. – с. 169-171.
30. Хаитов Р.М., Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Иванова А.С. Эпидемиологическая и экономическая эффективность иммунизации вакциной гриппол при гриппе и ОРВИ у взрослых и детей.// ЖМЭИ. – 2003. – Т.57 – № 3. – с. 83-86.
31. Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Потапчук М.В., Репко И.А., Коротков А.В., Сергеева М.В., А.Б. К., Писарева М.М., Кузнецов В.В., Грудинин М.П., Киселев О.И. Характеристика холодоадаптированного штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 как потенциального донора аттенуации и высокой репродуктивности.// Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57. – № 6. – с. 13-17.
32. Цыбалова Л.М., Киселев О.И. Универсальные вакцины против гриппа. Разработки, перспективы использования.// Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57. – № 1. – с. 9-14.
33. (CBER). C.f.B.E.a.R. Guidance for industry. Clinical data needed to support the licensure of seasonal inactivated influenza vaccines: 2009 [accessed April 2018]. <https://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm074794.htm/> – 2009. – V. – №.
34. 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 in Health. – 2007. – V. 10. – № 2. – p. 98-116.
35. Abdel-Ghafar A.N., Chotpitayasunondh T., Gao Z., Hayden F.G., Nguyen D.H., de Jong M.D., Naghdaliyev A., Peiris J.S., Shindo N., Soeroso S., Uyeki T.M. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans// N Engl J Med. – 2008. – V. 358. – № 3. – p. 261-73.
36. Administration T.G. Australian Public Assessment Report for Quadrivalent live attenuated influenza vaccine. Available at: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-influenza-virus-171106.pdf/> – 2017. – V. – №.
37. Air G.M. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus// Proc Natl Acad Sci U S A. – 1981. – V. 78. – № 12. – p. 7639-43.
38. Air G.M. Influenza neuraminidase// Influenza Other Respir Viruses. – 2012. – V. 6. – № 4. – p. 245-56.
39. Aleksandrova G.I., Goldfarb V.E., Garmashova L.M., Geft R.A., Smorodintsev A.A. Analysis of antigenic and biological properties of influenza B virus strains, isolated in Leningrad in 1955-1967// Acta Virol. – 1971. – V. 15. – № 6. – p. 446-56.
40. Alexandrova G. Basic trends in vaccination of children against influenza by use of live vaccine// Proc. Symposium on Live Influenza Vaccine, Yugoslav. Acad. Sci. Art. – 1971. – V. – №. – p. 121-130.
41. 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., et al. 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. – 1984. – V. 44. – № 3. – p. 734-9.
42. Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain// Rev Roum Inframicrobiol. – 1965. – V. 2. – №. – p. 179-189.
43. Ambrose C.S., Levin M.J., Belshe R.B. The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults// Influenza Other Respi Viruses. – 2011. – V. 5. – № 2. – p. 67-75.

44. Ambrose C.S., Wu X., Jones T., Mallory R.M. The role of nasal IgA in children vaccinated with live attenuated influenza vaccine// *Vaccine*. – 2012. – V. 30. – № 48. – p. 6794-801.
45. Ann J., Samant M., Rheume C., Dumas C., Beaulieu E., Morasse A., Mallett C., Hamelin M.E., Papadopoulou B., Boivin G. Adjuvanted inactivated influenza A(H3N2) vaccines induce stronger immunogenicity in mice and confer higher protection in ferrets than unadjuvanted inactivated vaccines// *Vaccine*. – 2014. – V. 32. – № 43. – p. 5730-9.
46. Anonymous. Development of a Clinical Trial Plan for Pandemic Influenza Vaccines. Department of Health and Human Services. National Institute of Allergy and Infection Diseases. September 22–23, 2003, Bethesda, Maryland. Meeting Summary. <http://www.niaid.nih.gov/about/organization/dmid/Documents/pansummary.pdf>// – 2003. – V. – №.
47. Anonymous. Human cases of influenza at the human-animal interface, 2013// *Wkly Epidemiol Rec*. – 2014. – V. 89. – № 28. – p. 309-20.
48. Anonymous. Novavax' H7N9 avian influenza VLP vaccine positive in Phase 1/2// *Hum Vaccin Immunother*. – 2014. – V. 10. – № 11. – p. 3103-4.
49. Anonymous. FLUMIST® QUADRIVALENT Influenza Vaccine (live, attenuated) Intranasal spray. Product Monograph. Available at: <https://www.astrazeneca.com/content/dam/az-ca/downloads/productinformation/flumist-qlaiv-product-monograph-en.pdf>// – 2017. – V. – №.
50. Antrobus R.D., Coughlan L., Berthoud T.K., Dicks M.D., Hill A.V., Lambe T., Gilbert S.C. Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved Influenza A antigens// *Mol Ther*. – 2014. – V. 22. – № 3. – p. 668-674.
51. Artois J., Jiang H., Wang X., Qin Y., Percy M., Lai S., Shi Y., Zhang J., Peng Z., Zheng J., He Y., Dhingra M.S., von Dobschuetz S., Guo F., Martin V., Kalpravidh W., Claes F., Robinson T., Hay S.I., Xiao X., Feng L., Gilbert M., Yu H. Changing Geographic Patterns and Risk Factors for Avian Influenza A(H7N9) Infections in Humans, China// *Emerg Infect Dis*. – 2018. – V. 24. – № 1. – p. 87-94.
52. Asai N., Yokoi T., Nishiyama N., Koizumi Y., Sakanashi D., Kato H., Hagihara M., Suematsu H., Yamagishi Y., Mikamo H. Secondary organizing pneumonia following viral pneumonia caused by severe influenza B: a case report and literature reviews// *BMC Infect Dis*. – 2017. – V. 17. – № 1. – p. 572.
53. Ashkenazi S., Vertruyen A., Aristegui J., Esposito S., McKeith D.D., Klemola T., Birolek J., Kuhr J., Bujnowski T., Desgrandchamps D., Cheng S.M., Skinner J., Gruber W.C., Forrest B.D., Group C.-T.S. Superior relative efficacy of live attenuated influenza vaccine compared with inactivated influenza vaccine in young children with recurrent respiratory tract infections// *Pediatr Infect Dis J*. – 2006. – V. 25. – № 10. – p. 870-9.
54. Atsmon J., Kate-Ilovitz E., Shaikevich D., Singer Y., Volokhov I., Haim K.Y., Ben-Yedidia T. Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine// *J Clin Immunol*. – 2012. – V. 32. – № 3. – p. 595-603.
55. Babu T.M., Levine M., Fitzgerald T., Luke C., Sangster M.Y., Jin H., Topham D., Katz J., Treanor J., Subbarao K. Live attenuated H7N7 influenza vaccine primes for a vigorous antibody response to inactivated H7N7 influenza vaccine// *Vaccine*. – 2014. – V. 32. – № 50. – p. 6798-804.
56. Balish A.L., Davis C.T., Saad M.D., El-Sayed N., Esmat H., Tjaden J.A., Earhart K.C., Ahmed L.E., Abd El-Halem M., Ali A.H., Nassif S.A., El-Ebiary E.A., Taha M., Aly M.M., Arafa A., O'Neill E., Xiyan X., Cox N.J., Donis R.O., Klimov A.I. Antigenic and genetic diversity of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses isolated in Egypt// *Avian Dis*. – 2010. – V. 54. – № 1 Suppl. – p. 329-34.
57. Bandell A., Woo J., Coelingh K. Protective efficacy of live-attenuated influenza vaccine (multivalent, Ann Arbor strain): a literature review addressing interference// *Expert Rev Vaccines*. – 2011. – V. 10. – № 8. – p. 1131-41.

58. Bao Y., Bolotov P., Dernovoy D., Kiryutin B., Zaslavsky L., Tatusova T., Ostell J., Lipman D. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information// *J Virol.* – 2008. – V. 82. – № 2. – p. 596-601.
59. Bardiya N., Bae J.H. Influenza vaccines: recent advances in production technologies// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2005. – V. 67. – № 3. – p. 299-305.
60. Barr I.G., McCauley J., Cox N., Daniels R., Engelhardt O.G., Fukuda K., Grohmann G., Hay A., Kelso A., Klimov A., Odagiri T., Smith D., Russell C., Tashiro M., Webby R., Wood J., Ye Z., Zhang W., Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition f. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 northern hemisphere season// *Vaccine.* – 2010. – V. 28. – № 5. – p. 1156-67.
61. Barria M.I., Garrido J.L., Stein C., Scher E., Ge Y., Engel S.M., Kraus T.A., Banach D., Moran T.M. Localized mucosal response to intranasal live attenuated influenza vaccine in adults// *J Infect Dis.* – 2013. – V. 207. – № 1. – p. 115-24.
62. Barroso S.P., Nico D., Nascimento D., Santos A.C., Couceiro J.N., Bozza F.A., Ferreira A.M., Ferreira D.F., Palatnik-de-Sousa C.B., Souza T.M., Gomes A.M., Silva J.L., Oliveira A.C. Intranasal Immunization with Pressure Inactivated Avian Influenza Elicits Cellular and Humoral Responses in Mice// *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – № 6. – p. e0128785.
63. Bart S.A., Hohenboken M., Della Cioppa G., Narasimhan V., Dormitzer P.R., Kanasa-Thanan N. A cell culture-derived MF59-adjuvanted pandemic A/H7N9 vaccine is immunogenic in adults// *Sci Transl Med.* – 2014. – V. 6. – № 234. – p. 234ra55.
64. Baz M., Luke C.J., Cheng X., Jin H., Subbarao K. H5N1 vaccines in humans// *Virus Res.* – 2013. – V. – №.
65. Bean W.J., Jr., Cox N.J., Kendal A.P. Recombination of human influenza A viruses in nature// *Nature.* – 1980. – V. 284. – № 5757. – p. 638-40.
66. Beare A.S., Hall T.S. Recombinant influenza-A viruses as live vaccines for man. Report to the Medical Research Council's Committee on Influenza and other Respiratory Virus Vaccines// *Lancet.* – 1971. – V. 2. – № 7737. – p. 1271-3.
67. 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.* – 1975. – V. 2. – № 7938. – p. 729-32.
68. 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.* – 2016. – V. 16. – № 8. – p. 942-51.
69. Belser J.A., Davis C.T., Balish A., Edwards L.E., Zeng H., Maines T.R., Gustin K.M., Martinez I.L., Fasce R., Cox N.J., Katz J.M., Tumpey T.M. Pathogenesis, transmissibility, and ocular tropism of a highly pathogenic avian influenza A (H7N3) virus associated with human conjunctivitis// *J Virol.* – 2013. – V. 87. – № 10. – p. 5746-54.
70. Belser J.A., Gustin K.M., Pearce M.B., Maines T.R., Zeng H., Pappas C., Sun X., Carney P.J., Villanueva J.M., Stevens J., Katz J.M., Tumpey T.M. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice// *Nature.* – 2013. – V. 501. – № 7468. – p. 556-9.
71. Belser J.A., Katz J.M., Tumpey T.M. The ferret as a model organism to study influenza A virus infection// *Dis Model Mech.* – 2011. – V. 4. – № 5. – p. 575-9.
72. Belshe R.B. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza// *Vaccine.* – 2010. – V. 28 Suppl 4. – №. – p. D45-53.
73. Belshe R.B., Edwards K.M., Vesikari T., Black S.V., Walker R.E., Hultquist M., Kemble G., Connor E.M., Group C.-T.C.E.S. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children// *N Engl J Med.* – 2007. – V. 356. – № 7. – p. 685-96.

74. Belshe R.B., Gruber W.C., Mendelman P.M., Mehta H.B., Mahmood K., Reisinger K., Treanor J., Zangwill K., Hayden F.G., Bernstein D.I., Kotloff K., King J., Piedra P.A., Block S.L., Yan L., Wolff M. Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine// *J Infect Dis.* – 2000. – V. 181. – № 3. – p. 1133-7.
75. Belshe R.B., Mendelman P.M., Treanor J., King J., Gruber W.C., Piedra P., Bernstein D.I., Hayden F.G., Kotloff K., Zangwill K., Iacuzio D., Wolff M. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children// *N Engl J Med.* – 1998. – V. 338. – № 20. – p. 1405-12.
76. Belz G.T., Xie W., Altman J.D., Doherty P.C. A previously unrecognized H-2D(b)-restricted peptide prominent in the primary influenza A virus-specific CD8(+) T-cell response is much less apparent following secondary challenge// *J Virol.* – 2000. – V. 74. – № 8. – p. 3486-93.
77. Berkhoff E.G., Geelhoed-Mieras M.M., Verschuren E.J., van Baalen C.A., Gruters R.A., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. The loss of immunodominant epitopes affects interferon-gamma production and lytic activity of the human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in vitro// *Clin Exp Immunol.* – 2007. – V. 148. – № 2. – p. 296-306.
78. Berlanda Scorza F., Tsvetnitsky V., Donnelly J.J. Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines// *Vaccine.* – 2016. – V. 34. – № 26. – p. 2926-2933.
79. Berthoud T.K., Hamill M., Lillie P.J., Hwenda L., Collins K.A., Ewer K.J., Milicic A., Poyntz H.C., Lambe T., Fletcher H.A., Hill A.V., Gilbert S.C. Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA-NP+M1// *Clin Infect Dis.* – 2011. – V. 52. – № 1. – p. 1-7.
80. Beyer W.E., Palache A.M., de Jong J.C., Osterhaus A.D. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy. A meta-analysis// *Vaccine.* – 2002. – V. 20. – № 9-10. – p. 1340-53.
81. Bioscience C. Site-Directed Mutagenesis by PCR Overlap and Fast Mutagenesis. Available at: <https://www.civicbio.com/project/story-16-site-directed-mutagenesis-by-pcr-overlap-and-fast-mutagenesis///> – 2016. – V. – №.
82. Black S., Nicolay U., Vesikari T., Knuf M., Del Giudice G., Della Cioppa G., Tsai T., Clemens R., Rappuoli R. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children// *Pediatr Infect Dis J.* – 2011. – V. 30. – № 12. – p. 1081-5.
83. Bos T.J., Nayak D.P. Identification of defects in the neuraminidase gene of four temperature-sensitive mutants of A/WSN/33 influenza virus// *Virology.* – 1986. – V. 154. – № 1. – p. 85-96.
84. Briand F.X., Schmitz A., Ogor K., Le Prioux A., Guillou-Cloarec C., Guillemoto C., Allee C., Le Bras M.O., Hirchaud E., Quenault H., Touzain F., Cherbonnel-Pansart M., Lemaitre E., Courtillon C., Gares H., Daniel P., Fediaevsky A., Massin P., Blanchard Y., Eterradossi N., van der Werf S., Jestin V., Niqueux E. Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential// *Euro Surveill.* – 2017. – V. 22. – № 9.
85. Broadbent A.J., Santos C.P., Paskel M., Matsuoka Y., Lu J., Chen Z., Jin H., Subbarao K. Replication of live attenuated cold-adapted H2N2 influenza virus vaccine candidates in non human primates// *Vaccine.* – 2015. – V. 33. – № 1. – p. 193-200.
86. Brooks W.A., Zaman K., Lewis K.D., Ortiz J.R., Goswami D., Feser J., Sharmeen A.T., Nahar K., Rahman M., Rahman M.Z., Barin B., Yunus M., Fry A.M., Bresee J., Azim T., Neuzil K.M. Efficacy of a Russian-backbone live attenuated influenza vaccine among young children in Bangladesh: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial// *Lancet Glob Health.* – 2016. – V. – №.

87. Buckland B., Boulanger R., Fino M., Srivastava I., Holtz K., Khramtsov N., McPherson C., Meghrouh J., Kubera P., Cox M.M. Technology transfer and scale-up of the Flublok recombinant hemagglutinin (HA) influenza vaccine manufacturing process// *Vaccine*. – 2014. – V. 32. – № 42. – p. 5496-502.
88. Buckland B.C. The development and manufacture of influenza vaccines// *Hum Vaccin Immunother*. – 2015. – V. 11. – № 6. – p. 1357-60.
89. Buehler J., Navi D., Lorusso A., Vincent A., Lager K., Miller C.L. Influenza A virus PB1-F2 protein expression is regulated in a strain-specific manner by sequences located downstream of the PB1-F2 initiation codon// *J Virol*. – 2013. – V. 87. – № 19. – p. 10687-99.
90. Bui H.H., Sidney J., Li W., Fusseder N., Sette A. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines// *BMC Bioinformatics*. – 2007. – V. 8. – №. – p. 361.
91. Bullough P.A., Hughson F.M., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion// *Nature*. – 1994. – V. 371. – № 6492. – p. 37-43.
92. Burke S.A., Trock S.C. Use of Influenza Risk Assessment Tool for Prepandemic Preparedness// *Emerg Infect Dis*. – 2018. – V. 24. – № 3. – p. 471-477.
93. Calis J.J., Maybeno M., Greenbaum J.A., Weiskopf D., De Silva A.D., Sette A., Kesmir C., Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity// *PLoS Comput Biol*. – 2013. – V. 9. – № 10. – p. e1003266.
94. Carter D.M., Bloom C.E., Kirchenbaum G.A., Tsvetnitsky V., Isakova-Sivak I., Rudenko L., Ross T.M. Cross-protection against H7N9 influenza strains using a live-attenuated H7N3 virus vaccine// *Vaccine*. – 2015. – V. 33. – № 1. – p. 108-16.
95. Carter D.M., Darby C.A., Johnson S.K., Carlock M.A., Kirchenbaum G.A., Allen J.D., Vogel T.U., Delagrave S., DiNapoli J., Kleanthous H., Ross T.M. Elicitation of Protective Antibodies against a Broad Panel of H1N1 Viruses in Ferrets Preimmune to Historical H1N1 Influenza Viruses// *J Virol*. – 2017. – V. 91. – № 24.
96. Carter D.M., Darby C.A., Lefoley B.C., Crevar C.J., Alefantis T., Oomen R., Anderson S.F., Strugnell T., Cortes-Garcia G., Vogel T.U., Parrington M., Kleanthous H., Ross T.M. Design and Characterization of a Computationally Optimized Broadly Reactive Hemagglutinin Vaccine for H1N1 Influenza Viruses// *J Virol*. – 2016. – V. 90. – № 9. – p. 4720-34.
97. Caspard H., Belongia E.A., Bernatoniene J., Clipper L., Congeni B., Faust S., Gaglani M. Multicenter Study of the Effectiveness of Live Attenuated Influenza Vaccine and Inactivated Influenza Vaccine in Children from 2015-2016 in the United States and the United Kingdom - Interim Results. in *Options IX for the Control of Influenza*. 2016. Chicago, IL, USA.
98. Caspard H., Coelingh K.L., Mallory R.M., Ambrose C.S. Association of vaccine handling conditions with effectiveness of live attenuated influenza vaccine against H1N1pdm09 viruses in the United States// *Vaccine*. – 2016. – V. 34. – № 42. – p. 5066-5072.
99. Caspard H., Gaglani M., Clipper L., Belongia E.A., McLean H.Q., Griffin M.R., Talbot H.K., Poehling K.A., Peters T.R., Veney N., Ambrose C.S. Effectiveness of live attenuated influenza vaccine and inactivated influenza vaccine in children 2-17 years of age in 2013-2014 in the United States// *Vaccine*. – 2016. – V. 34. – № 1. – p. 77-82.
100. CDC. Summary of Influenza Risk Assessment Tool (IRAT) Results. Available at: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/monitoring/irat-virus-summaries.htm/> – 2017. – V. – №.
101. Chan W., Zhou H., Kemble G., Jin H. The cold adapted and temperature sensitive influenza A/Ann Arbor/6/60 virus, the master donor virus for live attenuated influenza vaccines, has multiple defects in replication at the restrictive temperature// *Virology*. – 2008. – V. 380. – № 2. – p. 304-11.

