

**АУТЕНТИЧНАЯ ЖИВАЯ ГРИППОЗНАЯ КУЛЬТУРАЛЬНАЯ
ВАКЦИНА И ЕЕ ИМИТАЦИИ**

Киселева И. В. ¹,

Ларионова Н. В. ¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург,
Россия.

THE AUTHENTIC LIVE INFLUENZA CELL-BASED VACCINE AND ITS IMITATIONS

Kiseleva I. V.^a,

Larionova N. V.^a

^a Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia.

Резюме

Проблема перевода производства гриппозных вакцин с развивающихся куриных эмбрионов в культуру клеток млекопитающих обсуждается на протяжении уже многих лет. Разрабатываемые технологии производства культуральных вакцин базируются на двух перспективных субстратах – перевиваемых клеточных линиях Vero и MDCK, которые эффективно поддерживают репродукцию вирусов гриппа различных подтипов. В 2018 году Всемирная организация здравоохранения сделала первые рекомендации по составу гриппозных вакцин, подготовленных в культуре клеток млекопитающих. С этого момента Всемирная организация здравоохранения дает рекомендации на предстоящий эпидемический сезон отдельно для «яичных» и культуральных вакцин. Культуральная гриппозная вакцина имеет ряд неоспоримых преимуществ. К ним можно отнести возможность массовой наработки препарата, что особенно важно при наступлении пандемической ситуации, а также отсутствие в вакцине такого аллергизирующего фактора, как яичный белок. Полагают также, что традиционно производимые в развивающихся куриных эмбрионах гриппозные вакцины из-за приобретенных адаптационных «яичных» мутаций могут быть менее эффективными, чем вакцины, подготовленные на основе клеточных культур. Все вышесказанное свидетельствует в пользу того, что разработка адекватных клеточных систем, высокочувствительных к современным циркулирующим штаммам вируса гриппа и способных обеспечить накопление больших количеств вирусной биомассы, представляет значительный практический интерес. Если сравнивать между собой две традиционные гриппозные вакцины, инактивированную и живую, последняя имеет ряд преимуществ, таких, как неинъекционный путь введения, более широкий спектр защиты, высокая урожайность, низкая себестоимость, простота производственного процесса и пр. Если сюда добавить новый – клеточный – субстрат для производства и накопления вирусной биомассы, то вырисовывается перспектива разработки практически лишенного недостатков вакцинного

препарата. Несмотря на очевидные преимущества культуры клеток в качестве субстрата для производства гриппозных вакцин, некоторые гриппозные вакцины, и среди них живая гриппозная вакцина, продолжают производить в развивающихся куриных эмбрионах. Поэтому нам представилось целесообразным собрать доступную научную литературу о разработке подходов к созданию живой гриппозной холодоадаптированной культуральной вакцины.

Ключевые слова: гриппозные вакцины; живая гриппозная вакцина; реассортанты; субстраты; развивающиеся куриные эмбрионы, культура клеток.

Abstract

The problem of transferring the technology of influenza vaccine production from developing chicken embryos to mammalian cell culture has been discussed for many years. The technologies being developed for the production of cell-based vaccines rely on two promising substrates – continuous Vero and MDCK cell lines, which effectively support the replication of influenza viruses of various subtypes. In 2018, the WHO issued the first recommendations on the composition of influenza vaccines produced in mammalian cell culture. Since then, the WHO has issued separate recommendations for egg-based and cell-based vaccines for the upcoming epidemic season. The cell-based influenza vaccine has a number of undeniable advantages: the possibility of mass production of the vaccine preparation, which is particularly important during a pandemic, and the lack of an allergenic factor such as egg white in the vaccine. It is also believed that conventional egg-based influenza vaccines may be less effective than cell-based vaccines due to acquired adaptive “egg” mutations. All of the above suggests that the development of appropriate cellular systems highly sensitive to currently circulating influenza virus strains and capable of ensuring the accumulation of large amounts of viral biomass is of considerable practical interest. If we compare two conventional influenza vaccines, inactivated and live, the latter has a number of advantages, such as a non-injection route of administration, a broader spectrum of protection, high yield, low cost, simplicity of the production process, etc. If we add to this a new – cellular – substrate for the production and accumulation of viral biomass, we have the prospect of developing a vaccine preparation with virtually no drawbacks. Despite the obvious advantages of cell culture as a substrate for influenza vaccine production, some influenza vaccines, including live attenuated cold-adapted influenza vaccine, are still produced in the developing chicken embryos. Therefore, we considered it appropriate to collect the available scientific literature on the development of approaches for the production of a live influenza cold-adapted cell-based vaccine.

