

ИСАКОВА-СИВАК

Ирина Николаевна

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

03.02.02. - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург

2018

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

Научный консультант: заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заведующая отделом вирусологии им. А.А.Смординцева ФГБНУ «ИЭМ»
Руденко Лариса Георгиевна

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита состоится «_____» _____ 2018 г. в _____ часов
на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им.
А.А.Смординцева» МЗ РФ по адресу: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17,
тел. (812) 499 15 04;
e-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им.
А.А.Смординцева» МЗ РФ и на сайте www.influenza.spb.ru
Автореферат разослан: «_____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 001.043.01
кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [WHO 2017]. 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. [Bardiya, 2005; Hayden, 2009; Jin, 2015]. 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 [Rudenko, 1993; Slepishkin, 1993]. В настоящее время для подготовки реассортантных вакцинных штаммов для ЖГВ типа А в России используется хорошо охарактеризованный безвредный для людей холодадаптированный донор 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 чрезвычайно опасно в случае пандемии, т.к. существует угроза задержки начала производства вакцины. 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 холодадаптированного донора аттенуации Лен/17, обладают признаками температурочувствительности (*ts* фенотип) и холодадаптированности (*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 [Klimov, 2001; Kiseleva, 2004], 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 [Harfoot 2017; Hoa, 2017; Artois, 2018]. 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 выделяться от птиц и свиней [Makarova, 1999; Glaser, 2006; Ma, 2007; Gulyaeva, 2017]. 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 [WHO, 2006]. Так, одним из главных преимуществ ЖГВ перед ИГВ явилась доступность вакцины для развивающихся стран, ущерб для которых в случае пандемии гриппа прогнозируется наиболее серьезный [Gellin 2016; Grohmann, 2016]. 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 гемагглютинина. 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 [Egorov, 1984]. 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 [Александрова, 1994]. 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 [Richman, 1979]. 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 [Kiseleva, 2004]. 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. Более точные эксперименты с одноклеточными реассортантами между генетически однородными вирусами указывали на ведущую роль генов PB2 и PB1 в передаче *ts* фенотипа [Klimov, 2001]. 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 [Klimov, 2001] не определяли принадлежность HA 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 генно-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, 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 [Lindstrom, 2004]. При подготовке вакцинных штаммов H2N2 методом классической реассортации с вышеуказанным донором аттенуации могут возникнуть методические сложности, т.к. донор Лен/17 имеет тот же серотип, 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 [WHO 2017]. Разработке вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа (ВПВГ) H5N1 уделяется особенно пристальное внимание ввиду их эндемичности во всех регионах мира, а также чрезвычайно высокой степени вариабельности 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 [Larionova, 2013, Kiseleva, 2017], 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 кливедж-сайта молекулы НА. Соответственно, для подготовки вакцинных штаммов ЖГВ против таких вирусов также потребовалась обратнo-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 клейдов, 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 геной инженерии, удалось отобрать наиболее удачную комбинацию мутаций в молекуле гемагглютинина 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 моноклеаров 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 генном 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 гемагглютинина, путем конструирования вакцинных штаммов ЖГВ, несущих химерные молекулы НА (содержат идентичный stalk-домен от вируса Н1N1, а глобулярные части – от различных антигенно-неродственных вирусов гриппа подтипов Н5N1, Н8N4, Н9N2). Последовательная иммунизация животных такими модифицированными ЖГВ приводит к выработке антител, нацеленных на stalk-домен НА, 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 А/PR/8/59/M2 (Н1N1) 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 набирать большие объемы вакцины в более короткие сроки, а также будет способствовать снижению себестоимости препарата. Штамм А/PR/8/59/M2 (Н1N1) депонирован в Государственной коллекции Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» под №V-654. Вакцинные штаммы, подготовленные с использованием нового донора аттенуации – А/59/M2/Калифорния/66/2211 (Н2N2) и А/59/M2/Токио/67/22111 (Н2N2) – 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 А/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 Н5N1 и Н7N9 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.

В результате выполнения данного исследования был решен ряд задач фундаментального характера. В частности, оценен вклад индивидуальных мутаций в генах донора аттенуации Лен/17

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 пополнили Национальную коллекцию вакцинных штаммов для производства пандемических вакцин. Вакцинные штаммы А/17/Калифорния/66/4412 (H2N2), А/17/Токио/67/912 (H2N2) и А/17/Ануй/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 генной 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 PR8, 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 H1N1pdm 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 холодоадаптированного донора аттенуации А/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 HA после иммунизации. Комбинация обоих подходов является перспективной стратегией для создания универсальной гриппозной вакцины.

Личный вклад автора. Автор провел анализ литературных данных по проблеме исследования, принял непосредственное участие в дизайне и выполнении экспериментальных работ, провел обработку полученных результатов и представил результаты в научных публикациях и докладах на отечественных и международных конференциях.

Автором сконструирован адамантан-чувствительный альтернативный донор аттенуации и высокой репродуктивности на базе холодоадаптированного штамма аттенуации А/PR8/59/1 (H1N1), разработанного ранее в отделе вирусологии им. А.А.Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» (авторы А.Ю.Егоров, Г.И.Александрова); изучен вклад мутантных генов в проявление биологических свойств модифицированного донора А/PR8/59/M2.

Автором разработана обратно-генетическая система для отечественного донора аттенуации живой гриппозной вакцины А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), которая позволила получить изученные в исследовании генно-инженерные вакцинные штаммы ЖГВ H5N1 и H7N9, а также установить роль индивидуальных мутаций донора аттенуации в проявлении его температурочувствительного фенотипа.

Автором подготовлены вакцинные штаммы ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа H5N1, H7N9 и H2N2 (совместно с к.б.н. Т.А.Смолоногиной), а также проведены их доклинические исследования. Клинические исследования ЖГВ H2N2 и H7N9 проведены совместно с сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава РФ.

Исследования по конструированию вакцинных штаммов универсальной живой гриппозной вакцины, несущих химерные молекулы гемагглютинина, проводились совместно с профессором F.Krammer (Mount Sinai School of Medicine, Нью-Йорк, США). В этом исследовании автором сконструированы вакцинные штаммы ЖГВ H5N1 и H9N2, содержащие stalk-домен HA от вируса

A/PR8/59/1 (H1N1). Вакцинный штамм ЖГВ H9N2, содержащий stalk-домен HA от вируса А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1), был получен совместно с к.б.н. Т.А.Смолоногиной. Контрольные вакцинные штаммы ЖГВ H5N1 и H8N1, несущие интактные молекулы HA, получены автором лично.

Автором подготовлена панель вакцинных штаммов ЖГВ, несущих NP ген от современных циркулирующих вирусов гриппа (5:3 реассортанты) и проведено сравнительное изучение 6:2 и 5:3 реассортантных штаммов на модели мышей. Сравнительные иммунологические исследования 6:2 и 5:3 вакцинных штаммов подтипа H3N2 на модели хорьков, а также оценка кросс-реактивности Т-клеток человека к различным эпитопам NP *in vitro*, проведены к.б.н. Кореньковым Д.А.

Доклиническое изучение экспериментальных вакцинных штаммов, полученных в данном исследовании, на модели хорьков проводилось в сотрудничестве со следующими научными центрами: The Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Билтховен, Голландия) – изучение ЖГВ H2N2 и ЖГВ H7N9; Centers for Disease Control and Prevention (Атланта, США) – изучение живой и инактивированной вакцин против высокопатогенных вирусов H5N1; The WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (Мельбурн, Австралия) – сравнительное изучение ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 подтипа H3N2; и ООО «Институт доклинических исследований» (Россия) – изучение ЖГВ из высокопатогенного штамма H7N9.

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: «Universal influenza vaccines» (Lausanne, Switzerland, 2018); «2nd International Meetings on Respiratory Pathogens» (Singapore, 2018); «The Sixth European Influenza Conference. ESWI» (Riga, Latvia, 2017); «International Conference on Cancer and Infectious Diseases» (Madrid, Spain, 2017); «Options for the Control of Influenza IX» (Chicago, USA, 2016); «7th Orthomyxovirus Research Conference» (Toulouse, France, 2015); «2015 Keystone Symposia Conference» (Breckenridge, USA, 2015); «The Fourth European Influenza Conference. ESWI» (Riga, Latvia, 2014); «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); «Influenza Vaccines for the World» (Valencia, Spain, 2012); «The Fourth European Influenza Conference. ESWI» (Malta, 2011); «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 диссертационного исследования 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.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа содержит введение, основную часть, включающую обзор литературы, материалы и методы исследования, шесть глав собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, приложения и список литературы. Работа изложена на 301 странице машинописного текста. Включает 50 таблиц, 82 рисунка и приложение. Список цитируемой литературы включает 567 источников, из них 32 отечественных.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 (H1N1pdm), А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09, А/дикая утка/Швеция/24/02 (H8N4), А/серебристая чайка/Сарма/51/2006 (H6N1), А/17/перепел/Гонконг/97/84 (H9N2), 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), WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (Мельбурн, Австралия).

Плазмидные ДНК. Векторы для обратной генетики вирусов гриппа, рCIPolISapIT и рHW2000, были любезно предоставлены Dr. E. Fodor (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Великобритания) и Dr. R. Webster (St. Jude Children's Hospital, Memphis, TN, США), соответственно. Набор из восьми плазмидных ДНК с двунаправленным считыванием, кодирующих все сегменты вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1), был получен из CDC. Плазмидные ДНК на основе вектора рUC19, кодирующие НА и NA гены высокопатогенного вируса гриппа А/Гуандонг/17SF003/2016 (ΔH7N9), были получены из NIBSC (Великобритания). Плазмидные ДНК на основе векторов рHW2000, кодирующие интактные и химерные молекулы НА вирусов гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (ΔH5N1) и А/дикая утка/Швеция/24/02 (H8N4), были любезно предоставлены профессором F. Krammer (Mount Sinai School of Medicine, Нью-Йорк, США).

Рекомбинантные белки и пептиды. Рекомбинантные молекулы НА вирусов гриппа H2N2, H3N2, H6N1, H9N2, а также химерный белок сH6/1, содержащий stalk-домен от вируса PR8, а глобулярный домен – от штамма H6N1 были любезно предоставлены профессором F. Krammer (Нью-Йорк, США). Пептиды, соответствующие иммуногенным эпитопам NP белка вирусов гриппа, были синтезированы компанией Алмабион (г. Воронеж) и ООО «АТГ Сервис Ген» (г. Санкт-Петербург).

Доноры крови. Кровь здоровых доноров была получена и HLA-типирована в the Australian Red Cross Blood Service (ARCBS) (Victoria, Австралия).

Подготовку вакцинных штаммов для ЖГВ методом классической реассортации в РКЭ осуществляли согласно методикам, описанным ранее [Александрова, 1977]. В качестве селективных факторов использовали инкубацию зараженных вирусной смесью РКЭ при пониженной до 26°C температуре и крысиную гипериммунную сыворотку против ХА донора аттенуации. Полученные реассортанты подвергались анализу состава генома методом частичного секвенирования вирусных генов с использованием специально разработанных универсальных пар праймеров [Matyushenko, 2017].