102. Chen G.L., Lamirande E.W., Jin H., Kemble G., Subbarao K. Safety, immunogenicity, and efficacy of a cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) vaccine in mice and ferrets// *Virology*. – 2010. – V. 398. – № 1. – p. 109-14.
103. Chen G.L., Lamirande E.W., Yang C.F., Jin H., Kemble G., Subbarao K. Evaluation of replication and cross-reactive antibody responses of H2 subtype influenza viruses in mice and ferrets// *J Virol*. – 2010. – V. 84. – № 15. – p. 7695-702.
104. Chen L., Zanker D., Xiao K., Wu C., Zou Q., Chen W. Immunodominant CD4+ T-cell responses to influenza A virus in healthy individuals focus on matrix 1 and nucleoprotein// *J Virol*. – 2014. – V. 88. – № 20. – p. 11760-73.
105. Chen L.M., Davis C.T., Zhou H., Cox N.J., Donis R.O. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses// *PLoS Pathog*. – 2008. – V. 4. – № 5. – p. e1000072.
106. Chen W.H., Jackson L.A., Edwards K.M., Keitel W.A., Hill H., Noah D.L., Creech C.B., Patel S.M., Mangal B., Kotloff K.L. Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of Inactivated Monovalent Influenza A(H5N1) Virus Vaccine Administered With or Without AS03 Adjuvant// *Open Forum Infect Dis*. – 2014. – V. 1. – № 3. – p. ofu091.
107. Chen Z., Baz M., Lu J., Paskel M., Santos C., Subbarao K., Jin H., Matsuoka Y. Development of a high-yield live attenuated H7N9 influenza virus vaccine that provides protection against homologous and heterologous H7 wild-type viruses in ferrets// *J Virol*. – 2014. – V. 88. – № 12. – p. 7016-23.
108. Cheung T.K., Poon L.L. Biology of influenza A virus// *Ann N Y Acad Sci*. – 2007. – V. 1102. – №. – p. 1-25.
109. Chirkova T.V., Naykhin A.N., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Donina S.A., Mironov A.N., Rudenko L.G. Memory T-cell immune response in healthy young adults vaccinated with live attenuated influenza A (H5N2) vaccine// *Clin Vaccine Immunol*. – 2011. – V. 18. – № 10. – p. 1710-8.
110. Chua B.Y., Wong C.Y., Mifsud E.J., Edenborough K.M., Sekiya T., Tan A.C., Mercuri F., Rockman S., Chen W., Turner S.J., Doherty P.C., Kelso A., Brown L.E., Jackson D.C. Inactivated Influenza Vaccine That Provides Rapid, Innate-Immune-System-Mediated Protection and Subsequent Long-Term Adaptive Immunity// *MBio*. – 2015. – V. 6. – № 6. – p. e01024-15.
111. Chung J.R., Flannery B., Thompson M.G., Gaglani M., Jackson M.L., Monto A.S., Nowalk M.P., Talbot H.K., Treanor J.J., Belongia E.A., Murthy K., Jackson L.A., Petrie J.G., Zimmerman R.K., Griffin M.R., McLean H.Q., Fry A.M. Seasonal Effectiveness of Live Attenuated and Inactivated Influenza Vaccine// *Pediatrics*. – 2016. – V. 137. – № 2. – p. e20153279.
112. Chung K.Y., Coyle E.M., Jani D., King L.R., Bhardwaj R., Fries L., Smith G., Glenn G., Golding H., Khurana S. ISCOMATRIX adjuvant promotes epitope spreading and antibody affinity maturation of influenza A H7N9 virus like particle vaccine that correlate with virus neutralization in humans// *Vaccine*. – 2015. – V. 33. – № 32. – p. 3953-62.
113. CIDRAP. CDC vaccine panel brings back FluMist for 2018-19 season. Available at: <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2018/02/cdc-vaccine-panel-brings-back-flumist-2018-19-season/> – 2018. – V. – №.
114. Coelingh K.L., Luke C.J., Jin H., Talaat K.R. Development of live attenuated influenza vaccines against pandemic influenza strains// *Expert Rev Vaccines*. – 2014. – V. 13. – № 7. – p. 855-71.
115. Conenello G.M., Zamarin D., Perrone L.A., Tumpey T., Palese P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence// *PLoS Pathog*. – 2007. – V. 3. – № 10. – p. 1414-21.
116. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B.M., Agatic G., Bianchi S., Giacchetto-Sasselli I., Calder L., Sallusto F., Collins P., Haire L.F., Temperton N.,

- Langedijk J.P., Skehel J.J., Lanzavecchia A. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins// *Science*. – 2011. – V. 333. – № 6044. – p. 850-6.
117. 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.* – 2014. – V. 10. – № 1. – p. e1003831.
118. Couch R.B., Atmar R.L., Franco L.M., Quarles J.M., Wells J., Arden N., Nino D., Belmont J.W. Antibody correlates and predictors of immunity to naturally occurring influenza in humans and the importance of antibody to the neuraminidase// *J Infect Dis.* – 2013. – V. 207. – № 6. – p. 974-81.
119. Coughlan L., Sridhar S., Payne R., Edmans M., Milicic A., Venkatraman N., Lugonja B., Clifton L., Qi C., Folegatti P.M., Lawrie A.M., Roberts R., de Graaf H., Sukhtankar P., Faust S.N., Lewis D.J.M., Lambe T., Hill A., Gilbert S.C. Heterologous Two-Dose Vaccination with Simian Adenovirus and Poxvirus Vectors Elicits Long-Lasting Cellular Immunity to Influenza Virus A in Healthy Adults// *EBioMedicine*. – 2018. – V. 29. – №. – p. 146-154.
120. Cox M.M., Hollister J.R. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells// *Biologicals*. – 2009. – V. 37. – № 3. – p. 182-9.
121. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines// *Scand J Immunol.* – 2004. – V. 59. – № 1. – p. 1-15.
122. Cox R.J., Madhun A.S., Hauge S., Sjursen H., Major D., Kuhne M., Hoschler K., Saville M., Vogel F.R., Barclay W., Donatelli I., Zambon M., Wood J., Haaheim L.R. A phase I clinical trial of a PER.C6 cell grown influenza H7 virus vaccine// *Vaccine*. – 2009. – V. 27. – № 13. – p. 1889-97.
123. CPMP. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines: 1997 [accessed April 2017]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003945.pdf – 1997. – V. – №.
124. D'Mello T., Brammer L., Blanton L., Kniss K., Smith S., Mustaquim D., Steffens C., Dhara R., Cohen J., Chaves S.S., Finelli L., Bresee J., Wallis T., Xu X., Abd Elal A.I., Gubareva L., Wentworth D., Villanueva J., Katz J., Jernigan D., Centers for Disease C., Prevention. Update: Influenza activity--United States, September 28, 2014-February 21, 2015// *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2015. – V. 64. – № 8. – p. 206-12.
125. De Groot A.S., Ardito M., Terry F., Levitz L., Ross T., Moise L., Martin W. Low immunogenicity predicted for emerging avian-origin H7N9: implication for influenza vaccine design// *Hum Vaccin Immunother.* – 2013. – V. 9. – № 5. – p. 950-6.
126. De Groot A.S., Moise L., Liu R., Gutierrez A.H., Terry F., Koita O.A., Ross T.M., Martin W. Cross-conservation of T-cell epitopes: now even more relevant to (H7N9) influenza vaccine design// *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – V. 10. – № 2. – p. 256-62.
127. Deng L., Cho K.J., Fiers W., Saelens X. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines// *Vaccines (Basel)*. – 2015. – V. 3. – № 1. – p. 105-36.
128. Desheva J.A., Lu X.H., Rekestin A.R., Rudenko L.G., Swayne D.E., Cox N.J., Katz J.M., Klimov A.I. Characterization of an influenza A H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic H5N1 viruses with pandemic potential// *Vaccine*. – 2006. – V. 24. – № 47-48. – p. 6859-66.
129. Dhere 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*. – 2011. – V. 29 Suppl 1. – №. – p. A16-21.
130. DiazGranados C.A., Dunning A.J., Kimmel M., Kirby D., Treanor J., Collins A., Pollak R., Christoff J., Earl J., Landolfi V., Martin E., Gurunathan S., Nathan R., Greenberg D.P.,

- Tornieporth N.G., Decker M.D., Talbot H.K. Efficacy of high-dose versus standard-dose influenza vaccine in older adults// *N Engl J Med.* – 2014. – V. 371. – № 7. – p. 635-45.
131. DiazGranados C.A., Saway W., Gouaux J., Baron M., Baker J., Denis M., Jordanov E., Landolfi V., Yau E. Safety and immunogenicity of high-dose trivalent inactivated influenza vaccine in adults 50-64 years of age// *Vaccine.* – 2015. – V. 33. – № 51. – p. 7188-7193.
 132. Dolfi D.V., Mansfield K.D., Kurupati R.K., Kannan S., Doyle S.A., Ertl H.C., Schmader K.E., Wherry E.J. Vaccine-induced boosting of influenza virus-specific CD4 T cells in younger and aged humans// *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 10. – p. e77164.
 133. Dowdle W.R. Influenza A virus recycling revisited// *Bull World Health Organ.* – 1999. – V. 77. – № 10. – p. 820-8.
 134. Durward M., Harms J., Splitter G. Antigen specific killing assay using CFSE labeled target cells// *J Vis Exp.* – 2010. – V. – № 45. – p. 2250.
 135. ECDC. Avian Flu Diary. NPM14: Because Pandemics Happen. Available at: <http://afludiary.blogspot.ru/2014/09/npm14-because-pandemics-happen.html/> – 2014. – V. – №.
 136. Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D., Grassauer A., Alexandrova G., Katinger H., Muster T. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells// *J Virol.* – 1998. – V. 72. – № 8. – p. 6437-41.
 137. Egorov A., Medvedeva T.E., Polezhaev F.I., Alexandrova G.I., Ghendon Yu Z. Peculiarities of obtaining and characterization of a cold-adapted A/PR/8/34 influenza virus variant// *Acta Virol.* – 1984. – V. 28. – № 1. – p. 19-25.
 138. Ellebedy A.H., Krammer F., Li G.M., Miller M.S., Chiu C., Wrarmert J., Chang C.Y., Davis C.W., McCausland M., Elbein R., Edupuganti S., Spearman P., Andrews S.F., Wilson P.C., Garcia-Sastre A., Mulligan M.J., Mehta A.K., Palese P., Ahmed R. Induction of broadly cross-reactive antibody responses to the influenza HA stem region following H5N1 vaccination in humans// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – V. 111. – № 36. – p. 13133-8.
 139. Ermler M.E., Kirkpatrick E., Sun W., Hai R., Amanat F., Chromikova V., Palese P., Krammer F. Chimeric Hemagglutinin Constructs Induce Broad Protection against Influenza B Virus Challenge in the Mouse Model// *J Virol.* – 2017. – V. 91. – № 12.
 140. Falkenhorst G., Harder T., Renschmidt C., Terhardt M., Zepp F., Ledig T., Wicker S., Keller-Stanislawski B., Mertens T. Background paper to the recommendation for the preferential use of live-attenuated influenza vaccine in children aged 2-6 years in Germany// *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* – 2013. – V. 56. – № 11. – p. 1557-64.
 141. Fang R., Min Jou W., Huylebroeck D., Devos R., Fiers W. Complete structure of A/duck/Ukraine/63 influenza hemagglutinin gene: animal virus as progenitor of human H3 Hong Kong 1968 influenza hemagglutinin// *Cell.* – 1981. – V. 25. – № 2. – p. 315-23.
 142. FDA. Guidance for Industry. Clinical Data Needed to Support the Licensure of Pandemic Influenza Vaccines// <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm091985.pdf>. Accessed 14 July 2014. – 2007. – V. – №.
 143. Ferko B., Stasakova J., Romanova J., Kittel C., Sereinig S., Katinger H., Egorov A. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes// *J Virol.* – 2004. – V. 78. – № 23. – p. 13037-45.
 144. Fernandez-Sesma A. The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity// *Infect Disord Drug Targets.* – 2007. – V. 7. – № 4. – p. 336-43.
 145. Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccine// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 45. – p. 6280-3.

146. Finch C., Li W., Perez D., Design of Alternative Live Attenuated Influenza Virus Vaccines, in *Influenza Pathogenesis and Control - Volume II*, M.B.A. Oldstone and Compans R.W., Editors. 2015, Springer International Publishing. p. 205-235.
147. Florent G. Gene constellation of live influenza A vaccines// *Arch Virol.* – 1980. – V. 64. – № 2. – p. 171-3.
148. Florent G., Lobmann M., Beare A.S., Zygraich N. RNAs of influenza virus recombinants derived from parents of known virulence for man// *Arch Virol.* – 1977. – V. 54. – № 1-2. – p. 19-28.
149. Fodor E., Devenish L., Engelhardt O.G., Palese P., Brownlee G.G., Garcia-Sastre A. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA// *J Virol.* – 1999. – V. 73. – № 11. – p. 9679-82.
150. Forrest B.D., Pride M.W., Dunning A.J., Capeding M.R., Chotpitayasunondh T., Tam J.S., Rappaport R., Eldridge J.H., Gruber W.C. Correlation of cellular immune responses with protection against culture-confirmed influenza virus in young children// *Clin Vaccine Immunol.* – 2008. – V. 15. – № 7. – p. 1042-53.
151. Frank H., Wittekind C., Liebert U.G., Siekmeyer M., Siekmeyer W., Schuster V., Kiess W. Lethal influenza B myocarditis in a child and review of the literature for pediatric age groups// *Infection.* – 2010. – V. 38. – № 3. – p. 231-5.
152. Freidl G.S., Meijer A., de Bruin E., de Nardi M., Munoz O., Capua I., Breed A.C., Harris K., Hill A., Kosmider R., Banks J., von Dobschuetz S., Stark K., Wieland B., Stevens K., van der Werf S., Enouf V., van der Meulen K., Van Reeth K., Dauphin G., Koopmans M., Consortium F. Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1)// *Euro Surveill.* – 2014. – V. 19. – № 18.
153. Fries L.F., Smith G.E., Glenn G.M. A recombinant viruslike particle influenza A (H7N9) vaccine// *N Engl J Med.* – 2013. – V. 369. – № 26. – p. 2564-6.
154. Fulvini A.A., Ramanunnair M., Le J., Pokorny B.A., Arroyo J.M., Silverman J., Devis R., Bucher D. Gene constellation of influenza A virus reassortants with high growth phenotype prepared as seed candidates for vaccine production// *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 6. – p. e20823.
155. Gaglani M., Pruszynski J., Murthy K., Clipper L., Robertson A., Reis M., Chung J.R., Piedra P.A., Avadhanula V., Nowalk M.P., Zimmerman R.K., Jackson M.L., Jackson L.A., Petrie J.G., Ohmit S.E., Monto A.S., McLean H.Q., Belongia E.A., Fry A.M., Flannery B. Influenza Vaccine Effectiveness Against 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Differed by Vaccine Type During 2013-2014 in the United States// *J Infect Dis.* – 2016. – V. 213. – № 10. – p. 1546-56.
156. Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y., Kropotkina E.A., Mashin V.V., Krasilnikov I.V., Klimov A.I., Rudenko L.G. Comparative safety, immunogenicity, and efficacy of several anti-H5N1 influenza experimental vaccines in a mouse and chicken models (Testing of killed and live H5 vaccine)// *Influenza Other Respir Viruses.* – 2012. – V. 6. – № 3. – p. 188-95.
157. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., Lvov D.K., Robertson J.S., Bovin N.V., Matrosovich M.N. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyllactosamine)// *Virology.* – 1997. – V. 232. – № 2. – p. 345-50.
158. Gamblin S.J., Skehel J.J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins// *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285. – № 37. – p. 28403-9.
159. Gao R., Cao B., Hu Y., Feng Z., Wang D., Hu W., Chen J., Jie Z., Qiu H., Xu K., Xu X., Lu H., Zhu W., Gao Z., Xiang N., Shen Y., He Z., Gu Y., Zhang Z., Yang Y., Zhao X., Zhou L., Li X., Zou S., Zhang Y., Yang L., Guo J., Dong J., Li Q., Dong L., Zhu Y., Bai T., Wang S., Hao P., Yang W., Han J., Yu H., Li D., Gao G.F., Wu G., Wang Y., Yuan Z., Shu Y.

- Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus// *N Engl J Med.* – 2013. – V. 368. – № 20. – p. 1888-97.
160. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C.B., Emery S.L., Hillman M.J., Rivaller P., Smagala J., de Graaf M., Burke D.F., Fouchier R.A., Pappas C., Alpuche-Aranda C.M., Lopez-Gatell H., Olivera H., Lopez I., Myers C.A., Faix D., Blair P.J., Yu C., Keene K.M., Dotson P.D., Jr., Boxrud D., Sambol A.R., Abid S.H., St George K., Bannerman T., Moore A.L., Stringer D.J., Blevins P., Demmler-Harrison G.J., Ginsberg M., Kriner P., Waterman S., Smole S., Guevara H.F., Belongia E.A., Clark P.A., Beatrice S.T., Donis R., Katz J., Finelli L., Bridges C.B., Shaw M., Jernigan D.B., Uyeki T.M., Smith D.J., Klimov A.I., Cox N.J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans// *Science.* – 2009. – V. 325. – № 5937. – p. 197-201.
 161. Gauger P.C., Loving C.L., Khurana S., Lorusso A., Perez D.R., Kehrli M.E., Jr., Roth J.A., Golding H., Vincent A.L. Live attenuated influenza A virus vaccine protects against A(H1N1)pdm09 heterologous challenge without vaccine associated enhanced respiratory disease// *Virology.* – 2014. – V. 471-473. – №. – p. 93-104.
 162. Gauger P.C., Vincent A.L., Loving C.L., Henningson J.N., Lager K.M., Janke B.H., Kehrli M.E., Jr., Roth J.A. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus// *Vet Pathol.* – 2012. – V. 49. – № 6. – p. 900-12.
 163. Gauger P.C., Vincent A.L., Loving C.L., Lager K.M., Janke B.H., Kehrli M.E., Jr., Roth J.A. Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (delta-cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009 H1N1 influenza virus// *Vaccine.* – 2011. – V. 29. – № 15. – p. 2712-9.
 164. Ge S., Wang Z. An overview of influenza A virus receptors// *Crit Rev Microbiol.* – 2011. – V. 37. – № 2. – p. 157-65.
 165. Gellin B.G., Qadri F. Preparing for the unpredictable: The continuing need for pandemic influenza preparedness// *Vaccine.* – 2016. – V. 34. – № 45. – p. 5391-5392.
 166. George M., Farooq M., Dang T., Cortes B., Liu J., Maranga L. Production of cell culture (MDCK) derived live attenuated influenza vaccine (LAIV) in a fully disposable platform process// *Biotechnol Bioeng.* – 2010. – V. 106. – № 6. – p. 906-17.
 167. Gething M.J., Bye J., Skehel J., Waterfield M. Cloning and DNA sequence of double-stranded copies of haemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus// *Nature.* – 1980. – V. 287. – № 5780. – p. 301-6.
 168. Ghedin E., Sengamalay N.A., Shumway M., Zaborsky J., Feldblyum T., Subbu V., Spiro D.J., Sitz J., Koo H., Bolotov P., Dernovoy D., Tatusova T., Bao Y., St George K., Taylor J., Lipman D.J., Fraser C.M., Taubenberger J.K., Salzberg S.L. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution// *Nature.* – 2005. – V. 437. – № 7062. – p. 1162-6.
 169. Ghendon Y.Z., Markushin S.G., Akopova, II, Koptiaeva I.B., Nechaeva E.A., Mazurkova L.A., Radaeva I.F., Kolokoltseva T.D. Development of cell culture (MDCK) live cold-adapted (CA) attenuated influenza vaccine// *Vaccine.* – 2005. – V. 23. – № 38. – p. 4678-84.
 170. Giles B.M., Crevar C.J., Carter D.M., Bissel S.J., Schultz-Cherry S., Wiley C.A., Ross T.M. A computationally optimized hemagglutinin virus-like particle vaccine elicits broadly reactive antibodies that protect nonhuman primates from H5N1 infection// *J Infect Dis.* – 2012. – V. 205. – № 10. – p. 1562-70.
 171. Giles B.M., Ross T.M. A computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) based H5N1 VLP vaccine elicits broadly reactive antibodies in mice and ferrets// *Vaccine.* – 2011. – V. 29. – № 16. – p. 3043-54.

172. Gill M.A., Schlaudecker E.P. Perspectives from the Society for Pediatric Research: Decreased Effectiveness of the Live Attenuated Influenza Vaccine// *Pediatr Res.* – 2018. – V. 83. – № 1-1. – p. 31-40.
173. Girard M.P., Katz J.M., Pervikov Y., Hombach J., Tam J.S. Report of the 7th meeting on Evaluation of Pandemic Influenza Vaccines in Clinical Trials, World Health Organization, Geneva, 17-18 February 2011// *Vaccine.* – 2011. – V. 29. – № 44. – p. 7579-86.
174. Glaser L., Zamarin D., Acland H.M., Spackman E., Palese P., Garcia-Sastre A., Tewari D. Sequence analysis and receptor specificity of the hemagglutinin of a recent influenza H2N2 virus isolated from chicken in North America// *Glycoconj J.* – 2006. – V. 23. – № 1-2. – p. 93-9.
175. Goff P.H., Eggink D., Seibert C.W., Hai R., Martinez-Gil L., Krammer F., Palese P. Adjuvants and immunization strategies to induce influenza virus hemagglutinin stalk antibodies// *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 11. – p. e79194.
176. Goff P.H., Krammer F., Hai R., Seibert C.W., Margine I., Garcia-Sastre A., Palese P. Induction of cross-reactive antibodies to novel H7N9 influenza virus by recombinant Newcastle disease virus expressing a North American lineage H7 subtype hemagglutinin// *J Virol.* – 2013. – V. 87. – № 14. – p. 8235-40.
177. Gould P.S., Easton A.J., Dimmock N.J. Live Attenuated Influenza Vaccine contains Substantial and Unexpected Amounts of Defective Viral Genomic RNA// *Viruses.* – 2017. – V. 9. – № 10.
178. Grant E., Wu C., Chan K.F., Eckle S., Bharadwaj M., Zou Q.M., Kedzierska K., Chen W. Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8+ T-cell responses// *Immunol Cell Biol.* – 2013. – V. 91. – № 2. – p. 184-94.
179. Gras S., Kedzierski L., Valkenburg S.A., Laurie K., Liu Y.C., Denholm J.T., Richards M.J., Rimmelzwaan G.F., Kelso A., Doherty P.C., Turner S.J., Rossjohn J., Kedzierska K. Cross-reactive CD8+ T-cell immunity between the pandemic H1N1-2009 and H1N1-1918 influenza A viruses// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. – № 28. – p. 12599-604.
180. Grohmann G., Francis D.P., Sokhey J., Robertson J. Challenges and successes for the grantees and the Technical Advisory Group of WHO's influenza vaccine technology transfer initiative// *Vaccine.* – 2016. – V. 34. – № 45. – p. 5420-5424.
181. Grohskopf L.A., Sokolow L.Z., Broder K.R., Olsen S.J., Karron R.A., Jernigan D.B., Bresee J.S. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines// *MMWR Recomm Rep.* – 2016. – V. 65. – № 5. – p. 1-54.
182. Grohskopf L.A., Sokolow L.Z., Broder K.R., Walter E.B., Bresee J.S., Fry A.M., Jernigan D.B. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices - United States, 2017-18 Influenza Season// *MMWR Recomm Rep.* – 2017. – V. 66. – № 2. – p. 1-20.
183. Gulyaeva M., Sharshov K., Suzuki M., Sobolev I., Sakoda Y., Alekseev A., Sivay M., Shestopalova L., Shchelkanov M., Shestopalov A. Genetic characterization of an H2N2 influenza virus isolated from a muskrat in Western Siberia// *J Vet Med Sci.* – 2017. – V. 79. – № 8. – p. 1461-1465.
184. 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., Heldens J.G., van den Bosch H., Cox N.J., Tumpey T.M., Klimov A.I., Rudenko L., Donis R.O., Katz J.M. Comparative immunogenicity and cross-clade protective efficacy of mammalian cell-grown inactivated and live attenuated H5N1 reassortant vaccines in ferrets// *J Infect Dis.* – 2011. – V. 204. – № 10. – p. 1491-9.
185. Hai R., Krammer F., Tan G.S., Pica N., Eggink D., Maamary J., Margine I., Albrecht R.A., Palese P. Influenza viruses expressing chimeric hemagglutinins: globular head and stalk domains derived from different subtypes// *J Virol.* – 2012. – V. 86. – № 10. – p. 5774-81.
186. Hai R., Schmolke M., Leyva-Grado V.H., Thangavel R.R., Margine I., Jaffe E.L., Krammer F., Solorzano A., Garcia-Sastre A., Palese P., Bouvier N.M. Influenza A(H7N9) virus gains

- neuraminidase inhibitor resistance without loss of in vivo virulence or transmissibility// *Nat Commun.* – 2013. – V. 4. – №. – p. 2854.
187. Halbroth B.R., Heil A., Distler E., Dass M., Wagner E.M., Plachter B., Probst H.C., Strand D., Hartwig U.F., Karner A., Aichinger G., Kistner O., Landfester K., Herr W. Superior in vitro stimulation of human CD8+ T-cells by whole virus versus split virus influenza vaccines// *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 7. – p. e103392.
 188. Halliley J.L., Khurana S., Krammer F., Fitzgerald T., Coyle E.M., Chung K.Y., Baker S.F., Yang H., Martinez-Sobrido L., Treanor J.J., Subbarao K., Golding H., Topham D.J., Sangster M.Y. High Affinity H7 Head and Stalk Domain-Specific Antibody Responses to an Inactivated Influenza H7N7 Vaccine after Priming with Live Attenuated Influenza Vaccine// *J Infect Dis.* – 2015. – V. – №.
 189. Harfoot R., Webby R.J. H5 influenza, a global update// *Journal of Microbiology.* – 2017. – V. 55. – № 3. – p. 196-203.
 190. Harris K., Ream R., Gao J., Eichelberger M.C. Intramuscular immunization of mice with live influenza virus is more immunogenic and offers greater protection than immunization with inactivated virus// *Virol J.* – 2011. – V. 8. – №. – p. 251.
 191. Hause B.M., Collin E.A., Liu R., Huang B., Sheng Z., Lu W., Wang D., Nelson E.A., Li F. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family// *MBio.* – 2014. – V. 5. – № 2. – p. e00031-14.
 192. Hayden F.G., Howard W.A., Palkonyay L., Kieny M.P. Report of the 5th meeting on the evaluation of pandemic influenza prototype vaccines in clinical trials: World Health Organization, Geneva, Switzerland, 12-13 February 2009// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 31. – p. 4079-89.
 193. Hayward A.C., Wang L., Goonetilleke N., Fragaszy E.B., Bermingham A., Copas A., Dukes O., Millett E.R., Nazareth I., Nguyen-Van-Tam J.S., Watson J.M., Zambon M., Flu Watch G., Johnson A.M., McMichael A.J. Natural T Cell-mediated Protection against Seasonal and Pandemic Influenza. Results of the Flu Watch Cohort Study// *Am J Respir Crit Care Med.* – 2015. – V. 191. – № 12. – p. 1422-31.
 194. He F., Leyrer S., Kwang J. Strategies towards universal pandemic influenza vaccines// *Expert Rev Vaccines.* – 2016. – V. 15. – № 2. – p. 215-25.
 195. He W., Wang W., Han H., Wang L., Zhang G., Gao B. Molecular basis of live-attenuated influenza virus// *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 3. – p. e60413.
 196. He X.S., Holmes T.H., Zhang C., Mahmood K., Kemble G.W., Lewis D.B., Dekker C.L., Greenberg H.B., Arvin A.M. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines// *J Virol.* – 2006. – V. 80. – № 23. – p. 11756-66.
 197. Hehme N., Engelmann H., Kunzel W., Neumeier E., Sanger R. Pandemic preparedness: lessons learnt from H2N2 and H9N2 candidate vaccines// *Med Microbiol Immunol.* – 2002. – V. 191. – № 3-4. – p. 203-8.
 198. 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.* – 2014. – V. 32. – № 39. – p. 5118-24.
 199. Helmeke C., Grafe L., Irscher 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.* – 2015. – V. 10. – № 4. – p. e0122910.
 200. Herfst S., Imai M., Kawaoka Y., Fouchier R.A. Avian influenza virus transmission to mammals// *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2014. – V. 385. – №. – p. 137-55.
 201. Herfst S., Schrauwen E.J., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., Sorrell E.M., Bestebroer T.M., Burke D.F., Smith D.J., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.,

- Fouchier R.A. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets// *Science*. – 2012. – V. 336. – № 6088. – p. 1534-41.
202. Hillaire M.L., van Trierum S.E., Kreijtz J.H., Bodewes R., Geelhoed-Mieras M.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Kuiken T., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Cross-protective immunity against influenza pH1N1 2009 viruses induced by seasonal influenza A (H3N2) virus is mediated by virus-specific T-cells// *J Gen Virol*. – 2011. – V. 92. – № Pt 10. – p. 2339-49.
203. Hoa L.N.M., Tuan N.A., My P.H., Huong T.T.K., Chi N.T.Y., Hau Thu T.T., Carrique-Mas J., Duong M.T., Tho N.D., Hoang N.D., Thanh T.L., Diep N.T., Duong N.v., Toan T.K., Tung T.S., Mai L.Q., Iqbal M., Wertheim H., van Doorn H.R., Bryant J.E., consortium t.V. Assessing evidence for avian-to-human transmission of influenza A/H9N2 virus in rural farming communities in northern Vietnam// *Journal of General Virology*. – 2017. – V. 98. – № 8. – p. 2011-2016.
204. Hobson D., Curry R.L., Beare A.S., Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses// *J Hyg (Lond)*. – 1972. – V. 70. – № 4. – p. 767-77.
205. 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*. – 2000. – V. 267. – № 2. – p. 310-7.
206. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids// *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2000. – V. 97. – № 11. – p. 6108-13.
207. Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses// *Arch Virol*. – 2001. – V. 146. – № 12. – p. 2275-89.
208. Hoft D.F., Babusis E., Worku S., Spencer C.T., Lottenbach K., Truscott S.M., Abate G., Sakala I.G., Edwards K.M., Creech C.B., Gerber M.A., Bernstein D.I., Newman F., Graham I., Anderson E.L., Belshe R.B. Live and inactivated influenza vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children// *J Infect Dis*. – 2011. – V. 204. – № 6. – p. 845-53.
209. Hoof I., Peters B., Sidney J., Pedersen L.E., Sette A., Lund O., Buus S., Nielsen M. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans// *Immunogenetics*. – 2009. – V. 61. – № 1. – p. 1-13.
210. Huang S.S., Banner D., Paquette S.G., Leon A.J., Kelvin A.A., Kelvin D.J. Pathogenic influenza B virus in the ferret model establishes lower respiratory tract infection// *J Gen Virol*. – 2014. – V. 95. – № Pt 10. – p. 2127-39.
211. Huang Y., Li X., Zhang H., Chen B., Jiang Y., Yang L., Zhu W., Hu S., Zhou S., Tang Y., Xiang X., Li F., Li W., Gao L. Human infection with an avian influenza A (H9N2) virus in the middle region of China// *J Med Virol*. – 2015. – V. 87. – № 10. – p. 1641-8.
212. Hughes B., Hayden F., Perikov Y., Hombach J., Tam J.S. Report of the 5th meeting on influenza vaccines that induce broad spectrum and long-lasting immune responses, World Health Organization, Geneva, 16-17 November 2011// *Vaccine*. – 2012. – V. 30. – № 47. – p. 6612-22.
213. 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*. – 2010. – V. 28. – № 22. – p. 3848-55.
214. Ilyushina N.A., Ikizler M.R., Kawaoka Y., Rudenko L.G., Treanor J.J., Subbarao K., Wright P.F. Comparative study of influenza virus replication in MDCK cells and in primary cells derived from adenoids and airway epithelium// *J Virol*. – 2012. – V. 86. – № 21. – p. 11725-34.

215. Impagliazzo A., Milder F., Kuipers H., Wagner M.V., Zhu X., Hoffman R.M., van Meersbergen R., Huizingh J., Wannings P., Verspuij J., de Man M., Ding Z., Apetri A., Kukrer B., Sneekes-Vriese E., Tomkiewicz D., Laursen N.S., Lee P.S., Zakrzewska A., Dekking L., Tolboom J., Tettero L., van Meerten S., Yu W., Koudstaal W., Goudsmit J., Ward A.B., Meijberg W., Wilson I.A., Radosevic K. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen// *Science*. – 2015. – V. 349. – № 6254. – p. 1301-6.
216. Isakova-Sivak I. Use of live attenuated influenza vaccines in young children in resource-poor settings// *Lancet Glob Health*. – 2016. – V. 4. – № 12. – p. e879-e880.
217. Isakova-Sivak I., Korenkov D., Smolonogina T., Tretiak T., Donina S., Rekestin A., Naykhin A., Shcherbik S., Pearce N., Chen L.M., Bousse T., Rudenko L. Comparative studies of infectivity, immunogenicity and cross-protective efficacy of live attenuated influenza vaccines containing nucleoprotein from cold-adapted or wild-type influenza virus in a mouse model// *Virology*. – 2017. – V. 500. – №. – p. 209-217.
218. Isakova-Sivak I., Rudenko L. Safety, immunogenicity and infectivity of new live attenuated influenza vaccines// *Expert Rev Vaccines*. – 2015. – V. 14. – № 10. – p. 1313-29.
219. Isakova-Sivak I., Rudenko L. Tackling a novel lethal virus: a focus on H7N9 vaccine development// *Expert Rev Vaccines*. – 2017. – V. 16. – № 7. – p. 1-13.
220. Itoh Y., Shichinohe S., Nakayama M., Igarashi M., Ishii A., Ishigaki H., Ishida H., Kitagawa N., Sasamura T., Shiohara M., Doi M., Tsuchiya H., Nakamura S., Okamatsu M., Sakoda Y., Kida H., Ogasawara K. Emergence of H7N9 Influenza A Virus Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Nonhuman Primates// *Antimicrob Agents Chemother*. – 2015. – V. 59. – № 8. – p. 4962-73.
221. Jackson L.A., Campbell J.D., Frey S.E., Edwards K.M., Keitel W.A., Kotloff K.L., Berry A.A., Graham I., Atmar R.L., Creech C.B., Thomsen I.P., Patel S.M., Gutierrez A.F., Anderson E.L., El Sahly H.M., Hill H., Noah D.L., Bellamy A.R. Effect of Varying Doses of a Monovalent H7N9 Influenza Vaccine With and Without AS03 and MF59 Adjuvants on Immune Response: A Randomized Clinical Trial// *JAMA*. – 2015. – V. 314. – № 3. – p. 237-46.
222. Jackson S., Van Hoeven N., Chen L.M., Maines T.R., Cox N.J., Katz J.M., Donis R.O. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: a public health risk assessment// *J Virol*. – 2009. – V. 83. – № 16. – p. 8131-40.
223. Jacobsen H., Rajendran M., Choi A., Sjursen H., Brokstad K.A., Cox R.J., Palese P., Krammer F., Nachbagauer R. Influenza Virus Hemagglutinin Stalk-Specific Antibodies in Human Serum are a Surrogate Marker for In Vivo Protection in a Serum Transfer Mouse Challenge Model// *MBio*. – 2017. – V. 8. – № 5.
224. Jadhao S.J., Achenbach J., Swayne D.E., Donis R., Cox N., Matsuoka Y. Development of Eurasian H7N7/PR8 high growth reassortant virus for clinical evaluation as an inactivated pandemic influenza vaccine// *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – № 14. – p. 1742-50.
225. Janeway C.J., Travers P., Walport M., et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. T cell-mediated cytotoxicity. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27101/>. 2001.
226. Jang Y.H., Byun Y.H., Lee D.H., Lee K.H., Lee Y.J., Lee Y.H., Park J.K., Song C.S., Seong B.L. Cold-adapted X-31 live attenuated 2009 pandemic H1N1 influenza vaccine elicits protective immune responses in mice and ferrets// *Vaccine*. – 2013. – V. 31. – № 9. – p. 1320-7.
227. Jang Y.H., Byun Y.H., Lee Y.J., Lee Y.H., Lee K.H., Seong B.L. Cold-adapted pandemic 2009 H1N1 influenza virus live vaccine elicits cross-reactive immune responses against seasonal and H5 influenza A viruses// *J Virol*. – 2012. – V. 86. – № 10. – p. 5953-8.
228. Jang Y.H., Jung E.J., Byun Y.H., Lee K.H., Lee E.Y., Lee Y.J., Seong B.L. Immunogenicity and protective efficacy of cold-adapted X-31 live attenuated pre-pandemic H5N1 influenza vaccines// *Vaccine*. – 2013. – V. 31. – № 33. – p. 3339-46.

