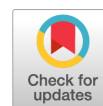


ОПТИМИЗАЦИЯ СВОЙСТВ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ



Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Е.А. Степанова, Л.Г. Руденко

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Классическая реассортация в развивающихся куриных эмбрионах является хорошо отработанной методикой для получения штаммов живой гриппозной вакцины. Сформированные естественным путем реассортантные вакцинные штаммы характеризуются высокой репродуктивностью, генетически стабильными признаками температурочувствительности и холодоустойчивости, полностью соответствующими характеристикам донора аттенуации, участвующего в скрещивании с эпидемическим вирусом. Наряду с антигенной актуальностью, естественная реассортация гарантирует аттенуацию вакцинных штаммов, хорошую репродуктивность в клетках верхних дыхательных путей и неспособность к репродукции в нижних отделах респираторного тракта. Однако при классической реассортации скорость и эффективность получения вакцинных реассортантов в существенной степени зависят от уникальных свойств эпидемического вируса, и поэтому не могут быть стабильными. Возможности генно-инженерных технологий привлекают тем, что позволяют получать вакцинные реассортанты быстро и эффективно, снижают вероятность появления спонтанных мутаций, позволяют работать с высокопатогенными вирусами, однако вакцинный штамм лишается преимуществ естественного отбора, при котором происходит селекция наиболее жизнеспособных клонов. В настоящем исследовании представлены результаты сравнительной оценки штаммов живой гриппозной вакцины А(Н3N2), полученных параллельно методами классической реассортации и генно-инженерной сборки по критериям, подтверждающим наследование вакцинными штаммами необходимых свойств, гарантирующих их безвредность и высокую репродуктивность в куриных эмбрионах. Реассортантные штаммы для живой гриппозной вакцины, полученные обоими методами, сохраняли все аттенуирующие мутации, унаследованные от донора аттенуации, были высокорепродуктивными при оптимальной температуре, их температурочувствительность соответствовала этому признаку у донора аттенуации. Однако у штаммов, полученных методом обратной генетики, наблюдалась частичная утрата холодоустойчивости по сравнению с холодоустойчивостью донора аттенуации и реассортантов из классического скрещивания. Снижение холодоустойчивости может негативно повлиять на эффективность вакцины. Важно, что за несколько дополнительных пассажей в куриных эмбрионах при пониженной температуре холодоустойчивость вакцинного реассортантного штамма, собранного генно-инженерным путем, удалось повысить. Из этого следует, что холодоустойчивость вирусов является фенотипическим признаком, степень проявления которого зависит от температурных условий культивирования вируса. При конструировании реассортантов методами обратной генетики отсутствует необходимый селективный фактор — пониженная температура инкубации. Чтобы холодоустойчивый фено-

Адрес для переписки:

Ларионова Наталья Валентиновна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-42-92, 8 921 332-80-61. Факс: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: nvlarionova@mail.ru

Contacts:

Natalie V. Larionova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academic Pavlov str., 12,
Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-42-92, +7 921 332-80-61. Fax: +7 (812) 234-68-68.
E-mail: nvlarionova@mail.ru

Для цитирования:

Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Степанова Е.А., Руденко Л.Г. Оптимизация свойств реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины, полученных методом обратной генетики // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6. С. 1018–1026. doi: 10.15789/2220-7619-OPO-17525

Citation:

Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Stepanova E.A., Rudenko L.G. Optimized properties of live vaccine influenza reassortant strains obtained by reverse genetics // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1018–1026. doi: 10.15789/2220-7619-OPO-17525

Работа проведена в рамках выполнения плановой темы научных исследований по государственному заданию (№ 122020300200-8 в ЕГИСУ).

The research was carried out within the framework of the planned topic of fundamental scientific research (No. 122020300200-8 in the Unified State Information System of Accounting).

тип реализовался в полной мере, необходимо дополнительное культивирование генно-инженерных реассортантов при пониженной температуре. Таким образом, метод обратной генетики с использованием плазмидной технологии дает возможность эффективной подготовки реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины. Важным этапом получения вакцинных штаммов с помощью генно-инженерных приемов должен быть контроль их холодоадаптированного фенотипа и, при необходимости, оптимизация холодоустойчивого фенотипа дополнительными пассажами при пониженной температуре.

Ключевые слова: вирус гриппа, живая гриппозная вакцина (ЖГВ), холодоадаптированность (*ca*-признак), температурочувствительность (*ts*-признак), аттенуация (*att*), классическая реассортация (*NR*), генно-инженерная сборка реассортантов (*RGR*).