Подготовку вакцинных штаммов для ЖГВ методами генной инженерии осуществляли согласно методикам, описанным E.Hoffmann с соавт. [Hoffmann, 2000]. Клонирование вирусных генов в векторы для обратной генетики проводили с использованием универсальных пар праймеров, специфичных для всех восьми генов вирусов гриппа А [Hoffmann, 2001]. Нуклеотидные последовательности всех генов верифицировали с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 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. Жизнеспособные вирусы гриппа получали либо при помощи липидной трансфекции ко-культуры клеток НЕК293Т/MDСК, используя реагент TransIT LT-1 (Mirus, США), либо при помощи электропорации клеток Vero с использованием электропоратора Neon® (Invitrogen, США) и прилагающегося к нему набора Neon® Kit 100 мкл.

Оценка фенотипических свойств вирусов гриппа. Сравнительное изучение ростовых характеристик исследуемых вирусов проводили в двух системах: развивающихся куриных эмбрионах и культуре клеток MDСК. Оценку чувствительности вирусов к репродукции при различных температурах инкубации (*ts/ca* фенотип) оценивали путем их титрования в РКЭ при 33, 26, 38 и 39°C. Длительность инкубации вирусов составляла 48 часов для температур 33-39°C и 6 суток – для 26°C. Титры вирусов рассчитывали по методу Рида и Мэнча и выражали в \log_{10} ЭИД₅₀/мл. Вирус считали температурочувствительным (т.е. обладающим *ts* фенотипом), если разница в титрах при оптимальной и повышенной температурах была не ниже 5,0 \log_{10} ЭИД₅₀. Вирус считали холодоадаптированным (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 \log_{10} ЭИД₅₀. *Ts* фенотип вирусов также оценивали путем их титрования в культуре клеток MDСК при 33, 37 или 38°C методом бляшкообразования. Титр вируса выражали в \log_{10} БОЕ/мл. Вирусы считали температурочувствительными при ≥ 100 -кратном снижении титра вируса при повышенной температуре инкубации, по сравнению с оптимальной температурой 33°C.

Исследования на лабораторных животных проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (2010) и были одобрены соответствующими локальными этическими комитетами тех организаций, на базе которых проводились экспериментальные процедуры. Работа с высокопатогенными вирусами гриппа проводилась в специализированных лабораториях с уровнем биобезопасности ABL3-3. В работе были использованы мыши линий BALB/c, CBA и C57BL/6J. 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 (Мельбурн, Австралия) и ООО «Институт доклинических исследований» (Россия). 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).

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, выявляемый в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), иммуноферментном анализе (ИФА, сывороточные IgG и IgA антитела), реакции микронейтрализации (РМН), а также в реакции ингибирования нейраминидазной активности (РИНА);

- 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).

Анализ Т-клеточных эпитопов в составе вирусных белков проводили с использованием базы данных иммунноэпитопов IEDB (Immune Epitope Database) и алгоритмов netCTL major histocompatibility complex I peptide binding. Для оценки протеосомного кливдежа NP был использован алгоритм IEDB netChop. Иммуногенность предсказанных ЦТЛ-эпитопов оценивалась с помощью алгоритма T cell class I peptide MHC immunogenicity predictor. Анализ консервации эпитопов проводили с помощью алгоритма epitope Conservancy Analysis, а аффинность связывания ЦТЛ-эпитопа и МНС комплекса предсказывалась с помощью алгоритма netMHCpan.

Оценку кросс-реактивности Т-клеток человека к различным эпитопам нуклеопротеина *in vitro* проводили на мононуклеарах периферической крови (МПК) HLA-типированных доноров крови, используя для стимуляции вакцинные штаммы ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3. Определение уровней эпитоп-специфических CD8+ Т-клеток проводили методом внутриклеточного окрашивания цитокинов после стимуляции Т лимфоцитов пептидами, соответствующими различным эпитопам NP белка вирусов гриппа.

Клинические испытания живых гриппозных вакцин H2N2 и H7N9 на добровольцах проводились на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ и были одобрены Министерством здравоохранения РФ, локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ, 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).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6 и GraphPad Prism 5. Для сравнения данных использовали следующие тесты: Mann-Whitney U-test; Wilcoxon Matched Pairs Test; Fisher exact (two-tailed); ANOVA (two way); Версия Wilcoxon-Mann-Whitney test, адаптированная для анализа данных с небольшим размером выборки. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. ИЗУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ДОНОРОВ АТТЕНУАЦИИ И ВЫСОКОЙ РЕПРОДУКТИВНОСТИ ДЛЯ ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

2.1.1. 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.

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.Сморозина [Egorov, 1984]. 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 [Александрова, 1994]. 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 PR8. При помощи целенаправленного точечного мутагенеза были модифицированы шесть генов, кодирующие внутренние и неструктурные белки вируса PR8 таким образом, чтобы консенсусная аминокислотная последовательность этих генов полностью соответствовала сиквенсу донора аттенуации 59/1. Следует отметить, что в настоящее время существует несколько вариаций штамма PR8, значительно отличающихся между собой по сиквенсу [Murakami, 2008], и для донора аттенуации 59/1 были определены следующие уникальные мутации, появившиеся в процессе его холодовой адаптации: PB2 (V545L; R630K), PB1 (R58K; W437C), PA (V14A; R359K), NP (E18G; P95S), M1 (A137T; C151S) и NS2 (E25G).

Для получения адамантан-чувствительного варианта 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 [Weinstock, 2006]. 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. 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, был получен модифицированный донор аттенуации, которому было присвоено название A/PR/8/59/M2 (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. 1). Для изучения вклада отдельных генов донора 59/M2 в проявлении его фенотипических свойств методами обратной генетики был сконструирован набор одногенных реассортантов (ОГР), несущих один ген вируса 59/M2, а остальные семь генов – от штамма PR8. 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. 1). Внесение PB2 гена в геном вируса PR8 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.

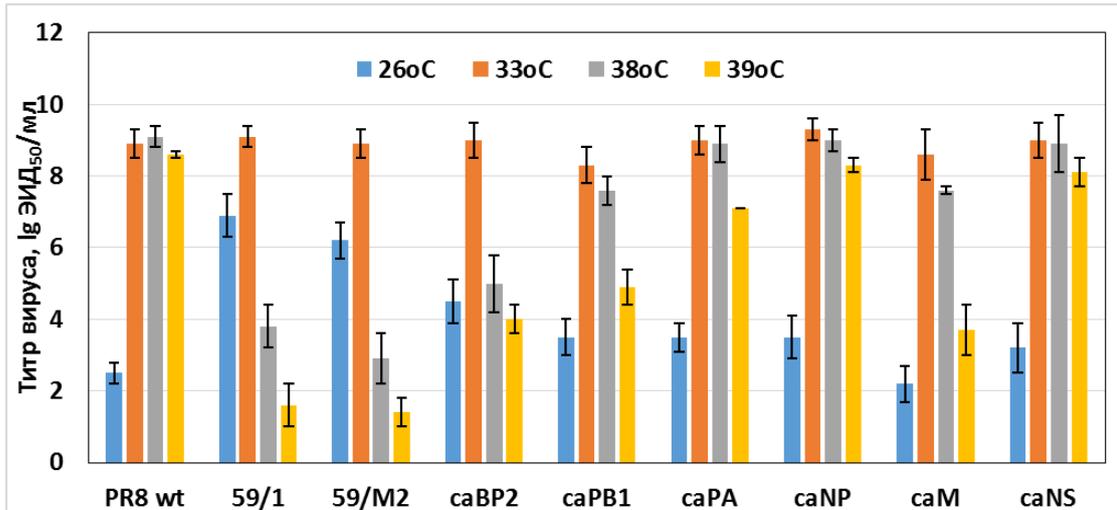


Рисунок 1. Инфекционная активность вирусов PR8, 59/1, 59/M2, а также одногенных реассортантных штаммов PR8, содержащих один ген от вируса 59/M2, в развивающихся куриных эмбрионах при различных температурах инкубации.

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, 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 1 видно, что титр вирусов 59/1 и PR8 не изменяется в присутствии ремантадина, тогда как титр вирусов 59/M2 и caM падает в 40-50 раз, что свидетельствует об их чувствительности к адамантанам.

Таблица 1. 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

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. Среди всех исследованных вирусов, только штамм PR8 вызывал гибель мышей (Табл. 2). Репродукция в носовых ходах мышей всех исследованных вирусов колебалась в пределах 3,9-5,3 lg ЭИД₅₀/мл. Вирус PR8 активно репродуцировался в легких мышей, тогда как репродукция донора аттенуации 59/M2 и его прототипа в легких была существенно снижена (Табл. 2). Суммарно, полученные данные указывают на аттенуированный фенотип доноров 59/1 и 59/M2.

Таблица 2. Репродуктивная активность нового донора аттенуации 59/M2, а также реассортантных вакцинных штаммов А(H2N2) 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)	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

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 высокой урожайностью, что может способствовать увеличению производственной мощности и снижению себестоимости ЖГВ. 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 *ts* мутации от донора аттенуации А/Энн Арбор/6/60 [Jin, 2004]

2.1.2. 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. 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 в работе [Hoffmann, 2000]. Секвенирование полученных плазмид подтвердило идентичность последовательностей плазмидных вставок исходным вирусным генам. Жизнеспособный вирус Лен/17-rg был получен путем трансфекции ко-культуры клеток 293T/MDCK заданным набором плазмид. Полногеномное секвенирование вируса Лен/17-rg подтвердило полную идентичность всех вирусных генов исходному штамму Лен/17.

Разработанная обратно-генетическая система для донора аттенуации Лен/17 открыла возможность изучения роли точечных мутаций, свойственных донору Лен/17, в проявлении его биологических свойств. Для этого с помощью целенаправленного точечного мутагенеза была получена обратно-генетическая копии «дикого» вируса Лен/134, на базе которого, в свою очередь, была сконструирована панель мутантных вирусов, несущих уникальные мутации донора Лен/17 –

индивидуально, либо в различных комбинациях. Определение инфекционных титров, а также размеров бляшек, формируемых сконструированными вирусами в культуре клеток MDCK, инкубируемых при различных температурах (33, 37 и 38°C), позволила выявить роль индивидуальных мутаций донора Лен/17 в проявлении его *ts* фенотипа. Так, по данному показателю *ts* мутации расположились следующим образом: PB2(V478L) > PB1(K265N) > PB1(V591I) > NS2(M100I) (Табл. 3). 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 [Kiseleva, 2003; Klimov, 2004]. 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 [Klimov, 2004]., а позднее – в культуре клеток MDCK при 33°C и 37°C [Kiseleva, 2004]. 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.