229. Jang Y.H., Lee E.Y., Byun Y.H., Jung E.J., Lee Y.J., Lee Y.H., Lee K.H., Lee J., Seong B.L. Protective efficacy in mice of monovalent and trivalent live attenuated influenza vaccines in the background of cold-adapted A/X-31 and B/Lee/40 donor strains// *Vaccine*. – 2014. – V. 32. – № 5. – p. 535-43.
230. Jang Y.H., Seong B.L. Principles underlying rational design of live attenuated influenza vaccines// *Clin Exp Vaccine Res.* – 2012. – V. 1. – № 1. – p. 35-49.
231. Jang Y.H., Seong B.L. Options and Obstacles for Designing a Universal Influenza Vaccine// *Viruses*. – 2014. – V. 6. – № 8. – p. 3159-3180.
232. Jefferson T., Di Pietrantonj C., Rivetti A., Bawazeer G.A., Al-Ansary L.A., Ferroni E. Vaccines for preventing influenza in healthy adults// *Cochrane Database Syst Rev.* – 2010. – V. – № 7. – p. CD001269.
233. Jhung M.A., Epperson S., Biggerstaff M., Allen D., Balish A., Barnes N., Beaudoin A., Berman L., Bidol S., Blanton L., Blythe D., Brammer L., D'Mello T., Danila R., Davis W., de Fijter S., Diorio M., Durand L.O., Emery S., Fowler B., Garten R., Grant Y., Greenbaum A., Gubareva L., Havers F., Haupt T., House J., Ibrahim S., Jiang V., Jain S., Jernigan D., Kazmierczak J., Klimov A., Lindstrom S., Longenberger A., Lucas P., Lynfield R., McMorrow M., Moll M., Morin C., Ostroff S., Page S.L., Park S.Y., Peters S., Quinn C., Reed C., Richards S., Scheftel J., Simwale O., Shu B., Soyemi K., Stauffer J., Steffens C., Su S., Torso L., Uyeki T.M., Vetter S., Villanueva J., Wong K.K., Shaw M., Bresee J.S., Cox N., Finelli L. Outbreak of variant influenza A(H3N2) virus in the United States// *Clin Infect Dis.* – 2013. – V. 57. – № 12. – p. 1703-12.
234. Jiao P., Song H., Liu X., Song Y., Cui J., Wu S., Ye J., Qu N., Zhang T., Liao M. Pathogenicity, Transmission and Antigenic Variation of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses// *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – № 635.
235. Jin H., Chen Z., Liu J., Kemble G. Genetic engineering of live attenuated influenza viruses// *Methods Mol Biol.* – 2012. – V. 865. – №. – p. 163-74.
236. Jin H., Lu B., Zhou H., Kemble G. Genetic studies of FluMist influenza vaccines derived from cold adapted A/Ann Arbor/6/60// *International Congress Series*. – 2004. – V. 1263. – №. – p. 153-156.
237. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma C., Zhao J., Yang C.F., Kemble G., Greenberg H. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60// *Virology*. – 2003. – V. 306. – № 1. – p. 18-24.
238. Jin H., Subbarao K., Live Attenuated Influenza Vaccine, in *Influenza Pathogenesis and Control - Volume II*, M.B.A. Oldstone and Compans R.W., Editors. 2015, Springer International Publishing. p. 181-204.
239. Jin H., Zhou H., Lu B., Kemble G. Imparting Temperature Sensitivity and Attenuation in Ferrets to A/Puerto Rico/8/34 Influenza Virus by Transferring the Genetic Signature for Temperature Sensitivity from Cold-Adapted A/Ann Arbor/6/60// *J Virol.* – 2003. – V. 78. – № 2. – p. 995-998.
240. Jin H., Zhou H., Lu B., Kemble G. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60// *J Virol.* – 2004. – V. 78. – № 2. – p. 995-8.
241. 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., Williams T.L., Cox N.J., Barr J.R., Donis R.O. Identification of Influenza A/PR/8/34 Donor Viruses Imparting High Hemagglutinin Yields to Candidate Vaccine Viruses in Eggs// *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 6. – p. e0128982.
242. Johnson N.P., Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic// *Bull Hist Med.* – 2002. – V. 76. – № 1. – p. 105-15.

243. 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.* – 2014. – V. 88. – № 2. – p. 1175-88.
244. Jonges M., Welkers M.R., Jeeninga R.E., Meijer A., Schneeberger P., Fouchier R.A., de Jong M.D., Koopmans M. Emergence of the virulence-associated PB2 E627K substitution in a fatal human case of highly pathogenic avian influenza virus A(H7N7) infection as determined by Illumina ultra-deep sequencing// *J Virol.* – 2014. – V. 88. – № 3. – p. 1694-702.
245. Jonges M., Welkers M.R.A., Jeeninga R.E., Meijer A., Schneeberger P., Fouchier R.A.M., de Jong M.D., Koopmans M. Emergence of the Virulence-Associated PB2 E627K Substitution in a Fatal Human Case of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A(H7N7) Infection as Determined by Illumina Ultra-Deep Sequencing// *Journal of Virology.* – 2014. – V. 88. – № 3. – p. 1694-1702.
246. Kang Y., Shen X., Yuan R., Xiang B., Fang Z., Murphy R.W., Liao M., Shen Y., Ren T. Pathogenicity and transmissibility of three avian influenza A (H5N6) viruses isolated from wild birds// *J Infect.* – 2018. – V. 76. – № 3. – p. 286-294.
247. Karron R.A., Talaat K., Luke C., Callahan K., Thumar B., Dilorenzo S., McAuliffe J., Schappell E., Suguitan A., Mills K., Chen G., Lamirande E., Coelingh K., Jin H., Murphy B.R., Kemble G., Subbarao K. Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 36. – p. 4953-60.
248. Katinger H., Egorov A., Ferko B., Romanova J., Katinger D., Live influenza vaccine and method of manufacture. 2002, Google Patents
249. Kaverin N.V., Smirnov Y.A., Govorkova E.A., Rudneva I.A., Gitelman A.K., Lipatov A.S., Varich N.L., Yamnikova S.S., Makarova N.V., Webster R.G., Lvov D.K. Cross-protection and reassortment studies with avian H2 influenza viruses// *Arch Virol.* – 2000. – V. 145. – № 6. – p. 1059-66.
250. 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// *J Virol.* – 1989. – V. 63. – № 11. – p. 4603-8.
251. Kayali G., Webby R.J., Ducatez M.F., El Shesheny R.A., Kandeil A.M., Govorkova E.A., Mostafa A., Ali M.A. The epidemiological and molecular aspects of influenza H5N1 viruses at the human-animal interface in Egypt// *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 3. – p. e17730.
252. Keijzer C., Haijema B.J., Meijerhof T., Voorn P., de Haan A., Leenhouts K., van Roosmalen M.L., van Eden W., Broere F. Inactivated influenza vaccine adjuvanted with bacterium-like particles induce systemic and mucosal influenza A virus specific T-cell and B-cell responses after nasal administration in a TLR2 dependent fashion// *Vaccine.* – 2014. – V. 32. – № 24. – p. 2904-10.
253. 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.* – 1997. – V. 13. – № 5. – p. 591-609.
254. Khan A.S., Polezhaev F., Vasiljeva R., Drinevsky V., Buffington J., Gary H., Sominina A., Keitel W., Regnery H., Lonskaya N.L., Doroshenko E., Gavrillov A., Ivakhov I., Arden N., Schonberger L.B., Couch R., Kendal A., Cox N. Comparison of US inactivated split-virus and Russian live attenuated, cold-adapted trivalent influenza vaccines in Russian schoolchildren// *J Infect Dis.* – 1996. – V. 173. – № 2. – p. 453-6.
255. Khurana S., Loving C.L., Manischewitz J., King L.R., Gauger P.C., Henningson J., Vincent A.L., Golding H. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease// *Sci Transl Med.* – 2013. – V. 5. – № 200. – p. 200ra114.
256. Kilbourne E.D. Influenza pandemics of the 20th century// *Emerg Infect Dis.* – 2006. – V. 12. – № 1. – p. 9-14.

257. Kile J.C., Ren R., Liu L., Greene C.M., Roguski K., Iuliano A.D., Jang Y., Jones J., Thor S., Song Y., Zhou S., Trock S.C., Dugan V., Wentworth D.E., Levine M.Z., Uyeki T.M., Katz J.M., Jernigan D.B., Olsen S.J., Fry A.M., Azziz-Baumgartner E., Davis C.T. Update: Increase in Human Infections with Novel Asian Lineage Avian Influenza A(H7N9) Viruses During the Fifth Epidemic - China, October 1, 2016-August 7, 2017// *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2017. – V. 66. – № 35. – p. 928-932.
258. Kimble J.B., Angel M., Wan H., Sutton T.C., Finch C., Perez D.R. Alternative reassortment events leading to transmissible H9N1 influenza viruses in the ferret model// *J Virol.* – 2014. – V. 88. – № 1. – p. 66-71.
259. Kimble J.B., Sorrell E., Shao H., Martin P.L., Perez D.R. Compatibility of H9N2 avian influenza surface genes and 2009 pandemic H1N1 internal genes for transmission in the ferret model// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – V. 108. – № 29. – p. 12084-8.
260. Kiseleva I., Klimov A., Su Q. Role of individual genes of the A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) cold-adapted donor strain in manifestation of the temperature-sensitive phenotype of reassortant influenza A viruses. . in *Options for the Control of Influenza IV.* . 2003: Elsevier.
261. Kiseleva I., Klimov A., Su Q., Szymkowiak C., Toner T., Kwan W., Rudenko L., Shaw A., Youil R. Role of individual genes of the A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) cold-adapted donor strain in manifestation of the temperature-sensitive phenotype of reassortant influenza A viruses// *International Congress Series.* – 2004. – V. 1263. – №. – p. 547-550.
262. 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.* – 2017. – V. 11. – №. – p. 316-329.
263. Kiseleva I., Su Q., Toner T.J., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rudenko L., Shaw A.R., Youil R. Cell-based assay for the determination of temperature sensitive and cold adapted phenotypes of influenza viruses// *J Virol Methods.* – 2004. – V. 116. – № 1. – p. 71-8.
264. Kiseleva I.V., Voeten J.T., Teley L.C., Larionova N.V., Drieszen-van der Crujjsen S.K., Basten S.M., Heldens J.G., van den Bosch H., Rudenko L.G. PB2 and PA genes control the expression of the temperature-sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus// *J Gen Virol.* – 2010. – V. 91. – № Pt 4. – p. 931-7.
265. Klimov A.I., Cox N.J., Yotov W.V., Rocha E., Alexandrova G.I., Kendal A.P. Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus// *Virology.* – 1992. – V. 186. – № 2. – p. 795-7.
266. Klimov A.I., Kiseleva I.V., Alexandrova G.I., Cox N.J. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. in *Options for the Control of Influenza IV.* 2001. Okinawa, Japan: Elsevier Science BV.
267. Klumpp K., Ruigrok R.W., Baudin F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure// *EMBO J.* – 1997. – V. 16. – № 6. – p. 1248-57.
268. Krammer F. Emerging influenza viruses and the prospect of a universal influenza virus vaccine// *Biotechnol J.* – 2015. – V. 10. – № 5. – p. 690-701.
269. Krammer F., Fouchier R.A.M., Eichelberger M.C., Webby R.J., Shaw-Saliba K., Wan H., Wilson P.C., Compans R.W., Skountzou I., Monto A.S. NAction! How Can Neuraminidase-Based Immunity Contribute to Better Influenza Virus Vaccines?// *mBio.* – 2018. – V. 9. – № 2.
270. Krammer F., Hai R., Yondola M., Tan G.S., Leyva-Grado V.H., Ryder A.B., Miller M.S., Rose J.K., Palese P., Garcia-Sastre A., Albrecht R.A. Assessment of influenza virus hemagglutinin stalk-based immunity in ferrets// *J Virol.* – 2014. – V. 88. – № 6. – p. 3432-42.

271. Krammer F., Margine I., Hai R., Flood A., Hirsh A., Tsvetnitsky V., Chen D., Palese P. H3 stalk-based chimeric hemagglutinin influenza virus constructs protect mice from H7N9 challenge// *J Virol.* – 2014. – V. 88. – № 4. – p. 2340-3.
272. Krammer F., Margine I., Tan G.S., Pica N., Krause J.C., Palese P. A carboxy-terminal trimerization domain stabilizes conformational epitopes on the stalk domain of soluble recombinant hemagglutinin substrates// *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – № 8. – p. e43603.
273. Krammer F., Palese P. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines// *Curr Opin Virol.* – 2013. – V. 3. – № 5. – p. 521-30.
274. Krammer F., Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines// *Nat Rev Drug Discov.* – 2015. – V. 14. – № 3. – p. 167-82.
275. Krammer F., Pica N., Hai R., Margine I., Palese P. Chimeric hemagglutinin influenza virus vaccine constructs elicit broadly protective stalk-specific antibodies// *J Virol.* – 2013. – V. 87. – № 12. – p. 6542-50.
276. Krammer F., Pica N., Hai R., Tan G.S., Palese P. Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies Are Boosted following Sequential Infection with Seasonal and Pandemic H1N1 Influenza Virus in Mice// *J Virol.* – 2012. – V. 86. – № 19. – p. 10302-7.
277. Kreijtz J.H., Kroeze E.J., Stittelaar K.J., de Waal L., van Amerongen G., van Trierum S., van Run P., Bestebroer T., Kuiken T., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D. Low pathogenic avian influenza A(H7N9) virus causes high mortality in ferrets upon intratracheal challenge: a model to study intervention strategies// *Vaccine.* – 2013. – V. 31. – № 43. – p. 4995-9.
278. Kulkarni P.S., Agarkhedkar S., Lalwani S., Bavdekar A.R., Jog S., Raut S.K., Parulekar V., Agarkhedkar S.S., Palkar S., Mangrulkar S. Effectiveness of an Indian-made Attenuated influenza A(H1N1)pdm 2009 vaccine: A case control study// *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – V. 10. – № 3.
279. Kulkarni P.S., Agarkhedkar S., Lalwani S., Bavdekar A.R., Jog S., Raut S.K., Parulekar V., Agarkhedkar S.S., Palkar S., Mangrulkar S. Effectiveness of an Indian-made attenuated influenza A(H1N1)pdm 2009 vaccine: a case control study// *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – V. 10. – № 3. – p. 566-71.
280. Lambe T., Carey J.B., Li Y., Spencer A.J., van Laarhoven A., Mullarkey C.E., Vrdoljak A., Moore A.C., Gilbert S.C. Immunity against heterosubtypic influenza virus induced by adenovirus and MVA expressing nucleoprotein and matrix protein-1// *Sci Rep.* – 2013. – V. 3. – №. – p. 1443.
281. Lambre C.R., Terzidis H., Greffard A., Webster R.G. Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates// *J Immunol Methods.* – 1990. – V. 135. – № 1-2. – p. 49-57.
282. Lamere M.W., Moquin A., Lee F.E., Misra R.S., Blair P.J., Haynes L., Randall T.D., Lund F.E., Kaminski D.A. Regulation of antinucleoprotein IgG by systemic vaccination and its effect on influenza virus clearance// *J Virol.* – 2011. – V. 85. – № 10. – p. 5027-35.
283. Lamm M.E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces// *Annu Rev Microbiol.* – 1997. – V. 51. – №. – p. 311-40.
284. Langlois I. Viral diseases of ferrets// *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* – 2005. – V. 8. – № 1. – p. 139-60.
285. Larionova N., Kiseleva I., Isakova-Sivak I., Rekstin A., Dubrovina I., Bazhenova E., Ross T.M., Swayne D., Gubareva L., Tsvetnitsky V., Fedorova E., Doroshenko E., Rudenko L. Live Attenuated Influenza Vaccines against Highly Pathogenic H5N1 avian Influenza: Development and Preclinical Characterization.// *J Vaccines Vaccin.* – 2013. – V. 4:208. – №.
286. Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K., Buus S., Lund O., Nielsen M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction// *BMC Bioinformatics.* – 2007. – V. 8. – №. – p. 424.