OPTIMIZED PROPERTIES OF LIVE VACCINE INFLUENZA REASSORTANT STRAINS OBTAINED BY REVERSE GENETICS

Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Stepanova E.A., Rudenko L.G.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Classical reassortment in developing chicken eggs is a well-established technique for obtaining LAIV strains. Naturally generated reassortant vaccine strains are characterized by high reproductive capacity, genetically stable characteristics of temperature sensitivity and cold resistance, which correspond to the characteristics of the MDV involved in crossing with the epidemic virus. Along with antigenic relevance, natural reassortment ensures attenuation of vaccine strains, good reproduction capacity in upper respiratory tract cells and inability to reproduction in the lower respiratory tract. With classical reassortment, the speed and efficiency of obtaining vaccine reassortants largely depend on the properties of epidemic virus, and therefore cannot be stable. The potential of reverse genetics is attractive because it allows to obtain vaccine reassortants quickly and efficiently, reduce the likelihood of spontaneous mutations; however, the vaccine strain is deprived of the advantages of natural selection, in which the most viable clones are selected. This study presents the results of comparatively assessed A(H3N2) LAIVs obtained in parallel by classical reassortment and reverse genetics according to criteria confirming that vaccine strains inherit the necessary properties that guarantee their harmlessness and high reproduction in chicken embryos. Strains for LAIV obtained by both methods retained all attenuating mutations inherited from the MDV, were highly reproductive at the optimal temperature, with temperature sensitivity corresponded to the MDV. However, strains obtained by reverse genetics, was observed to have partial loss of cold resistance in comparison with that of the MDV and classical reassortants. Reduced cold adaptation may negatively affect vaccine effectiveness. It is important that after several additional passages in chicken embryos at low temperature, the cold resistance of the vaccine strain, assembled by reverse genetics, was increased. Credibly that cold resistance is a phenotypic trait, the degree of manifestation of which depends on the temperature conditions of virus multiplication. The selective factor of reduced incubation temperature is missing in reverse genetics. In order for the cold-adapted phenotype to be fully realized, additional passages at low temperature of RG-reassortants are necessary. Thus, the reverse genetics method using plasmid technology allows to effectively prepare reassortant strains for LAIV. An important stage in obtaining vaccine strains using genetic engineering techniques should be the control of their cold-adapted phenotype and its optimization by additional passages at low temperature.

Key words: influenza virus, live attenuated influenza vaccine (LAIV), cold adaptation (*ca*-sign), temperature sensitivity (*ts*-sign), attenuation (*att*), natural reassortment (*NR*), reverse genetic reassortment (*RGR*).

Введение

Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) — эффективное и безопасное средство профилактики сезонного и пандемического гриппа [24]. Вводимая интраназально, аттенуированная вакцина имитирует естественную инфекцию и стимулирует активацию тех же звеньев иммунного ответа, что и возбудитель гриппа. Более широкий защитный эффект не только против возбудителя, к которому она получена, но и против его дрейфовых вариантов является преимуществом ЖГВ в сравнении с инактивированной вакциной [2, 8]. Дополнительным бонусом ЖГВ является легкое нетравматичное введение препарата впрыскиванием в нос.

Штамм ЖГВ представляет собой реассортант с формулой генома 6:2, содержащий 2 гена, кодирующих HA и NA актуального эпидемического вируса, что необходимо для выработки соответствующего иммунного ответа, а шесть генов, кодирующих внутренние белки — от штамма-донора аттенуации, что обеспечивает безопасность (аттенуацию, *att*) вакцинных вирусов. В результате объединения необходимых для вакцинного вируса характеристик реассортант приобретает эпидемиологическую актуальность и безвредность для человека.

В настоящее время известны два методических приема получения реассортантных штаммов для ЖГВ: 1) метод классической реассор-

тации в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) [1, 23]; 2) метод обратно-генетической сборки с использованием плазмид [10, 11, 25].

От выбранного методического приема зависит быстрота получения штаммов ЖГВ. Подготовку генно-инженерных штаммов для ЖГВ осуществляет компания MedImmune (США). Штаммы ЖГВ в России (в отделе вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины») получают методом классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах. Метод классической реассортации достаточно трудоемкий и не гарантирует быстрого получения штаммов с требуемой формулой генома [5, 17].

Опыт использования в нашей стране и в мире генно-инженерных вакцин, в частности против SARS-CoV-2 [18], открывает перспективы для использования технологии обратной генетики также при разработке штаммов ЖГВ, что может дать возможность получать штаммы ЖГВ существенно быстрее.

В настоящем исследовании представлены результаты сравнительной оценки по биологическим критериям, специфичным для ЖГВ, качества препаратов, полученных параллельно методом классической реассортации (Natural Reassortment, NR) и с помощью приемов обратной генетики (Reverse Genetic Reassortment, RGR).

Материалы и методы

Вирусы гриппа. В работе использованы вирусы гриппа А(Н3N2), полученные из Центра по контролю и предупреждению заболеваемости (CDC, США), из коллекции NIBSC (Великобритания) и центра ВОЗ (Австралия).

В представленном исследовании реассортантным штаммам ЖГВ давали названия по их эпидемическому предшественнику и методу получения реассортанта (например, штамм ЖГВ на основе вируса А/Darwin/09/2021 называли А/Darwin/2021-NR или А/Darwin/2021-RG).