Таблица 3. Оценка роли индивидуальных мутаций донора аттенуации Лен/17 в проявлении *ts* фенотипа вакцинных штаммов ЖГВ, а также их влияния на *ts* фенотип антигенно-удаленного вируса гриппа А

Ген	Мутация	Роль мутаций в проявлении <i>ts</i> фенотипа (настоящее исследование)	Реверсии, необходимые для восстановления «дикого» фенотипа вируса	Влияние на <i>ts</i> фенотип вируса А/PR/8/34 (H1N1)	Влияние на <i>att</i> фенотип вируса А/PR/8/34 (H1N1)
PB2	Val-478-Leu	<i>ts</i> +++	X	<i>ts</i> +++	<i>att</i> +++
PB1	Lys-265-Asn	<i>ts</i> ++	X	<i>ts</i> ++	<i>att</i> ++
	Val-591-Ile	<i>ts</i> +	X	<i>ts</i> +	<i>att</i> +
PA	Leu-28-Pro	<i>non-ts</i>		<i>non-ts</i>	<i>non-att</i>
	Val-341-Leu	<i>non-ts</i>		<i>non-ts</i>	<i>non-att</i>
NP*	Asn-492-Ser	<i>non-ts</i>		н/д	н/д
M1	Ile-15-Val	<i>non-ts</i>		н/д	н/д
	Phe-144-Leu	<i>non-ts</i>		н/д	н/д
NS2	Met-100-Ile	<i>ts</i> +	X	<i>non-ts</i>	<i>non-att</i>

* Мутация, возникшая при адаптации вируса Лен/17 к культуре клеток MDCK.

н/д – не делали

Важным результатом данного раздела работы явилось определение условий для полного восстановления дикого фенотипа вируса: для этого требовалась одновременная реверсия всех четырех вышеупомянутых *ts* мутаций (Табл.3). Эти данные указывают на высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин, поскольку случайная реверсия четырех мутаций в процессе репликации вакцинных штаммов в верхних дыхательных путях привитых лиц представляется крайне маловероятной.

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. В работе также определяли инфекционные титры вирусов методом бляшек в культуре клеток MDCK, инкубируемых при различных температурах (33, 37 и 38°C). 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. 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 IgБОЕ, но при этом не изменялся титр вируса при 37°C. Наибольшим эффектом обладала мутация в PB2 гене (V-478-L), которая индивидуально приносила *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 приносить *ts* фенотип в генетически удаленные вирусы гриппа (Табл. 3). 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 IgБОЕ.

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 явился мутантный штамм PB2^{478L}/PA^{28P,341L}, который имел *ts* фенотип, сопоставимый с мутантами PB2^{478L} и PB2^{478L}/PB1^{591I}, однако сохранял вирулентность «дикого» штамма PR8. 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 ОГР саРА формировать более крупные и четкие бляшки при 38°C, чем контрольный вирус Лен/134-rg. Таким образом, взаимодействие изучаемых *ts* мутации носит сложный комплексный характер. При этом можно выделить две мутации, приносящие 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 мутациями.

2.2. РАЗРАБОТКА ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НАИБОЛЕЕ ВЕРОЯТНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БУДУЩИХ ПАНДЕМИЙ ГРИППА

2.2.1. 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 серотип, 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/99/513 (Н1N1) [17/НК/513]. 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.

Поскольку к концу своей циркуляции эпидемические вирусы Н2N2 разошлись на две эволюционно удаленные ветви [Lindstrom, 2004], 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.

Два реассортантных вакцинных штамма Н2N2 были подготовлены методом классической реассортации в РКЭ эпидемических вирусов Н2N2 с модифицированным донором аттенуации 59/M2, при этом в качестве селективного фактора использовалась сыворотка к вирусу PR8. Полученные вакцинные реассортанты А/59/M2/Токио/67/22111 [59/Ток/22111] и А/59/M2/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 Н2N2 была подготовлена методом классической реассортации с использованием в качестве источника генов внутренних и неструктурных белков вакцинного штамма 17/НК/513. На основе данного вакцинного штамма были получены 6:2 реассортанты, несущие НА 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 Н2N2 выявило наличие одной замены в НА1 субъединице вируса 17/Ток/326 (Glu-121-Gly, нумерация Н2). Данная мутация расположена за пределами известных антигенных и рецептор-связывающих сайтов молекулы НА, поэтому ее влияние на антигенные и иммуногенные свойства вируса маловероятно [Tsuchiya, 2001].

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 ($p < 0,05$).

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 негликозилированные белки вируса. Несмотря на схожие показатели инфекционной активности вакцинных штаммов 59/Ток/22111 и 17/Ток/326 в РКЭ, 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. 2). 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 ИГВ из данного штамма, по сравнению с реассортантом 17/Ток/326.

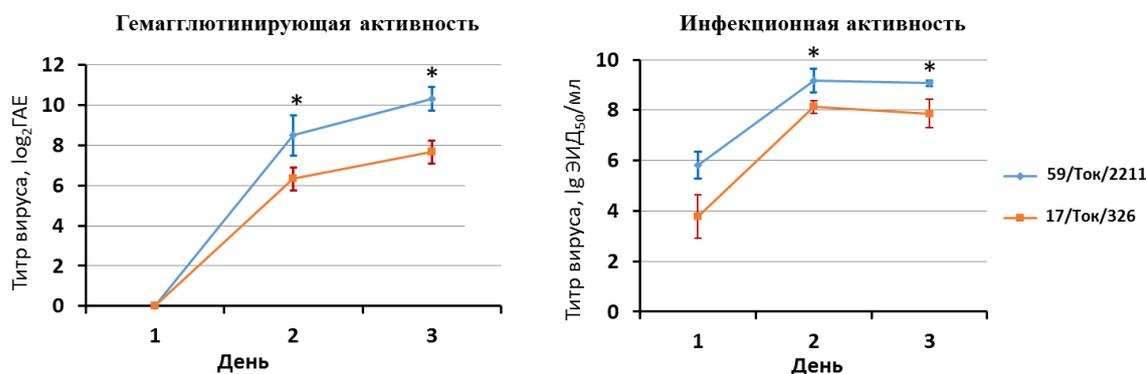


Рисунок 2. Кинетика накопления вакцинных штаммов H2N2 в РКЭ при оптимальной температуре. * $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

Для оценки иммуногенности вакцинных кандидатов H2N2 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 H2N2. Кроме того, контрольная группа хорьков получала препарат плацебо (PBS). Все три вакцинных штамма H2N2 индуцировали высокие уровни антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител, при этом штамм 17/Кал/395 был наиболее иммуногенен – он индуцировал не только самые высокие уровни гомологичных антител, но также и наивысшие уровни гетерологичных антител к вирусам А/Ток/3/67 и Лен/17. Как следствие – ЖГВ из штамма 17/Кал/395 значительно лучше защищала животных от репликации как гомологичного вируса А/Кал/1/66, так и гетерологичного вируса А/Ток/3/67, чем вакцина из штамма 17/Ток/326. Это было показано как при оценке репликации эпидемических вирусов H2N2 в мазках из зева и носовых ходах иммунизированных хорьков после челленджа, так и по патоморфологическому анализу тканей носовых ходов животных после челленджа (Рис. 3).

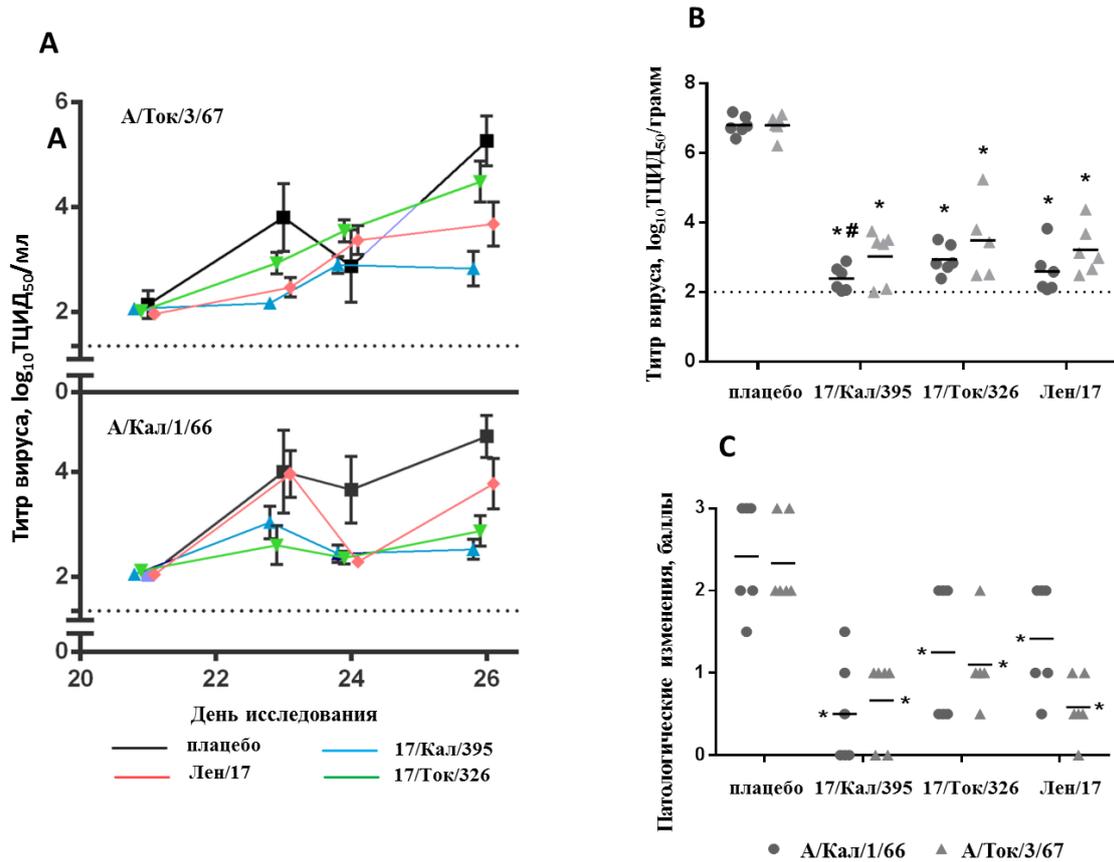


Рисунок 3. Защитная эффективность ЖГВ H2N2 на модели хорьков. Выделение вируса из мазков из зева (А), репликация вирусов в носовых ходах (В) и патологические изменения тканей носовых ходов (С) иммунизированных хорьков после заражения эпидемическими вирусами H2N2. Достоверное снижение титров по сравнению с группой плацебо обозначено * ($p < 0,05$). Достоверное снижение титров по сравнению с группой 17/Ток/326 обозначено # ($p < 0,05$).

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. На рисунке 4 представлена зависимость выхода продукта сиалидазной реакции от концентрации вируса, выраженной в агглютинирующих единицах. Интересно, что NA-индуцированное десиалирование фетуина, вызванное штаммом 17/Кал/395, было значительно более эффективным по сравнению с аналогичными дозами вируса 17/Ток/326.

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 [Couch,2013; Monto,2015]. 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 значимых 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.

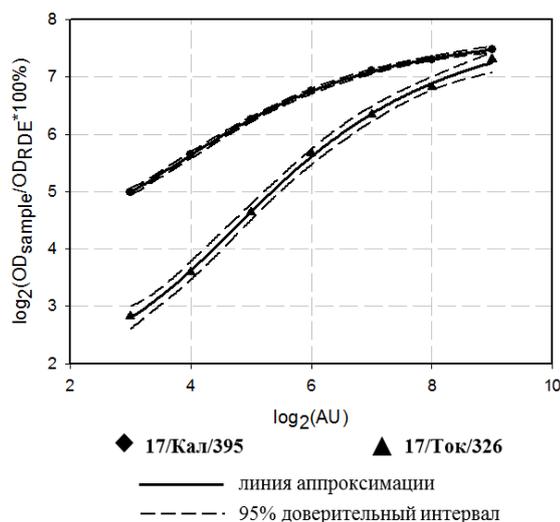


Рисунок 4. Активность нейраминидазы вакцинных штаммов H2N2. Активность НА выражена в процентах от активности RDE в тесте десалирования фетуина. Пунктирные линии указывают 95% доверительный интервал к линии аппроксимации (сплошная линия).