287. Lau Y.F., Wright A.R., Subbarao K. The contribution of systemic and pulmonary immune effectors to vaccine-induced protection from H5N1 influenza virus infection// *J Virol.* – 2012. – V. 86. – № 9. – p. 5089-98.
288. Le Bon A., Schiavoni G., D'Agostino G., Gresser I., Belardelli F., Tough D.F. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo// *Immunity.* – 2001. – V. 14. – № 4. – p. 461-70.
289. Lee K.H., Seo S.U., Song J.M., Lee C.M., Kim H.A., Seong B.L. Characterization of live influenza vaccine donor strain derived from cold-adaptation of X-31 virus// *Vaccine.* – 2006. – V. 24. – № 11. – p. 1966-74.
290. Lee M.S., Chen L.H., Chen Y.P., Liu Y.P., Li W.C., Lin Y.L., Lee F. Highly pathogenic avian influenza viruses H5N2, H5N3, and H5N8 in Taiwan in 2015// *Vet Microbiol.* – 2016. – V. 187. – №. – p. 50-57.
291. Lenny B.J., Sonnberg S., Danner A.F., Friedman K., Webby R.J., Webster R.G., Jones J.C. Evaluation of multivalent H2 influenza pandemic vaccines in mice// *Vaccine.* – 2017. – V. 35. – № 10. – p. 1455-1463.
292. Li C., Hatta M., Nidom C.A., Muramoto Y., Watanabe S., Neumann G., Kawaoka Y. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. – № 10. – p. 4687-92.
293. Lillie P.J., Berthoud T.K., Powell T.J., Lambe T., Mullarkey C., Spencer A.J., Hamill M., Peng Y., Blais M.E., Duncan C.J., Sheehy S.H., Havelock T., Faust S.N., Williams R.L., Gilbert A., Oxford J., Dong T., Hill A.V., Gilbert S.C. Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans// *Clin Infect Dis.* – 2012. – V. 55. – № 1. – p. 19-25.
294. Lindstrom S.E., Cox N.J., Klimov A. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events// *Virology.* – 2004. – V. 328. – № 1. – p. 101-19.
295. Lingel A., Bullard B.L., Weaver E.A. Efficacy of an Adenoviral Vected Multivalent Centralized Influenza Vaccine// *Sci Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1. – p. 14912.
296. Linster M., van Boheemen S., de Graaf M., Schrauwen E.J., Lexmond P., Manz B., Bestebroer T.M., Baumann J., van Riel D., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Matrosovich M., Fouchier R.A., Herfst S. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus// *Cell.* – 2014. – V. 157. – № 2. – p. 329-39.
297. Liu C.G., Liu M., Liu F., Lv R., Liu D.F., Qu L.D., Zhang Y. Emerging multiple reassortant H5N5 avian influenza viruses in ducks, China, 2008// *Vet Microbiol.* – 2013. – V. 167. – № 3-4. – p. 296-306.
298. Liu D., Zhang Z., He L., Gao Z., Li J., Gu M., Hu J., Wang X., Liu X., Liu X. Characteristics of the emerging chicken-origin highly pathogenic H7N9 viruses: A new threat to public health and poultry industry// *J Infect.* – 2018. – V. 76. – № 2. – p. 217-220.
299. Liu J., Shi X., Schwartz R., Kemble G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 46. – p. 6460-3.
300. Liu K., Yao Z., Zhang L., Li J., Xing L., Wang X. MDCK cell-cultured influenza virus vaccine protects mice from lethal challenge with different influenza viruses// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – V. 94. – № 5. – p. 1173-9.
301. Liu L., Nachbagauer R., Zhu L., Huang Y., Xie X., Jin S., Zhang A., Wan Y., Hirsh A., Tian D., Shi X., Dong Z., Yuan S., Hu Y., Krammer F., Zhang X., Xu J. Induction of Broadly Cross-Reactive Stalk-Specific Antibody Responses to Influenza Group 1 and Group 2 Hemagglutinins by Natural H7N9 Virus Infection in Humans// *J Infect Dis.* – 2017. – V. 215. – № 4. – p. 518-528.
302. Lu S., Zhao Z., Zhang J., Wang W., He X., Yu M., Zhang C., Li X., Guo Z., Yang X., Liu L., Zhi M., Fu T., Lv X., Ma W., Liao M., Chai H., Liu L., Qian J., Ma J. Genetics,

- pathogenicity and transmissibility of novel reassortant H5N6 highly pathogenic avian influenza viruses first isolated from migratory birds in western China// *Emerg Microbes Infect.* – 2018. – V. 7. – № 1. – p. 6.
303. Lu X., Edwards L.E., Desheva J.A., Nguyen D.C., Rekstin A., Stephenson I., Szretter K., Cox N.J., Rudenko L.G., Klimov A., Katz J.M. Cross-protective immunity in mice induced by live-attenuated or inactivated vaccines against highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses// *Vaccine.* – 2006. – V. 24. – № 44-46. – p. 6588-93.
304. Luke C.J., Subbarao K. Improving pandemic H5N1 influenza vaccines by combining different vaccine platforms// *Expert Rev Vaccines.* – 2014. – V. 13. – № 7. – p. 873-83.
305. 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.* – 2007. – V. 104. – № 52. – p. 20949-54.
306. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c// *Nature.* – 1967. – V. 213. – № 5076. – p. 612-4.
307. Maassab H.F., Bryant M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans// *Rev Med Virol.* – 1999. – V. 9. – № 4. – p. 237-44.
308. Maassab H.F., Kendal A.P., Abrams G.D., Monto A.S. Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets// *J Infect Dis.* – 1982. – V. 146. – № 6. – p. 780-90.
309. Machkovech H.M., Bedford T., Suchard M.A., Bloom J.D. Positive Selection in CD8+ T-Cell Epitopes of Influenza Virus Nucleoprotein Revealed by a Comparative Analysis of Human and Swine Viral Lineages// *J Virol.* – 2015. – V. 89. – № 22. – p. 11275-83.
310. Madan A., Segall N., Ferguson M., Frenette L., Kroll R., Friel D., Soni J., Li P., Innis B.L., Schuind A. Immunogenicity and Safety of an AS03-Adjuvanted H7N9 Pandemic Influenza Vaccine in a Randomized Trial in Healthy Adults// *J Infect Dis.* – 2016. – V. 214. – № 11. – p. 1717-1727.
311. Maher J.A., DeStefano J. The ferret: an animal model to study influenza virus// *Lab Anim (NY).* – 2004. – V. 33. – № 9. – p. 50-3.
312. 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.* – 1999. – V. 80 (Pt 12). – №. – p. 3167-71.
313. Manini I., Trombetta C.M., Lazzeri G., Pozzi T., Rossi S., Montomoli E. Egg-Independent Influenza Vaccines and Vaccine Candidates// *Vaccines (Basel).* – 2017. – V. 5. – № 3.
314. Margine I., Krammer F., Hai R., Heaton N.S., Tan G.S., Andrews S.A., Runstadler J.A., Wilson P.C., Albrecht R.A., Garcia-Sastre A., Palese P. Hemagglutinin stalk-based universal vaccine constructs protect against group 2 influenza A viruses// *J Virol.* – 2013. – V. 87. – № 19. – p. 10435-46.
315. Margine I., Palese P., Krammer F. Expression of functional recombinant hemagglutinin and neuraminidase proteins from the novel H7N9 influenza virus using the baculovirus expression system// *J Vis Exp.* – 2013. – V. – № 81. – p. e51112.
316. Martinez-Baz I., Casado I., Navascues A., Diaz-Gonzalez J., Aguinaga A., Barrado L., Delfrade J., Ezpeleta C., Castilla J. Effect of Repeated Vaccination With the Same Vaccine Component Against 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus// *J Infect Dis.* – 2017. – V. 215. – № 6. – p. 847-855.
317. Masoodi T.A., Shaik N.A., Shafi G., Munshi A., Ahamed A.K., Masoodi Z.A. Comparative analysis of hemagglutinin of 2009 H1N1 influenza A pandemic indicates its evolution to 1918 H1N1 pandemic// *Gene.* – 2012. – V. 491. – № 2. – p. 200-4.
318. 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// *J Virol.* – 2000. – V. 74. – № 18. – p. 8502-12.

319. Matsuzaki Y., Katsushima N., Nagai Y., Shoji M., Itagaki T., Sakamoto M., Kitaoka S., Mizuta K., Nishimura H. Clinical features of influenza C virus infection in children// *J Infect Dis.* – 2006. – V. 193. – № 9. – p. 1229-35.
320. Matsuzaki Y., Sugawara K., Mizuta K., Tsuchiya E., Muraki Y., Hongo S., Suzuki H., Nakamura K. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata City, Japan, in 1996 and 1998// *J Clin Microbiol.* – 2002. – V. 40. – № 2. – p. 422-9.
321. Matsuzaki Y., Sugawara K., Takashita E., Muraki Y., Hongo S., Katsushima N., Mizuta K., Nishimura H. Genetic diversity of influenza B virus: the frequent reassortment and cocirculation of the genetically distinct reassortant viruses in a community// *J Med Virol.* – 2004. – V. 74. – № 1. – p. 132-40.
322. Matyushenko V., Isakova-Sivak I., Smolonogina T., Dubrovina I., Tretiak T., Rudenko L. Genotyping assay for differentiation of wild-type and vaccine viruses in subjects immunized with live attenuated influenza vaccine// *PLoS One.* – 2017. – V. 12. – № 7. – p. e0180497.
323. Mazanec M.B., Kaetzel C.S., Lamm M.E., Fletcher D., Nedrud J.G. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – V. 89. – № 15. – p. 6901-5.
324. McCullers J.A. Preparing for the next influenza pandemic// *Pediatr Infect Dis J.* – 2008. – V. 27. – № 10 Suppl. – p. S57-9.
325. McLean H.Q., Caspard H., Griffin M.R., Poehling K.A., Gaglani M., Belongia E.A., Talbot H.K., Peters T.R., Murthy K., Ambrose C.S. Effectiveness of live attenuated influenza vaccine and inactivated influenza vaccine in children during the 2014-2015 season// *Vaccine.* – 2017. – V. 35. – № 20. – p. 2685-2693.
326. McLean H.Q., Thompson M.G., Sundaram M.E., Meece J.K., McClure D.L., Friedrich T.C., Belongia E.A. Impact of repeated vaccination on vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) and B during 8 seasons// *Clin Infect Dis.* – 2014. – V. 59. – № 10. – p. 1375-85.
327. McMichael A.J., Gotch F.M., Noble G.R., Beare P.A. Cytotoxic T-cell immunity to influenza// *N Engl J Med.* – 1983. – V. 309. – № 1. – p. 13-7.
328. Memoli M.J., Shaw P.A., Han A., Czajkowski L., Reed S., Athota R., Bristol T., Fargis S., Riso K., Powers J.H., Davey R.T., Jr., Taubenberger J.K. Evaluation of Antihemagglutinin and Antineuraminidase Antibodies as Correlates of Protection in an Influenza A/H1N1 Virus Healthy Human Challenge Model// *MBio.* – 2016. – V. 7. – № 2. – p. e00417-16.
329. Milian E., Kamen A.A. Current and Emerging Cell Culture Manufacturing Technologies for Influenza Vaccines// *Biomed Res Int.* – 2015. – V. 2015. – №. – p. 504831.
330. Miller M.S., Tsibane T., Krammer F., Hai R., Rahmat S., Basler C.F., Palese P. 1976 and 2009 H1N1 influenza virus vaccines boost anti-hemagglutinin stalk antibodies in humans// *J Infect Dis.* – 2013. – V. 207. – № 1. – p. 98-105.
331. Minor P.D., Engelhardt O.G., Wood J.M., Robertson J.S., Blayer S., Colegate T., Fabry L., Heldens J.G., Kino Y., Kistner O., Kompier R., Makizumi K., Medema J., Mimori S., Ryan D., Schwartz R., Smith J.S., Sugawara K., Trusheim H., Tsai T.F., Krause R. Current challenges in implementing cell-derived influenza vaccines: implications for production and regulation, July 2007, NIBSC, Potters Bar, UK// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 22. – p. 2907-13.
332. Monto A.S., Petrie J.G., Cross R.T., Johnson E., Liu M., Zhong W., Levine M., Katz J.M., Ohmit S.E. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection// *J Infect Dis.* – 2015. – V. 212. – № 8. – p. 1191-9.
333. Montomoli E., Khadang B., Piccirella S., Trombetta C., Mennitto E., Manini I., Stanzani V., Lapini G. Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production// *Expert Rev Vaccines.* – 2012. – V. 11. – № 5. – p. 587-94.
334. Moriyama M., Takeyama H., Hasegawa H., Ichinohe T. Induction of lung CD8(+) T cell responses by consecutive inoculations of a poly(I:C) influenza vaccine// *Vaccine.* – 2017. – V. 35. – № 48 Pt B. – p. 6620-6626.

335. Morokutti A., Muster T., Ferko B. Intranasal vaccination with a replication-deficient influenza virus induces heterosubtypic neutralising mucosal IgA antibodies in humans// *Vaccine*. – 2014. – V. 32. – № 17. – p. 1897-900.
336. Mulligan M.J., Bernstein D.I., Winokur P., Rupp R., Anderson E., Roupheal N., Dickey M., Stapleton J.T., Edupuganti S., Spearman P., Ince D., Noah D.L., Hill H., Bellamy A.R., Group D.H.N.V.S. Serological responses to an avian influenza A/H7N9 vaccine mixed at the point-of-use with MF59 adjuvant: a randomized clinical trial// *JAMA*. – 2014. – V. 312. – № 14. – p. 1409-19.
337. Murakami S., Horimoto T., Mai le Q., Nidom C.A., Chen H., Muramoto Y., Yamada S., Iwasa A., Iwatsuki-Horimoto K., Shimojima M., Iwata A., Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells// *J Virol*. – 2008. – V. 82. – № 21. – p. 10502-9.
338. Myers K.P., Olsen C.W., Gray G.C. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature// *Clin Infect Dis*. – 2007. – V. 44. – № 8. – p. 1084-8.
339. Nabel G.J., Fauci A.S. Induction of unnatural immunity: prospects for a broadly protective universal influenza vaccine// *Nat Med*. – 2010. – V. 16. – № 12. – p. 1389-91.
340. Nabel G.J., Wei C.J., Ledgerwood J.E. Vaccinate for the next H2N2 pandemic now// *Nature*. – 2011. – V. 471. – № 7337. – p. 157-8.
341. Nachbagauer R., Kinzler D., Choi A., Hirsh A., Beaulieu E., Lecrenier N., Innis B.L., Palese P., Mallett C.P., Krammer F. A chimeric haemagglutinin-based influenza split virion vaccine adjuvanted with AS03 induces protective stalk-reactive antibodies in mice// *NPJ Vaccines*. – 2016. – V. 1. – №.
342. Nachbagauer R., Krammer F. Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies// *Clin Microbiol Infect*. – 2017. – V. 23. – № 4. – p. 222-228.
343. Nachbagauer R., Liu W.-C., Choi A., Wohlbold T.J., Atlas T., Rajendran M., Solórzano A., Berlanda-Scorza F., García-Sastre A., Palese P., Albrecht R., Krammer F. A universal influenza virus vaccine candidate confers protection against pandemic H1N1 infection in preclinical ferret studies// *npj Vaccines*. – 2017. – V. 2. – № 26. – p. 1-13.
344. Nachbagauer R., Miller M.S., Hai R., Ryder A.B., Rose J.K., Palese P., Garcia-Sastre A., Krammer F., Albrecht R.A. Hemagglutinin Stalk Immunity Reduces Influenza Virus Replication and Transmission in Ferrets// *J Virol*. – 2015. – V. 90. – № 6. – p. 3268-73.
345. Nachbagauer R., Wohlbold T.J., Hirsh A., Hai R., Sjursen H., Palese P., Cox R.J., Krammer F. Induction of broadly reactive anti-hemagglutinin stalk antibodies by an H5N1 vaccine in humans// *J Virol*. – 2014. – V. 88. – № 22. – p. 13260-8.
346. Nakada S., Creager R.S., Krystal M., Aaronson R.P., Palese P. Influenza C virus hemagglutinin: comparison with influenza A and B virus hemagglutinins// *J Virol*. – 1984. – V. 50. – № 1. – p. 118-24.
347. Nakajima S., Brown D.J., Ueda M., Nakajima K., Sugiura A., Pattnaik A.K., Nayak D.P. Identification of the defects in the hemagglutinin gene of two temperature-sensitive mutants of A/WSN/33 influenza virus// *Virology*. – 1986. – V. 154. – № 2. – p. 279-85.
348. Nakatsu S., Murakami S., Shindo K., Horimoto T., Sagara H., Noda T., Kawaoka Y. Influenza C and D viruses package eight organized ribonucleoprotein complexes// *J Virol*. – 2018. – V. – №.
349. Naykhin A., Petukhova G., Chirkova T., Korenkov D., Donina S., Rudenko L. Virus-specific CD4+ and CD8+ memory T-cells in young volunteers after immunization with pandemic live attenuated reassortant influenza vaccines A(H5N2) and A(H1N1)// *Influenza and other respiratory viruses*. – 2011. – V. 5 (Suppl. 1). – №. – p. 195-201.
350. 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*. – 2011. – V. 3. – №. – p. 38-44.

351. Nechaeva E.A., Sen'kina T.Y., Ryzhikov A.B., Radaeva I.F., P'Yankova O G., Danil'chenko N.V., Sviridenko T.M., Bogryantzeva M.P., Gilina N.V., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of live cultural pandemic influenza vaccine Vector-Flu// BMC Proc. – 2011. – V. 5 Suppl 8. – №. – p. P104.
352. Nedland H., Wollman J., Sreenivasan C., Quast M., Singrey A., Fawcett L., Christopher-Hennings J., Nelson E., Kaushik R.S., Wang D., Li F. Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States// Zoonoses Public Health. – 2018. – V. 65. – № 1. – p. e148-e154.
353. Neumann G., Kawaoka Y. Transmission of influenza A viruses// Virology. – 2015. – V. 479-480. – №. – p. 234-46.
354. Neuzil K., Ortiz J., Influenza Vaccines and Vaccination Strategies, in The Vaccine Book. 2016.
355. Nguyen-Van-Tam J.S., Nair P., Acheson P., Baker A., Barker M., Bracebridge S., Croft J., Ellis J., Gellertlie R., Gent N., Ibbotson S., Joseph C., Mahgoub H., Monk P., Reghitt T.W., Sundkvist T., Sellwood C., Simpson J., Smith J., Watson J.M., Zambon M., Lightfoot N., Incident Response T. Outbreak of low pathogenicity H7N3 avian influenza in UK, including associated case of human conjunctivitis// Euro Surveill. – 2006. – V. 11. – № 5. – p. E060504 2.
356. Nguyen D.C., Uyeki T.M., Jadhao S., Maines T., Shaw M., Matsuoka Y., Smith C., Rowe T., Lu X., Hall H., Xu X., Balish A., Klimov A., Tumpey T.M., Swayne D.E., Huynh L.P., Nghiem H.K., Nguyen H.H., Hoang L.T., Cox N.J., Katz J.M. Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001// J Virol. – 2005. – V. 79. – № 7. – p. 4201-12.
357. Nguyen H.H., Moldoveanu Z., Novak M.J., van Ginkel F.W., Ban E., Kiyono H., McGhee J.R., Mestecky J. Heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection is associated with virus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocyte responses induced in mucosa-associated tissues// Virology. – 1999. – V. 254. – № 1. – p. 50-60.
358. Nicholson K.G., Colegate A.E., Podda A., Stephenson I., Wood J., Ypma E., Zambon M.C. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza// Lancet. – 2001. – V. 357. – № 9272. – p. 1937-43.
359. Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Kesmir C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage// Immunogenetics. – 2005. – V. 57. – № 1-2. – p. 33-41.
360. Nohynek H., Baum U., Syrjanen R., Ikonen N., Sundman J., Jokinen J. Effectiveness of the live attenuated and the inactivated influenza vaccine in two-year-olds - a nationwide cohort study Finland, influenza season 2015/16// Euro Surveill. – 2016. – V. 21. – № 38.
361. O'Hagan D.T., Ott G.S., Nest G.V., Rappuoli R., Giudice G.D. The history of MF59((R)) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes// Expert Rev Vaccines. – 2013. – V. 12. – № 1. – p. 13-30.
362. O'Neill R.E., Talon J., Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins// EMBO J. – 1998. – V. 17. – № 1. – p. 288-96.
363. Ohmit S.E., Petrie J.G., Cross R.T., Johnson E., Monto A.S. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection// J Infect Dis. – 2011. – V. 204. – № 12. – p. 1879-85.
364. Ohmit S.E., Petrie J.G., Malosh R.E., Fry A.M., Thompson M.G., Monto A.S. Influenza vaccine effectiveness in households with children during the 2012-2013 season: assessments of prior vaccination and serologic susceptibility// J Infect Dis. – 2015. – V. 211. – № 10. – p. 1519-28.
365. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Available at: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> 7th Edition, Volumes 1 and 2. 1404 pages. – 2012. – V. – №.