Культивирование вирусов осуществляли в 10–11-дневных развивающихся куриных эмбрионах, полученных из АО «Птицефабрика Синявинская» (Ленинградская область, Россия). В зависимости от задач исследования инфицированные эмбрионы инкубировали при перmissive температуре 32–33°C в течение 2–3 суток, при пониженной температуре 26°C в течение 5–6 суток и повышенной до 39°C температуре в течение 2–3 суток, после чего эмбрионы охлаждали и собирали вирусосодержащую аллантоисную жидкость. Титры вирусов рассчитывали по методу Reed & Muench [20] и выражали в lg ЭИД₅₀/мл.

Температурочувствительность вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32–33°C) и повышен-

ной до 39°C температуре инкубации. Вирусы считали температурочувствительными, то есть демонстрирующими ts-признак, если эта разница (RCT — reproductive capacity at different temperatures) составляла не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, и температуроустойчивыми (non-ts-признак), если RCT не превышала 3,5 lg ЭИД₅₀/мл.

Степень холодоустойчивости вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32–33°C) и пониженной до 26°C температуре инкубации. Вирусы считали холодоустойчивыми, то есть демонстрирующими non-ca-признак, если RCT₂₆ составляла не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, и холодоустойчивыми (ca-признак), если RCT₂₆ не превышала 3,5 lg ЭИД₅₀/мл.

Получение штаммов ЖГВ методом классической реассортации в РКЭ. Реассортацию эпидемических вирусов гриппа А с отечественным донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) для получения NR-вакцинных штаммов проводили в 10–11-дневных РКЭ по стандартной методике [1, 23]. Этапы работы включали: одновременное инфицирование РКЭ при оптимальной температуре рекомендованным ВОЗ актуальным эпидемическим вирусом и донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), селективные пассажи и клонирование в присутствии селективирующих факторов: пониженной до 25–26°C температуры и нейтрализующих антител против поверхностных гликопротеинов донора аттенуации, последующие 1–2 дополнительных клонирования при оптимальной температуре и накопление готового вакцинного NR-штамма.

Генно-инженерная сборка штаммов ЖГВ с помощью плазмид. RG-реассортанты получали по протоколу Isakova-Sivak с соавт. [13] с использованием комплекта плазмид, кодирующих гены донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Гены HA и NA эпидемически актуального вируса клонировали в вектор для обратной генетики вируса гриппа (pCIPolISapIT) по сайтам рестрикции SapI. Для этого из биоматериала, содержащего вирус гриппа, выделяли РНК набором «Ампли-Прайм РИБО-ПРЕП» (НекстБио, Россия), постановку ПЦР осуществляли с использованием набора «OneTaq One-Step» (New England Biolabs, США) и комплекта специфических праймеров, вносящих на концы сегментов сайты для клонирования генов эндонуклеазой SapI [11]. Фрагменты очищали из геля, производили рестрикцию эндонуклеазой SapI (New England Biolabs, США) и лигировали в вектор pCIPolISapIT, обработанный рестриктазой SapI, с использованием лигазы T4 (Евроген, Россия). Полученным материалом трансформировали клетки *E. coli* и производили скрининг колоний. Отбирали колонии бактерий,

содержащие плазмиды, кодирующие гены HA и NA целевого вируса, и не содержащие замен в последовательности. Из колоний накапливали биомассу и выделяли пДНК в препаративных количествах наборами «Биолабмикс макси-преп» (Новосибирск, Россия). Контроль последовательности вставки в плазмиду осуществляли методом сэнгеровского секвенирования [21] (детали метода приведены ниже).

Сборку вирусов гриппа проводили по методике [22] путем электропорации клеток Vero набором из 8 плазмид, кодирующих 6 генов донора аттенуации (PB2, PB1, PA, NP, M, NS), а также HA и NA эпидемического вируса. Трансфицированные клетки инкубировали при 33°C при 5% CO₂ в бессывороточной среде OptiPRO SFM (Thermo Fischer Scientific, США) в присутствии трипсина (Sigma, США). Через 72 ч клетки соскабливали, ресуспендировали в среде и взвесью клеток заражали РКЭ. Инкубировали РКЭ при 33°C в течение 72 ч, после чего оценивали наличие вируса методом РГА.

Скрининг NR- и RGR-штаммов для отбора кандидатов с нужной формулой генома, а также для подтверждения формулы генома, производили с использованием метода пиросеквенирования [6]. РНК из вирусосодержащей хориоаллантоисной жидкости выделяли с помощью набора «Ампли-прайм РИБО-ПРЕП» (НекстБио, Россия), проводили постановку ПЦР набором «ОТ-ПЦР Биомастер» (Биолабмикс, Россия), после чего проводили пиросеквенирование с помощью RuгоMark Q24 в соответствии с протоколом производителя.

Полногеномное секвенирование вирусов гриппа. Кандидатные штаммы в ЖГВ подвергали полногеномному секвенированию. Выделение вирусной РНК проводили при помощи набора «Ампли-прайм РИБО-ПРЕП» (НекстБио, Россия). Амплификацию генов перед секвенированием осуществляли одношаговым набором для ОТ-ПЦР «ОТ-ПЦР Биомастер» (Биолабмикс, Россия), фрагменты разделяли в 1% агарозном геле, после чего производили очистку набором «Cleanup» (Евроген, Россия). Полученные фрагменты секвенировали с помощью капиллярного секвенатора «3130xl Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя с использованием набора «BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Thermo Fischer Scientific, США). Анализ последовательности производили в программе Unipro Ugene [19]. Последовательности эпидемических вирусов гриппа получали из базы данных GISAID (<https://gisaid.org>).