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 с 17/Ток/326. Поэтому для дальнейших клинических испытаний на добровольцах была рекомендована ЖГВ H2N2 из вакцинного штамма 17/Кал/395.

Клинические испытания ЖГВ H2N2 (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 вводили интраназально двукратно с интервалом 28 дней. 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. Образцы сывороток крови собирали на 0, 28, 56 и 112 день исследования. Образцы МПК волонтеров забирали на 0, 6, 28 и 56 день для оценки Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию.

ЖГВ H2N2 была ареактогенна и хорошо переносилась добровольцами. Не было зафиксировано серьезных нежелательных явлений после вакцинации, а слабые местные и системные побочные реакции регистрировались на одинаковых уровнях для лиц из группы ЖГВ H2N2 и группы плацебо. Наличие вакцинного вируса определяли либо при помощи ПЦР, либо методом культивирования в РКЭ. После первой иммунизации вирус обнаруживался у 78,6% привитых лиц, причем вирусная РНК не обнаруживалась далее 4-го дня после вакцинации. После второй дозы вирусная РНК обнаруживалась у 77,8% привитых лиц, в основном только на 1 сутки. Инфекционный вирус выделялся в РКЭ в основном на 1-й день после вакцинации и ревакцинации. Молекулярно-генетический анализ изолятов 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.

Оценку иммуногенности ЖГВ H2N2 проводили с использованием различных иммунологических тестов. Доля лиц, ответивших 4-кратным и более увеличением титров антител после иммунизации, варьировала в зависимости от используемого 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 8,0% добровольцев были обнаружены приросты сывороточных IgG антител в ИФА на 112 день исследования (Табл. 4). Суммарно, у 85,2% добровольцев 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 антиагглютинирующих антител не превышала 1:10. 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. Помимо этого, у 36% добровольцев отмечено достоверное увеличение уровней вирус-специфических CD8+ Т клеток. Суммарно, с учетом все использованных тестов иммунный ответ был зафиксирован у 92,6% добровольцев, получивших ЖГВ H2N2 (Табл. 4). При этом никаких иммунных ответов не наблюдалось в группе плацебо.

Таблица 4. Иммуногенность ЖГВ H2N2 для здоровых взрослых добровольцев

Доза вакцины	% лиц, ответивших на введение ЖГВ H2N2 в указанном иммунологическом тесте								
	РТГА	PMH	IgG	IgA	sIgA в секретах носа	sIgA в слюне	CD4+ Т клетки	CD8+ Т клетки	Итого
1 (день 28)	18,5	29,6	0	7,4	22,2	11,1	7,4	11,1	59,3
2 (день 56)	33,3	44,4	3,7	51,9	40,7	33,3	11,1	11,1	85,2
2 (день 112)	60,0	48,0	8,0	48,0	н/д	н/д	20,0	36,0	92,6

н/д – не делали; sIgA – секреторные IgA антитела.

2.2.2. ПОДГОТОВКА, ДОКЛИНИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(H7N9)

Вирусы гриппа H7N9 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 H7N9 претерпели достаточно серьезные эволюционные изменения, в связи с чем потребовалась разработка вакцинных штаммов ЖГВ против эволюционно-удаленных вирусов данного подтипа.

В настоящей работе методом классической реассортации в РКЭ был создан вакцинный штамм А/17/Ануи/2013/61 (H7N9). Данный штамм унаследовал поверхностные антигены от потенциально пандемического вируса А/Ануи/1/2013 (H7N9), а остальные шесть генов – от холодоадаптированного донора аттенуации Лен/17. Секвенирование полного гена гемагглютинина реассортантного штамма выявило две аминокислотные замены по сравнению с последовательностью вируса А/Ануи/1/2013 (H7N9), доступной в базе данных GISAID: Asn-123-Asp и Asn-149-Asp, Н7 нумерация. Несмотря на идентичность антигенных свойств реассортанта

A/17/Ануи/2013/61 (H7N9) и родительского штамма A/Ануи/1/2013 (H7N9), представлялось необходимым определить, какое влияние обнаруженные мутации могут оказывать на такие важные свойства вакцинного штамма, как его инфекционная активность, рецепторная специфичность, иммуногенность и защитная эффективность. Анализ пространственного расположения замен показал, что позиция 123 располагается в 120-петле рецептор-связывающего кармана [543], позиция 149 - в 150-петле, и входит в состав антигенного сайта В [176] (Рис. 5). 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.

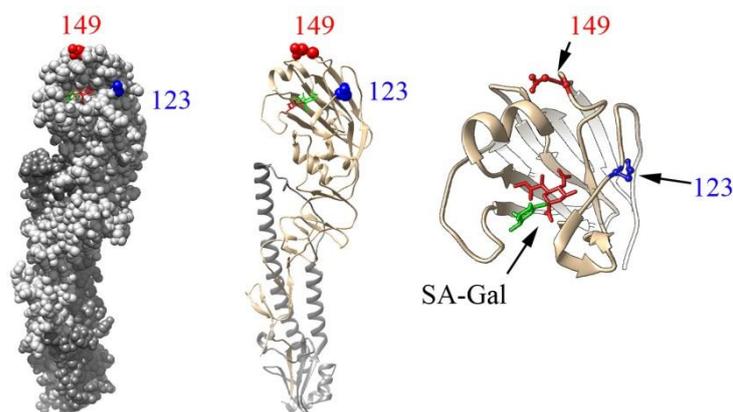


Рисунок 5. Расположение аминокислотных позиций 123 и 149 в гемагглютанине вируса гриппа Н7. Слева тример НА, в центре – схематичное изображение элементов структуры мономера, справа – крупное изображение рецептор-связывающего кармана с синтетическим аналогом человеческого рецептора вируса гриппа (SA-Gal). Выделены аминокислоты 123 и 149. Иллюстрация подготовлена на основе структуры PDBID 4BSE.

Для оценки влияния данных мутаций на биологические свойства ЖГВ H7N9 методами генной инженерии были сконструированы два реассортантных вакцинных штамма H7N9, отличающиеся только по позициям 123 и 149 в молекуле НА (123D/149D и 123N/149N). Всесторонний анализ полученных вирусов в системах *in vitro* и *in vivo* показал, что штамм 123D/149D обладал более высоким сродством к $\alpha 2,6$ -рецепторам, что позволяет предполагать его более высокую репликативную активность в клетках млекопитающих. Кроме того, вариант 123D/149D индуцировал более высокие уровни гомологичных и гетерологичных антител в сыворотках мышей линии BALB/с. Таким образом, мутации, возникшие в вакцинном штамме A/17/Ануи/2013/61 (H7N9), являются полезными и ЖГВ из данного штамма является перспективной для дальнейшего изучения в доклинических и клинических исследованиях.

Доклинические испытания ЖГВ H7N9 проводили на модели хорьков. На основании суммарных данных изучения репродукции вирусов в респираторных и системных органах, динамики изменения температуры тела и массы тела, изученных симптомов было показано, что моновалентная ЖГВ H7N9 хорошо переносилась лабораторными животными и ее профиль репликации был идентичен профилю репликации донора аттенуации.

Для оценки иммуногенности ЖГВ H7N9 проводили как однократную, так и двукратную иммунизацию хорьков. ЖГВ H7N9 индуцировала у хорьков высокие уровни сывороточных антигемагглютинирующих, антинейраминидазных и нейтрализующих антител на 13, 20 и 23 сутки после первичной иммунизации, а также на 17 сутки после второй дозы вакцины (Рис. 6). Несмотря на повторную иммунизацию животных вакциной ЖГВ H7N9, уровни антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител незначительно снижались к 17 суткам после второй дозы, тогда как титры анти-НА антител увеличивались, хотя эти различия не были достоверными (Рис. 6).

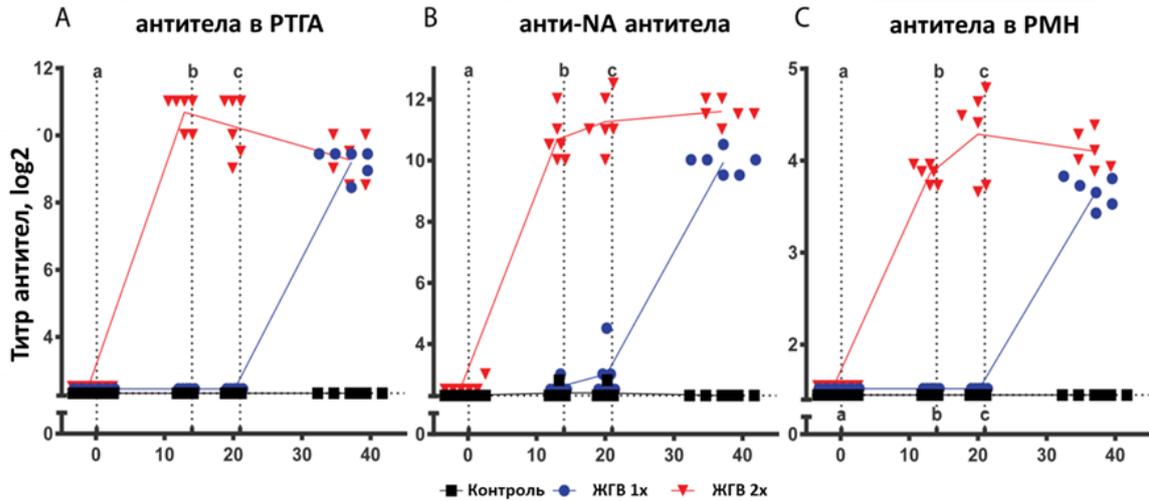


Рисунок 6. Уровни антигемагглютинирующих (А), антинейраминидазных (В) и вирус-нейтрализующих (С) антител в сыворотках хорьков, иммунизированных однократно ЖГВ Н7N9 (синие кружки), двукратно ЖГВ Н7N9 (красные треугольники), или получивших препарат плацебо (черные квадраты). Вертикальные штрихованные линии означают: а. первая вакцинация при двукратном режиме 2хЖГВ; б. первая вакцинация при однократном режиме 1хЖГВ; с. вторая вакцинация при двукратном режиме 2хЖГВ.

Для оценки защитной эффективности одно- и двукратной иммунизации ЖГВ Н7N9 хорьков подвергали челлендж-инфекции вирулентным гомологичным вирусом А/Ануи/1/2013 (Н7N9). Животные группы плацебо проявляли признаки тяжелого заболевания уже на 2-3 сутки после челленджа, при этом 3 из 6 животных в группе пали до окончания эксперимента. В отличие от контрольной группы, животные, вакцинированные ЖГВ Н7N9, практически не проявляли клинических симптомов заболевания, и ни один из хорьков не погиб от инфекции. Челлендж-вирус 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. 7). Как однократная, так и двукратная иммунизация индуцировала стерильный иммунитет (Рис. 7), и лишь детальный анализ патоморфологических изменений тканей легких хорьков после челленджа позволил выявить преимущество двукратной иммунизации перед однократной в плане защиты животных от развития легочной патологии после заражения вирулентным вирусом Н7N9.

