

На правах рукописи

КРУТИКОВА
Елена Витальевна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ
ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ У ДЕТЕЙ
В ВОЗРАСТЕ 1–3 ЛЕТ**

03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
*диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Санкт–Петербург
2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Научный руководитель:

Киселева Ирина Васильевна

Доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Официальные оппоненты:

Бурцева Елена Ивановна

Доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ

Зарубаев Владимир Викторович

Кандидат биологических наук, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация:

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)

Защита диссертации состоится _____ в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 4991504; e-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15/17); на сайте <http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан: «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Амосова И.В.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Согласно последним оценкам Всемирной организации здравоохранения (WHO) и Центра по контролю и предупреждению заболеваемости (CDC), грипп ежегодно приводит к тяжелым заболеваниям от 3 до 5 миллионов человек во всем мире, из которых умирают до 650 тысяч человек. Большинство случаев смертности происходит среди лиц старше 75 лет и детей младше 5 лет (CDC, 2017; WHO, 2018). Наиболее уязвимым контингентом, восприимчивым к гриппозной инфекции, являются маленькие дети, особенно в первые годы жизни (Monto et al, 1993). Заболеваемость среди детей младшего возраста отличается высокой контагиозностью, трансмиссивностью и частыми случаями осложнений, иногда заканчивающихся летальным исходом (Monto et al, 1993; Glezen et al, 1997). Кроме того, у детей в раннем возрасте трудно диагностировать грипп ввиду отсутствия конкретных признаков, жалоб или симптомов заболевания, что может привести к неэффективному лечению и осложнениям (Heikkinen et al, 1991).

По мнению специалистов WHO, вакцинация остается наиболее эффективным методом защиты от гриппозной инфекции (WHO, 2018). Существующие коммерческие противогриппозные вакцины подразделяются на инактивированные (ИГВ) и живые (ЖГВ). При вакцинации живой гриппозной вакциной развивается имитация инфекции в легкой форме со стимуляцией тех же звеньев иммунного ответа, что и при заболевании гриппом, что позволяет достичь формирования иммунитета, аналогичного естественному, с широким защитным потенциалом, в том числе местного иммунного ответа во входных воротах инфекции (Александрова, 1984; Григорьева, 2005; Rudenko, 2007; Rudenko et al., 2016; Jonson et al, 1986; Cox et al, 2004; Osterholm et al, 2012; Харит, 2017). В отличие от ЖГВ, инактивированная вакцина стимулирует иммунный ответ только к штамму, против которого она была сконструирована.

В США применение ЖГВ FluMist разрешено для здоровых детей с двух лет и взрослых до 49 лет (CDC, 2017), ИГВ для детей с противопоказаниями – с шести месяцев. Что касается России, то вакцинация ИГВ, также, как и за рубежом, начинается в шесть месяцев (Приказ Минздрава РФ №156/29 от 07.05.1998), а ЖГВ разрешена для всех возрастных групп, начиная с трех лет и старше (WHO, 2012).

До 2003 года в России производились два препарата ЖГВ, – это вакцина для детей в возрасте от трех до 16 лет, применяемая двукратно и вакцина для взрослых, применяемая однократно. Детский вариант вакцины готовился на донорах аттенуации А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) (А/Лен/47) и В/СССР/60/69 (В60), «взрослая» вакцина – на донорах А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (А/Лен/17) и В/СССР/60/69. Однако, в результате целого ряда клинических наблюдений за безопасностью, стабильностью и иммуногенностью вакцины для взрослых (на детях от 3 до 6 лет и от 7 14 лет), была обоснована возможность однократного применения взрослого варианта ЖГВ на детях с трех лет (Дешева и др., 2002; Григорьева и др., 2002). Поэтому, современная отечественная ЖГВ производится на основе доноров А/Лен/17 и В60 в виде единого препарата для всех возрастных групп населения, начиная с трех лет (WHO, 2012).

При первом контакте иммунной системы человека с антигеном в виде вакцинного штамма или эпидемического вируса происходит так называемый иммунологический импринтинг («антигенный грех») (Butler et al., 2018; Auladell et al., 2019), который заключается в том, что при следующем контакте с этим антигеном или антигеном той же филогенетической группы активируются В-клетки памяти и преимущественно вырабатываются антитела в отношении самого первого антигена. Известно, что при иммунизации инактивированными вакцинами иммунный ответ вырабатывается преимущественно на иммунодоминантные участки молекулы гемагглютинина, которые также являются гипервариабельными (Sridhar, 2015). Соответственно, при первой иммунизации серонегативных детей инактивированной вакциной, и последующем

контакте с мутировавшим вирусом гриппа, будут вырабатываться антитела, направленные не на новый инфекционный агент, а на общие у двух штаммов переменные участки гемагглютинина введенной инактивированной вакцины. В отличие от инактивированных вакцин, ЖГВ имитируют натуральную гриппозную инфекцию, формируя В- и Т-клетки памяти не только к переменным, но и к консервативным участкам вирусных белков, которые, что наиболее важно, локализируются непосредственно в органах респираторной системы (легкие, назо-ассоциированная лимфоидная ткань и др.) и обеспечивают быструю элиминацию вирулентного вируса (Sridhar, 2015). Именно поэтому важно, чтобы в самый первый раз дети контактировали именно с живым вирусом, причем одновременно со всеми циркулирующими серотипами (H1N1, H3N2, В), обеспечивая формирование иммунологической памяти к широкому спектру консервативных вирусных эпитопов. Сформировав такой сбалансированный «иммунологический отпечаток» в первые годы жизни, при последующей вакцинации или натуральной инфекции любым штаммом вируса гриппа будут быстро активироваться клетки иммунологической памяти, направленные на перекрестно-реагирующие эпитопы, обеспечивая кросс-протекцию. В этой связи ВОЗ подняла вопрос о необходимости начала вакцинации против гриппа живыми гриппозными вакцинами детей в возрасте одного года (ВОЗ, 2019).

Дети первого года жизни защищены естественным пассивным материнским иммунитетом. Вакцинация ИГВ разрешена начиная с 6-месячного возраста, а отечественной ЖГВ – с трех лет. Таким образом, если говорить о необходимости первой иммунизации именно ЖГВ, группа детей от одного года до трех лет остается незащищенной. Противогриппозная вакцинопрофилактика живой гриппозной вакциной детей в возрасте от 1 до 3 лет значительно снизила бы среди них заболеваемость гриппом. В связи с этим, очень важным, не охваченным на настоящий день звеном профилактики гриппозной инфекции, является разработка ЖГВ, наиболее эффективной для защиты детей первых трех лет жизни.

Для усовершенствования ЖГВ и повышения ее эффективности необходимо понимание всех аспектов защиты населения от циркулирующих штаммов. В последние годы все чаще социркулируют две антигенно отличающиеся линии вируса гриппа В – В/Victoria/2/87-подобные вирусы (В/Vic) и В/Yamagata/2/78-подобные вирусы (В/Yam). Поскольку в состав сезонной трехвалентной вакцины (Т-ЖГВ) входит лишь один генетический вариант вируса гриппа В, несоответствие вакцинного и циркулирующего штаммов может существенно снизить защитный эффект вакцинного препарата. Включение в состав гриппозных вакцин четырех штаммов вируса гриппа (так называемая четырехвалентная, или квадριвалентная вакцина), позволило бы избежать несоответствия между входящими в состав вакцины и циркулирующими штаммами вируса гриппа В (Heikkinen et al, 2014). В 2012 году ВОЗ впервые рекомендовала одновременное включение в состав гриппозных вакцин двух антигенных вариантов вируса гриппа В как альтернативу трехвалентной вакцине (ВОЗ, 2012). Тем не менее, трехвалентная вакцина до сих пор применяется во многих странах, поскольку разработка и применение квадριвалентной вакцины (К-ЖГВ) ограничиваются рядом факторов, таких, как требования регулирующих органов, увеличение времени и стоимости производства, рост цены на вакцину и пр. (Barr & Jelley, 2012).

Сложившаяся ситуация остро поставила вопрос об изучении потенциала перекрестной защиты трехвалентных вакцин, содержащих антигенно отличающиеся от циркулирующих штаммы вирусов гриппа В (Asahi-Ozaki et al, 2004; Yasugi et al, 2013).

Расширение сферы применения современной живой гриппозной вакцины, способной охватить самые широкие слои населения и защитить их от гриппозной инфекции даже в случае неполного совпадения циркулирующих и вакцинных штаммов вируса гриппа типа В является актуальной проблемой современной клинической вирусологии.

Степень разработанности темы. В 1960–х годах в отделе вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины (ИЭМ) методом длительного холододового пассирования в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) был подготовлен целый ряд холодоадаптированных (ХА) пассажных штаммов (А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), А/Лен/47, А/Лен/17, А/Виктория/35/30/72 (H3N2), В/СССР/60/69 (В60), В/Ленинград/14/17/55 (В14), В/Душанбе/1/62/66 и др.). На основе этих штаммов были подготовлены и испытаны в клинических наблюдениях, живые гриппозные вакцины на маленьких детях (от года) и на взрослых (Александрова и др., 1968; 1971; 1984). Затем, после разработки метода реассортации эти штаммы начали тестировать в качестве доноров аттенуации для ЖГВ нового поколения – реассортантной (Александрова и др., 1989; Медведева и др., 1989; Obrosova–Serova at al., 1990; Александрова и др., 1996).

В России до 2003 года применялись два вида живых вакцин – для взрослых на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 и для детей на основе более аттенуированного донора А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) и В/СССР/60/69. После того, как было доказано, что А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) можно использовать в качестве единого донора аттенуации для подготовки компонента ЖГВ типа А (Rudenko et al., 2001; Григорьева и др., 2002; Дешева и др., 2002), с 2003 года применяется единая трехвалентная реассортантная ЖГВ для всех групп населения старше трех лет на основе доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69.

Технология производства отечественной живой гриппозной вакцины была передана в Индию и Китай в рамках договора с WHO о «Подготовке новых вакцинных штаммов для сезонных и пандемических живых гриппозных вакцин для развивающихся стран». В Индии эта вакцина под названием «Nasovac–S» уже зарегистрирована для применения у всех возрастных групп, начиная с 2 лет. Что касается России, в свое время ХА донор А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) успешно применялся в качестве ЖГВ для иммунизации детей в возрасте одного года (Александрова и др., 1968; 1971; 1984). Донор аттенуации В60 в масштабных клинических наблюдениях был апробирован в основном на детях с трехлетнего возраста (Гольдфарб, 1972; Александрова, 1984) и только в одном исследовании – на детях от двух лет (Ortiz et al, 2015), поэтому применение отечественной ЖГВ, основанной на доноре В60, у детей в возрасте от одного года пока невозможно. Поскольку существует необходимость прививать от гриппа детей этой возрастной группы, должны быть проведены исследования, связанные с созданием и изучением донора ЖГВ типа В для самых маленьких детей.

Штамм В/Ленинград/14/17/55, пройдя масштабные клинические исследования на тысячах детей от одного года до 15 лет (Александрова и др., 1968; 1971; 1984; 1989; 1996; Медведева и др., 1989; Obrosova–Serova at al., 1990), мог бы стать перспективным донором при подготовке штаммов ЖГВ для детей одного года и старше. Однако, его изучение прекратилось в 1990–е годы, поэтому к началу нашей работы он не был до конца охарактеризован. Так, не была установлена его нуклеотидная и аминокислотная последовательность, что является важной характеристикой донора, поскольку количество и место расположения мутаций во внутренних генах донора определяет его аттенуирующие (*att*) свойства. Штамм В14 не был клонирован, а чистота популяции штамма является гарантией его безвредности. К тому же, не была установлена роль отдельных мутаций в аттенуации вируса В14.