Достоверность результатов исследований оценивали при помощи t-критерия Стьюдента для зависимых переменных.

Результаты

Проведена параллельная подготовка штаммов ЖГВ на основе разных субклад вирусов гриппа А(Н3N2) методами классической реассортации в РКЭ и обратной генетики.

Молекулярно-генетический анализ полученных NR- и RGR-штаммов подтвердил, что в их составе содержатся гены, кодирующие белки оболочки HA и NA от эпидемических вирусов и 6 генов, кодирующих внутренние белки, от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (вакцинная формула генома 6:2). Вакцинные реассортанты унаследовали от донора аттенуации мутации, определяющие температурочувствительность, холодоустойчивость и аттенуацию (ts/ca/att) (табл. 1).

Полногеномное секвенирование NR- и RGR-штаммов для ЖГВ также подтвердило сохранность у них всех аттенуирующих мутаций и отсутствие спонтанных мутаций (данные не представлены).

Сравнение ростовых характеристик реассортантных штаммов ЖГВ проводили при оптимальной (32°C) и пограничных температурах: пониженной до 26°C и повышенной до 39°C. Исследовали NR-штаммы ЖГВ, которые прошли 7–8 пассажей в РКЭ в процессе их получения, и RGR-штаммы ЖГВ, которые после сборки в клетках Vero из-за особенностей методики прошли в РКЭ всего 2–3 пассажа.

Результаты оценки характеристик репродуктивности вакцинных штаммов, полученных по NR- и RGR-технологиям, при разных температурах представлены в табл. 2.

NR- и RGR-вакцинные реассортанты имели достаточно высокие титры репродукции при оптимальной температуре 32°C и между собой отличались незначительно.

Во всех случаях репродуктивность вакцинных реассортантов превышала репродуктивность их эпидемических предшественников и соответствовала высокой инфекционной активности донора аттенуации.

Все штаммы ЖГВ-NR обладали выраженными ts- и ca-характеристиками, соответствующими ts/ca-характеристикам донора аттенуации (табл. 2). Следует заметить, что все исследованные вирусы, независимо от их принадлежности к определенной субкладе, оказались природно температурочувствительными, но в меньшей степени, чем донор аттенуации А/Ленинград/134/157 (Н2N2). Степень температурочувствительности штаммов ЖГВ-NR и ЖГВ-RGR соответствовала температурочувствительности донора аттенуации.

Что же касается оценки репродукции RG-реассортантов при пониженной температуре,

Таблица 1. Состав кодирующих мутаций во внутренних генах донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и вакцинных штаммов, полученных методами классической реассортации и обратной генетики (по данным частичного секвенирования генома)

Table 1. Composition of coding mutations in the internal genes of the MDV A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and vaccine strains obtained by classical reassortment and reverse genetics methods (according to partial genome sequencing data)

Белок Protein	Позиция аминокислоты Amino acid position	non-ts/ non-ca Len/wt*	ts/ca Len17	Аминокислотные замены в генах, кодирующих внутренние реассортантов, полученных на основе указанных эпидемических вирусов A(H3N2)												
				A/Singapore/ GPO454/2018		A/Kansas/ 14/2017		A/Brisbane/ 190/2017		A/Switzerland/ 8060/2017		A/Abu Dhabi/ 240/2018		A/SouthAustralia/ 34/2019		A/Darwin/ 09/2021
		NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	
PB2	478	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
PB1	265	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	
	591	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	
PA	28	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	
	341	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
NP	ген NP донора аттенуации Len17 не содержит кодирующих мутаций/the NP gene of the MDV Len17 does not contain coding mutations															
M1	15	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
M2	86**	Ala	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	
NS2	100	Met	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	

Примечания. *Len/wt — эпидемический вирус А/Ленинград/134/57 (H2N2) является «диким» предшественником донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Len17). **Популяция донора аттенуации Len17 гетерогенна по этой позиции, часть ее не содержит мутацию Ala-86-Thr [13, 15].
Notes. *Len/wt — epidemic virus A/Leningrad/134/57 (H2N2) is a "wild" precursor of the MDV A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) (Len17). **The population of MDV Len17 is heterogeneous for this position; part of it does not contain the mutation Ala-86-Thr [13, 15].

то все они отличались сниженной холодоустойчивостью по сравнению с холодоустойчивостью донора аттенуации и реассортантов из классического NR-скрещивания. Четыре из семи RGR-штаммов для ЖГВ по использованным критериям, прописанным в разделе «Материалы и методы», не могли быть отнесены к обладающим са-фенотипом, у остальных трех сохранилась холодоустойчивость, но она была снижена в сравнении со штаммами ЖГВ-NR и с донором аттенуации. В среднем, штаммы ЖГВ-RGR были менее холодоустойчивы на 0,5–2,1 lg ЭИД₅₀ по сравнению со штаммами ЖГВ-NR. Все эпидемические вирусы обладали non-са-фенотипом.