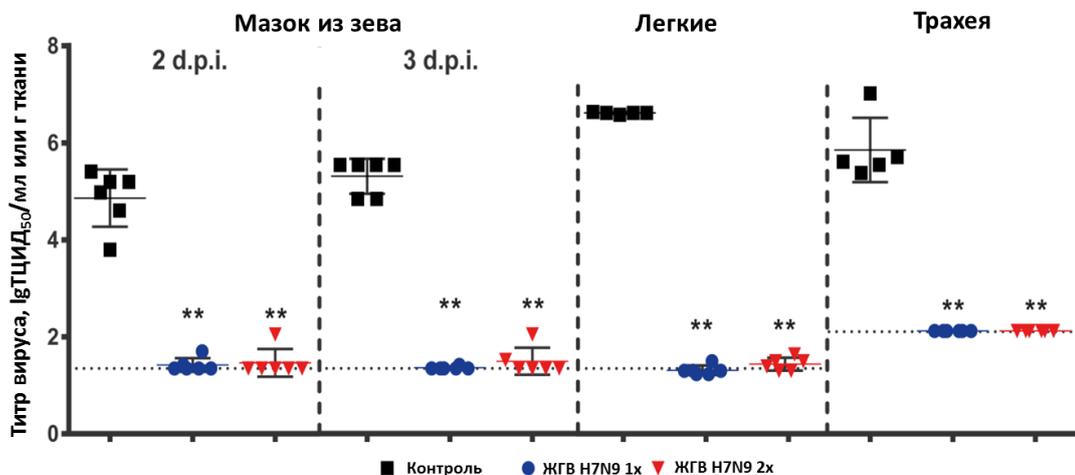


Рисунок 7. Размножение вируса А/Ануи/1/2013 (Н7N9) в респираторном тракте хорьков. Титры вируса в мазке из зева на 2 и 3 сутки после челленджа, а также в трахее и легких на 3 сутки после челленджа, в группе плацебо (черные квадраты), ЖГВ Н7N9 1х (синие кружки) и ЖГВ Н7N9 2х (красные треугольники). Пунктирной линией указаны уровни детекции вируса. ** $p < 0.01$ по сравнению с группой плацебо (критерий Манна-Уитни).

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 в возрасте от 19 до 49 лет. В данных клинических испытаниях оценивалась безвредность, приживляемость, трансмиссивность и иммуногенность ЖГВ Н7N9 для взрослых здоровых лиц. 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. Образцы МПК волонтеров забирали на 0, 6, 28 и 56 день для оценки Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию.

ЖГВ Н7N9 была ареактогенна и хорошо переносилась добровольцами. ЖГВ Н7N9 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. После второй дозы вакцинный вирус выделялся слабее: только 60% волонтеров были положительными с использованием метода ПЦР, и только у 24% добровольцев выделился жизнеспособный вирус. Молекулярно-генетический анализ изолятов показал, что все вирусы сохранили полный набор аттенуирующих мутаций в генах внутренних и неструктурных белков вируса. Полноразмерное секвенирование генов НА и NA выявило одну аминокислотную замену (Leu-68-Phe) в субъединице НА2 у трех изолятов, выделенных от двух иммунизированных добровольцев, что указывает на адаптационную природу данной мутации. Ни у одного из волонтеров группы плацебо не был обнаружен вакцинный вирус, что подтверждает отсутствие трансмиссивности вакцинного штамма ЖГВ Н7N9 от привитых невакцинированным лицам

Оценку иммуногенности ЖГВ Н7N9 также проводили с использованием различных иммунологических тестов. Доля лиц, ответивших на введение вакцины, варьировала в зависимости от используемого теста. Важно отметить, что уже после однократной иммунизации у подавляющего большинства добровольцев (86,2%) был зафиксирован иммунный ответ хотя бы в одном из тестов (Табл. 5). После второй иммунизации этот показатель составил 93,1%. 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%. Таким образом, ЖГВ из штамма А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9) обладала наиболее выраженной иммуногенностью для людей среди всех ранее протестированных ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа, таких как Н5N2, Н7N3 и Н2N2, что также согласуется со способностью вакцинного вируса Н7N9 активно реплицироваться в верхних дыхательных путях привитых добровольцев.

Таблица 5. Иммуногенность ЖГВ Н7N9 для здоровых взрослых добровольцев

Доза вакцины	% лиц, ответивших на введение ЖГВ Н7N9 в указанном иммунологическом тесте								
	РТГА	PMH	IgG	IgA	sIgA в секретах носа	sIgA в слюне	CD4+ Т клетки	CD8+ Т клетки	Итого
1 (день 28)	10,3	48,3	13,8	6,9	27,6	24,1	10,0	6,7	86,2
2 (день 56)	65,5	72,4	24,1	13,8	27,6	27,6	20,7	6,9	93,1

sIgA – секреторные IgA антитела.

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

В настоящей работе были сконструированы и изучены на лабораторных животных два вакцинных штамма ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа (ВПВГ) Н5N1 двух генетических линий (А/Вьетнам/1203/2004 [VN1203], клайд 1 и А/Египет/321/2007 [EG321], клайд 2.2.1) с использованием культуры клеток MDCK в качестве субстрата. Общепринятым подходом для ослабления вирулентных свойств ВПВГ является удаление четырех основных аминокислот из кливедж-сайта молекулы НА [Steel, 2009]. Соответственно, сконструировать безопасные вакцинные штаммы, как для ИГВ, так и для ЖГВ представляется возможным только при использовании методов генной 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.

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 Н5N1 методом классической реассортации в РКЭ [Larionova, 2013]. Можно предположить, что активность нейраминидазы донора Лен/17 превосходит таковую вирусов Н5N1, и в процессе реассортации и последующей селекции преимущество получают вирусы, содержащие НА от донора аттенуации.

Генно-инженерные вакцинные штаммы VN-Лен/17rg и EG-Лен/17rg 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 Н5N1, 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 А/Энн Арбор/6/60 [Subbarao, 2003].

Детальное изучение иммуногенных и защитных свойств сконструированных в данной работе вакцинных штаммов VN-Лен/17rg и EG-Лен/17rg 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 Н5N1 из штамма одного клайда полностью защищала животных от челленджа высокопатогенным вирусом другого клайда. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами оценки кросс-протективных свойств вакцинного штамма ЖГВ, подготовленного из низкопатогенного вируса Н5N2 [Desheva, 2006; Lu, 2006].

В экспериментах на хорьках сравнивалась иммуногенность и защитная эффективность живой и инактивированной вакцин Н5N1, подготовленных из реассортантного штамма VN-Лен/17rg. В предварительных экспериментах была показана необходимость двукратной иммунизации хорьков ЖГВ Н5N1 для индукции существенных титров антигемагглютинирующих и нейтрализующих антител, что существенно отличается от результатов изучения ЖГВ подтипов Н2N2 и Н7N9 на этой животной модели.

Однократная иммунизация как ЖГВ, так и ИГВ вызывала образование гомологичных антител в РТГА, которые значительно повышались после повторной иммунизации. Кроме того, после второй вакцинации значительно увеличивались уровни гетерологичных антител к вирусу EG321. Как и ожидалось, по уровню сывороточных антигемагглютинирующих антител к обоим вирусам Н5N1 инактивированная вакцина была более иммуногенна, чем живая.

Аналогично, сывороточные анти-VN1203 IgG и IgA антитела в сыворотках крови хорьков, привитых ИГВ, были значительно выше таковых после иммунизации живой вакциной, причем как после одной дозы, так и после двух доз (Рис. 8А). Подобные результаты были получены и при анализе уровней VN1203-специфичных IgG антител в назальных смывах вакцинированных хорьков (Рис. 8В). 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 (Рис. 8В), что согласуется с более выраженной способностью ЖГВ индуцировать более мощный локальный IgA-ответ по сравнению с ИГВ.

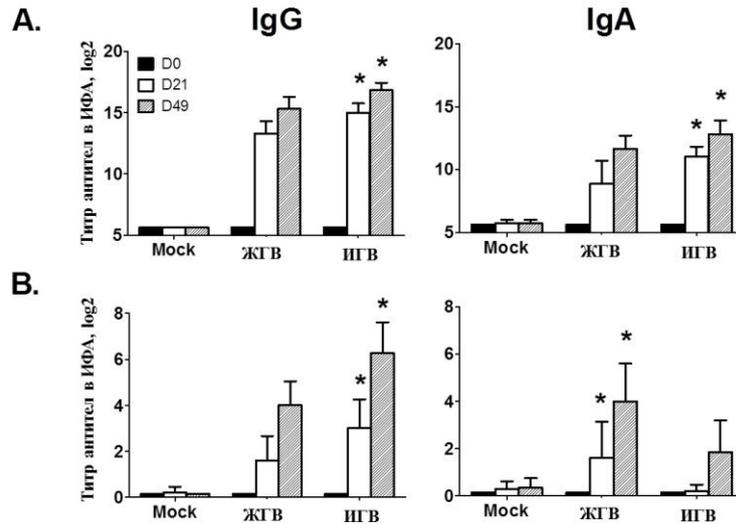


Рисунок 8. Уровни VN1203-специфичных IgG и IgA антител в сыворотках (А) и назальных смывах (В) хорьков, привитых живой и инактивированной вакциной из реассортантного штамма VN-Лен/17rg (H5N1). * $p < 0,05$ по сравнению с ЖГВ или ИГВ.

В обеих группах животные были полностью защищены от репликации в респираторном тракте гомологичного вирулентного вируса VN1203. Однако животные, привитые живой вакциной, были лучше защищены от заражения гетерологичным высокопатогенным вирусом EG321, чем животные группы ИГВ (Рис. 9). При этом данная дополнительная защита хорошо коррелирует с усиленной индукцией перекрестно-реагирующих секреторных IgA антител после иммунизации живой вакциной.

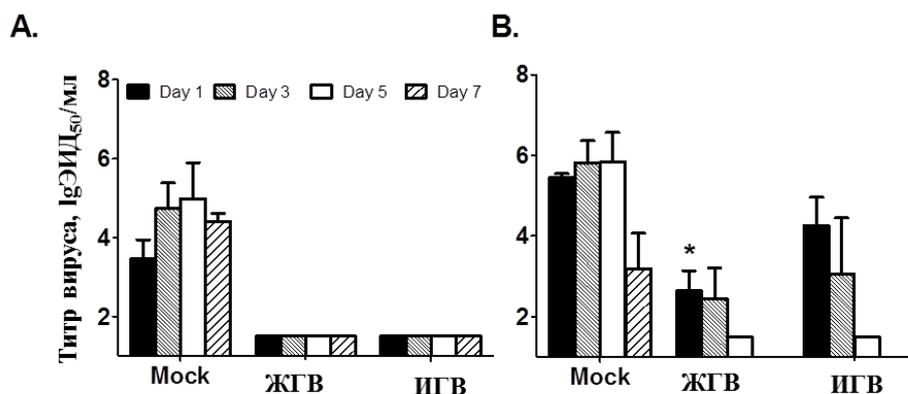


Рисунок 9. Титры гомологичных и гетерологичных высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 в назальных смывах иммунизированных и контрольных хорьков на 1, 3, 5 и 7 сутки после челленджа. А. Заражение гомологичным вирусом VN1203. В. Заражение гетерологичным вирусом EG2321. Уровень детекции составил 1,2 IgЭИД₅₀/мл. * $p < 0,05$ по сравнению с ИГВ.