Механизмы аттенуации ХА доноров аттенуации типа А детально изучены как в экспериментах *in vitro*, так и в системе *in vivo* (Jin et al, 2003, 2004; Kiseleva et al, 2004; Isakova–Sivak et al, 2011; He et al, 2013). Степень изученности молекулярных основ аттенуации ХА вирусов гриппа В значительно уступает информации, полученной для вирусов гриппа А. Для них также изучалась роль генов в их аттенуации, но в основном эксперименты проводилось в системе *in vitro*. Была показана ключевая роль PB2 и PA генов в формировании температурочувствительного (*ts*) фенотипа донора В60 (Kiseleva et al, 2010; Voeten, Kiseleva et al, 2010; Ларионова, 2017). При изучении механизмов

аттенуации корейского донора В/Lee/40са были опубликованы данные, касающиеся только описания фенотипа вируса, без информации о конкретных генетических позициях, ответственных за его аттенуацию (Audsley et al, 2007). Что же касается изучения роли отдельных генов в аттенуации ХА вирусов гриппа В на лабораторных животных, то такие исследования проводились только для американского донора аттенуации В/Ann Arbor/1/66са (Hoffmann et al, 2005).

Все вышесказанное объясняет причину того, почему в современных условиях в настоящей стадии изученности, без проведения всестороннего анализа молекулярно–биологических характеристик ХА штамм В/Ленинград/14/17/55 пока невозможно использовать в качестве донора аттенуации.

Определение состава генома реассортантов занимает важное место в процессе подготовки штаммов ЖГВ. Анализ реассортантов–кандидатов в вакцинные штаммы проводится с использованием различных методов: рестрикционный анализ (Klimov & Cox, 1995; Kiseleva et al, 2011), мультиплексная ПЦР (He et al, 2009), секвенирование (Sanger et al, 1977) и частичное секвенирование (Matyushenko et al, 2017). У каждого метода есть свои преимущества и недостатки. Основными ограничениями методов рестрикционного анализа и мультиплексной ПЦР является оценка результатов косвенным путем – по размеру фрагментов на электрофореграмме, что подразумевает возможность получения ложных результатов. Полное или частичное секвенирование исключает получение ложных результатов, однако, анализ реассортантов требует применения дорогостоящих реактивов и значительных трудозатрат, в связи с чем малоприспособно для рутинного анализа большого числа образцов. В связи с этим необходимо разработать альтернативный, высокоскоростной и недорогой метод первичного скрининга вакцинных кандидатов.

В последние годы в мире сложилась уникальная ситуация, при которой в разных районах земного шара одновременно циркулируют обе генетические линии вируса гриппа В – В/Vic и В/Yam, не говоря уже о реассортантах с поверхностными гликопротеинами, унаследованными от разных линий (McCuller et al, 1999; Shaw et al, 2002; Xu et al, 2004). Такие эволюционные особенности вирусов гриппа В определяют особый интерес, проявляемый к применению К–ЖГВ. Однако, добавление еще одного компонента в состав Т–ЖГВ с одной стороны сопровождается удорожанием производства и, как следствие, повышением стоимости препарата, а с другой вызывает опасения возможной интерференции вакцинных штаммов. Поэтому вопрос об эффективности Т–ЖГВ в случае неполного антигенного совпадения циркулирующих и вакцинных штаммов вируса гриппа В остается актуальным.

Опубликован ряд работ, позволяющих в результате продемонстрированной кросс–протективности положительно оценить перспективы использования Т–ЖГВ, содержащей антигенно отличающиеся от циркулирующих штаммов вакцинные компоненты вируса гриппа В (Jang & Seong, 2013; Laurie et al, 2018). В России подобные исследования пока не проводились.

Все вышесказанное свидетельствует о том, что углубленное изучение вакцинных компонентов типа В трехвалентной ЖГВ расширит перспективы повышения ее эффективности и дальнейшей модернизации.

Ко времени начала наших исследований ряд вопросов требовал изучения, в частности:

1. Подбор и характеристика ХА альтернативного донора аттенуации В14 для подготовки штаммов ЖГВ типа В для детей в возрасте одного года и старше.
2. Установление молекулярных механизмов аттенуации ХА донора, подготовленного на основе резервного вируса В14, на модели *in vitro* и *in vivo*.
3. Отработка эффективного, информативного и малозатратного метода определения состава генома реассортантов при подготовке штаммов ЖГВ.
4. Изучение возможной перекрестной протективности Т–ЖГВ на модели хорьков.

Цель и задачи исследования. В связи с вышесказанным, **целью настоящей работы** явилось усовершенствование донора аттенуации живой гриппозной вакцины типа В для детей в возрасте 1–3 лет.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи**:

1. Получить клонированный вариант резервного донора аттенуации В/Ленинград/14/17/55 и охарактеризовать его фенотипические и молекулярно–генетические особенности и иммуногенность с целью возможного использования при подготовке штаммов живой гриппозной вакцины для детей в возрасте 1–3 лет.
2. Модифицировать метод пиросеквенирования для оперативной оценки состава генома реассортантов вируса гриппа В.
3. Изучить механизмы аттенуации донора В/Ленинград/14/17/55.
4. Изучить перекрестную протективность живых моно– и трехвалентных гриппозных вакцин, содержащих антигенно отличающиеся линии вируса гриппа В.

Научная новизна. Впервые получен и полностью охарактеризован клон В14/710 донора аттенуации ЖГВ, подготовленный на основе ХА вируса В/Ленинград/14/17/55, с целью его возможного использования в качестве резервного донора при подготовке вакцинных штаммов для детей в возрасте 1–3 лет. Впервые получены данные о локализации мутаций в геноме альтернативного донора В14/710; выявлено 17 уникальных аминокислотных замен в его внутренних генах. Впервые установлена роль полимеразных генов альтернативного донора В14/710 в формировании его *ts* фенотипа и аттенуации для животных. Модифицирован метод пиросеквенирования и впервые применен для оценки состава генома реассортантов при подготовке отечественных штаммов ЖГВ типа В. На модели мышей установлена иммуногенность реассортантных штаммов, подготовленных на основе альтернативного донора В14/710, не уступающая иммуногенности аналогичных вакцинных штаммов, подготовленных на основе базового донора аттенуации В/СССР/60/69. Продемонстрирована перспективность использования мышей как модели для сравнительного анализа степени аттенуации различных вирусов гриппа. На модели хорьков продемонстрирована перекрестная защита между линиями вируса гриппа В В/Vic и В/Yam, входящими в состав живой гриппозной вакцины.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа включает как фундаментальные, так и практические аспекты. Получен и экспериментально охарактеризован резервный донор аттенуации В14/710, содержащий на 10 кодирующих мутаций больше, чем базовый донор В60, и более аттенуированный, что делает его перспективным донором аттенуации штаммов ЖГВ, предназначенной для детей в возрасте одного года и старше.

Получены данные о влиянии генов, кодирующих белки полимеразного комплекса, а именно генов PB2 и PA, на аттенуацию альтернативного донора В14/710, что вносит существенный вклад в понимание фундаментальных аспектов аттенуации вируса гриппа В в целом.

Модифицированная тест–система метода определения состава генома реассортантов вируса гриппа В в 2–3 раза ускоряет и удешевляет процесс подготовки штаммов ЖГВ.

Показано, что мыши являются адекватной моделью для изучения различий в степени аттенуации вирусов гриппа.

В доклинических исследованиях на хорьках охарактеризованы моно– и трехвалентные ЖГВ, в результате чего была показана перекрестная защита между линиями вируса гриппа В/Vic и В/Yam. При этом вакцины, содержащие вирусы гриппа Викторианской линии, более эффективно защищали животных от челленджа «диким» вирусом гриппа В линии Ямагата.

Подготовленный автором вакцинный штамм В/60/Пхукет/2013/26 депонирован в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ России (НИИ вирусологии №2808), передан в

АО «НПО «Микроген» для включения в состав ЖГВ и использовался в эпидемический по гриппу сезон 2015–2016 гг. Штамм также был передан в ВНО в рамках договора о «Подготовке новых вакцинных штаммов для сезонных и пандемических живых гриппозных вакцин для развивающихся стран».

Методология исследования представляет собой алгоритм достижения поставленной в диссертационной работе цели и включает в себя набор приемов и методов, как классических (вирусологических, серологических и молекулярно–биологических), так и авторскую методику оценки состава генома реассортантов вируса гриппа В.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Из гетерогенной популяции резервного донора В/Ленинград/14/17/55 выделен и методами фенотипического, молекулярно–генетического и серологического анализа охарактеризован клон В14/710, перспективный для использования в качестве альтернативного донора для подготовки штаммов ЖГВ типа В для детей в возрасте одного года и старше.

2. Гены, кодирующие внутренние белки вируса В14/710, содержат 17 кодирующих мутаций, что на 10 аминокислотных замен больше, чем у базового донора В/СССР/60/69. Это является основой для более выраженной аттенуации вируса В14/710 по сравнению с донором В/СССР/60/69, продемонстрированной в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

3. Гены, кодирующие полимеразный комплекс, участвуют в формировании *ts* и *att* фенотипа альтернативного донора аттенуации В14/710. Сочетание генов PB2 и PA донора В14/710 в геноме реассортантов приводит к их температурочувствительности и аттенуации для животных, что позволяет предположить существование единого механизма аттенуации ХА вирусов гриппа В.

4. Модифицированный метод пиросеквенирования позволяет за 2–3 дня сократить анализ генома вируса гриппа В и в 2 раза удешевить анализ реассортантов при подготовке штаммов ЖГВ типа В по сравнению с применяемыми ранее методами.

5. В экспериментах на хорьках вакцинные штаммы вируса гриппа В вызывают перекрестную защиту от инфекции, вызванной гетерологичными линиями В/Vic и В/Yam, как в виде моновалентной ЖГВ, так и в составе Т–ЖГВ.

Личный вклад автора заключается в непосредственном выполнении всех экспериментальных разделов работы, анализе и интерпретации полученных результатов и в анализе литературных данных по теме исследования.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов диссертации подтверждается значительным объемом исследований, проведенных с использованием современных средств и методик и статистической обработкой полученных данных. Результаты проделанной работы были представлены на 14 международных и российских конференциях: на XIX–XXII–й Международной медико–биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (СПб, 2016–2019); на XX–XXIII–й Международной Пушинской школе–конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2016–2019); на XXI–XXII–й Санкт–Петербургской ассамблее молодых ученых и специалистов «Правительство Санкт–Петербурга комитет по науке и высшей школе» (СПб, 2016, 2019); на IX–X–ой Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (Москва, 2017, 2018); на VII–м Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт–Петербургские научные чтения–2017» (СПб, 2017); на 6–й конференции Европейской научной рабочей группы по гриппу (ESWI) (Рига, Латвия, 2017); на Оксфордской конференции по гриппу (Оксфорд, Великобритания, 2018), на 10–й Конференции по контролю за гриппом (Options X, Сингапур, 2019), а также регулярно заслушивались на заседаниях отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» (2014–2019).

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 19 научных статьях, 11 из которых представлены в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 9 – в индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus. По теме диссертации получен 1 патент РФ и опубликовано 22 тезиса российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 101 странице текста, включая 24 таблицы и 10 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 193 источника, из них 34 отечественных и 159 иностранных.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. В работе были использованы следующие вирусы гриппа: (1) «дикие» вирусы гриппа, полученные из CDC, США: В/Phuket/3073/2013 (В/Ph) и В/Massachusetts/2/12 (В/Mass) – линия Yamagata (В/Yam); В/Brisbane/60/08 (В/Br) и В/Indiana/25/2015 (В/Ind) – линия Victoria (В/Vic); В/Lee/40 (В/Lee); (2) доноры аттенуации: В/Ленинград/14/17/55, В/СССР/60/69; (3) вакцинные штаммы, подготовленные на основе донора аттенуации В60: В/60/32 (Ермаченко и др., патент №1731811), В/60/Phuket/2013/26 (В/60/Ph) (Киселева и др., патент №2808), В/60/Brisbane/08/83 (В/60/Br) (Ларионова и др., патент №2422517); (4) вакцинные штаммы, подготовленные на основе донора аттенуации В14: В/14/28 (Ермаченко и др., патент № 2008351), В/14/Brisbane/2017/54 (В/14/Br) (авторский штамм), В/14/Phuket/2017/74 (В/14/Ph) (авторский штамм); (5) три- и квадривалентные ЖГВ, использованные в экспериментах на хорьках, были предоставлены Serum Institute of India (Индия). В их состав входили штаммы, подготовленные на основе доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2Н2) и В/СССР/60/69 и следующих эпидемических вирусов: А/New York/61/2015 (Н1Н1)pdm09, А/Hong Kong/4801/2014 (Н3Н2), В/Phuket/3073/2013 (В/Yam) и В/Brisbane/60/08 (В/Vic).

Развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). Инкубацию вирусов проводили в 10–11–дневных куриных эмбрионах, полученных из ООО «Племрепродуктор Назия» (Л.О., пос. Приладожский). Инфекционную активность вирусов оценивали по методу Reed и Muench (1938). Температурочувствительность (*ts*-фенотип) вирусов гриппа оценивали по разности инфекционных титров при оптимальной (32°C) и субоптимальной (37°C, 38°C) температуре инкубации. Холодоустойчивость (*ca*-фенотип) вирусов оценивали по разности инфекционных титров при оптимальной и пониженной до 26°C температуре инкубации. Титры вируса представляли в lg ЭИД₅₀/мл. Вирусы считали *ts*, когда разница в титрах при оптимальной и повышенной температуре составляла не менее 5,5 lg ЭИД₅₀/мл и температуроустойчивыми (*non-ts*), если эта разница была не больше 3,0 lg ЭИД₅₀/мл. Вирусы считали *ca*, когда разница в титрах при оптимальной и пониженной температуре составляла не более 3,5 lg ЭИД₅₀/мл и *non-ca*, если этот показатель составлял не менее 5,0 lg ЭИД₅₀/мл.

Реассортантные штаммы ЖГВ получали по стандартной методике (Александрова и др., 1977), в ряде случаев повышая или понижая температуру инкубации для получения широкого набора реассортантов с разнообразной формулой генома.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Титр сывороточных антител в крови животных определяли в РТГА по методическим указаниям МУ 3.3.2.1758–03.

Животные. Работа с половозрелыми мышами с массой тела 10–12 г. (самки линии СВА и белые беспородные самцы) и белыми беспородными крысами самцами с массой тела 30–350 г., полученными из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленобласть, Всеволожский район, дер. Рапполово), была одобрена локальным этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ» (№5/15 от 26.06.2015).

Эксперименты на серонегативных самках хорьков с массой тела 0,7–1,1 кг проводили на базе ООО «Институт доклинических исследований» (Ленинградская обл., Всеволожский р-н, пос. Кузьмолловский) в соответствии с решениями локальной биоэтической комиссии при ООО «Институт доклинических исследований» №1.4/17 от 18.01.2017 и №1.33/17 от 05.06.2017.

Вся работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (2010). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с санитарно–эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218–14 (2014) и с Директивой Европейского парламента и совета Европейского союза (2010).

Анализ генома. Нуклеотидную последовательность реассортантных штаммов вируса гриппа определяли с помощью секвенирования последовательностей сегментов генома по методу Сэнгера при использовании автоматического капиллярного секвенатора 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Состав генома штаммов анализировали с помощью модифицированного нами метода пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMarkQ24.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента или непараметрического критерия Манна–Уитни с использованием программного обеспечения Statistica 6.0 и GraphPad Prism 5.0. Для оценки статистических различий между группами хорьков использовали односторонний анализ дисперсии (ANOVA). За величину уровня статистической значимости было принято значение $p < 0,05$.

2. СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ДОНОР АТТЕНУАЦИИ В/ЛЕНИНГРАД/14/17/55 ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ОДНОГО ГОДА И СТАРШЕ

Защита от гриппа детей раннего возраста является одной из важнейших задач здравоохранения. В музее отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» хранится ХА штамм В/Ленинград/14/17/55, который может стать перспективным донором при подготовке штаммов ЖГВ типа В для детей в возрасте от года до трех лет. Он обладает всеми фенотипическими свойствами, присущими донорам аттенуации (*ts/ca/att* фенотип), в 1960–1970 гг. был широко апробирован в клинических наблюдениях в качестве вакцинного штамма, а в 1980–1990 гг. – как донор аттенуации. После многочисленных клинических наблюдений на детях в возрасте от одного года и старше, В14 зарекомендовал себя как штамм, обладающий повышенными характеристиками безопасности, ареактогенностью и иммуногенностью для детей младшего дошкольного и школьного возраста (Александрова и др. 1968; 1971; 1989; Сиротенко и др., 1971; Полежаев и др., 1986).

После 1991 года в качестве базового донора аттенуации ЖГВ был выбран ХА вирус В/СССР/60/69, а ХА вирус В/Ленинград/14/17/55 остался в качестве резервного; его исследования были приостановлены, в связи с чем отсутствуют данные о геноме вируса и молекулярных основах его аттенуации. Поскольку данная информация на сегодняшний день является основополагающей для использования нового донорского вируса при подготовке ЖГВ, в представленной работе резервный штамм В14 был полностью охарактеризован самыми современными методами.

Прежде всего, была определена нуклеотидная последовательность донора В14. Была выявлена гетерогенность его популяции по ряду позиций, что потребовало его

клонирования для получения чистой линии. Ранее (в 1960–1970 гг.) вирус В14 этой процедуре не подвергался. В нашем распоряжении имелся вакцинный штамм В/14/28, подготовленный в 1980–х гг. на основе эпидемического вируса В/СССР/3/87 и донора аттенуации В14. Поскольку теоретически при скрещивании донора с «диким» вирусом в геном реассортанта переходит любой из клонов гетерогенной популяции донора, важно было отобрать клон донора В/Ленинград/14/17/55, по фенотипическим характеристикам и нуклеотидному составу максимально соответствующий вакцинному штамму В/14/28, в прошлом зарекомендовавшему себя как безвредный и высокоиммуногенный для детей (Отчет ИЭМа №58–2/16–52 от 19.09.1991г.).

Было проведено двойное клонирование вируса В14 методом предельных разведений на SPF (свободных от специфической патогенной флоры) РКЭ, в результате чего отобрали 8 клонов. Температурочувствительность полученных клонов определяли по двум точкам за верхним пределом температурного оптимума (37 и 38°C), опираясь на полученный ранее опыт (Ларионова, 2017) работы с официально разрешенным к использованию базовым донором аттенуации В60. Проведенный фенотипический анализ показал, что отобранные клоны, как и сам донор В14, обладая выраженным *ca* фенотипом, проявляют определенную вариабельность при культивировании за верхними пределами температурного оптимума (37 и 38°C), позволившую разделить их на 3 группы: (1) температуроустойчивые при 37°C, но температурочувствительные при 38°C; (2) клоны с «пограничной» (не четко выраженной) температурой инкубации; (3) *ts* как при 37°C, так и при 38°C (табл. 1).

Таблица 1. Фенотипические характеристики доноров аттенуации и клонов, подготовленных на основе резервного донора В/Ленинград/14/17/55

Вирусы, клоны	RCT при t °C			Фенотип при t °C			
	37 °C	38 °C	26 °C	37 °C	38 °C	26 °C	
Базовый донор В60 ¹	1,5±0,4	8,0±0,2	2,0±0,1	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>	
Резервный донор В14	4,0±2,0	6,8±1,2	1,7±0,5	<i>ts/±ts</i>	<i>ts/±ts</i>	<i>ca</i>	
Вакцинный штамм В/14/28	6,3±0,7	7,6±0,9	2,1±0,3	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>	
В14/740	Группа 1	3,0±1,2	4,8±1,9	5,3±1,2	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/830		3,3±1,9	6,8±0,4	3,5±0,8	<i>non-ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/780	Группа 2	4,0±0,9	6,8±0,5	2,2±0,5	<i>±ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/690		3,9±1,5	3,6±1,9	3,1±0,5	<i>±ts</i>	<i>±ts</i>	<i>ca</i>
В14/680		4,9±0,3	5,4±1,5	2,6±0,9	<i>±ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/611	Группа 3	6,3±1,8	5,3±0,9	3,0±0,3	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/710		6,2±0,2	7,8±0,1	1,9±0,2	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>
В14/610		6,5±0,5	6,8±0,2	1,8±0,1	<i>ts</i>	<i>ts</i>	<i>ca</i>

¹По материалам Ларионовой, 2017

Подобное группирование клонов альтернативного донора еще раз подтвердило гетерогенность его популяции и необходимость выбора клона с наиболее четкими *ts* и *ca* характеристиками. В качестве контролей были использованы базовый донор аттенуации В60, *ts* при 38°C, но *non-ts* при 37°C и вакцинный штамм В/14/28, который оказался высоко температурочувствительным при обеих использованных температурах.

Известно, что *ts* фенотип вирусов гриппа четко коррелирует с аттенуацией (Kiseleva et al, 2000). Поскольку нашей задачей было выделение из популяции ХА вируса В14 наиболее аттенуированного клона, который должен опережать по этому показателю базовый донор В60, пристальное внимание было уделено группе 3, как наиболее *ts* и соответствующей по этому признаку штамму сравнения В/14/28. Мы провели полногеномное секвенирование всех *ts* клонов этой группы (В14/611; В14/710; В14/610) и вакцинного штамма В/14/28. Для дальнейшей работы был выбран клон В14/710, не содержащий гетерогенных позиций, наиболее чувствительный к температурам

инкубации 37°C и 38°C и полностью соответствующий по нуклеотидным последовательностям внутренних генов вакцинному штамму В/14/28.

Сравнительный анализ *ts* фенотипа двух вирусов – В14/710 и базового донора В60 – показал, что у донора В14/710 титр при повышенной (37°C) температуре инкубации статистически достоверно ниже (критерий Манна–Уитни $U=0$, $Z=1,99$, $p=0,046$), то есть его *ts* фенотип достоверно более выражен (2,2 против 3,2 lg ЭИД₅₀/мл).

2.1.1 ВЫЯВЛЕНИЕ АТТЕНУИРУЮЩИХ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ШТАММА В14/710

Поскольку «дикий» родитель резервного донора не сохранился, для определения кодирующих замен, которые могут отвечать за аттенуацию вируса В14, путем множественного выравнивания было выполнено сравнение последовательностей белков и генетических сегментов донора В14 с последовательностями «диких» вирусов гриппа В разных лет выделения. Использовалось от 220 до 730 доступных аминокислотных последовательностей, представленных в базе данных Influenza Research Database (www.fludb.org).

Анализ последовательности альтернативного донора В14/710 выявил в консервативных участках генов, кодирующих внутренние белки, 22 аминокислотные замены, 17 из которых оказались уникальными (табл. 2).

Таблица 2. Аминокислотные замены во внутренних белках клонированного донора В14/710

Сегмент генома	А/к позиция	В/14/28 ²	В14/710	WT вирусы	А/к замена обнаружена у WT вирусов	Уникальность замены
PB2	20	Pro	Pro	Thr	0/592	Да
	62	Ile	Ile	Thr	2/592	Да
	124	Arg	Arg	Lys	0/592	Да
	158	Gln	Gln	Pro	2/592	Да
	303	Met	Met	Ile	1/592	Да
	467	Gly	Gly	Glu	1/592	Да
PB1	75	Lys	Lys	Glu	0/596	Да
	737	Gly	Gly	Asp	2/596	Да
PA	191	Arg	Arg	Ile	0/730	Да
	236	Arg	Arg	Lys	7/730	Да
	538	Ile	Ile	Val	1/730	Да
	614	Ala	Ala	Thr	1/730	Да
	673	Asn	Asn	Gly/Ser	0/730	Да
NP	145	Val	Val	Ile	1/610	Да
	242	Gly	Gly	Val	0/610	Да
	377	Asn	Asn	Asp	1/610	Да
	631	Ile	Ile	Thr	3/610	Да
M1 ¹	–	–	–	–	271/271	Нет замен
BM2	21	Val	Val	Met	10/454	Нет
	87	Val	Val	Ile	10/454	Нет
NS1 ¹	–	–	–	–	753/753	Нет замен
NS2 ¹	–	–	–	–	220/220	Нет замен
ВСЕГО уникальных кодирующих замен:						17

¹Анализ аминокислотных последовательностей NS и M сегментов не выявил различий между клоном В14/710 и эпидемическими вирусами гриппа В, представленными в базе данных Influenza Research Database. ²Вакцинный штамм В/14/28 использован в качестве вируса сравнения.