366. Ortiz J.R., Goswami D., Lewis K.D., Sharmeen A.T., Ahmed M., Rahman M., Rahman M.Z., Feser J., Neuzil K.M., Brooks W.A. Safety of Russian-backbone seasonal trivalent, live-attenuated influenza vaccine in a phase II randomized placebo-controlled clinical trial among children in urban Bangladesh// *Vaccine*. – 2015. – V. 33. – № 29. – p. 3415-21.
367. Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A. Influenza B virus in seals// *Science*. – 2000. – V. 288. – № 5468. – p. 1051-3.
368. Oxford J.S., McGeoch D.J., Schild G.C., Beare A.S. Analysis of virion RNA segments and polypeptides of influenza A virus recombinants of defined virulence// *Nature*. – 1978. – V. 273. – № 5665. – p. 778-9.
369. Palese P. Influenza: old and new threats// *Nat Med*. – 2004. – V. 10. – № 12 Suppl. – p. S82-7.
370. Palker T., Kiseleva I., Johnston K., Su Q., Toner T., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rubin B., Petrukhin L., Wlochowski J., Monteiro J., Kraiouchkine N., DiStefano D., Rudenko L., Shaw A., Youil R. Protective efficacy of intranasal cold-adapted influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) vaccines comprised of egg- or cell culture-derived reassortants// *Virus Res*. – 2004. – V. 105. – № 2. – p. 183-94.
371. Pantin-Jackwood M.J., Swayne D.E. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds// *Rev Sci Tech*. – 2009. – V. 28. – № 1. – p. 113-36.
372. Park J.K., Han A., Czajkowski L., Reed S., Athota R., Bristol T., Rosas L.A., Cervantes-Medina A., Taubenberger J.K., Memoli M.J. Evaluation of Preexisting Anti-Hemagglutinin Stalk Antibody as a Correlate of Protection in a Healthy Volunteer Challenge with Influenza A/H1N1pdm Virus// *MBio*. – 2018. – V. 9. – № 1.
373. Paules C.I., Marston H.D., Eisinger R.W., Baltimore D., Fauci A.S. The Pathway to a Universal Influenza Vaccine// *Immunity*. – 2017. – V. 47. – № 4. – p. 599-603.
374. Pebody R., Sile B., Warburton F., Sinnathamby M., Tsang C., Zhao H., Ellis J., Andrews N. Live attenuated influenza vaccine effectiveness against hospitalisation due to laboratory-confirmed influenza in children two to six years of age in England in the 2015/16 season// *Euro Surveill*. – 2017. – V. 22. – № 4.
375. Penttinen P.M., Friede M.H. Decreased effectiveness of the influenza A(H1N1)pdm09 strain in live attenuated influenza vaccines: an observational bias or a technical challenge?// *Euro Surveill*. – 2016. – V. 21. – № 38.
376. Perdue M.L., Arnold F., Li S., Donabedian A., Cioce V., Warf T., Huebner R. The future of cell culture-based influenza vaccine production// *Expert Rev Vaccines*. – 2011. – V. 10. – № 8. – p. 1183-94.
377. Petrie J.G., Malosh R.E., Cheng C.K., Ohmit S.E., Martin E.T., Johnson E., Truscon R., Eichelberger M.C., Gubareva L.V., Fry A.M., Monto A.S. The Household Influenza Vaccine Effectiveness Study: Lack of Antibody Response and Protection Following Receipt of 2014-2015 Influenza Vaccine// *Clin Infect Dis*. – 2017. – V. 65. – № 10. – p. 1644-1651.
378. Petukhova G., Naikhin A., Chirkova T., Donina S., Korenkov D., Rudenko L. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated reassortant influenza vaccine (LAIIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method// *Vaccine*. – 2009. – V. 27. – № 19. – p. 2580-7.
379. Pica N., Hai R., Krammer F., Wang T.T., Maamary J., Eggink D., Tan G.S., Krause J.C., Moran T., Stein C.R., Banach D., Wrammert J., Belshe R.B., Garcia-Sastre A., Palese P. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses// *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – V. 109. – № 7. – p. 2573-8.
380. Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity// *Cell*. – 1992. – V. 69. – № 3. – p. 517-28.
381. Pitisuttithum P., Boonnak K., Chamnanchanunt S., Puthavathana P., Luvira V., Lerdsamran H., Kaewkungwal J., Lawpoolsri S., Thanachartwet V., Silachamroon U., Masamae W.,

- Schuetz A., Wirachwong P., Thirapakpoomanunt S., Rudenko L., Sparrow E., Friede M., Kieny M.P. 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.* – 2017. – V. 17. – № 8. – p. 833-842.
382. Pleguezuelos O., Robinson S., Fernandez A., Stoloff G.A., Mann A., Gilbert A., Balaratnam G., Wilkinson T., Lambkin-Williams R., Oxford J., Caparros-Wanderley W. A Synthetic Influenza Virus Vaccine Induces a Cellular Immune Response That Correlates with Reduction in Symptomatology and Virus Shedding in a Randomized Phase Ib Live-Virus Challenge in Humans// *Clin Vaccine Immunol.* – 2015. – V. 22. – № 7. – p. 828-35.
383. Pleguezuelos O., Robinson S., Stoloff G.A., Caparros-Wanderley W. Synthetic Influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial// *Vaccine.* – 2012. – V. 30. – № 31. – p. 4655-60.
384. Powell T.J., Strutt T., Reome J., Hollenbaugh J.A., Roberts A.D., Woodland D.L., Swain S.L., Dutton R.W. Priming with cold-adapted influenza A does not prevent infection but elicits long-lived protection against supralethal challenge with heterosubtypic virus// *J Immunol.* – 2007. – V. 178. – № 2. – p. 1030-8.
385. Prabakaran M., He F., Meng T., Madhan S., Yunrui T., Jia Q., Kwang J. Neutralizing epitopes of influenza virus hemagglutinin: target for the development of a universal vaccine against H5N1 lineages// *J Virol.* – 2010. – V. 84. – № 22. – p. 11822-30.
386. 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// *Emerging Infectious Diseases.* – 2006. – V. 12. – № 10. – p. 1548-1558.
387. Pyhala R. Antibody status to influenza A/Singapore/1/57(H2N2) in Finland during a period of outbreaks caused by H3N2 and H1N1 subtype viruses// *J Hyg (Lond).* – 1985. – V. 95. – № 2. – p. 437-45.
388. Qi W., Jia W., Liu D., Li J., Bi Y., Xie S., Li B., Hu T., Du Y., Xing L., Zhang J., Zhang F., Wei X., Eden J.S., Li H., Tian H., Li W., Su G., Lao G., Xu C., Xu B., Liu W., Zhang G., Ren T., Holmes E.C., Cui J., Shi W., Gao G.F., Liao M. 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.* – 2018. – V. 92. – № 2.
389. Qiao C., Liu Q., Bawa B., Shen H., Qi W., Chen Y., Mok C.K., Garcia-Sastre A., Richt J.A., Ma W. Pathogenicity and transmissibility of reassortant H9 influenza viruses with genes from pandemic H1N1 virus// *J Gen Virol.* – 2012. – V. 93. – № Pt 11. – p. 2337-45.
390. Quinones-Parra S., Grant E., Loh L., Nguyen T.H., Campbell K.A., Tong S.Y., Miller A., Doherty P.C., Vijaykrishna D., Rossjohn J., Gras S., Kedzierska K. Preexisting CD8+ T-cell immunity to the H7N9 influenza A virus varies across ethnicities// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – V. 111. – № 3. – p. 1049-54.
391. Rajao D.S., Perez D.R. Universal Vaccines and Vaccine Platforms to Protect against Influenza Viruses in Humans and Agriculture// *Front Microbiol.* – 2018. – V. 9. – №. – p. 123.
392. Ramanunninair M., Le J., Onodera S., Fulvini A.A., Pokorny B.A., Silverman J., Devis R., Arroyo J.M., He Y., Boyne A., Bera J., Halpin R., Hine E., Spiro D.J., Bucher D. Molecular signature of high yield (growth) influenza A virus reassortants prepared as candidate vaccine seeds// *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 6. – p. e65955.
393. Rambaut A., Pybus O.G., Nelson M.I., Viboud C., Taubenberger J.K., Holmes E.C. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus// *Nature.* – 2008. – V. 453. – № 7195. – p. 615-9.
394. Ramos E.L., Mitcham J.L., Koller T.D., Bonavia A., Usner D.W., Balaratnam G., Fredlund P., Swiderek K.M. Efficacy and safety of treatment with an anti-m2e monoclonal antibody in experimental human influenza// *J Infect Dis.* – 2015. – V. 211. – № 7. – p. 1038-44.

395. 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., Del Giudice G., Finco O., Kang T.H., Ippolito G.C., Georgiou G., Kepler T.B., Haynes B.F., Moody M.A., Liao H.X., Schmidt A.G., Harrison S.C. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain// *Nat Med.* – 2016. – V. 22. – № 12. – p. 1465-1469.
396. Reed C., Meltzer M.I., Finelli L., Fiore A. Public health impact of including two lineages of influenza B in a quadrivalent seasonal influenza vaccine// *Vaccine.* – 2012. – V. 30. – № 11. – p. 1993-8.
397. Reid A.H., Taubenberger J.K., Fanning T.G. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus// *Nat Rev Microbiol.* – 2004. – V. 2. – № 11. – p. 909-14.
398. Rekstin A., Desheva Y., Kiseleva I., Ross T., Swayne D., Rudenko L. Live Attenuated Influenza H7N3 Vaccine is Safe, Immunogenic and Confers Protection in Animal Models// *Open Microbiol J.* – 2014. – V. 8. – №. – p. 154-62.
399. Rekstin A., Isakova-Sivak I., Petukhova G., Korenkov D., Losev I., Smolonogina T., Tretiak T., Donina S., Shcherbik S., Bousse T., Rudenko L. Immunogenicity and Cross Protection in Mice Afforded by Pandemic H1N1 Live Attenuated Influenza Vaccine Containing Wild-Type Nucleoprotein// *Biomed Res Int.* – 2017. – V. 2017. – №. – p. 9359276.
400. Rekstin A.R., Kiseleva I.V., Klimov A.I., Katz J.M., Rudenko L.G. Interferon and other proinflammatory cytokine responses in vitro following infection with wild-type and cold-adapted reassortant influenza viruses// *Vaccine.* – 2006. – V. 24. – № 44-46. – p. 6581-4.
401. Renegar K.B., Small P.A., Jr., Boykins L.G., Wright P.F. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract// *J Immunol.* – 2004. – V. 173. – № 3. – p. 1978-86.
402. Reuman P.D., Keely S., Schiff G.M. Assessment of signs of influenza illness in the ferret model// *J Virol Methods.* – 1989. – V. 24. – № 1-2. – p. 27-34.
403. Rhorer J., Ambrose C.S., Dickinson S., Hamilton H., Oleka N.A., Malinoski F.J., Wittes J. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children: A meta-analysis of nine randomized clinical trials// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 7. – p. 1101-10.
404. 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.* – 1979. – V. 1. – № 3. – p. 413-33.
405. Rimmelzwaan G.F., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development// *Curr Opin Biotechnol.* – 2007. – V. 18. – № 6. – p. 529-36.
406. Rimmelzwaan G.F., Kreijtz J.H., Bodewes R., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Influenza virus CTL epitopes, remarkably conserved and remarkably variable// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 45. – p. 6363-5.
407. Rogers G.N., Paulson J.C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin// *Virology.* – 1983. – V. 127. – № 2. – p. 361-73.
408. Rolfes M., Blanton L., Brammer L., Smith S., Mustaquim D., Steffens C., Cohen J., Leon M., Chaves S.S., Abd Elal A.I., Gubareva L., Hall H., Wallis T., Villanueva J., Bresee J., Cox N., Finelli L., Centers for Disease C., Prevention. Update: influenza activity - United States, September 28- December 6, 2014// *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2014. – V. 63. – № 50. – p. 1189-94.
409. Romanova J., Katinger D., Ferko B., Vcelar B., Sereinig S., Kuznetsov O., Stukova M., Erofeeva M., Kiselev O., Katinger H., Egorov A. Live cold-adapted influenza A vaccine produced in Vero cell line// *Virus Res.* – 2004. – V. 103. – № 1-2. – p. 187-93.
410. Romanova J., Krenn B.M., Wolschek M., Ferko B., Romanovskaja-Romanko E., Morokutti A., Shurygina A.P., Nakowitsch S., Ruthsatz T., Kiefmann B., Konig U., Bergmann M., Sachet M., Balasingam S., Mann A., Oxford J., Slais M., Kiselev O., Muster T., Egorov A.

- Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine// *PLoS One*. – 2009. – V. 4. – № 6. – p. e5984.
411. Rondy M., Kissling E., Emborg H.D., Gherasim A., Pebody R., Trebbien R., Pozo F., Larrauri A., McMenamin J., Valenciano M., Group I.M.I.-M. Interim 2017/18 influenza seasonal vaccine effectiveness: combined results from five European studies// *Euro Surveill*. – 2018. – V. 23. – № 9.
412. 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*. – 2017. – V. 65. – № 11. – p. 1914-1920.
413. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X., Lim W., Fukuda K., Cox N.J., Katz J.M. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays// *J Clin Microbiol*. – 1999. – V. 37. – № 4. – p. 937-43.
414. 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*. – 2001. – V. 1219. – №. – p. 945-950.
415. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S., Mironov A., Rekstin A., Grigorieva E., Donina S., Gambaryan A., Katlinsky A. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I-II clinical trials)// *Influenza Other Respi Viruses*. – 2008. – V. 2. – № 6. – p. 203-9.
416. Rudenko L., Isakova-Sivak I. Pandemic preparedness with live attenuated influenza vaccines based on A/Leningrad/134/17/57 master donor virus// *Expert Rev Vaccines*. – 2015. – V. 14. – № 3. – p. 395-412.
417. Rudenko L., Isakova-Sivak I., Donina S. H7N3 live attenuated influenza vaccine has a potential to protect against new H7N9 avian influenza virus// *Vaccine*. – 2013. – V. 31. – № 42. – p. 4702-5.
418. Rudenko L., Kiseleva I., Naykhin A.N., Erofeeva M., Stukova M., Donina S., Petukhova G., Pisareva M., Krivitskaya V., Grudin M., Buzitskaya Z., Isakova-Sivak I., Kuznetsova S., Larionova N., Desheva J., Dubrovina I., Nikiforova A., Victor J.C., Neuzil K., Flores J., Tsvetnitsky V., Kiselev O. Assessment of human immune responses to H7 avian influenza virus of pandemic potential: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study of live attenuated H7N3 influenza vaccine// *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 2. – p. e87962.
419. 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*. – 2015. – V. 11. – № 12. – p. 2839-48.
420. Rudenko L., Slepushkin A., Monto A., Grigorieva E., Rekstin A., Bragina V., Kendal A., Cox N., Y. G., Alexandrova G. Comparative studies of the efficacy of live attenuated and inactivated vaccines in children in Novgorod// *Options for the control of influenza II*. - Elsevier Science Publishers. – 1993. – V. – №. – p. 85-90.
421. Rudenko L., van den Bosch H., Kiseleva I., Mironov A., Naikhin A., Larionova N., Bushmenkov D. Live attenuated pandemic influenza vaccine: clinical studies on A/17/California/2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries// *Vaccine*. – 2011. – V. 29 Suppl 1. – №. – p. A40-4.
422. Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories// *Vaccine*. – 2016. – V. – №.

423. Rudenko L.G., Arden N.H., Grigorieva E., Naychin A., Rekstin A., Klimov A.I., Donina S., Desheva J., Holman R.C., DeGuzman A., Cox N.J., Katz J.M. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and US inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents// *Vaccine*. – 2000. – V. 19. – № 2-3. – p. 308-18.
424. 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*. – 1996. – V. 74. – № 1. – p. 77-84.
425. Rudenko L.G., Slepishkin 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., et al. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia// *J Infect Dis*. – 1993. – V. 168. – № 4. – p. 881-7.
426. Ruigrok R.W., Barge A., Durrer P., Brunner J., Ma K., Whittaker G.R. Membrane interaction of influenza virus M1 protein// *Virology*. – 2000. – V. 267. – № 2. – p. 289-98.
427. Ryder A.B., Nachbagauer R., Buonocore L., Palese P., Krammer F., Rose J.K. Vaccination with Vesicular Stomatitis Virus-Vectored Chimeric Hemagglutinins Protects Mice against Divergent Influenza Virus Challenge Strains// *J Virol*. – 2015. – V. 90. – № 5. – p. 2544-50.
428. Sagawa H., Ohshima A., Kato I., Okuno Y., Isegawa Y. The immunological activity of a deletion mutant of influenza virus haemagglutinin lacking the globular region// *J Gen Virol*. – 1996. – V. 77 (Pt 7). – №. – p. 1483-7.
429. Saha S., Yoshida S., Ohba K., Matsui K., Matsuda T., Takeshita F., Umeda K., Tamura Y., Okuda K., Klinman D., Xin K.Q., Okuda K. A fused gene of nucleoprotein (NP) and herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus// *Virology*. – 2006. – V. 354. – № 1. – p. 48-57.
430. Sakabe S., Ozawa M., Takano R., Iwastuki-Horimoto K., Kawaoka Y. Mutations in PA, NP, and HA of a pandemic (H1N1) 2009 influenza virus contribute to its adaptation to mice// *Virus Res*. – 2011. – V. 158. – № 1-2. – p. 124-9.
431. Schafer J., Khristova M.L., Busse T.L., Sinnecker R., Kharitonov I.G., Schrader C., Suss J., Bucher D. Analysis of internal proteins of influenza A (H2N2) viruses isolated from birds in East Germany in 1983// *Acta Virol*. – 1992. – V. 36. – № 2. – p. 113-20.
432. Schafer J.R., Kawaoka Y., Bean W.J., Suss J., Senne D., Webster R.G. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir// *Virology*. – 1993. – V. 194. – № 2. – p. 781-8.
433. Schild G.C., Oxford J.S., Dowdle W.R., Coleman M., Pereira M.S., Chakraverty P. Antigenic variation in current influenza A viruses: evidence for a high frequency of antigenic 'drift' for the Hong Kong virus// *Bull World Health Organ*. – 1974. – V. 51. – № 1. – p. 1-11.
434. Scholtissek C., Rohde W., Von Hoyningen V., Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2// *Virology*. – 1978. – V. 87. – № 1. – p. 13-20.
435. Seo S.U., Byun Y.H., Lee E.Y., Jung E.J., Jang Y.H., Kim H.A., Ha S.H., Lee K.H., Seong B.L. Development and characterization of a live attenuated influenza B virus vaccine candidate// *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – № 7. – p. 874-81.
436. Shcherbik S., Pearce N., Balish A., Jones J., Thor S., Davis C.T., Pearce M., Tumpey T., Cureton D., Chen L.M., Villanueva J., Bousse T.L. Generation and Characterization of Live Attenuated Influenza A(H7N9) Candidate Vaccine Virus Based on Russian Donor of Attenuation// *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 9. – p. e0138951.
437. Shen Z., Bowen R.A., Ge P., Yu J., Shen Y., Kong W., Jiang C., Wu J., Zhu C., Xu Y., Wei W., Rudenko L., Kiseleva I., Xu F. Evaluation of a candidate live attenuated influenza vaccine prepared in Changchun BCCT (China) for safety and efficacy in ferrets// *Vaccine*. – 2016. – V. 34. – № 48. – p. 5953-5958.
438. Shi Y., Zhang W., Wang F., Qi J., Wu Y., Song H., Gao F., Bi Y., Zhang Y., Fan Z., Qin C., Sun H., Liu J., Haywood J., Liu W., Gong W., Wang D., Shu Y., Wang Y., Yan J., Gao G.F.