Иммуноглобулины класса А являются основными антителами, связанными с иммунной системой слизистой оболочки, и имеют решающее значение для защиты верхних дыхательных путей от вирусной инфекции [Renegar, 2004; Tamura, 1991]. 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 [Cox, 2004; Wright, 1983]. Такая стимуляция антител, в частности перекрестно-реактивных IgA, после вторичного воздействия вируса может более эффективно ингибировать прикрепление вируса к поверхностям слизистой оболочки дыхательных путей [Tamura, 1991].

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.

2.3. РАЗРАБОТКА ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, ИНДУЦИРУЮЩЕЙ ШИРОКИЙ СПЕКТР ПЕРЕКРЕСТНО-РЕАГИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА

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 [Berlanda Scorza, 2016; He, 2016; Rajao, 2018].

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.

2.3.1. ПОДХОДЫ К ИНДУКЦИИ КРОСС-РЕАКТИВНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Одним из многообещающих подходов, разрабатываемых в последние 5 лет, является направленная индукция кросс-реактивных антител, нацеленных на консервативный stalk-домен молекулы HA, путем конструирования химерных молекул HA, 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 [Krammer, 2013, 2014; Ryder, 2015], и в настоящем исследовании были использованы HA вакцинные штаммы ЖГВ для конструирования подобного рода экспериментальных вакцин.

В настоящей работе были проведены два независимых эксперимента, в одном из которых оценивался прямой защитный эффект иммунизации мышей вакцинными штаммами с химерными HA, а во втором была использована стратегия пассивной иммунизации, при которой наивным животным вводилась сыворотка мышей, привитых различными вакцинными вариантами ЖГВ.

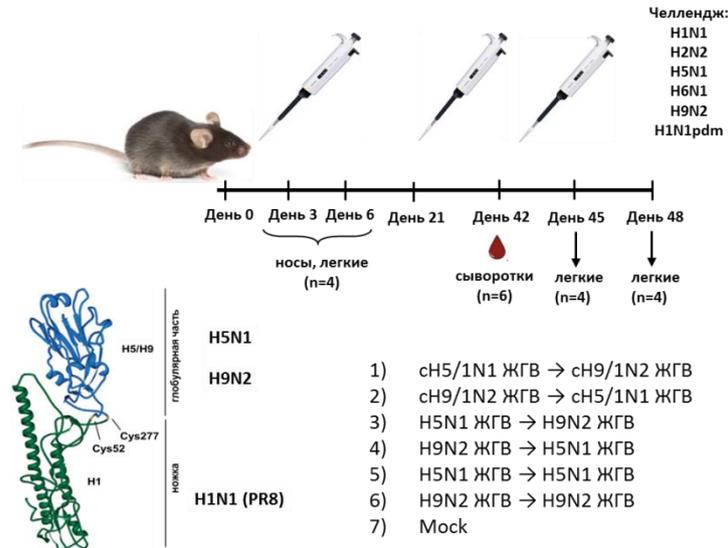


Рисунок 10. Схема эксперимента по оценке прямой защиты мышей линии C57BL/6J при помощи последовательной иммунизации вакцинными штаммами ЖГВ, экспрессирующими химерные и классические молекулы НА.

Последовательная двукратная иммунизация мышей приводила к образованию кросс-реактивных антител в сыворотках крови животных, причем антиагглютинирующие антитела выявлялись только к тем вирусам, которые были использованы для иммунизации (H5N1 и H9N2), поскольку данный класс антител реагирует с глобулярной частью молекулы НА. В отличие от РТГА, кросс-реактивные IgG антитела выявлялись в ИФА с использованием различных антигенов (H1N1, H2N2, H6N1, H5N1, H9N2), при этом анти-stalk IgG антитела (выявляемые с использованием химерного белка сН6/1 в качестве подложки для ИФА) 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.

Защитный эффект различных режимов вакцинации оценивали по снижению титров различных гетерологичных вирусов (H1N1, H2N2, H6N1, H1N1pdm09) в легких мышей на 3 и 6 сутки после челленджа. Интересно, что все иммунизированные мыши были полностью защищены от заражения вирусами H2N2 и H6N1, что указывает на вклад различных факторов иммунного ответа в защиту. Тем не менее, при заражении вирусами H1N1 и H1N1pdm09 было отмечено более существенное снижение титров вирусов в легких у мышей, иммунизированных ЖГВ с химерными молекулами НА, по сравнению с классическими вариантами ЖГВ (Рис. 11)

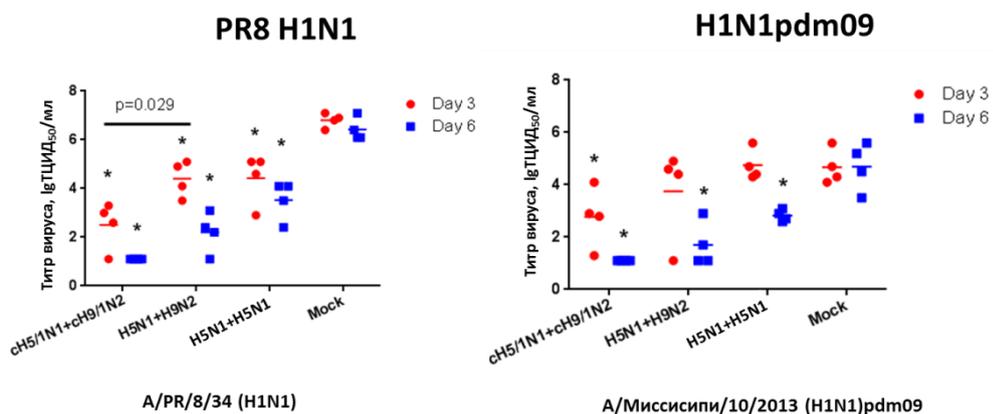


Рисунок 11. Репродукция гетерологичных вирусов гриппа в легких иммунизированных мышей на 3 и 6 сутки после челленджа. * $p < 0,05$ по сравнению с Mock.

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.

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 реасортантные штаммы ЖГВ, содержащие гемагглютинины с антигенно нерелевантными глобулярными доменами (от вирусов H5N1, H8N4 и H9N2), но при этом идентичными stalk-доменами вируса H1N1pdm09 (Рис. 12). Контрольная группа получала три дозы соответствующих штаммов ЖГВ, содержащих природные молекулы НА (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 НА от вируса H1N1pdm09, чтобы исключить различное влияние анти-НА антител в защите.

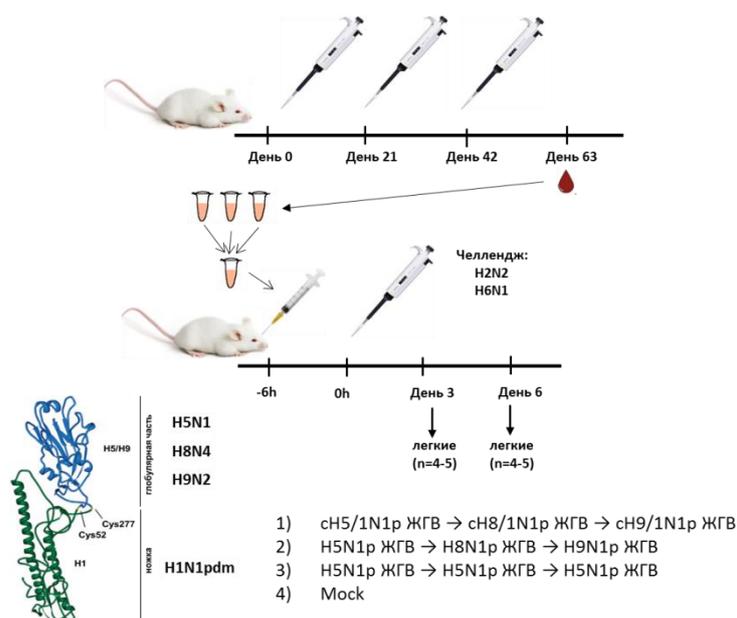


Рисунок 12. Схема эксперимента по оценке индукции кросс-реактивных антител вакцинными штаммами ЖГВ, экспрессирующими химерные и классические молекулы НА, с использованием пассивной иммунизации мышей линии BALB/c.

Три последовательные иммунизации в каждой из вакцинных групп привели к выработке мощного противовирусного гуморального иммунного ответа. В отличие от первого эксперимента, в данном опыте были определены кросс-реактивные антитела не к цельным вирусным антигенам, а к рекомбинантным белкам НА. Титры анти-Н9 антител были обнаружены только в тех группах, которые получали либо cH9/1N1p, либо H9N1p ЖГВ. Важно отметить, что у группы мышей, привитых ЖГВ с химерными НА, обнаруживались значительно более высокие титры IgG антител против химерного белка cH6/1 по сравнению с двумя другими вакцинными группами, что указывает на индукцию анти-stalk антител в первой группе. Кроме того, уровни IgG антител

против H2 и H6 белков были также значительно выше в группе химерных ЖГВ, чем у мышей, привитых классическими вариантами вакцины.

Для оценки защитного эффекта обнаруженных антител пулированную сыворотку от иммунизированных мышей вводили внутривенно наивным животным посредством ретро-орбитальной инъекции. Через 6 часов после пассивной иммунизации мышей заражали интраназально гетерологичными вирусами подтипов H2N2 и H6N1. Введение пассивно-иммунизированным мышам вирулентного вируса H6N1 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. 13). Заражение пассивно-иммунизированных мышей вирусом H2N2 не выявило значительных различий между опытными группами в титрах вируса на 3-й день после заражения, однако на 6-й день после заражения сыворотки от мышей, иммунизированных химерными ЖГВ, значительно снижали титр вируса в легких по сравнению с контрольной группой, в то время как другие пассивно-иммунизированные мыши не были защищены (Рис. 13). Результаты данного эксперимента позволяют сделать вывод о том, что усиленная кросс-протективность сHA-содержащих ЖГВ опосредуется антителами.