Поскольку уровень холодоустойчивости RG-вакцинных штаммов не соответствовал стандартным значениям, принятым для характеристики штаммов ЖГВ [5], на модели вакцинного реассортанта А/Darwin/09/2021-RG (H3N2) была исследована возможность оптимизировать са-фенотип штаммов ЖГВ-RG. Были проведены его последовательные пассажи в РКЭ при 26°C. У штамма ЖГВ на основе А/Darwin/09/2021-RG (H3N2), который характеризовался недостаточной холодоустойчивостью (RCT26 = 4,6 lg ЭИД₅₀), постепенно повышалась способность к репродукции при 26°C, и за три пассажа в РКЭ при пониженной температуре инкубации его са-фенотип практически сравнялся с са-фенотипом NR-аналога (рис.).

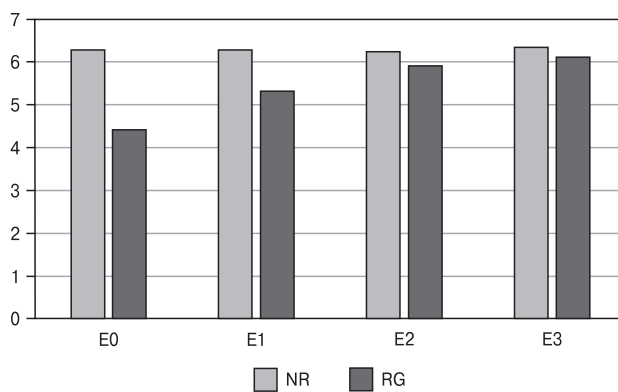


Рисунок. Изменение са-фенотипа штаммов ЖГВ-NR и ЖГВ-RG на основе эпидемического вируса А/Darwin/09/2021 (H3N2) при последовательных пассажах в развивающихся куриных эмбрионах при 26°C

Figure. Changes in the ca-phenotype of LAIV-NR and LAIV-RG strains based on A/Darwin/09/2021 (H3N2) wild type virus during successive passages in developing chicken embryos at 26°C

Примечание. По оси абсцисс: число дополнительных пассажей штаммов ЖГВ в РКЭ при 26°C. По оси ординат: инфекционный титр вируса в РКЭ при 26°C, lg ЭИД₅₀/мл.
Note. X-axis: the number of additional passages of LAIV strains in eggs at 26°C. On the y-axis: infectious titer of the virus in eggs at 26°C, lg EID₅₀/mL.

Таблица 2. Репродуктивные свойства реассортантных штаммов сезонной ЖГВ, подготовленных методами классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах и генно-инженерной сборки

Table 2. Characteristics of reproductive capacities of seasonal LAIV reassortant strains prepared by classical reassortment in developing chicken embryos and reverse genetic method

Вирус A(H3N2) Virus A(H3N2)	Клада Clade	WT*/Реассортант WT*/Reassortant	Инфекционный титр (lg ЭИД ₅₀ /мл)**** Infectious titer (lg EID ₅₀ /mL)****			РСТ***** (lg ЭИД ₅₀) RСТ***** (lg EID ₅₀)		Фенотип Phenotype	
			32°C	26°C	39°C	26°C	39°C		
A/Singapore/ GPO454/2018	3C.2a1	WT	7,8±0,1	2,0±0,1	1,7±0,3	5,8	6,1	non-ca	ts
		NR**	8,6±0,2	6,2±0,1	1,2±0,0	2,4	7,4	ca	ts
		RGR***	9,1±0,2	5,7±0,2	≤ 1,2±0,0	3,4	≥ 7,9	ca	ts
A/Kansas/ 14/2017	3C.3a	WT	7,7±0,3	2,0±0,2	2,1±0,1	5,6	≥ 5,6	non-ca	ts
		NR	8,0±0,2	4,9±0,3	≤ 1,2±0,0	3,1	≥ 6,8	ca	ts
		RGR	8,0±0,2	3,4±0,1	≤ 1,2±0,0	4,6	≥ 6,8	non-ca	ts
A/Brisbane/ 190/2017	3C.2a2	WT	7,7±0,3	2,0±0,1	1,2±0,0	5,7	≥ 6,5	non-ca	ts
		NR	8,5±0,1	5,5±0,2	≤ 1,2±0,0	3,0	≥ 7,3	ca	ts
		RGR	7,9±0,2	4,7±0,1	≤ 1,2±0,0	3,2	≥ 6,7	ca	ts
A/Switzerland/ 8060/2017	3C.2a2	WT	6,8±0,4	1,2±0,1	2,5±0,2	5,6	4,3	non-ca	ts
		NR	9,2±0,1	6,2±0,2	1,2±0,1	3,0	8,0	ca	ts
		RGR	9,2±0,1	5,5±0,2	≤ 1,2±0,0	3,7	≥ 8,0	non-ca	ts
A/Abu Dhabi/ 240/2018	3C.2a1b	WT	6,8±0,2	2,0±0,1	2,2±0,3	4,8	4,6	non-ca	ts
		NR	9,1±0,1	6,7±0,1	1,7±0,2	2,4	7,4	ca	ts
		RGR	8,5±0,1	4,0±0,2	1,2±0,1	4,5	7,3	non-ca	ts
A/South Australia/ 34/2019	3C.2a1b	WT	7,7±0,1	2,7±0,1	1,2±0,0	5,0	≥ 6,5	non-ca	ts
		NR	8,2±0,2	6,0±0,4	≤ 1,2±0,0	2,2	≥ 7,0	ca	ts
		RGR	8,9±0,1	6,2±0,2	≤ 1,2±0,0	2,7	≥ 7,7	ca	ts
A/Darwin/ 09/2021	3C.2a1b.2a.2	WT	8,2±0,2	2,2±0,0	1,7±0,4	6,0	6,5	non-ca	ts
		NR	9,2±0,1	6,3±0,2	1,2±0,0	2,9	8,0	ca	Ts
		RGR	9,0±0,1	4,4±0,2	1,2±0,1	4,6	7,8	non-ca	ts
A/Leningrad/ 134/17/57 (H2N2) MDV		NR	9,4±0,1	7,4±0,0	≤ 1,2±0,0	2,0	≥ 7,4	ca	ts