- Structures and receptor binding of hemagglutinins from human-infecting H7N9 influenza viruses// *Science*. – 2013. – V. 342. – № 6155. – p. 243-7.
439. Shortridge K.F. H2N2 influenza viruses in domestic ducks// *Lancet*. – 1979. – V. 1. – № 8113. – p. 439.
440. Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin// *Annu Rev Biochem*. – 2000. – V. 69. – №. – p. 531-69.
441. Skowronski D.M., Chambers C., Sabaiduc S., De Serres G., Winter A.L., Dickinson J.A., Gubbay J., Fonseca K., Charest H., Krajden M., Petric M., Mahmud S.M., Van Caesele P., Bastien N., Eshaghi A., Li Y. Integrated Sentinel Surveillance Linking Genetic, Antigenic, and Epidemiologic Monitoring of Influenza Vaccine-Virus Relatedness and Effectiveness During the 2013-2014 Influenza Season// *J Infect Dis*. – 2015. – V. 212. – № 5. – p. 726-39.
442. Skowronski D.M., Chambers C., Sabaiduc S., De Serres G., Winter A.L., Dickinson J.A., Krajden M., Gubbay J.B., Drews S.J., Martineau C., Eshaghi A., Kwindt T.L., Bastien N., Li Y. A Perfect Storm: Impact of Genomic Variation and Serial Vaccination on Low Influenza Vaccine Effectiveness During the 2014-2015 Season// *Clin Infect Dis*. – 2016. – V. 63. – № 1. – p. 21-32.
443. Skowronski D.M., Janjua N.Z., De Serres G., Sabaiduc S., Eshaghi A., Dickinson J.A., Fonseca K., Winter A.L., Gubbay J.B., Krajden M., Petric M., Charest H., Bastien N., Kwindt T.L., Mahmud S.M., Van Caesele P., Li Y. Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses// *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 3. – p. e92153.
444. Slepishkin A., Obrosova-Serova N., Burtseva E., Govorkova E., Vartanyan R., Verestsinsky A., Rudenko L., Alexandrova G., Torok T., Kendal A. Results of several controlled trials of live cold-adapted influenza A(H3N2) and influenza B vaccines for children in Moscow, 1987-1990// *Options for the control of influenza II*. - Elsevier Science Publishers. – 1993. – V. – №. – p. 79-83.
445. Smith G.J., Donis R.O., World Health Organization/World Organisation for Animal H.F., Agriculture Organization H.E.W.G. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013-2014// *Influenza Other Respir Viruses*. – 2015. – V. 9. – № 5. – p. 271-6.
446. Smorodintseff A.A., Tushinsky M.D., Drobyshevskaya A.I., Korovin A.A., Osetroff A.I. INVESTIGATION ON VOLUNTEERS INFECTED WITH THE INFLUENZA VIRUS// *The American Journal of the Medical Sciences*. – 1937. – V. 194. – № 2. – p. 159-170.
447. Sobhanie M., Matsuoka Y., Jegaskanda S., Fitzgerald T., Mallory R., Chen Z., Luke C., Treanor J., Subbarao K. Evaluation of the Safety and Immunogenicity of a Candidate Pandemic Live Attenuated Influenza Vaccine (pLAIV) Against Influenza A(H7N9)// *J Infect Dis*. – 2016. – V. 213. – № 6. – p. 922-9.
448. Sridhar S. Heterosubtypic T-Cell Immunity to Influenza in Humans: Challenges for Universal T-Cell Influenza Vaccines// *Front Immunol*. – 2016. – V. 7. – №. – p. 195.
449. Sridhar S., Begom S., Bermingham A., Hoschler K., Adamson W., Carman W., Bean T., Barclay W., Deeks J.J., Lalvani A. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza// *Nat Med*. – 2013. – V. 19. – № 10. – p. 1305-12.
450. Sridhar S., Brokstad K.A., Cox R.J. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines// *Vaccines (Basel)*. – 2015. – V. 3. – № 2. – p. 373-89.
451. Stadlbauer D., Rajabhathor A., Amanat F., Kaplan D., Masud A., Treanor J.J., Izikson R., Cox M.M., Nachbagauer R., Krammer F. Vaccination with a Recombinant H7 Hemagglutinin-Based Influenza Virus Vaccine Induces Broadly Reactive Antibodies in Humans// *mSphere*. – 2017. – V. 2. – № 6.

452. Stanekova Z., Adkins I., Kosova M., Janulikova J., Sebo P., Vareckova E. Heterosubtypic protection against influenza A induced by adenylate cyclase toxoids delivering conserved HA2 subunit of hemagglutinin// *Antiviral Res.* – 2013. – V. 97. – № 1. – p. 24-35.
453. Stanekova Z., Vareckova E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development// *Virology*. – 2010. – V. 7. – №. – p. 351.
454. Steel J., Lowen A.C., Pena L., Angel M., Solorzano A., Albrecht R., Perez D.R., Garcia-Sastre A., Palese P. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza// *J Virol.* – 2009. – V. 83. – № 4. – p. 1742-53.
455. Steel J., Lowen A.C., Wang T.T., Yondola M., Gao Q., Haye K., Garcia-Sastre A., Palese P. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain// *MBio.* – 2010. – V. 1. – № 1.
456. Stepanova L.A., Sergeeva M.V., Shuklina M.A., Shaldzhyan A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Tsybalova L.M. A Fusion Protein Based on the Second Subunit of Hemagglutinin of Influenza A/H2N2 Viruses Provides Cross Immunity// *Acta Naturae.* – 2016. – V. 8. – № 2. – p. 116-26.
457. Stephenson I., Wood J.M., Nicholson K.G., Charlett A., Zambon M.C. Detection of anti-H5 responses in human sera by HI using horse erythrocytes following MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 vaccine// *Virus Res.* – 2004. – V. 103. – № 1-2. – p. 91-5.
458. Stittelaar K.J., Veldhuis Kroeze E.J., Rudenko L., Dhare R., Thirapakpoomanunt S., Kieny M.P., Osterhaus A.D. Efficacy of live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 influenza in ferrets// *Vaccine.* – 2011. – V. 29. – № 49. – p. 9265-70.
459. Stohr K. Vaccinate before the next pandemic?// *Nature.* – 2010. – V. 465. – № 7295. – p. 161.
460. Su W., Cheng K.L., Chu D.K.W., Zhou J., Mao X., Zhong Z., Song Y., Peiris M., Wu J., Yen H.L. Genetic analysis of H7N9 highly pathogenic avian influenza virus in Guangdong, China, 2016-2017// *J Infect.* – 2018. – V. 76. – № 1. – p. 93-96.
461. Subbarao K. Evaluation of a Genetically Modified Reassortant H5N1 Influenza A Virus Vaccine Candidate Generated by Plasmid-Based Reverse Genetics// *Virology.* – 2003. – V. 305. – № 1. – p. 192-200.
462. Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K., Cox N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness// *Science.* – 1998. – V. 279. – № 5349. – p. 393-6.
463. Suguitan A.L., Jr., Marino M.P., Desai P.D., Chen L.M., Matsuoka Y., Donis R.O., Jin H., Swayne D.E., Kemble G., Subbarao K. The influence of the multi-basic cleavage site of the H5 hemagglutinin on the attenuation, immunogenicity and efficacy of a live attenuated influenza A H5N1 cold-adapted vaccine virus// *Virology.* – 2009. – V. 395. – № 2. – p. 280-8.
464. Suguitan A.L., Jr., McAuliffe J., Mills K.L., Jin H., Duke G., Lu B., Luke C.J., Murphy B., Swayne D.E., Kemble G., Subbarao K. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets// *PLoS Med.* – 2006. – V. 3. – № 9. – p. e360.
465. Sultana I., Yang K., Getie-Kehtie M., Couzens L., Markoff L., Alterman M., Eichelberger M.C. Stability of neuraminidase in inactivated influenza vaccines// *Vaccine.* – 2014. – V. 32. – № 19. – p. 2225-30.
466. Suptawiwat O., Kongchanagul A., Chan-It W., Thitithanyanont A., Wiriyarat W., Chaichuen K., Songserm T., Suzuki Y., Puthavathana P., Auewarakul P. A simple screening assay for receptor switching of avian influenza viruses// *J Clin Virol.* – 2008. – V. 42. – № 2. – p. 186-9.

467. Suzuki M., Okamatsu M., Hiono T., Matsuno K., Sakoda Y. Potency of an inactivated influenza vaccine prepared from A/duck/Hokkaido/162/2013 (H2N1) against a challenge with A/swine/Missouri/2124514/2006 (H2N3) in mice// *J Vet Med Sci.* – 2017. – V. 79. – № 11. – p. 1815-1821.
468. Tafalla M., Buijssen M., Geets R., Vonk Noordegraaf-Schouten M. A comprehensive review of the epidemiology and disease burden of Influenza B in 9 European countries// *Hum Vaccin Immunother.* – 2016. – V. 12. – № 4. – p. 993-1002.
469. Takahashi Y. Memory B cells in systemic and mucosal immune response: implications for successful vaccination// *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2007. – V. 71. – № 10. – p. 2358-66.
470. Talaat K.R., Karron R.A., Callahan K.A., Luke C.J., DiLorenzo S.C., Chen G.L., Lamirande E.W., Jin H., Coelingh K.L., Murphy B.R., Kemble G., Subbarao K. A live attenuated H7N3 influenza virus vaccine is well tolerated and immunogenic in a Phase I trial in healthy adults// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 28. – p. 3744-53.
471. Talaat K.R., Karron R.A., Liang P.H., McMahon B.A., Luke C.J., Thumar B., Chen G.L., Min J.Y., Lamirande E.W., Jin H., Coelingh K.L., Kemble G.W., Subbarao K. An open-label phase I trial of a live attenuated H2N2 influenza virus vaccine in healthy adults// *Influenza Other Respi Viruses.* – 2012. – V. – №.
472. Talaat K.R., Luke C.J., Khurana S., Manischewitz J., King L.R., McMahon B.A., Karron R.A., Lewis K.D., Qin J., Follmann D.A., Golding H., Neuzil K.M., Subbarao K. A live attenuated influenza A(H5N1) vaccine induces long-term immunity in the absence of a primary antibody response// *J Infect Dis.* – 2014. – V. 209. – № 12. – p. 1860-9.
473. Talbot H.K., Nian H., Zhu Y., Chen Q., Williams J.V., Griffin M.R. Clinical effectiveness of split-virion versus subunit trivalent influenza vaccines in older adults// *Clin Infect Dis.* – 2015. – V. 60. – № 8. – p. 1170-5.
474. Tam J.S., Capeding M.R., Lum L.C., Chotpitayasunondh T., Jiang Z., Huang L.M., Lee B.W., Qian Y., Samakoses R., Lolekha S., Rajamohanam K.P., Narayanan S.N., Kirubakaran C., Rappaport R., Razmpour A., Gruber W.C., Forrest B.D., Pan-Asian C.-T.P.E.T.N. Efficacy and safety of a live attenuated, cold-adapted influenza vaccine, trivalent against culture-confirmed influenza in young children in Asia// *Pediatr Infect Dis J.* – 2007. – V. 26. – № 7. – p. 619-28.
475. Tamura S., Funato H., Hirabayashi Y., Suzuki Y., Nagamine T., Aizawa C., Kurata T. Cross-protection against influenza A virus infection by passively transferred respiratory tract IgA antibodies to different hemagglutinin molecules// *Eur J Immunol.* – 1991. – V. 21. – № 6. – p. 1337-44.
476. Tamura S., Tanimoto T., Kurata T. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines// *Jpn J Infect Dis.* – 2005. – V. 58. – № 4. – p. 195-207.
477. Tan P.T., Heiny A.T., Miotto O., Salmon J., Marques E.T., Lemonnier F., August J.T. Conservation and diversity of influenza A H1N1 HLA-restricted T cell epitope candidates for epitope-based vaccines// *PLoS One.* – 2010. – V. 5. – № 1. – p. e8754.
478. Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation// *Cell Host Microbe.* – 2010. – V. 7. – № 6. – p. 440-51.
479. Taubenberger J.K., Morens D.M., Fauci A.S. The Next Influenza Pandemic: Can It Be Predicted?// *JAMA : the journal of the American Medical Association.* – 2007. – V. 297. – № 18. – p. 2025-2027.
480. Terebuh P., Adija A., Edwards L., Rowe T., Jenkins S., Kleene J., Fukuda K., Katz J.M., Bridges C.B. Human Infection with Avian Influenza A(H7N2) Virus - Virginia, 2002// *Influenza Other Respi Viruses.* – 2018. – V. – №.
481. Thomas P.G., Keating R., Hulse-Post D.J., Doherty P.C. Cell-mediated protection in influenza infection// *Emerg Infect Dis.* – 2006. – V. 12. – № 1. – p. 48-54.
482. Tirado S.M., Yoon K.J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease// *Viral Immunol.* – 2003. – V. 16. – № 1. – p. 69-86.

483. Tong N., Nakajima K., Nakajima S. Identification of the sites for suppressor mutations on the hemagglutinin molecule to temperature-sensitive phenotype of the influenza virus// *Microbiol Immunol.* – 1995. – V. 39. – № 9. – p. 687-92.
484. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P.J., Gilbert A.T., Chang J., Guo Z., Davis C.T., Paulson J.C., Stevens J., Rupprecht C.E., Holmes E.C., Wilson I.A., Donis R.O. New world bats harbor diverse influenza A viruses// *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9. – № 10. – p. e1003657.
485. Treanor J., Wright P.F. Immune correlates of protection against influenza in the human challenge model// *Dev Biol (Basel).* – 2003. – V. 115. – №. – p. 97-104.
486. Treanor J.J., Campbell J.D., Zangwill K.M., Rowe T., Wolff M. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine// *N Engl J Med.* – 2006. – V. 354. – № 13. – p. 1343-51.
487. Tsuchiya E., Sugawara K., Hongo S., Matsuzaki Y., Muraki Y., Li Z.N., Nakamura K. Antigenic structure of the haemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus// *J Gen Virol.* – 2001. – V. 82. – № Pt 10. – p. 2475-84.
488. Tu W., Mao H., Zheng J., Liu Y., Chiu S.S., Qin G., Chan P.L., Lam K.T., Guan J., Zhang L., Guan Y., Yuen K.Y., Peiris J.S., Lau Y.L. Cytotoxic T lymphocytes established by seasonal human influenza cross-react against 2009 pandemic H1N1 influenza virus// *J Virol.* – 2010. – V. 84. – № 13. – p. 6527-35.
489. Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S.F., Kitphati R., Auwanit W., Puthavathana P., Uiprasertkul M., Boonnak K., Pittayawonganon C., Cox N.J., Zaki S.R., Thawatsupha P., Chittaganpitch M., Khontong R., Simmerman J.M., Chunsuttiwat S. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1)// *N Engl J Med.* – 2005. – V. 352. – № 4. – p. 333-40.
490. Valkenburg S.A., Josephs T.M., Clemens E.B., Grant E.J., Nguyen T.H., Wang G.C., Price D.A., Miller A., Tong S.Y., Thomas P.G., Doherty P.C., Rossjohn J., Gras S., Kedzierska K. Molecular basis for universal HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell immunity against influenza viruses// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – V. 113. – № 16. – p. 4440-5.
491. Valkenburg S.A., Quinones-Parra S., Gras S., Komadina N., McVernon J., Wang Z., Halim H., Iannello P., Cole C., Laurie K., Kelso A., Rossjohn J., Doherty P.C., Turner S.J., Kedzierska K. Acute emergence and reversion of influenza A virus quasispecies within CD8+ T cell antigenic peptides// *Nat Commun.* – 2013. – V. 4. – №. – p. 2663.
492. van de Sandt C.E., Dou Y., Vogelzang-van Trierum S.E., Westgeest K.B., Pronk M.R., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., Hillaire M.L. Influenza B virus-specific CD8+ T-lymphocytes strongly cross-react with viruses of the opposing influenza B lineage// *J Gen Virol.* – 2015. – V. 96. – № 8. – p. 2061-73.
493. van de Sandt C.E., Kreijtz J.H., de Mutsert G., Geelhoed-Mieras M.M., Hillaire M.L., Vogelzang-van Trierum S.E., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Human cytotoxic T lymphocytes directed to seasonal influenza A viruses cross-react with the newly emerging H7N9 virus// *J Virol.* – 2014. – V. 88. – № 3. – p. 1684-93.
494. van de Sandt C.E., Kreijtz J.H., Rimmelzwaan G.F. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses// *Viruses.* – 2012. – V. 4. – № 9. – p. 1438-76.
495. Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Plotnikova M.A., Kiselev O.I. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins// *Virus Res.* – 2014. – V. 185. – №. – p. 53-63.
496. Vemula S.V., Sayedahmed E.E., Sambhara S., Mittal S.K. Vaccine approaches conferring cross-protection against influenza viruses// *Expert Rev Vaccines.* – 2017. – V. 16. – № 11. – p. 1141-1154.
497. Vesikari T., Karvonen A., Korhonen T., Edelman K., Vainionpaa R., Salmi A., Saville M.K., Cho I., Razmpour A., Rappaport R., O'Neill R., Georgiu A., Gruber W., Mendelman P.M., Forrest B., Group C.-T.T.S. A randomized, double-blind study of the safety,