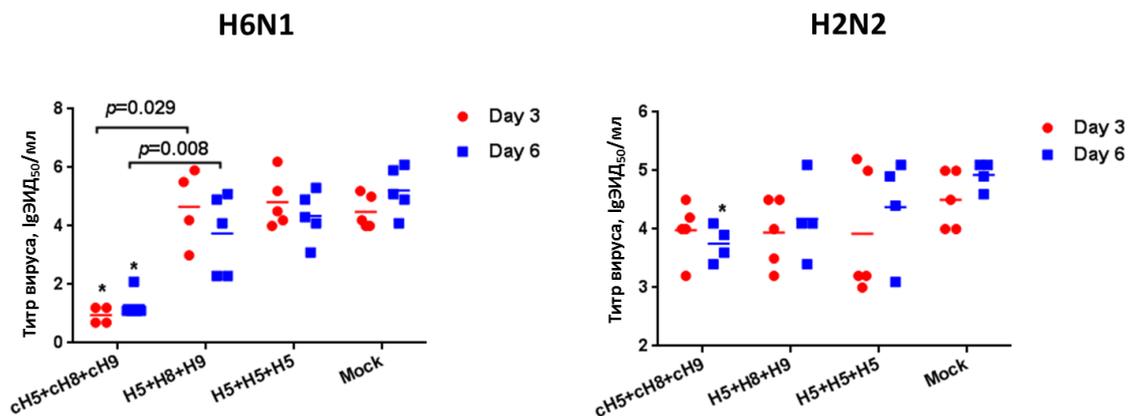


Рисунок 13. Репродукция гетерологичных вирусов гриппа в легких иммунизированных мышей на 3 и 6 сутки после челленджа. * $p < 0,05$ по сравнению с Mock.

2.3.2. 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 [Nguyen, 1999]. Современные вакцинные штаммы ЖГВ имеют формулу генома 6:2, т.е. два гена, HA и NA, передаются от циркулирующего эпидемического вируса, а шесть генов, кодирующие внутренние белки вириона – от ХА донора аттенуации Лен/17. Ранее было показано, что NP белок подвержен существенному антигенному дрейфу [Berkhoff, 2007; Rimmelzwaan, 2009], 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 исследовании был проведен иммуноэпитопный анализ NP белка вирусов гриппа А, показавший, что лишь 44% ЦТЛ-эпитопов донора аттенуации Лен/17 на 100% сохранились в циркулирующих вирусах H1N1pdm09 и H3N2. Один из наиболее простых способов

актуализировать эпитопный состав NP в составе ЖГВ является включение в состав вакцинного штамма NP гена от эпидемического вируса гриппа, т.е. конструирование вакцинных штаммов с формулой генома 5:3. 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. Однако анализ цитотоксической активности Т-лимфоцитов иммунизированных мышей выявил преимущество 5:3 реассортантов перед 6:2 вариантами в плане распознавания и уничтожения клеток-мишеней, нагруженных современным вирусом и/или NP эпитопом (Рис. 14).

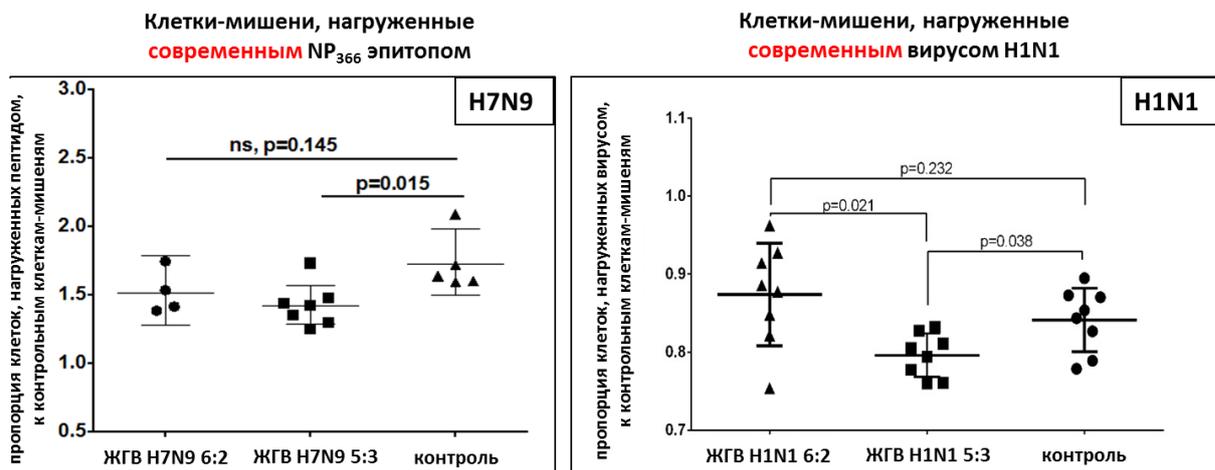


Рисунок 14. *In vivo* цитотоксическая активность CD8⁺ Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных вакцинными штаммами ЖГВ 6:2 и ЖГВ 5:3 подтипов H7N9 и H1N1pdm09.

Данные по *in vivo* цитотоксической активности ЦТЛ иммунизированных мышей хорошо коррелировали с защитой животных от заражения гетерологичными вирусами гриппа (Рис. 15). Если при челлендже гомологичным вирулентным вирусом H7N9 все иммунизированные мыши были полностью защищены, то при челлендже гетерологичными вирусами H7N3 (для ЖГВ H7N9) или А/Нью Йорк/61/15 (для ЖГВ H1N1pdm09), а также реассортантными штаммами H1N1 7:1, содержащими NP от вирусов H7N9 и H1N1pdm09, титры вирусов в легких на 3 сутки после заражения достоверно снижались по сравнению с группой плацебо только у мышей, привитых ЖГВ 5:3 (Рис. 15).

Как известно, современные вирусы H3N2 слабо реплицируются в респираторном тракте мышей, поэтому не представлялось возможным охарактеризовать сконструированные пары 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. Было показано, что внесение NP гена от эпидемического вируса не сказывалась на безвредности ЖГВ для хорьков, а также на способности индуцировать перекрестно-реагирующий гуморальный иммунный ответ.

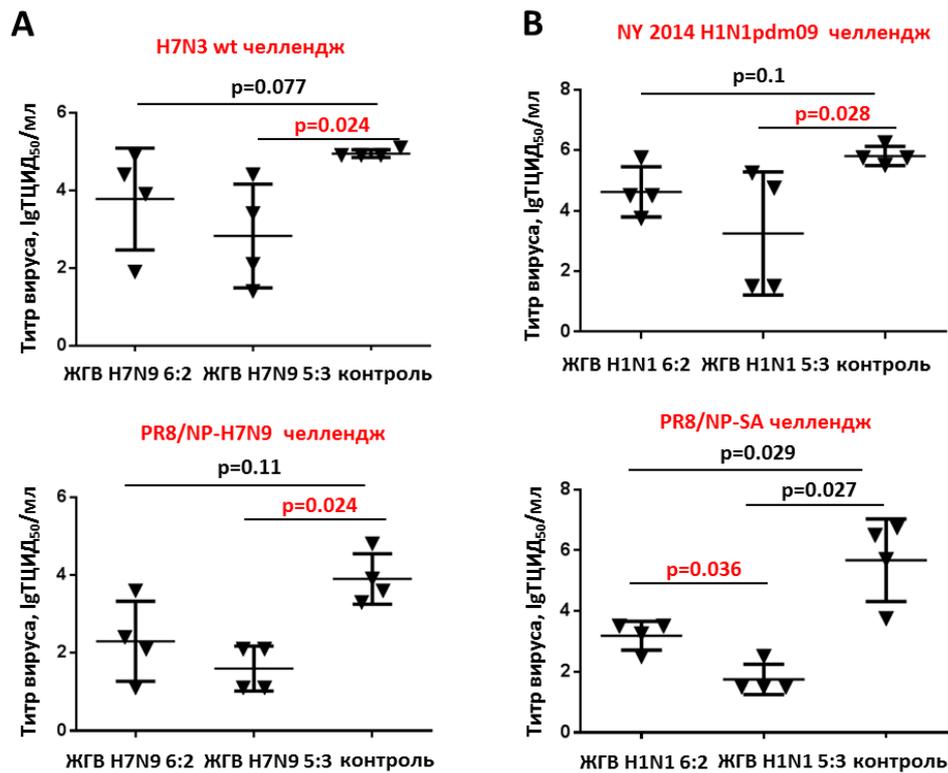


Рисунок 15. Титры вирусов в легких мышей, иммунизированных штаммами 6:2 и 5:3 подтипов H7N9 (А) и H1N1pdm09 (В), после экспериментального заражения гетерологичными вирусами гриппа.

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 [Keijzer, 2014; Wang, 2015]. Кроме того, активно развивается направление целенаправленной индукции Т-клеточного иммунитета путем интраназальной иммунизации ИГВ в комплексе со специфическими адьювантами [Barroso, 2015; Chua, 2015; Moriyama, 2017]. 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.

Также 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 известно, ЦТЛ-иммунный ответ не является стерильным, поэтому Т-клетки, образуемые в ходе последовательной иммунизации

живыми вакцинами, экспрессирующими химерные молекулы HA, не будут препятствовать продуктивной вирусной инфекции после каждой последующей дозы ЖГВ. Соответственно, стратегия иммунизации людей модифицированными ЖГВ, содержащими химерные HA 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 сродство 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 геной 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 для доноров 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.

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 гемагглютинаина 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 А/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 гемагглютинаина 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 гемагглютинаина (stalk-домен от вируса H1N1, а вариабельные 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 гемагглютинаина, а также NP гена от современного вируса гриппа, является перспективной стратегией для создания универсальной живой гриппозной вакцины.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

ОБЗОРЫ

1. Руденко Л.Г. Разработка и клиническое изучение отечественной живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа. / Руденко Л.Г., **Исакова-Сивак И.Н.**, Найхин А.Н., Дешева Ю.А., Ларионова Н.В., Киселева И.В., Стукова М.А., Ерофеева М.К.,

- Никифорова А.Н., Миронов А.Н. // **Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.**– 2013.– №4(71).– С.74-81.
2. L Rudenko. H7N9: Can H7N3 live attenuated influenza vaccine be used at the early stage of the pandemic? / L Rudenko, I Isakova-Sivak, A Rekstin. // **Expert Review of Vaccines.**– 2014.– Vol.13.– №1.– P.1-4.
3. L Rudenko. Pandemic Preparedness with Live Attenuated Influenza Vaccines Based on A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) Master Donor Virus. // L Rudenko, I Isakova-Sivak. // **Expert Review of Vaccines.**– 2015.– Vol. 14.– №3.– P.395-412.
4. I Isakova-Sivak. Safety, immunogenicity and infectivity of new live attenuated influenza vaccines. / I Isakova-Sivak, L Rudenko. // **Expert Review of Vaccines.**– 2015.– Vol.14.– №10.– P.1313-1329.
5. Isakova-Sivak I. Reassortant viruses for influenza vaccines: is it time to reconsider their genome structures? / Isakova-Sivak I., Korenkov D., Rudenko L. // **Expert Review of Vaccines.**– 2016.– Vol.15.– №5.– P.565-567.
6. I Isakova-Sivak I. Tackling a novel lethal virus: a focus on H7N9 vaccine development. / Isakova-Sivak, L Rudenko. // **Expert Review of Vaccines.**– 2017.– Vol.16.– №7.– P.709–721.