Количество уникальных кодирующих мутаций в геноме вируса В14/710 оказалось значительно выше, чем у других известных доноров аттенуации типа В (для сравнения: у донора аттенуации вакцины FluMist – В/Ann Arbor/6/60 – 9 мутаций; у донора В60 – 7 мутаций). Расположение замен в белках В14/710 отличается от замен, известных для используемых на настоящий момент доноров аттенуации В60 и В/Ann Arbor/6/60.

2.2 ЭКСПРЕСС–СКРИНИНГ РЕАССОРТАНТОВ ВИРУСОВ ГРИППА В МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

Быстрый и адекватный метод скрининга реассортантов играет немаловажную роль при подготовке штаммов ЖГВ. Использование разработанной нами модификации нового, оперативного и экономичного метода анализа, основанного на современной технологии пиросеквенирования, позволяет существенно сократить время анализа генома реассортантов – в течение одного дня можно определить полный состав генома 15–20 реассортантов вируса гриппа В, то есть провести не менее 120–160 анализов.

Протокол генотипирования реассортантов основан на секвенировании коротких переменных участков последовательности генов. Для выявления консервативных и переменных участков генов и подбора праймеров было выполнено множественное выравнивание последовательностей вирусов гриппа В, циркулировавших с 1940 по 2018 гг. и доступных в Influenza Research Database. Такое выравнивание позволило подобрать универсальные праймеры для анализа генома реассортантов, полученных на основе любых эпидемических вирусов гриппа В и доноров аттенуации В60 и/или В14/710.

Праймеры этапа ПЦР подбирались на консервативные участки вирусов В14/710, В60, В/Mass, В/Ind, В/Ph, фланкирующие переменные участки. Для дальнейшего определения принадлежности генов реассортантов тому или другому родительскому вирусу, праймеры этапа пиросеквенирования подбирались к консервативным фрагментам, непосредственно за которыми начинаются высоко переменные участки последовательности анализируемых родительских штаммов.

В качестве примера на рисунке 1 представлены пирограммы, полученные при анализе переменных участков последовательностей полимеразных генов вирусов гриппа В60, В14/710 и В/Ind. Как видно из рисунка, анализ данного участка позволяет легко определить происхождение гена от того или иного «родительского» вируса.

В результате применения метода пиросеквенирования нам удалось в течение двух недель проанализировать происхождение генов более 300 реассортантов, подготовленных с использованием доноров аттенуации В60 и В14/710 и четырех эпидемических вирусов, принадлежащих к двум различным генетическим линиям.

Кроме того, использование разработанной методики позволяет выявлять пробы, в которых содержится популяция вирусов, гетерогенная по отдельным генам, то есть содержащая примеси реассортантов разной формулы генома. Смеси, в целом содержащие реассортанты с искомым набором генов 6:2, но гетерогенные по одному–двум генам, являются наиболее перспективными для дальнейшего клонирования. Пиросеквенирование позволяет найти такие реассортанты уже на ранних этапах подготовки вакцинных штаммов.

2.3 МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АТТЕНУАЦИИ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ВИРУСА В14/710

Три основных свойства донора определяют аттенуацию вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на его основе. Это *ts/ca/att* фенотип. Эти свойства обусловлены наличием аттенуирующих мутаций в геноме ХА донора аттенуации. Для установления молекулярных основ аттенуации ХА вируса гриппа необходимо исследовать роль каждого его «внутреннего» гена, в котором содержатся уникальные аминокислотные замены.

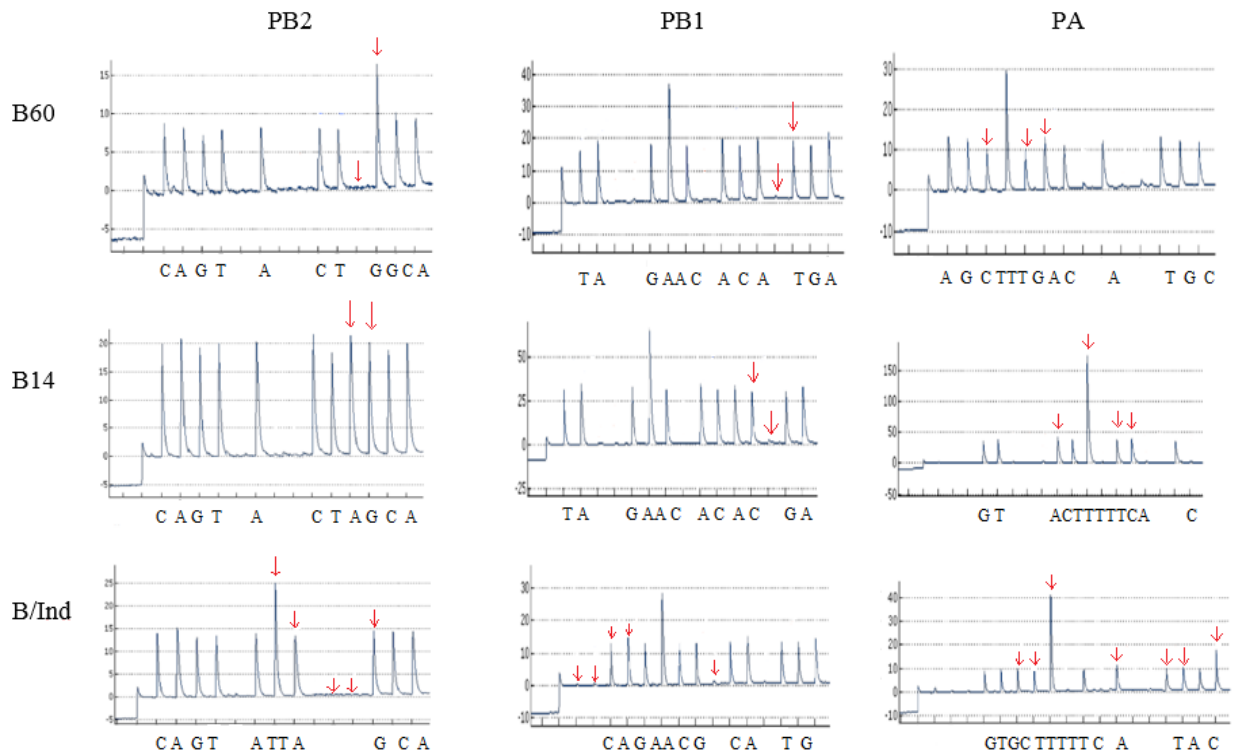


Рисунок 1. Пирограммы, полученные путем пиросеквенирования полимеразных генов вирусов В60, В14/710 и В/Ind. Обозначения: по оси абсцисс – нуклеотидная последовательность вирусов, по оси ординат – интенсивность флюоресценции в относительных единицах; стрелками обозначены пики, показывающие характерные отличия между сравниваемыми вирусами.

2.3.1 РОЛЬ МУТАНТНЫХ ГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ТЕМПЕРАТУРОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА ВИРУСА В14/710

Для оценки вклада мутантных генов в формирование *ts* фенотипа потенциального донора ЖГВ для самых маленьких детей – В14/710, проводилось его скрещивание с эпидемическими вирусами гриппа В, принадлежащими к различным генетическим линиям и отличающимся от него температуроустойчивым (*non-ts*) фенотипом.

При скрещивании альтернативного донора В14/710 с эпидемическими вирусами В/Lee/40, В/Mass (линия Ямагата) и В/Ind (линия Виктория) мы получили репрезентативную коллекцию одногенных и полигенных реассортантов с различными сочетаниями генов от донора и эпидемических вирусов (2:6, 6:2, 5:3, 4:4, 3:5, 1:7, 7:1). Изучение роли генов в формировании *ts* фенотипа полученных реассортантов показало, что для проявления температурочувствительного фенотипа достаточно наследования от донора В14 только генов полимеразного комплекса, причем сочетание генов РА и РВ2 от донора В14 при «диком» РВ1 уже обеспечивало выраженный *ts* фенотип реассортанта, независимо от генетической линии, к которой относился «дикий» родитель. Сочетания генов РВ1+РВ2 от донора В14 при наследовании третьего гена от «дикого» родителя также обеспечивало *ts* фенотип. Более того, присутствие только одного РВ2 сегмента от донора в полимеразном комплексе реассортантов с разным сочетанием остальных генов также приводило к температурочувствительности реассортантов. Наследование гена NP от В14 в отдельных случаях приводило к появлению *ts* фенотипа даже при наличии в полимеразном комплексе только одного «холодного» гена, что говорит о важной роли взаимодействия (конstellации) «донорских белков» в становлении *ts* фенотипа (табл. 3).

Таблица 3. Роль генов донора аттенуации В14/710 в формировании его температурочувствительного фенотипа

Формула генома	Кол-во вирусов	*Гены унаследованы от:		Фенотип при 37 °С
		ХА донора аттенуации	WT вируса	
7:1	3	PB2, PB1, PA, NP, NA, M, NS	HA	<i>ts</i>
6:2	3	PB2, PB1, PA, NP, M, NS	HA, NA	<i>ts</i>
	4	PB2, PB1, NP, NA, NS	PA, HA	<i>ts</i>
	5	PB2, PA, NP, NA, M, NS	PB1, HA	<i>ts</i>
5:3	15	PB2, PB1, NP, NA, NS	PA, HA, M	<i>ts</i>
	19	PB2, PB1, PA, NP, NS	HA, NA, M	<i>ts</i>
	7	PB2, PB1, PA, NA, NS	HA, NP, M	<i>ts</i>
	4	PB2, NP, NA, M, NS	PB1, PA, HA	<i>ts</i>
4:4	9	NS, M, NP, PB2	PB1, PA, HA, NA	<i>ts</i>
	4	PB2, PB1, PA, M	HA, NP, NA, NS	<i>ts</i>
3:5	15	NP, NA, M	PB2, PB1, PA, HA, NS	<i>non-ts</i>
	2	PB2, PB1, NS	PA, HA, NP, NA, M	<i>ts</i>
	7	PB2, PB1, PA	HA, NP, NA, M, NS	<i>ts</i>
2:6	6	M, NS	PB2, PB1, PA, HA, NP, NA	<i>non-ts</i>
	3	NP, NS	PB2, PB1, PA, HA, NA, M	<i>non-ts</i>
	6	NA, M	PB2, PB1, PA, HA, NP, NS	<i>non-ts</i>
	5	PB2, PA	PB1, HA, NP, NA, M, NS	<i>ts</i>
1:7	2	NP	PB2, PB1, PA, HA, NA, M, NS	<i>non-ts</i>
	3	NA	PB2, PB1, PA, HA, NP, M, NS	<i>non-ts</i>

2.3.2 РОЛЬ ГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ АТТЕНУИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ВИРУСА В14/710

Изучение уровня репликации реассортантов в легочной ткани мышей подтвердило данные фенотипического анализа, проведенного в системе *in vitro* (табл.4).