- transmissibility and phenotypic and genotypic stability of cold-adapted influenza virus vaccine// *Pediatr Infect Dis J.* – 2006. – V. 25. – № 7. – p. 590-5.
498. Victor J.C., Lewis K.D., Diallo A., Niang M.N., Diarra B., Dia N., Ortiz J.R., Widdowson M.A., Feser J., Hoagland R., Emery S.L., Lafond K.E., Neuzil K.M. Efficacy of a Russian-backbone live attenuated influenza vaccine among children in Senegal: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial// *Lancet Glob Health.* – 2016. – V. 4. – № 12. – p. e955-e965.
499. Vita R., Overton J.A., Greenbaum J.A., Ponomarenko J., Clark J.D., Cantrell J.R., Wheeler D.K., Gabbard J.L., Hix D., Sette A., Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0// *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № Database issue. – p. D405-12.
500. Wacheck V., Egorov A., Groiss F., Pfeiffer A., Fuereder T., Hoeflmayer D., Kundi M., Popow-Kraupp T., Redlberger-Fritz M., Mueller C.A., Cinatl J., Michaelis M., Geiler J., Bergmann M., Romanova J., Roethl E., Morokutti A., Wolschek M., Ferko B., Seipelt J., Dick-Gudenus R., Muster T. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1// *J Infect Dis.* – 2010. – V. 201. – № 3. – p. 354-62.
501. Wan H., Sultana I., Couzens L.K., Mindaye S., Eichelberger M.C. Assessment of influenza A neuraminidase (subtype N1) potency by ELISA// *J Virol Methods.* – 2017. – V. 244. – №. – p. 23-28.
502. Wang D.Y., Qi S.X., Li X.Y., Guo J.F., Tan M.J., Han G.Y., Liu Y.F., Lan Y., Yang L., Huang W.J., Cheng Y.H., Zhao X., Bai T., Wang Z., Wei H.J., Xiao N., Shu Y.L. Human infection with Eurasian avian-like influenza A(H1N1) virus, China// *Emerg Infect Dis.* – 2013. – V. 19. – № 10. – p. 1709-11.
503. Wang H., Feng Z., Shu Y., Yu H., Zhou L., Zu R., Huai Y., Dong J., Bao C., Wen L., Wang H., Yang P., Zhao W., Dong L., Zhou M., Liao Q., Yang H., Wang M., Lu X., Shi Z., Wang W., Gu L., Zhu F., Li Q., Yin W., Yang W., Li D., Uyeki T.M., Wang Y. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China// *Lancet.* – 2008. – V. 371. – № 9622. – p. 1427-34.
504. Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., Wilson I.A., Garcia-Sastre A., Moran T.M., Palese P. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. – № 44. – p. 18979-84.
505. Wang Y., Chen L., Cheng Y., Zhou S., Pang Y., Zhang J., Greene C.M., Song Y., Zhang T., Zhao G. Potential impact of B lineage mismatch on trivalent influenza vaccine effectiveness during the 2015-2016 influenza season among nursery school children in Suzhou, China// *Hum Vaccin Immunother.* – 2017. – V. – №. – p. 0.
506. Wang Z., Chua B.Y., Ramos J.V., Parra S.M., Fairmaid E., Brown L.E., Jackson D.C., Kedzierska K. Establishment of functional influenza virus-specific CD8(+) T cell memory pools after intramuscular immunization// *Vaccine.* – 2015. – V. 33. – № 39. – p. 5148-54.
507. Wareing M.D., Watson J.M., Brooks M.J., Tannock G.A. Immunogenic and isotype-specific responses to Russian and US cold-adapted influenza a vaccine donor strains A/Leningrad/134/17/57, A/Leningrad/134/47/57, and A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) in mice// *J Med Virol.* – 2001. – V. 65. – № 1. – p. 171-7.
508. Watanabe T., Zhong G., Russell C.A., Nakajima N., Hatta M., Hanson A., McBride R., Burke D.F., Takahashi K., Fukuyama S., Tomita Y., Maher E.A., Watanabe S., Imai M., Neumann G., Hasegawa H., Paulson J.C., Smith D.J., Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential// *Cell Host Microbe.* – 2014. – V. 15. – № 6. – p. 692-705.
509. Wei S.-H., Yang J.-R., Wu H.-S., Chang M.-C., Lin J.-S., Lin C.-Y., Liu Y.-L., Lo Y.-C., Yang C.-H., Chuang J.-H., Lin M.-C., Chung W.-C., Liao C.-H., Lee M.-S., Huang W.-T., Chen P.-J., Liu M.-T., Chang F.-Y. Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an

- epidemiological analysis// *The Lancet Respiratory Medicine*. – V. 1. – № 10. – p. 771-778.
510. Weinfurter J.T., Brunner K., Capuano S.V., 3rd, Li C., Broman K.W., Kawaoka Y., Friedrich T.C. Cross-reactive T cells are involved in rapid clearance of 2009 pandemic H1N1 influenza virus in nonhuman primates// *PLoS Pathog.* – 2011. – V. 7. – № 11. – p. e1002381.
511. Weinstock D.M., Zuccotti G. Adamantane resistance in influenza A// *JAMA*. – 2006. – V. 295. – № 8. – p. 934-6.
512. White S.K., Ma W., McDaniel C.J., Gray G.C., Lednicky J.A. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle// *J Clin Virol.* – 2016. – V. 81. – №. – p. 31-3.
513. WHO. WHO Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Available from: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd52/animal.pdf> accessed 12 August 2013.// – 2002. – V. – №.
514. WHO. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance; WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1// – 2002. – V. – №.
515. WHO. WHO global influenza preparedness plan. WHO/CDS/CSR/GIP/2005.5 http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5.pdf // – 2005. – V. – №.
516. WHO. WHO Guidance on Development of Influenza Vaccine Reference Viruses by Reverse Genetics. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_6.pdf // – 2005. – V. – №.
517. WHO. Global pandemic influenza action plan to increase vaccine supply. Geneva, Switzerland. WHO/IVB/06.13; WHO/CDS/EPR/GIP/2006.1 Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.13_eng.pdf?ua=1/ – 2006. – V. – №.
518. 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/Annex%20%20human%20pandemic%20influenza.pdf> // – 2007. – V. – №.
519. WHO. Zoonotic influenza viruses: antigenic and genetic characteristics and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness// *Wkly Epidemiol Rec.* – 2017. – V. 92. – № 42. – p. 633-47.
520. WHO. Zoonotic influenza viruses: antigenic and genetic characteristics and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness// *Wkly Epidemiol Rec.* – 2017. – V. 92. – № 12. – p. 129-44.
521. WHO. WHO News release. Up to 650 000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year. December 14, 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/seasonal-flu/en/> // – 2017. – V. – №.
522. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and candidate vaccine viruses developed for potential use in human vaccines. 22 February 2018. Available at: http://www.who.int/entity/influenza/vaccines/virus/201802_zoonotic_vaccinevirusupdate.pdf?ua=1/ // – 2018. – V. – №.
523. WHO. Human infection with avian influenza A(H7N4) virus – China. Disease outbreak news. 22 February 2018. Available at: <http://www.who.int/csr/don/22-february-2018-ah7n4-china/en/> // – 2018. – V. – №.
524. WHO. Tables on clinical evaluation of influenza vaccines. Pandemic and potentially pandemic influenza vaccines. Available at: http://www.who.int/entity/immunization/diseases/influenza/Table_clinical_evaluation_influenza_pandemic.xlsx?ua=1/ // – 2018. – V. – №.

525. WHO. Influenza (Seasonal). Fact sheet №211. Reviewed January 2018. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en//> – 2018. – V. – №.
526. WHO. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2018. Available at: http://www.who.int/entity/influenza/human_animal_interface/2018_01_25_tableH5N1.pdf?ua=1// – 2018. – V. – №.
527. WHO. Influenza at the human-animal interface. Summary and assessment, 8 December 2017 to 25 January 2018. Available at: http://www.who.int/entity/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_H_A_interface_25_01_2018_FINAL.pdf?ua=1// – 2018. – V. – №.
528. Widjoatmodjo M.N., Boes J., van Bers M., van Remmerden Y., Roholl P.J., Luytjes W. A highly attenuated recombinant human respiratory syncytial virus lacking the G protein induces long-lasting protection in cotton rats// *Virol J.* – 2010. – V. 7. – №. – p. 114.
529. Wilkinson T.M., Li C.K., Chui C.S., Huang A.K., Perkins M., Liebner J.C., Lambkin-Williams R., Gilbert A., Oxford J., Nicholas B., Staples K.J., Dong T., Douek D.C., McMichael A.J., Xu X.N. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans// *Nat Med.* – 2012. – V. 18. – № 2. – p. 274-80.
530. Wohlbold T.J., Krammer F. In the shadow of hemagglutinin: a growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen// *Viruses.* – 2014. – V. 6. – № 6. – p. 2465-94.
531. Wohlbold T.J., Nachbagauer R., Margine I., Tan G.S., Hirsh A., Krammer F. Vaccination with soluble headless hemagglutinin protects mice from challenge with divergent influenza viruses// *Vaccine.* – 2015. – V. 33. – № 29. – p. 3314-21.
532. Wohlgemuth N., Ye Y., Fenstermacher K.J., Liu H., Lane A.P., Pekosz A. The M2 protein of live, attenuated influenza vaccine encodes a mutation that reduces replication in human nasal epithelial cells// *Vaccine.* – 2017. – V. 35. – № 48 Pt B. – p. 6691-6699.
533. Wong S.S., Kaplan B., Zanin M., Debeauchamp J., Kercher L., Crumpton J.C., Seiler P., Sun Y., Tang L., Krauss S., Webster R., Webby R.J. Impact of Adjuvants on the Immunogenicity and Efficacy of Split-Virion H7N9 Vaccine in Ferrets// *J Infect Dis.* – 2015. – V. 212. – № 4. – p. 542-51.
534. Wong T.M., Allen J.D., Bebin-Blackwell A.G., Carter D.M., Adefantis T., DiNapoli J., Kleanthous H., Ross T.M. Computationally Optimized Broadly Reactive Hemagglutinin Elicits Hemagglutination Inhibition Antibodies against a Panel of H3N2 Influenza Virus Cocirculating Variants// *J Virol.* – 2017. – V. 91. – № 24.
535. Wressnigg N., Shurygina A.P., Wolff T., Redlberger-Fritz M., Popow-Kraupp T., Muster T., Egorov A., Kittel C. Influenza B mutant viruses with truncated NS1 proteins grow efficiently in Vero cells and are immunogenic in mice// *J Gen Virol.* – 2009. – V. 90. – № Pt 2. – p. 366-74.
536. Wressnigg N., Voss D., Wolff T., Romanova J., Ruthsatz T., Mayerhofer I., Reiter M., Nakowitsch S., Humer J., Morokutti A., Muster T., Egorov A., Kittel C. Development of a live-attenuated influenza B DeltaNS1 intranasal vaccine candidate// *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – № 21. – p. 2851-7.
537. Wright P.F., Karzon D.T. Live attenuated influenza vaccines// *Prog Med Virol.* – 1987. – V. 34. – №. – p. 70-88.
538. Wright P.F., Murphy B.R., Kervina M., Lawrence E.M., Phelan M.A., Karzon D.T. Secretory immunological response after intranasal inactivated influenza A virus vaccinations: evidence for immunoglobulin A memory// *Infect Immun.* – 1983. – V. 40. – № 3. – p. 1092-5.
539. Xie H., Wan X.F., Ye Z., Plant E.P., Zhao Y., Xu Y., Li X., Finch C., Zhao N., Kawano T., Zoueva O., Chiang M.J., Jing X., Lin Z., Zhang A., Zhu Y. H3N2 Mismatch of 2014-15

- Northern Hemisphere Influenza Vaccines and Head-to-head Comparison between Human and Ferret Antisera derived Antigenic Maps// *Sci Rep.* – 2015. – V. 5. – №. – p. 15279.
540. Xu L., Bao L., Deng W., Dong L., Zhu H., Chen T., Lv Q., Li F., Yuan J., Xiang Z., Gao K., Xu Y., Huang L., Li Y., Liu J., Yao Y., Yu P., Li X., Huang W., Zhao X., Lan Y., Guo J., Yong W., Wei Q., Chen H., Zhang L., Qin C. Novel avian-origin human influenza A(H7N9) can be transmitted between ferrets via respiratory droplets// *J Infect Dis.* – 2014. – V. 209. – № 4. – p. 551-6.
541. Xu X., Subbarao, Cox N.J., Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong// *Virology.* – 1999. – V. 261. – № 1. – p. 15-9.
542. Yamane N., Arikawa J., Odagiri T., Sukeno N., Ishida N. Isolation of three different influenza A viruses from an individual after probable double infection with H3N2 and H1N1 viruses// *Jpn J Med Sci Biol.* – 1978. – V. 31. – № 5-6. – p. 431-4.
543. Yang H., Carney P.J., Chang J.C., Villanueva J.M., Stevens J. Structural analysis of the hemagglutinin from the recent 2013 H7N9 influenza virus// *J Virol.* – 2013. – V. 87. – № 22. – p. 12433-46.
544. Yardeni T., Eckhaus M., Morris H.D., Huizing M., Hoogstraten-Miller S. Retro-orbital injections in mice// *Lab Anim (NY).* – 2011. – V. 40. – № 5. – p. 155-60.
545. Yassine H.M., Boyington J.C., McTamney P.M., Wei C.J., Kanekiyo M., Kong W.P., Gallagher J.R., Wang L., Zhang Y., Joyce M.G., Lingwood D., Moin S.M., Andersen H., Okuno Y., Rao S.S., Harris A.K., Kwong P.D., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection// *Nat Med.* – 2015. – V. 21. – № 9. – p. 1065-70.
546. Yassine H.M., Lee C.W., Gourapura R., Saif Y.M. Interspecies and intraspecies transmission of influenza A viruses: viral, host and environmental factors// *Anim Health Res Rev.* – 2010. – V. 11. – № 1. – p. 53-72.
547. Yen H.L., McKimm-Breschkin J.L., Choy K.T., Wong D.D., Cheung P.P., Zhou J., Ng I.H., Zhu H., Webby R.J., Guan Y., Webster R.G., Peiris J.S. Resistance to neuraminidase inhibitors conferred by an R292K mutation in a human influenza virus H7N9 isolate can be masked by a mixed R/K viral population// *MBio.* – 2013. – V. 4. – № 4.
548. Youil R., Su Q., Toner T.J., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rubin B., Petrukhin L., Kiseleva I., Shaw A.R., DiStefano D. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines// *J Virol Methods.* – 2004. – V. 120. – № 1. – p. 23-31.
549. Young J.F., Palese P. Evolution of human influenza A viruses in nature: recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1979. – V. 76. – № 12. – p. 6547-51.
550. Youzbashi E., Marschall M., Chaloupka I., Meier-Ewert H. [Distribution of influenza C virus infection in dogs and pigs in Bavaria]// *Tierarztl Prax.* – 1996. – V. 24. – № 4. – p. 337-42.
551. Yuan J., Zhang L., Kan X., Jiang L., Yang J., Guo Z., Ren Q. Origin and molecular characteristics of a novel 2013 avian influenza A(H6N1) virus causing human infection in Taiwan// *Clin Infect Dis.* – 2013. – V. 57. – № 9. – p. 1367-8.
552. Zamarin D., Garcia-Sastre A., Xiao X., Wang R., Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1// *PLoS Pathog.* – 2005. – V. 1. – № 1. – p. e4.
553. Zang Y., Du D., Ge P., Xu Y., Liu X., Zhang Y., Su W., Kiseleva I., Rudenko L., Xu F., Kong W., Jiang C. Development of one-step real-time PCR assay for titrating trivalent live attenuated influenza vaccines// *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – V. 10. – № 12. – p. 3642-8.

554. Zemmour J., Little A.M., Schendel D.J., Parham P. The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon// *J Immunol.* – 1992. – V. 148. – № 6. – p. 1941-8.
555. Zens K.D., Farber D.L. Memory CD4 T cells in influenza// *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2015. – V. 386. – №. – p. 399-421.
556. Zhang C., Zhao Z., Guo Z., Zhang J., Li J., Yang Y., Lu S., Wang Z., Zhi M., Fu Y., Yang X., Liu L., Zhang Y., Hua Y., Liu L., Chai H., Qian J. Amino Acid Substitutions Associated with Avian H5N6 Influenza A Virus Adaptation to Mice// *Frontiers in Microbiology.* – 2017. – V. 8. – №. – p. 1763.
557. Zhang Q., Shi J., Deng G., Guo J., Zeng X., He X., Kong H., Gu C., Li X., Liu J., Wang G., Chen Y., Liu L., Liang L., Li Y., Fan J., Wang J., Li W., Guan L., Li Q., Yang H., Chen P., Jiang L., Guan Y., Xin X., Jiang Y., Tian G., Wang X., Qiao C., Li C., Bu Z., Chen H. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet// *Science.* – 2013. – V. 341. – № 6144. – p. 410-4.
558. Zhang W., Wan J., Qian K., Liu X., Xiao Z., Sun J., Zeng Z., Wang Q., Zhang J., Jiang G., Nie C., Jiang R., Ding C., Li R., Horby P., Gao Z. Clinical characteristics of human infection with a novel avian-origin influenza A(H10N8) virus// *Chin Med J (Engl).* – 2014. – V. 127. – № 18. – p. 3238-42.
559. Zhang W., Wood J. The Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) -65 years of building trust and sharing and a role model for global health security// *Influenza Other Respir Viruses.* – 2018. – V. – №.
560. Zhdanov V.M., Lvov D.K., Zakstelskaya L.Y., Yakhno M.A., Isachenko V.I., Braude N.A., Reznik V.I., Pysina T.V., Andreyev V.P., Podchernyaeva R.Y. Return of epidemic A1 (H1N1) influenza virus// *Lancet.* – 1978. – V. 1. – № 8059. – p. 294-5.
561. Zheng W., Tao Y.J. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex// *FEBS Lett.* – 2013. – V. 587. – № 8. – p. 1206-14.
562. 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.* – 2016. – V. 29. – № 4. – p. 259-62.
563. Zhou J., Wang D., Gao R., Zhao B., Song J., Qi X., Zhang Y., Shi Y., Yang L., Zhu W., Bai T., Qin K., Lan Y., Zou S., Guo J., Dong J., Dong L., Wei H., Li X., Lu J., Liu L., Zhao X., Huang W., Wen L., Bo H., Xin L., Chen Y., Xu C., Pei Y., Yang Y., Zhang X., Wang S., Feng Z., Han J., Yang W., Gao G.F., Wu G., Li D., Wang Y., Shu Y. Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus// *Nature.* – 2013. – V. 499. – № 7459. – p. 500-3.
564. Zhu H., Wang D., Kelvin D.J., Li L., Zheng Z., Yoon S.W., Wong S.S., Farooqui A., Wang J., Banner D., Chen R., Zheng R., Zhou J., Zhang Y., Hong W., Dong W., Cai Q., Roehrl M.H., Huang S.S., Kelvin A.A., Yao T., Zhou B., Chen X., Leung G.M., Poon L.L., Webster R.G., Webby R.J., Peiris J.S., Guan Y., Shu Y. Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs// *Science.* – 2013. – V. 341. – № 6142. – p. 183-6.
565. Zhu W., Zhou J., Li Z., Yang L., Li X., Huang W., Zou S., Chen W., Wei H., Tang J., Liu L., Dong J., Wang D., Shu Y. Biological characterisation of the emerged highly pathogenic avian influenza (HPAI) A(H7N9) viruses in humans, in mainland China, 2016 to 2017// *Euro Surveill.* – 2017. – V. 22. – № 19.
566. Zitzow L.A., Rowe T., Morken T., Shieh W.J., Zaki S., Katz J.M. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets// *J Virol.* – 2002. – V. 76. – № 9. – p. 4420-9.
567. Zost S.J., Parkhouse K., Gumina M.E., Kim K., Diaz Perez S., 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.* – 2017. – V. 114. – № 47. – p. 12578-12583.