СТАТЬИ

7. Руденко Л.Г. Живая гриппозная вакцина, итоги разработок и перспективы применения / Руденко Л.Г. Ларионова Н.В. Киселева И.В. Исакова-Сивак И.Н. // Медицинский Академический Журнал.– 2010.– Т.10.– №4.– С. 235-239.
8. Isakova-Sivak I. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) / Isakova-Sivak I., Chen LM., Matsuoka Y., Voeten JTM., Kiseleva I., Heldens JGM., van den Bosch H., Klimov AI., Rudenko LG., Cox NJ., Donis RO. // **Virology.**– 2011.– Vol.412.– №2.– P.297-305.
9. Gustin K. Comparative immunogenicity and cross-clade protective efficacy of mammalian cell-grown inactivated and live-attenuated H5N1 reassortant vaccines in ferrets. / Maines T., Belser J., van Hoeven N., Lu X., Dong L., Isakova-Sivak I., Chen LM., Voeten JTM., Heldens JGM., van den Bosch H., Cox NJ., Klimov AI., Rudenko LG., Donis RO., Katz J. // **Journal of Infectious Diseases.**– 2011.– Vol.204.– №10.– P.1491-1499.
10. Кузнецова В.А. Разработка нового донора аттенуации для живой гриппозной аттенуированной вакцины. / Кузнецова В.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. Медицинский Академический Журнал.– 2012.– Т.12.– №4.– С.47–49.
11. L Rudenko. H7N3 live attenuated influenza vaccine has a potential to protect against new H7N9 avian influenza virus. / L Rudenko I Isakova-Sivak, S Donina. // **Vaccine.**– 2013.– Vol.31.– №42.– P.4702–4705.
12. N Larionova. Live Attenuated Influenza Vaccines against Highly Pathogenic H5N1 avian Influenza: Development and Preclinical Characterization. / N Larionova, I Kiseleva, I Isakova-Sivak, A Rekstin, I Dubrovina et al. // **Journal of Vaccines and Vaccination.**– 2013.– Vol.4.– №8 4: 208.
13. Isakova-Sivak I. Characterization of reverse genetics-derived cold-adapted master donor virus A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and reassortants with H5N1 surface genes in a mouse model. / Isakova-Sivak I., Chen LM., M Bourgeois, Y Matsuoka, JTM Voeten, JGM Heldens, H van den Bosch, A Klimov, L Rudenko, NJ Cox, RO Donis. // **Clinical and Vaccine Immunology.**– 2014.– Vol.21.– №5.– P.722-731.
14. Isakova-Sivak I. Development and pre-clinical evaluation of two LAIV strains against potentially pandemic A(H2N2) influenza virus. / Isakova-Sivak I., de Jonge J, Smolonogina T, Rekstin A, van Amerongen G, van Dijken H, Mouthaan J, Roholl P, Kuznetsova V, Doroshenko E, Tsvetnitsky V, Rudenko L. // **PLoS ONE.**– 2014.– 9(7): e102339.
15. Кореньков ДА. Сравнительный иммуноэпитопный анализ нуклеопротеинов современных циркулирующих вирусов гриппа А и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) для живой гриппозной вакцины. / Кореньков ДА, Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова ВА, Лосев ИВ, Руденко ЛГ, Найхин АН. // **Фундаментальные исследования.**– 2014.– №10.– С.908-912.
16. D Carter. Cross-protection against H7N9 influenza strains using a live-attenuated H7N3 virus vaccine. / D Carter, C Bloom, G Kirchenbaum, V Tsvetnitsky, I Isakova-Sivak, L Rudenko, T Ross. // **Vaccine.**– 2015.– Vol.33.– P.108–116.

17. С.А. Кузнецова. Влияние точечных мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) на иммунный ответ мышей. / С.А. Кузнецова, И.Н. Исакова-Сивак, В.А. Кузнецова, Г.Д. Петухова, И.В. Лосев, С.А. Дони́на, Л.Г. Руденко, А.Н. Найхин. // **Вопросы вирусологии.**- 2015.- №2.- С. 25-30.
18. I Isakova-Sivak. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers. / I Isakova-Sivak, M Stukova, M Erofeeva, A Naykhin, S Donina, G Petukhova, V Kuznetsova, I Kiseleva, T Smolonogina, I Dubrovina, M Pisareva, A Nikiforova, M Power, J Flores, L Rudenko // **Human Vaccines and Immunotherapeutics.**-2015.- Vol.11, №4.- P.971–983.
19. Kiseleva I. New Methodological Approaches in the Development of Russian Live Attenuated Vaccine for Pandemic Influenza. / Kiseleva I, Larionova N, I Isakova-Sivak, Fedorova E, Rudenko L. // **Translational Biomedicine.**- 2015.- Vol.6.- №2.- P.1-9.
20. Rudenko L. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. / Rudenko L., Isakova-Sivak I., Naykhin A., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Korenkov D., Matyushenko V., Sparrow E., Kieny M.P. // **Lancet Infectious Diseases.**- 2016.- Vol.16.- № 3.- P.303-310.
21. de Jonge J. H7N9 Live attenuated influenza vaccine is highly immunogenic, prevents virus replication and protects against severe bronchopneumonia in ferrets. / de Jonge J., Isakova-Sivak I., van Dijken H., Spijkers S., Mouthaan J., de Jong R., Smolonogina T., Roholl P., Rudenko L. // **Molecular Therapy.**- 2016.- Vol.24.- №5.- P.991-1002.
22. Rudenko L. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories. / Rudenko L, Yeolekar L, Kiseleva I, Isakova-Sivak I. // **Vaccine.**- 2016.- Vol.34.- №45.- P.5436-5441.
23. Isakova-Sivak I. Use of live attenuated influenza vaccines in young children in resource-poor settings. // **Lancet Global Health.**- 2016.- Vol.4.- №12:e879-e880.
24. Хайрушева Э.А. Фенотипические характеристики вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины, содержащих нуклеопротеин эпидемического вируса гриппа. / Хайрушева Э.А., Исакова-Сивак И.Н., Смолоногина Т.А., Третьяк Т.С., Руденко Л.Г. // **Медицинский Академический Журнал.**- 2016.- Том 16.- №4.- С.173-174.
25. Дорошенко Е.М. Пандемии гриппа и подготовка живых гриппозных вакцин для их сдерживания. / Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П. Исакова-Сивак И.Н. Руденко Л.Г. // «Биосфера».- 2016.- Т.8.- №3.- С.277-286.
26. Isakova-Sivak I., 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. / Isakova-Sivak I., Korenkov D, Smolonogina T, Tretiak T, Donina S, Rekstin A, Naykhin A, Shcherbik S, Pearce N, Chen LM, Bousse T, Rudenko L. // **Virology.**- 2017.- Vol.500.- P.209-217.
27. Rekstin A. Immunogenicity and Cross Protection in Mice Afforded by Pandemic H1N1 Live Attenuated Influenza Vaccine Containing Wild-Type Nucleoprotein. / Rekstin A, Isakova-Sivak I., Petukhova G, Korenkov D, Losev I, Smolonogina T, Tretiak T, Donina S, Shcherbik S, Bousse T, Rudenko L. // **BioMed Research International.** 2017;2017:9359276.
28. V. Matyushenko. Genotyping assay for differentiation of wild-type and vaccine viruses in subjects immunized with live attenuated influenza vaccine. / V. Matyushenko, I Isakova-Sivak, T Smolonogina, I Dubrovina, T Tretiak, L Rudenko. // **PLoS ONE.**- 2017.- 12(7):e0180497.
29. Петухова Г.Д. Влияние отдельных мутаций в генах, кодирующих внутренние белки вируса гриппа А, на формирование гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей. / Петухова Г.Д., Лосев И.В., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. // **Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.**- 2017.- Т.35.- №3 С.108-114.
30. Korenkov D. Live Attenuated Influenza Vaccines engineered to express the nucleoprotein of a recent isolate stimulate human influenza CD8+ T cells more relevant to current infections. / Korenkov D, Nguyen THO, Isakova-Sivak I., Smolonogina T, Brown LE, Kedzierska K, Rudenko L. // **Human Vaccines and Immunotherapeutics.**- 2018.- Т.14.- №4.- С.941-946.
31. I Isakova-Sivak. Broadly protective anti-hemagglutinin stalk antibodies induced by live attenuated influenza vaccine expressing chimeric hemagglutinin. / I Isakova-Sivak, D Korenkov, T Smolonogina, T Kotomina, S Donina, V Matyushenko, D Mezhenkaya, F Krammer, L Rudenko. // **Virology.**- 2018.- Т.518.- С.313-323.

32. Степанова Е.А. Аминокислотные замены N123D и N149D в молекуле гемагглютинина повышают иммуногенность вакцинного штамма живой гриппозной вакцины H7N9 в эксперименте. / Степанова Е.А., Котомина Т.С., Матюшенко В.А., Шаповалова В.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. // **Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины.**- 2018.- (принята к печати).

33. D Korenkov. Safety, immunogenicity and protection of A(H3N2) Live Attenuated Influenza Vaccines containing wild-type nucleoprotein in a ferret model. / D Korenkov, K Laurie, P Readling, L Caroline, KF Chan, I Isakova-Sivak, T Smolonogina, K Subbarao, I Barr, S Shcherbik, T Bousse, J Villanueva, L Rudenko // **Infection, Genetics and Evolution.**- 2018.- Vol.64.- P.95-104.

ПАТЕНТЫ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

1. **Патент РФ №042847.** Применение штамма вируса гриппа А/17/Новая Каледония/99/145 (H1N1) в качестве донора аттенуации для получения вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины подтипа H2N2. Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Калифорния/66/4412 (H2N2). Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Токио/67/912 (H2N2) / И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ».- №2011128994; заявл. 12.07.2011; опубл. 20.07.2015.

2. **Патент РФ №2556833.** Аттенуированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа А/PR/8/59/M2 (H1N1), предназначенный для получения вакцинных штаммов вируса гриппа в качестве донора аттенуации. Вакцинный штамм вируса гриппа А/59/M2/Калифорния/66/2211 (H2N2). Вакцинный штамм вируса гриппа А/59/M2/Токио/67/22111 (H2N2) / И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ».- №2011128981; заявл. 12.07.2011; опубл. 20.07.2015.

3. **Патент РФ №2563351.** Штамм вируса гриппа А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) для производства живой интраназальной гриппозной вакцины / Исакова-Сивак И.Н., Киселева ИВ, Кузнецова ВА, Руденко ЛГ. заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ».- №2013159030; заявл. 30.12.2013; опубл. 20.09.2015. Бюл №26.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность научному консультанту диссертационной работы - д.м.н., профессору, заслуженному деятелю науки РФ Л.Г. Руденко за постоянную поддержку и бесценный опыт, переданный в ходе выполнения всех разделов работы. Выражаю особую признательность сотрудникам отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» Д.А. Коренькову, Т.А. Смолоногой, В.А. Матюшенко, Т.С. Котоминой, Г.Д. Петуховой, Е.А. Степановой, С.А. Дониной и А.Р. Рекстину за помощь в проведении экспериментальной работы, критическом осмыслении полученных результатов, а также подготовке научных публикаций. Выражаю признательность за ценные консультации д.б.н, профессору И.В. Киселевой. Выражаю благодарность к.м.н. М.А. Стуковой, д.м.н. М.К. Ерофеевой, а также всем сотрудникам клиники ФГБУ «НИИ гриппа», принимавших участие в проведении клинических исследований живых гриппозных вакцин, полученных в настоящем исследовании.

Также выражаю признательность всем коллегам из зарубежных научных центров, принимавших участие в выполнении различных разделов работы – а именно Dr. R. Donis, профессору F. Krammer, Dr. J. De Jonge, Dr. K. Subbarao, Dr. I. Barr, Dr. T. Ross.