Примечание. *WT — (wild type) эпидемический вирус; **NR — (Natural Reassortment) полученные классическим методом реассортации; ***RGR — (Reverse Genetic Reassortment) полученные обратным генетическим методом; ****ЭИД₅₀/мл — 50% эмбриональная инфекционная доза вируса; *****RCT — (Reproductive Capacity at Different Temperatures) разность репродуктивной активности при оптимальной 32°C и при пониженной до 26°C температуре.

Note. *WT — wild type virus; **NR — (Natural Reassortment) obtained by classical reassortment method; ***RGR — (Reverse Genetic Reassortment) obtained using reverse genetic method; ****EID₅₀ — 50% embryo infective dose; *****RCT — (Reproductive Capacity at Different Temperatures) the difference in reproductive capacity at an optimal temperature of 32°C and at a temperature reduced to 26°C.

Обсуждение

Штаммы вируса гриппа А(Н3N2) за длительный период циркуляции выработали разнообразные антигенные и генетические стратегии ухода от популяционного иммунитета. Произошли изменения в их взаимодействии с птичьими и человеческими клеточными рецепторами, в этом взаимодействии вирусная NA научилась замещать HA, что приводит к сложностям с накоплением вирусов, подбором эритроцитов для антигенного анализа, искажается антигенная характеристика изолятов в серологических реакциях [7]. В результате этого вирусы А(Н3N2) стали самыми проблемными при подготовке на их основе штаммов ЖГВ методом классической реассортации. Поэтому в настоящей работе для сравнительной оценки методов получения вакцинных штаммов были выбраны именно вирусы А(Н3N2).

Метод классической реассортации в РКЭ позволяет получать сформированные естественным путем высокорепродуктивные реассортантные штаммы для живой гриппозной вакцины с генетически стабильными характеристиками температурочувствительности и холодоустойчивости, полностью соответствующими характеристикам донора аттенуации. Однако при классической реассортации скорость и эффективность получения реассортантов с необходимым составом генома не могут быть стабильными, поскольку в существенной степени зависят от уникальных свойств участвующего в скрещивании эпидемического вируса.

Приемы обратной генетики позволяют получать вакцинные реассортанты быстро и эффективно, снижают вероятность появления спонтанных мутаций, позволяют работать с высокопатогенными вирусами, однако вакцинный штамм лишается преимуществ естественного отбора, при котором происходит селекция наиболее жизнеспособных клонов, способных, в частности, эффективно размножаться в РКЭ [4, 25].

При отборе реассортантных штаммов для ЖГВ существуют нормативные требования, касающиеся высокой репродуктивности, безопасности и иммуногенности. В настоящем исследовании изучены признаки репродуктивности при оптимальной температуре, температурочувствительности и холодоустойчивости (ts/са), которые являются неотъемлемыми характеристиками вакцинных реассортантов и служат маркерами их аттенуации.

Наши исследования показали, что оба методических приема получения вакцинных штаммов NR и RGR позволяют получать высокорепродуктивные при оптимальной температуре штаммы ЖГВ. При обоих способах получения вакцинных штаммов обеспечивается генети-

ческая стабильность аттенуирующих мутаций, а ts-фенотип штаммов ЖГВ-RGR в полной мере соответствует ts-фенотипу штаммов ЖГВ-NR.

Холодоустойчивость является неотъемлемым свойством доноров аттенуации и передается вакцинным штаммам с генами, кодирующими внутренние белки. Этот признак является важным фактором, способствующим хорошей репликации вакцинных реассортантов в клетках верхних отделов респираторного тракта. Неожиданностью явилась частичная потеря свойства холодоустойчивости у RG-реассортантов на основе вирусов гриппа А(Н3N2) по сравнению со штаммами ЖГВ-NR и с донором аттенуации. Снижение показателя холодоустойчивости для вирусов гриппа А(Н3N2) составляло от 0,5 до 2,1 lg ЭИД₅₀ у разных штаммов. Интересно, что снижение са-фенотипа было отмечено ранее при конструировании химерных штаммов вируса гриппа, когда в качестве вектора использовали ЖГВ-RGR. При этом изменение са-фенотипа не снижало аттенуацию химерного вакцинного штамма для мышей [12].