Таблица 4. Репликация *ts* реассортантов в легких мышей на 3 сутки после интраназального заражения и родительских штаммов

Вирусы	Гены								Титр вируса в легких (lg ЭИД/мл/г)
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
Родительские вирусы									
B14/710	B14	B14	B14	B14	B14	B14	B14	B14	2,5 ± 0,21
B/Lee	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	7,9 ± 0,47
B/Mass	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	6,2 ± 0,50
B/Ind	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	6,0 ± 0,81
Реассортанты на основе донора В14/710 и WT вирусов гриппа В / количество									
2 шт.	B14	B14	B14	WT	B14	WT	B14	B14	1,9 ± 0,25
7 шт.	B14	B14	B14	WT	WT	WT	WT	WT	1,8 ± 0,97
5 шт.	B14	WT	B14	WT	WT	WT	WT	WT	2,3 ± 0,28
9 шт.	B14	WT	WT	WT	B14	WT	B14	B14	2,2 ± 0,23

Как видно из таблицы 4, в данном случае, так же как при оценке температурочувствительности, реассортанты, содержащие все три гена полимеразного комплекса от ХА родителя В14/710, не отличались по уровню репликации от самого альтернативного донора, также, как и реассортанты, содержащие гены PB2 и PA от ХА родителя, вне зависимости от генетической принадлежности эпидемического родителя.

Представленные результаты свидетельствуют о ведущей роли генов PB2 и PA в определении *ts* и *att* фенотипа реассортантов, подготовленных при скрещивании альтернативного донора В14/710 с эпидемическими вирусами.

В отличие от базового донора В60, который содержит немутантный ген PB1 (Kiseleva et al., 2010), в гене PB1 вируса В14/710 обнаружены две уникальные кодирующие мутации (табл. 2). Поэтому, для выяснения возможной роли гена PB1 в аттенуации донора В14/710 был сконструирован одногенный по PB1 реассортант В14–60 двух доноров – В14/710 и В60, содержащий в составе своего генома 7 генов от В14/710, и один немутантный ген PB1 – от В60 (табл. 5).

Таблица 5. Структура генома и фенотипические характеристики реассортанта В14–60 и его родительских вирусов

Вирус	Гены								Фенотип
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
В60	В60	В60	В60	В60	В60	В60	В60	В60	<i>ts, ca</i>
В14/710	В14	В14	В14	В14	В14	В14	В14	В14	> <i>ts, ca</i>
В14–60	В14	В60	В14	В14	В14	В14	В14	В14	>> <i>ts, ca</i>

Ранее было показано, что именно гены, кодирующие нуклеопротеиновый комплекс (PB2, PB1, PA, NP) играют определяющую роль в аттенуации (Hoffmann et al, 2005; Chen et al, 2006; Kiseleva et al, 2010; Ларионова, 2017). Донор В14/710 содержит мутации во всех четырех генах NP–комплекса в отличие от донора В60, несущего мутации только в двух полимеразных генах. Поэтому можно было ожидать, что замена в геноме вируса В14/710 гена PB1 на немутантный PB1 ген от донора В60 приведет к некоторому снижению аттенуирующих свойств полученного одногенного реассортанта. Однако, при исследовании фенотипических особенностей реассортанта В14–60 были получены неожиданные результаты (рис.2).

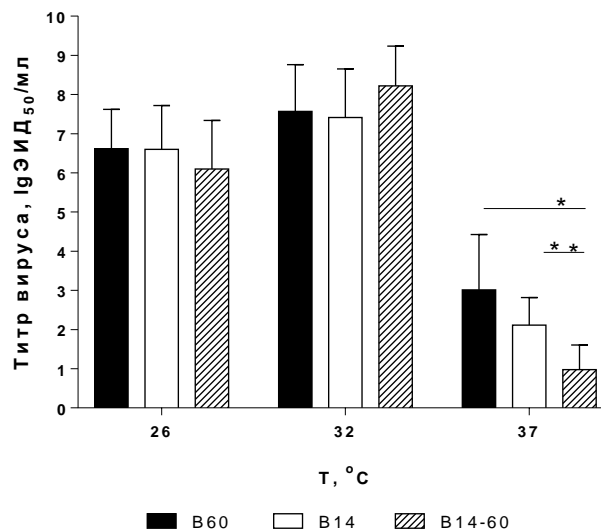


Рисунок 2. Инфекционные титры доноров аттенуации ЖГВ и их реассортанта В14–В60 при разных температурах инкубации. Обозначения: * (p=0,010); ** (p=0,018), критерий Манна–Уитни.

Изучение *ts/ca* фенотипа реассортанта В14–60 показало, что он не только сохранил свойство холодовой адаптации на уровне родительских вирусов, но, вопреки ожиданиям, был статистически достоверно более температурочувствителен, чем каждый родительский штамм по отдельности. Таким образом, разобщение генов полимеразного комплекса вируса В14/710 с включением в него немутантного PB1 гена от донора В60 привело к усилению *ts* фенотипа 7:1 реассортанта В14–60.

Изучение уровня репродукции реассортанта В14–60 в легких мышей показало, что он был более *att* для животных, чем исходные родительские вирусы (табл. 6). В первые сутки после заражения значение титра реассортанта В14–В60 в легких животных было статистически достоверно ниже титра родительского вируса В60 (критерий Манна–Уитни $U=0$, $Z=1,99$, $p=0,046$), уже на пятые сутки реассортантный вирус не детектировался в легких мышей, в то время как В60 и В14/710 продолжали выделяться из легких. На седьмые сутки ни один из исследованных вирусов в легких мышей не обнаруживался.

Таблица 6. Титры доноров аттенуации и одногенного реассортанта на их основе в легких мышей

Сутки	Титр вируса в легких (lg ЭИД/мл/г)		
	В60	В14/710	В14–60
1	3,3 ($\pm 0,56$)	2,26 ($\pm 0,53$)	0,96 ($\pm 0,26$)
3	3,1 ($\pm 0,7$)	2,5 ($\pm 0,21$)	2 ($\pm 0,65$)
5	1,8 ($\pm 0,77$)	1,5 ($\pm 0,86$)	0,7 ¹
7	0,7 ¹	0,7 ¹	0,7 ¹

¹Титр вируса был ниже детектируемого уровня.

Эти результаты еще раз подтверждают (1) высокую аттенуацию одногенного реассортанта В14–60, достоверно превышающую таковую родительских донорских вирусов и (2) факт прямой зависимости между температурочувствительным фенотипом ХА вируса и его аттенуацией.

2.4 ИММУНОГЕННОСТЬ РЕАССОРТАНТНЫХ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ, ПОДГОТОВЛЕННЫХ НА ВИРУСЕ В14/710, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МЫШАХ

В конце 1980–х гг. были проведены сравнительные наблюдения на детях в возрасте 3–14 лет безвредности и иммуногенности двух реассортантов, В/60/32 и В/14/28, подготовленных соответственно на основе доноров аттенуации В/СССР/60/69 и В/Ленинград/14/17/55. В качестве эпидемического родительского вируса был использован вирус В/СССР/3/87. Оба вакцинных штамма оказались ареактогенными для детей. Двукратная вакцинация серонегативных детей вызывала подъем титров антигемагглютинирующих антител в 4 и более раз у 63,9% (В/60/32) и 62,0% (В/14/28) привитых (Отчет ИЭМа №58–2/16–52 от 19.09.1991г.). Таким образом, по показателям безвредности и иммуногенности оба вакцинных штамма не уступали друг другу. Эти результаты послужили толчком для проведения заключительной части первого направления наших экспериментальных исследований, посвященной сравнительному изучению иммуногенности реассортантов, подготовленных параллельно на основе двух доноров аттенуации – базового (В60) и резервного (В14/710).

Из данных литературы известно, что иногда с повышением *att* свойств вакцинных штаммов страдала их иммуногенность – безвредные для человека гриппозные вакцины оказывались слабо иммуногенными (Александрова и др., 1994). Поэтому важно было продемонстрировать достаточную иммуногенность вакцинных штаммов, подготовленных на основе более аттенуированного, чем базовый донор В60, вируса. Для сравнения использовали три пары вакцинных штаммов – вирусы В/60/32 и В/14/28, одинаковая иммуногенность которых уже была успешно продемонстрирована в наблюдениях на детях, и вакцинные штаммы, подготовленные на основе современных эпидемических вирусов В/Phuket/3073/2013 (Yam) и В/Brisbane/60/08 (Vic) и обоих донорских штаммов.

Однократная интраназальная иммунизация мышей линии СВА в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀/мл приводила к выраженному гуморальному ответу на вакцинацию через 3 недели от начала опыта. Значение среднегеометрических титров находилось в интервале

1:160–1:320 (рис. 3). При этом не было обнаружено статистически значимых различий в уровне иммунного ответа у мышей, иммунизированных вакцинными штаммами, подготовленными на разных донорах аттенуации. Эти результаты позволяют предположить, что, вакцинные штаммы, подготовленные на более аттенуированном, чем базовый, доноре В14/710, способны стимулировать адекватный иммунный ответ.

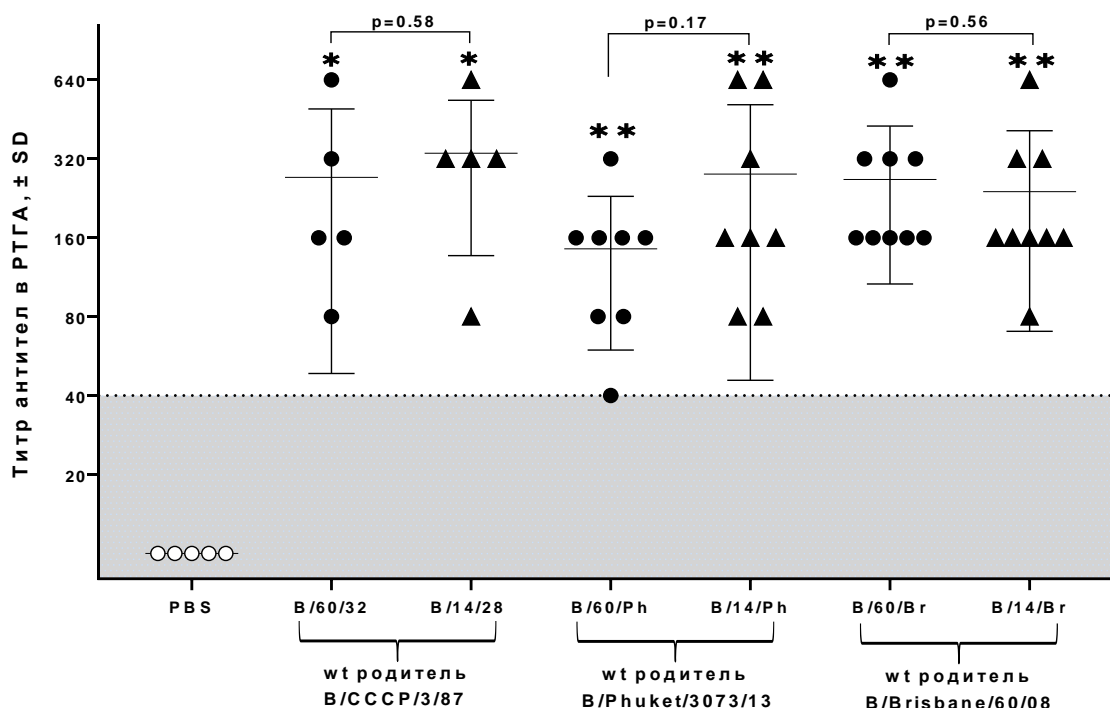


Рисунок 3. Иммуногенность вакцинных штаммов, подготовленных на основе доноров аттенуации В/СССР/60/69 и В14/710, на модели мышей линии СВА. Обозначения: черные кружки – штаммы, подготовленные на основе донора В60; черные треугольники – штаммы, подготовленные на основе донора В14; минимальный титр антител, рассматриваемый как сероконверсия (1:40), выделен серым цветом и обозначен пунктирной линией; статистически значимое снижение титра антител по отношению к группе неиммунизированных животных, получивших PBS, обозначено как *($p < 0,02$) и **($p < 0,0001$); вакцинные штаммы, подготовленные на основе донора В60: В/60/32, В/60/Ph, В/60/Br; вакцинные штаммы, подготовленные на основе донора В14/710: В/14/28, В/14/Ph, В/14/Br.