Частичная утрата са-фенотипа штаммами, полученными генно-инженерными методами, может повлиять на эффективность ЖГВ. Однако представленные в работе результаты быстрой и эффективной адаптации RG-реассортанта А(Н3N2) к репродукции при 26°C свидетельствуют о том, что холодоустойчивость легко удается повысить за несколько последовательных пассажей при пониженной температуре.

В связи с выявленным снижением холодоустойчивости сконструированных методами обратной генетики вакцинных штаммов, важно отметить, что исследования отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), как и доноров для американской ЖГВ на основе вирусов А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) и В/Энн Арбор/1/66, показали наличие взаимосвязи между аттенуацией для хорьков и ts-фенотипом реассортантов, тогда как между аттенуацией и са-фенотипом такой взаимосвязи не наблюдали [9, 14, 16].

В вирусологии зачастую используют понятие «фенотип», объявляя фенотипическим признак вируса, который на самом деле таковым не является, а является генетическим, обусловленным наследованием определенных мутаций в геноме. Так, признаки ts и са называют фенотипическими, в то время как за признаком температурочувствительности не наблюдается фенотипических проявлений, признак остается стабильным и неизменным в любых условиях культивирования. Ранее нами было показано, что температурочувствительные вакцинные штаммы не способны к репродукции при повышенных температурах и не меняют своих свойств в непермиссивных для них условиях повышенной температуры [3].

Представленные аргументы позволяют предположить, что признак холодоустойчивости действительно проявляет себя как фенотипический, способный подстраиваться к условиям окружающей среды. Признак са имеет норму реакции, зависящую от температурных условий культивирования вируса. Проявление признака снижается при снижении роли участия окружающей среды. При конструировании реассортантов ЖГВ методами обратной генетики отсутствует селективный фактор — пониженная температура. Чтобы са-фенотип у ЖГВ-RG реализовался в полной мере, необходимо дополнительное культивирование вируса при пониженной температуре.

Одна из причин, по которой традиционный метод классической реассортации при получении штаммов ЖГВ-NR предпочтительней для качества вакцинного препарата в сравнении с RG-технологией, заключается в том, что он предполагает естественный отбор таких вариантов, которые имеют констелляцию генов, оптимизирующую ростовые свойства вируса в РКЭ, что является важнейшим аспектом производственного процесса. Отсутствие естественной селекции может отрицательно сказываться на биологических характеристиках RG-реассортантов для ЖГВ. Однако новаторские RG-технологии бесспорно являются при-

влекательными, поскольку позволяют гарантированно получать реассортантные вирусы вакцинной формулы генома, свободные от ненужных мутаций, которые могут появиться в геноме в результате серийного пассирования в РКЭ. Представленные данные подтверждают перспективность RG-вакцинных штаммов ЖГВ, однако их подготовка должна осуществляться под строгим контролем и, при необходимости, сопровождаться коррекцией фенотипа полученных реассортантов.

Таким образом, метод обратной генетики с использованием плазмидной технологии дает возможность эффективной подготовки реассортантных штаммов для ЖГВ. По характеристикам репродукции при повышенной и оптимальной температурах штаммы ЖГВ-RG сравнимы с вакцинными штаммами, полученными в результате классической реассортации, что гарантирует их аттенуацию и важную для производства высокую репродуктивность. Стабильности генотипа RG реассортантов оказалось недостаточно для оптимального проявления их са-фенотипа. Важным этапом получения штаммов ЖГВ-RG должен быть контроль их холодадаптированного фенотипа и, при необходимости, оптимизация са-фенотипа дополнительными пассажами в РКЭ при пониженной температуре.