Таким образом, в результате проведенных исследований был отобран и фенотипически охарактеризован клон В14/710 ХА вируса В14, более аттенуированный, чем базовый донор В60, но не уступающий ему по иммуногенности, и установлены механизмы его аттенуации. Предстоят дальнейшие доклинические и клинические испытания, необходимые для его внедрения в практику как донора аттенуации типа В ЖГВ для защиты от гриппа детей в возрасте одного года и старше.

2.5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРОТЕКТИВНОСТЬ ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН, СОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕННО ОТЛИЧАЮЩИЕСЯ ЛИНИИ ВИРУСА ГРИППА В

Другим направлением нашей работы являлось изучение защитного потенциала вакцин, содержащих антигенно отличающиеся штаммы вируса гриппа В.

Социркуляция двух генетически разных линий вируса гриппа В – В/Vic и В/Yam, заставляет задуматься о решении проблемы несоответствия между входящими в состав трехвалентных вакцин и циркулирующими штаммами вируса гриппа В. В настоящем разделе сделана попытка оценки возможной перекрестной протективности ЖГВ, содержащей штаммы вируса гриппа В, принадлежащие к разным генетическим линиям. Были проведены исследования реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на

основе базового донора аттенуации В/СССР/60/69, поскольку современная эпидемиологическая ситуация требует немедленного решения вопроса о перспективности применения трехвалентных ЖГВ в случае несовпадения их штаммового состава с циркулирующими вирусами гриппа В.

В качестве моновалентных вакцин типа В в работе были использованы вакцинные штаммы, подготовленные на основе эпидемических вирусов В/Phuket/3073/2013 (В/Yam) или В/Brisbane/60/08 (В/Vic) и базового донора В60. В состав поливалентных вакцин входили те же вакцинные компоненты вируса гриппа В генетических линий В/Vic и В/Yam, которые были использованы в качестве моновакцин (табл. 7).

Таблица 7. Состав вакцин, использованных в экспериментах на хорьках

Вакцина	Вакцинные штаммы подготовлены на основе следующих WT вирусов:
М–ЖГВ	В/Phuket/3073/2013 (В/Yam)
М–ЖГВ	В/Brisbane/60/08 (В/Vic)
Т–ЖГВ	А/New York/61/2015 (H1N1)pdm09
	А/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) В/Phuket/3073/2013 (В/Yam)
Т–ЖГВ	А/New York/61/2015 (H1N1)pdm09
	А/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) В/Brisbane/60/08–like (В/Vic)
К–ЖГВ	А/New York/61/2015 (H1N1)pdm09
	А/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)
	В/Phuket/3073/2013 (В/Yam) В/Brisbane/60/08–like (В/Vic)

2.5.1 КРОСС–ПРОТЕКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ МОНОВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ТИПА В

В первой серии экспериментов была проведена оценка возможной кросс–протективности живой гриппозной моновалентной вакцины (М–ЖГВ) из штаммов вируса гриппа В, принадлежащих к генетическим линиям В/Vic и В/Yam (табл. 8).

Таблица 8. Схема изучения кросс–протективности моновалентной ЖГВ типа В в экспериментах на хорьках

Группа №	Вакцинный компонент ЖГВ		Челлендж–вирус	
	В/Vic	В/Yam	В/Vic	В/Yam
1 (ЖГВ В/Vic)	+		+	
2 (ЖГВ В/Vic)	+			+
3 (ЖГВ В/Yam)		+		+
4 (ЖГВ В/Yam)		+	+	
5 (контроль)	PBS	PBS	+	
6 (контроль)	PBS	PBS		+
7 (интактная)				

Хорьки были разделены на 7 групп по 3 животных в каждой. Группы 1 и 2 были проиммунизированы М–ЖГВ линии В/Vic, группы 3 и 4 – М–ЖГВ линии В/Yam в дозе 8,0 Ig ЭИД₅₀/хорька, группы 5 и 6 получили интраназально фосфатно–солевой буферный раствор (PBS, контроль челлендж–вируса). Спустя 21 день после иммунизации, животных 1, 4 и 5 группы заражали эпидемическим челлендж–вирусом линии В/Vic (В/Bris), а 2, 3 и 6 группы – эпидемическим челлендж–вирусом линии В/Yam (В/Phu) в

дозе 6,0 lg ЭИД₅₀/хорька. Животные 7 группы (интактной) не были ни вакцинированы, ни заражены эпидемическим вирусом.

После однократного введения хорькам М–ЖГВ из линий В/Vic или В/Yam в ВДП иммунизированных хорьков (группы 1–4) была отмечена репликация вакцинного вируса (рис. 4а). Клинические проявления у иммунизированных животных (изменение массы и температуры тела, физиологическая активность) не отличались от контрольных животных. После инфицирования эпидемическими челлендж–вирусами гриппа линии В/Vic или В/Yam, у контрольных групп животных (5 и 6) отмечали повышение температуры тела и снижение массы тела. Кроме того, была продемонстрирована репликация челлендж–вируса как в ВДП, так и в НДП животных (рис. 4а,б).

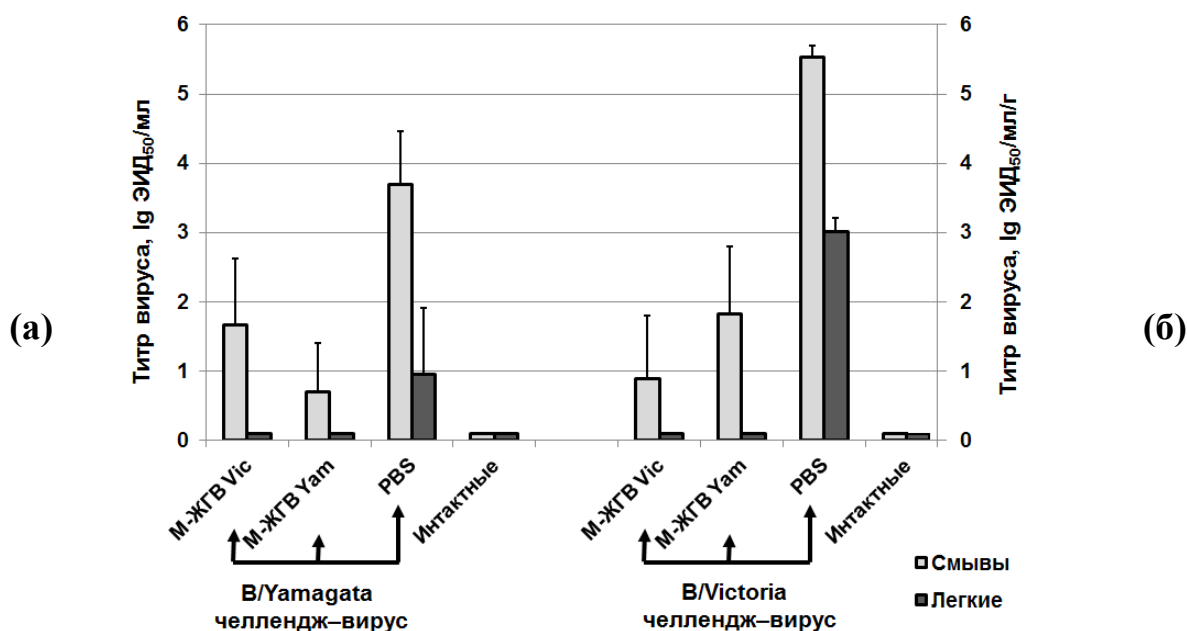


Рисунок 4. Репликация челлендж–вируса у хорьков, иммунизированных живой гриппозной моновакциной типа В. Обозначения: (а) после инфицирования вирусом линии В/Yam; (б) после инфицирования вирусом линии В/Vic.

После иммунизации у всех хорьков наблюдалось четырехкратное или более высокое увеличение титров гуморальных антител к гомологичному WT вирусу и наоборот, не было обнаружено перекрестного антительного ответа на гетерологичный вирус (табл. 9).

Таблица 9. Иммунный ответ у хорьков на введение живой гриппозной вакцины (по результатам РТГА)

Препарат	Среднегеометрический титр антител в сыворотках крови до и после иммунизации			
	H1N1	H3N2	V/Vic	V/Yam
М–ЖГВ (В/Vic)	5.0 / 5.0	5.0 / 5.0	5.0 / 36.0	5.0 / 5.0
М–ЖГВ (В/Yam)	5.0 / 5.0	5.0 / 5.0	5.0 / 5.0	5.0 / 90.0
Т–ЖГВ (В/Vic)	5.0 / 452.5	5.0 / 201.6	5.0 / 35.6*	5.0 / 5.0
Т–ЖГВ (В/Yam)	5.0 / 806.3	5.0 / 127.0	5.0 / 5.0	5.0 / 31.7**
К–ЖГВ	5.0 / 570.2	5.0 / 71.3	5.0 / 17.8	5.0 / 22.4
–	5.0 / 5.0	5.0 / 5.0	5.0 / 5.0	5.0 / 5.0

Обозначения: *Отличия между группами Т– или К–ЖГВ не были статистически значимыми (t–критерий Стьюдента = 1.18, p = 0.06). **Отличия между группами Т– или Ч–ЖГВ привитых животных не были статистически значимыми (t–критерий Стьюдента = 0.96, p = 0.50)

Ни у одного из животных, предварительно иммунизированных ЖГВ, не было обнаружено репликации ни гетерологичного, ни гомологичного челлендж-вируса в НДП (рис. 4). Средние титры челлендж-вируса в ВДП иммунизированных животных варьировали от 0,70 до 1,83 lg ЭИД₅₀/мл, тогда как в контрольных группах они составляли 5,53 (В/Vic) и 3,70 lg ЭИД₅₀/мл (В/Yam) соответственно.

Таким образом, однократная иммунизация хорьков моновакциной из линий В/Vic и В/Yam защищала животных от гриппозной инфекции, вызванной как гомологичным, так и гетерологичным челлендж-вирусом, не позволяя вирусу распространиться по нижним отделам дыхательного тракта.

2.5.2 КРОСС-ПРОТЕКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ

Получив в опытах с моновакцинами обнадеживающие результаты, мы провели серию аналогичных экспериментов, в которой М-ЖГВ была заменена на Т-ЖГВ. При изучении перекрестных защитных свойств Т-ЖГВ, хорьки были разделены на 9 групп, в каждой группе было по 3 животных. Группы 1 и 2 были проиммунизированы Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic), а группы 3 и 4 – Т-ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam) в дозе 8,0 lg ЭИД₅₀/хорька. Для контроля эффективности перекрестной защиты в случае несовпадения вакцинного вируса гриппа В в составе Т-ЖГВ и челлендж-вируса были включены группы 5 и 6, которые получали в той же дозе квадριвалентную вакцину (Н1N1, Н3N2, В/Vic, В/Yam). Группам 7 и 8 был введен интраназально PBS, а группа 9 оставалась интактной. Спустя 4 недели после иммунизации, хорьков 1, 3, 5 и 7 групп заражали эпидемическим челлендж-вирусом линии В/Vic, а животных 2, 4, 6 и 8 групп – эпидемическим челлендж-вирусом линии В/Yam в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀/хорька. Группы 7 и 8 являлись контролем челлендж-вирусов (табл. 10).

Таблица 10. Схема изучения кросс-протективности трехвалентной ЖГВ в экспериментах на хорьках

Группа №	ЖГВ (вакцинный В компонент)		Челлендж-вирус	
	В/Vic)	В/Yam	В/Vic	В/Yam
1 (Т-ЖГВ В/Vic)	+		+	
2 (Т-ЖГВ В/Vic)	+			+
3 (Т-ЖГВ В/Yam)		+	+	
4 (Т-ЖГВ В/Yam)		+		+
5 (К-ЖГВ)	+	+	+	
6 (К-ЖГВ)	+	+		+
7 (контроль)	PBS	PBS	+	
8 (контроль)	PBS	PBS		+
9 (интактная)				

При оценке клинических симптомов, у всех животных после иммунизации отмечалось некоторое снижение общей физической активности. Тем не менее, поведение животных 1–6 групп существенно не отличалось от контрольных групп 7–8 и интактной группы 9. Что касается температуры тела животных, анализ дисперсии данных (ANOVA), также не показал влияния вакцинации на изменение температуры тела ($p > 0,05$).

При оценке уровня репликации вакцинных вирусов в носовых ходах, у контрольных хорьков (группы 7–8) и интактной группе 9 вирус в ВДП ожидаемо не обнаруживался. У всех животных, иммунизированных как Т-ЖГВ, так и К-ЖГВ, титр вируса варьировал от 4,20 до 4,53 lg ЭИД₅₀/мл, что свидетельствует о хорошей

приживляемости вакцины. Следует отметить, что, поскольку животных иммунизировали трех– или четырехкомпонентной вакциной, в РКЭ определялся ее суммарный титр без детализации по отдельным компонентам. Тем не менее, доказательством того, что все вакцинные компоненты достаточно хорошо размножились в респираторном тракте вакцинированных животных, является тот факт, что в конце эксперимента у хорьков были выявлены достоверные приросты гуморальных антител ко всем вакцинным штаммам (таблица 9).

После челленджа эпидемическими вирусами гриппа линии V/Vic и V/Yam, у животных контрольных 7–8 групп проявлялись выраженные симптомы заболевания, такие, как чихание, потеря веса и повышение температуры тела (рис. 5а,б).

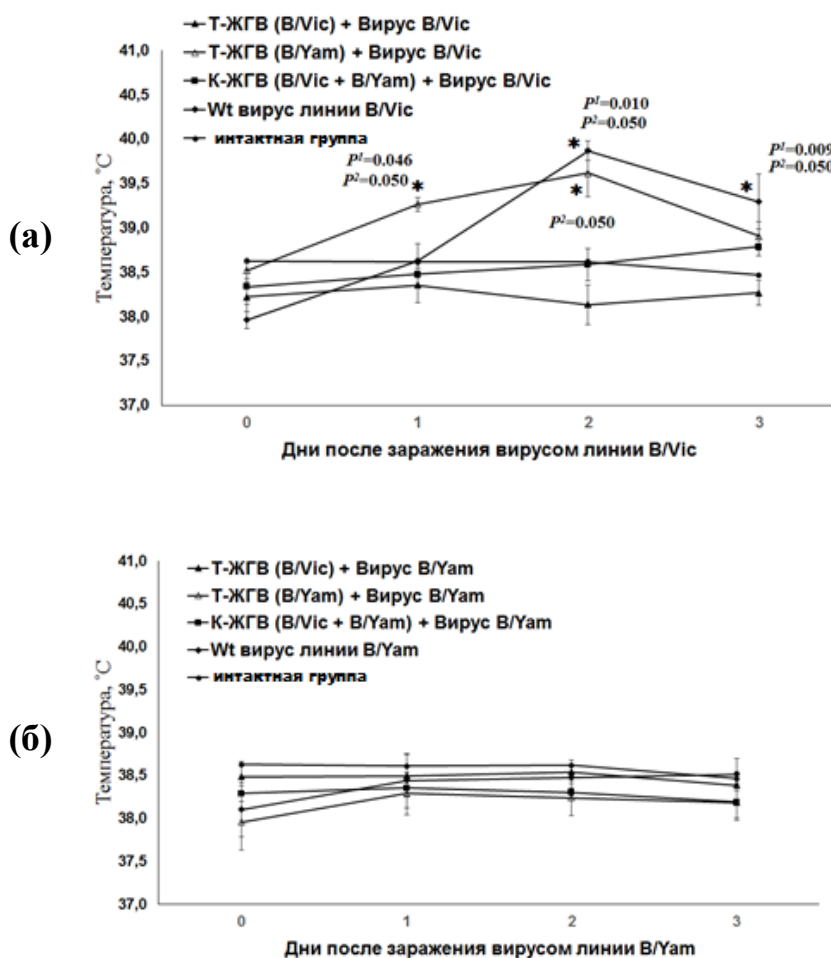


Рисунок 5. Температура тела хорьков, предварительно иммунизированных Т–ЖГВ или К–ЖГВ, после челленджа «дикими» вирусами гриппа. Обозначения: WT – вирус дикого типа; звездочка (*) над линиями указывает на статистически значимые различия по сравнению с интактной группой (ANOVA, $p < 0,05$); (а) после инфицирования хорьков вирусом линии V/Vic; (б) после инфицирования хорьков вирусом V/Yam.

Челлендж животных эпидемическим вирусом гриппа V/Vic привел к значительному повышению температуры тела в контрольной группе 7, по сравнению с интактной группой 9 (ANOVA, $p < 0,05$) (рис. 5а). В группах хорьков, иммунизированных Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, V/Vic) и К–ЖГВ, после их челленджа вирусом линии V/Vic не было зарегистрировано повышения температуры тела. У хорьков же, иммунизированных Т–ЖГВ (H1N1, H3N2, V/Yam) после челленджа эпидемическим вирусом линии V/Vic был зафиксирован небольшой подъем температуры ($39,5^{\circ}\text{C}$), однако, полученные

данные не имели статистически значимых отличий по сравнению с контрольной группой 7 ($p=0,658$, группа 3 против группы 7, U–тест Манна–Уитни).

Инфицирование хорьков вирусом гриппа «дикого» типа В/Yam не влияло на температуру тела животных контрольных групп, поэтому оценить защитный эффект Т– и К–ЖГВ против вируса линии Ямагата по этому признаку не удалось (рис. 5б).

При оценке репликации челлендж–вируса линии В/Yam, его присутствие не было обнаружено ни в носовых смывах, ни в легких животных, иммунизированных Т–ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam), содержащей гомологичный компонент вакцинного вируса гриппа В или К–ЖГВ (группы 4 и 6). В группе 2 – хорьки, иммунизированные Т–ЖГВ, содержащей викторианский вирус гриппа В (Н1N1, Н3N2, В/Vic), гетерологичный челлендж–вирус В/Yam выделялся из носовых ходов, однако, было отмечено статистически значимое снижение его репликации по сравнению с контрольной группой 8 (2,1 lg ЭИД₅₀/мл против 3,6 lg ЭИД₅₀/мл, Манн–Уитни U–тест, $p=0.049$; рис. 6а).

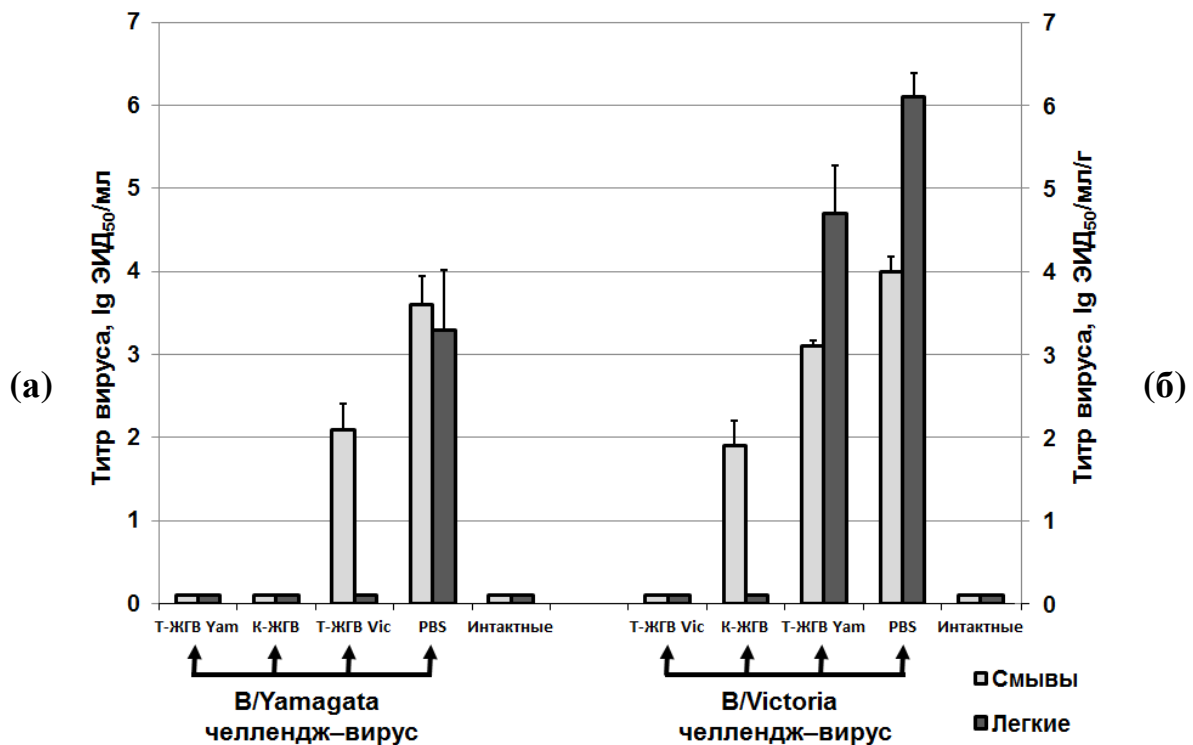


Рисунок 6. Репликация челлендж–вируса в респираторном тракте хорьков, предварительно вакцинированных трех– или квадριвалентной ЖГВ. Обозначения: (а) после инфицирования вирусом линии В/Yam; (б) после инфицирования вирусом линии В/Vic.

У животных, иммунизированных Т–ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic) или К–ЖГВ в легких не было обнаружено присутствия челлендж–вируса линии В/Vic (группы 1 и 5 соответственно). В носовых ходах хорьков, иммунизированных К–ЖГВ, было отмечено статистически значимое снижение репликации челлендж–вируса В/Vic (1,9 lg ЭИД₅₀/мл) по сравнению с контрольной группой 7 (4,0 lg ЭИД₅₀/мл). У хорьков, иммунизированных Т–ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam) в ВДП было зафиксировано снижение репликации вируса гетерологичной линии В/Vic. Кроме того, уровень репликации был статистически значимым по сравнению с контрольной группой животных (3,1 lg ЭИД₅₀/мл против 4,0 lg ЭИД₅₀/мл), однако, снижение репликации было не таким выраженным, как в 1–й группе животных. Что же касается Т–ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Yam) впоследствии зараженных гетерологичным вирусом В/Vic, то защита в НДП была менее выражена по сравнению группой хорьков, иммунизированных Т–ЖГВ (Н1N1, Н3N2, В/Vic) (рис. 5б).

При оценке уровня гуморального иммунного ответа в сыворотках крови хорьков спустя 28 дней после вакцинации, у всех иммунизированных животных было

зарегистрировано как минимум четырехкратное увеличение титров антигемагглютинирующих антител к гомологичным вирусам гриппа (табл. 9). При этом самые высокие титры в РТГА наблюдались для вакцинного компонента А(Н1N1)pdm09 (452.5–806.3). Для компонента А(Н3N2) было отмечены более низкие титры антител (71.3–201.6). Самые низкие показатели регистрировали для В компонентов вакцины (17.8–90.0). Что же касается антигемагглютинирующих антител к гетерологичным вирусам гриппа В, у иммунизированных трехвалентными вакцинами хорьков не было обнаружено перекрестно реагирующих антител.