Список литературы/References

1. Александрова Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа // Вопросы вирусологии. 1977. Т. 22, № 4. С. 387–395. [Alexandrova G.I. Use of the genetic recombination method for obtaining vaccinal strains of the influenza virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1977, vol. 22, no. 4, pp. 387–395. (In Russ.)]
2. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. СПб.: Наука, 1994. 152 с. [Alexandrova G.I., Klimov A.I. Live influenza vaccine. *St. Petersburg: Nauka*, 1994. 152 p. (In Russ.)]
3. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Исакова И.Н., Руденко Л.Г. Генетическая стабильность холодадаптированных вирусов гриппа // Вопросы вирусологии. 2006. Т. 51, № 4. С. 13–16. [Kiseleva I.V., Larionova N.V., Isakova I.N., Rudenko L.G. Genetic stability of cold-adapted influenza viruses. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2006, vol. 51, no. 4, pp. 13–16. (In Russ.)]
4. Киселева И.В., Руденко Л.Г. Разработка реассортантных гриппозных вакцин: классическое скрещивание или обратная генетика? // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 209–218. [Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of reassortant influenza vaccines: classical reassortment or reverse genetics? *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 209–218. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-DOR-2449
5. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Влияние биологических свойств сезонных вирусов гриппа на эффективность подготовки штаммов живой гриппозной вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2019. № 5. С. 24–34. [Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Grigorieva E.P., Rudenko L.G. The influence of seasonal influenza viruses biological features on the effectiveness of development strains for live influenza vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 5, pp. 24–34. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2019-5-24-34
6. Степанова Е.А., Крутикова Е.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Разработка протокола пиросеквенирования для анализа происхождения генов реассортантов при подготовке штаммов живой гриппозной вакцины // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. Т. 36, № 2. С. 101–107. [Stepanova E.A., Krutikova E.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of pyrosequencing-based assay for analyzing the origin of genes in preparing reassortant LAIV candidates. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2018, vol. 36, no. 2, pp. 101–107. (In Russ.)] doi: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-98-103
7. Allen J.D., Ross T.M. H3N2 influenza viruses in humans: viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2018, vol. 14, no. 8, pp. 1840–1847. doi: 10.1080/21645515.2018.1462639.
8. Cheng X., Zengel J.R., Suguitan A.L. Jr., Xu Q., Wang W., Lin J., Jin H. Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in heterologous protection in ferrets. *J. Infect. Dis.*, 2013, vol. 208, no. 4, pp. 594–602. doi: 10.1093/infdis/jit207

9. Herlocher M.L., Clavo A.C., Maassab H.F. Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses: mutations which may contribute to attenuation. *Virus Res.*, 1996, vol. 42, no. 1–2, pp. 11–25. doi: 10.1016/0168-1702(96)01292-0
10. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 11, pp. 6108–6113. doi: 10.1073/pnas.100133697
11. Hoffmann E., Krauss S., Perez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 25–26, pp. 3165–3170. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00268-2
12. Isakova-Sivak I., Matyushenko V., Stepanova E., Matushkina A., Kotomina T., Mezhenskaya D., Prokopenko P., Kudryavtsev I., Kopeykin P., Sivak K., Rudenko L. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying conserved T-cell epitopes of human adenoviruses induce functional cytotoxic T-cell responses and protect mice against both infections. *Vaccines (Basel)*, 2020, vol. 8, no. 2: 196. doi: 10.3390/vaccines8020196
13. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N.J., Donis R.O. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*, 2011, vol. 412, no. 2, pp. 297–305. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.004
14. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma C., Zhao J., Yang C.F., Kemble G., Greenberg H. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*, 2003, vol. 306, no. 1, pp. 18–24. doi: 10.1016/s0042-6822(02)00035-1
15. Klimov A.I., Kiseleva I.V., Desheva J.A., Cox N.J., Alexandrova G.I., Rudenko L.G. Live attenuated reassortant influenza vaccine prepared using A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) donor strain is genetically stable after replication in children 3–6 years of age. *International Congress Series*, 2001, vol. 1219, no. 2001, pp. 951–954. doi: 10.1016/S0531-5131(01)00020-6
16. Klimov A.I., Kiseleva I.V., Alexandrova G.I., Cox N.J. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. *International Congress Series*, 2001, vol. 1219, no. 2001, pp. 955–959. doi: 10.1016/S0531-5131(01)00369-7
17. Kiseleva I. Current opinion in LAIV: a matter of parent virus choice. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 12: 6815. doi: 10.3390/ijms23126815
18. Kurhade C., Xie X., Shi P.Y. Reverse genetic systems of SARS-CoV-2 for antiviral research. *Antiviral Res.*, 2023, vol. 210: 105486. doi: 10.1016/j.antiviral.2022
19. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bis091
20. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, 1938, vol. 27, iss. 3, pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
21. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
22. Smolonogina T.A., Isakova-Sivak I.N., Kotomina T.S., Evsina A.S., Stepanova E.A., Prokopenko P.I., Leontieva G.F., Suvorov A.N., Rudenko L.G. Generation of a vaccine against group B streptococcal infection on the basis of a cold-adapted influenza A virus. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, 2019, vol. 34, pp. 25–34. doi:10.3103/S0891416819010087
23. Wareing M.D., Marsh G.A., Tannock G.A. Preparation and characterization of attenuated cold-adapted influenza A reassortants derived from the A/Leningrad/134/17/57 donor strain. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 16, pp. 2082–2090. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00056-7
24. WHO. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza 12–13 June 2007. URL: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_120707/en/index.html (18.10.2023)
25. Wong S.S., Webby R.J. Traditional and new influenza vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 3, pp. 476–492. doi: 10.1128/CMR.00097-12

Авторы:

Ларионова Н.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Киселева И.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Баженова Е.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Степанова Е.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Руденко Л.Г., д.б.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородиной ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Larionova N.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Kiseleva I.V., DSc (Biology), Professor, Head of Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Bazhenova E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Stepanova E.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rudenko L.G., DSc (Biology), Professor, Head of the A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.11.2023
 Принята к печати 05.12.2023

Received 05.11.2023
 Accepted 05.12.2023