Таким образом, представленные выше результаты свидетельствуют о том, что однократная иммунизация как моно-, так и трехвалентной вакциной способна защищать от последующего заражения не только гомологичным, но и гетерологичным эпидемическим вирусом гриппа В. Продемонстрированная перекрестная защита, скорее всего связана с локальным или клеточно-опосредованным иммунным ответом, поскольку перекрестно реагирующих антител к гетерологичному вирусу гриппа В (как линии В/Vic, так и В/Yam) в реакции РТГА обнаружено не было.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были разработаны подходы к расширению возможностей применения современной живой гриппозной вакцины. Для достижения этой цели работа проводилась в двух основных направлениях:

(1). *Подготовка резервного донора аттенуации живой гриппозной вакцины типа В, более аттенуированного, чем используемый в настоящее время базовый донор аттенуации В/СССР/60/69.* Разработка этого направления позволит охватить вакцинацией самые широкие слои населения. В рамках этого направления подготовлен ХА вирус В14/710, который может являться перспективным донором внутренних генов для подготовки штаммов ЖГВ типа В для детей в возрасте от одного года до трех лет. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что он обладает более выраженными показателями температурочувствительности и аттенуации, чем используемый в настоящее время в практике здравоохранения базовый донор В/СССР/60/69. Это может быть связано с тем, что в генах, кодирующие внутренние белки, обнаружено на 10 уникальных аминокислотных замен больше, чем у донора В/СССР/60/69. При этом иммуногенность реассортантов, полученных на основе ХА вируса В14/710 не уступала иммуногенности реассортантов, подготовленных на базовом доноре В/СССР/60/69. Также исследованы механизмы аттенуации ХА вируса В14/710 и установлена ведущая роль гена PB2 в формировании его аттенуирующих свойств; выявлена взаимодополняющая роль генов PB2 и PA в этом процессе. Показан дополнительный вклад генов PB1 и NP донора В14/710 в формировании температурочувствительного фенотипа.

(2). *Доказательство возможности применения трехвалентных живых гриппозных вакцин, несовпадающих в антигенном отношении с циркулирующими штаммами вируса гриппа В.* Работа в этом направлении сделает производство вакцин более лабильным и позволит защитить население от гриппозной инфекции даже в случае неполного совпадения циркулирующих и вакцинных штаммов вируса гриппа типа В без увеличения антигенной нагрузки, связанной с включением дополнительного, четвертого вакцинного компонента в состав вакцины. В связи с участвовавшим несовпадением циркулирующих и вакцинных штаммов вируса гриппа В трехвалентная ЖГВ, подготовленная на основе отечественных доноров аттенуации, была охарактеризована в экспериментах на хорьках с точки зрения ее потенциальной кросс-протективности. Было установлено, что однократная иммунизация как моно-, так и трехвалентной ЖГВ защищает от последующего заражения гетерологичным эпидемическим вирусом гриппа В. При этом вакцинация препаратом, содержащим вакцинный штамм вируса гриппа В

Викторианской линии, обеспечивала более выраженную защиту от челленджа вирусом линии Ямагата. Этот факт требует дальнейшего изучения и объяснения.

Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации. Диссертационная работа открывает реальные перспективы для разработки нового поколения живой гриппозной вакцины для защиты от гриппа В детей первых трех лет жизни. Необходимо проведение доклинических исследований и клинических наблюдений на детях в возрасте от одного года до трех лет живой гриппозной вакцины, подготовленной на основе альтернативного ХА донора аттенуации В14/710. Перспективным представляется также дальнейшее углубленное изучение одногенного реассортанта В14–60, в предварительных экспериментах проявившего самый высокий аттенуирующий фенотип среди проанализированных ХА донорских вирусов.

ВЫВОДЫ:

1. На основе холодаадаптированного вируса гриппа В/Ленинград/14/17/55 подготовлен штамм В14/710, перспективный для использования в качестве резервного донора ЖГВ типа В для защиты от гриппа детей в возрасте от одного года до трех лет.

2. Показано, что в системе *in vitro* и *in vivo* резервный донор В14/710 более аттенуирован, чем базовый донор В/СССР/60/69, содержит на 10 уникальных кодирующих замен в консервативных участках внутренних белков больше, но в экспериментах на мышах по иммуногенности не уступающий базовому донору.

3. Установлена ведущая роль PB2 и PA генов в формировании аттенуирующего донора В14/710. Показан дополнительный вклад генов PB1 и NP в аттенуацию донора В14/710.

4. Модифицирован метод пиросеквенирования для оперативной оценки состава генома реассортантов вируса гриппа В.

5. На модели хорьков продемонстрирована перекрестная протективность моно- и трехвалентной ЖГВ. При этом защита от гетерологичного вируса гриппа В была более выражена в случае вакцинации препаратом, содержащим штаммы Викторианской линии.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Издания, рекомендованные ВАК РФ или входящие в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus:

1. **Крутикова, Е.В.** Холодаадаптированный вирус В/Ленинград/14/17/55 – альтернативный донор аттенуации живой гриппозной вакцины для детей младшего возраста. / Е.В. Крутикова, И.В. Киселева, Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, Е.А. Большунова, Л.Г. Руденко // Медицинский академический журнал. 2016.– 16(4). – С.156–157.

2. Киселева, И.В. Мыши как модель для изучения степени аттенуации холодаадаптированных штаммов вируса гриппа. / И.В. Киселева, **Е.В. Крутикова**, А.Р. Рекстин, К.Л. Крышень, Л.Г. Руденко // Медицинский академический журнал. – 2017.– 17(2). – С. 67–75.

3. Kiseleva, I. Cross-protective efficacy of monovalent live influenza B vaccines against genetically different lineages of B/Victoria and B/Yamagata in ferrets. / I. Kiseleva, **Е. Krutikova**, E. Stepanova, S. Donina, M. Pisareva, V. Krivitskaya, A. Rekstin, EG. Sparrow, G. Torelli, L. Rudenko // BioMed Research International. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–11.

4. Степанова, Е.А. Разработка протокола пиросеквенирования для оценки генетической стабильности вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины типа В. / Е.А. Степанова, **Е.В. Крутикова**, И.В. Киселева, В.А. Васильева, Л.Г. Руденко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – №2. – Т.165. – С. 206–211.

5. Stepanova, E. Development of Pyrosequencing Assay for Evaluation of Genetic Stability of Vaccine Strains of Live Attenuated Influenza Type B Vaccine / E. Stepanova, **Е. Krutikova**,

- I. Kiseleva, V. Vasil'eva, L. Rudenko // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 165. – No. 2. – P.243–247.
6. **Крутикова, Е.В.** Экспресс–скрининг реассортантов вируса гриппа В – кандидатов в вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины методом пиросеквенирования / Е.В. Крутикова, Е.А. Степанова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – №2. – 2018 – С. 107–111.
7. **Krutikova, E.** Express Screening of Reassortants of Influenza Virus B – Candidates for Vaccinating Strains of Live Influenza Vaccine by Using Pyrosequencing / E. Krutikova, E. Stepanova, I. Kiseleva, L. Rudenko // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. – 2018. – Vol. 33. – No. 2. – P.139–144.
8. Степанова, Е.А. Разработка протокола пиросеквенирования для анализа происхождения генов реассортантов при подготовке штаммов живой гриппозной вакцины / Е.А. Степанова, **Е.В. Крутикова**, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. –2018. –№2. – С. 101–107.
9. Stepanova, E. Development of Pyrosequencing–Based Assay for Analyzing the Origin of Genes in Preparing Reassortant LAIV Candidates / E. Stepanova, **E. Krutikova**, I. Kiseleva, L. Rudenko // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. – 2018. – Vol. 33. – No. 2. – P.131–138.
10. Rudenko, L. Two live attenuated vaccines against recent low–and highly pathogenic H7N9 influenza viruses are safe and immunogenic in ferrets / L. Rudenko, I. Kiseleva, **E. Krutikova**, E. Stepanova, I. Isakova–Sivak, et al. // *Vaccines*. – 2018. – Т. 6. – №. 4. – С. 74.
11. Rudenko, L. Rationale for vaccination with trivalent or quadrivalent live attenuated influenza vaccines: Protective vaccine efficacy in the ferret model / L. Rudenko, I. Kiseleva, **E. Krutikova**, E. Stepanova, A. Rekstin, et al. // *PLoS ONE*. – 2018. – V. 13. – No. 12.
12. **Крутикова, Е.В.** Пространственное расположение одиночных аминокислотных замен в белках холодоадаптированных штаммов вируса гриппа В и их возможная роль в холодовой адаптации / Е.В. Крутикова, Е.А. Степанова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. –2018. – №3. – Т.36. – С.13–24.
13. **Krutikova, E.** The spatial location of single amino acid substitutions in proteins of cold–adapted influenza B viruses and their impact upon cold adaptation / E. Krutikova, E. Stepanova, I. Kiseleva, L. Rudenko // *Molecular genetics, microbiology and virology*. – 2018. – V. 33. – No. 3. – P.169–181.
14. **Крутикова, Е.В.** Экспериментальное изучение конstellации генов холодоадаптированных доноров аттенуации живой гриппозной вакцины типа В / Е.В. Крутикова, Е.А. Степанова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2019. – Т. 167. – № 3. – С. 360–364.
15. **Krutikova, E.** Experimental Study of Genetic Constellation of Cold–Adapted Master Donor Viruses for Live Attenuated Influenza Vaccine Type B / E. Krutikova, E. Stepanova, I. Kiseleva, L. Rudenko // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2019. – V.167. – No. 3. – P.384–387.

Другие издания:

1. **Крутикова, Е.В.** Холодоадаптированный вирус В/Ленинград/14/55/77 как резервный донор аттенуации живой гриппозной вакцины / Е.В. Крутикова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // *Educatio*. – 2015. – №4(11). – С.134 –136.
2. **Крутикова, Е.В.** Фенотипические свойства современных вирусов гриппа типа В / Е.В. Крутикова, Е.А. Федорова, И.В. Киселева // *Интер–медикал*. – 2015. – 4(10). – С.96–98.
3. **Крутикова, Е.В.** Молекулярные механизмы аттенуации резервного донора живой гриппозной вакцины В/Ленинград/14/17/55 / Е.В. Крутикова, Е.А. Федорова, Е.А., Большунова, И.В. Киселева // *Современные тенденции развития науки и технологий*. – 2016. – 10(3). – С.76 – 78.

4. **Крутикова, Е.В.** Анализ состава генома реассортантов вируса гриппа методом пиросеквенирования и оценка их фенотипических свойств / Е.В. Крутикова, Е.А. Федорова, Е.В. Киреева, И.В. Киселева // Современные тенденции развития науки и технологий. – 2017. – 1(2). – С.88 – 90.

Патенты на изобретения Российской Федерации:

1. Патент 2605926 РФ, МПК С12N А61К. Штамм вируса гриппа В/60/Пхукет/2013/26 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей / Киселева И.В., **Крутикова Е.В.**, Дубровина И.А., Баженова Е.А., Ларионова Н.В., Руденко Л.Г.: заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». – № 2015122376/10; заявл. 17.04.2015; опубл. 27.12.2016, Бюл. № 36.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я искренне благодарна моему научному руководителю д.б.н., профессору И.В. Киселевой и заведующему отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева д.м.н., профессору, заслуженному деятелю науки РФ Л.Г. Руденко за постоянное внимание и поддержку.

Я благодарна всем соавторам моих печатных работ за участие и помощь в проведении исследований. Особую признательность хочу выразить сотрудникам отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» Е.А. Степановой, А.Р. Рекстину, Е.П. Григорьевой, Н.В. Ларионовой, Е.А. Баженовой, И.Н. Исаковой–Сивак и И.А. Дубровиной за неоценимую помощь и участие в настоящей работе.

Также хочу выразить благодарность всем сотрудникам ООО «Институт доклинических исследований», принимавшим участие в экспериментах на хорьках, особенно А.Е. Кательниковой и К.Л. Крышеню.

Я благодарю своих оппонентов и рецензентов за внимательное прочтение работы и ценные замечания.