Keywords: influenza vaccines; live influenza vaccine; reassortants; substrates; developing chicken embryos, cell culture.

1 Введение

С того времени, как было установлено, что развивающиеся куриные эмбрионы могут полноценно заменить чувствительных животных для выделения и накопления вирусов гриппа, гриппозные вакцины, как инаktivированные, так и живые, начали производить в развивающихся куриных эмбрионах. Однако на протяжении уже целого ряда лет активно обсуждается проблема перевода производства гриппозных вакцин на другой субстрат – в культуру клеток. Интерес к этому направлению не иссякает.

Разработка технологий производства культуральных гриппозных вакцин ведется давно, но только в 2000-х годах они получили признание и распространение [11, 18, 20, 27, 28, 30, 41, 42]. Наиболее перспективными субстратами для производства культуральных гриппозных вакцин считаются перевиваемые клеточные линии обезьяньего (Vero) и собачьего (MDCK) происхождения, которые поддерживают эффективную репродукцию вирусов гриппа различных подтипов. До 2018 года единственным одобренным ВОЗ субстратом для производства гриппозных вакцин были куриные эмбрионы. В сентябре 2018 года были сделаны первые рекомендации ВОЗ по составу гриппозных вакцин, подготовленных в культуре клеток [47], но еще в ноябре 2012 года FDA (США) одобрила применение первой культуральной субъединичной инаktivированной вакцины Flucelvaх против сезонного гриппа, приготовленной в клетках MDCK, для лиц старше 18 лет [17]. В настоящее время Flucelvaх применяют для лиц старше 6 месяцев [15]. Три культуральных живых гриппозных вакцины (ЖГВ) прошли первую фазу клинических испытаний: (1) сезонная культуральная вакцина на линии Vero [38]; все этапы приготовления вакцины были сделаны исключительно в клетках Vero, включая выделение эпидемических вирусов и создание нового донора аттенуации; хотя вакцина зарекомендовала себя как хорошо переносимая и иммуногенная, ее дальнейшие исследования были приостановлены; (2) сезонная ЖГВ, полностью подготовленная в

суспензионной культуре клеток MDCK [21] и (3) пандемическая H5N1 ЖГВ на клетках линии Vero [33, 44].

В 2011 году были опубликованы результаты совместной разработки новосибирского ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ИЭМа по созданию живой культуральной MDCK-вакцины «Вектор-Флю» против пандемического гриппа 2009 года на основе вакцинного штамма, разработанного в отделе вирусологии ИЭМа [2]. Результатом этого сотрудничества стал патент на способ получения сезонной и пандемической культуральной ЖГВ [4]. Предложенный способ включает культивирование вакцинного вируса в ферментерах в клетках MDCK в бессывороточной среде SFM4MegaVir на микроносителях. В качестве прототипа использован американский патент на способ получения микрокапсулированной формы ЖГВ для интраназального применения, включающий культивирование вакцинного штамма вируса гриппа на культуре клеток MDCK в бессывороточной питательной среде и получение микрокапсул [10].

Несмотря на очевидные преимущества культуры клеток в качестве субстрата для производства гриппозных вакцин, некоторые гриппозные вакцины, и среди них ЖГВ, традиционно продолжают производить в развивающихся куриных эмбрионах. Поэтому нам представилось целесообразным собрать доступную научную литературу о разработке подходов к созданию живой гриппозной холодоадаптированной (ХА) культуральной вакцины.

ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ РАЗРАБОТКИ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ВАКЦИН

По признанию ВОЗ, в случае наступления пандемической по гриппу ситуации живые гриппозные вакцины (ЖГВ) находятся на передней линии борьбы с инфекцией, поскольку обладают целым рядом неоспоримых преимуществ перед инаktivированными вакцинами, в числе которых следует указать неинъекционный путь введения, более широкий спектр защиты,

60 высокую урожайность, низкую себестоимость, простоту производственного
61 процесса и др. [46]. В настоящее время производство ЖГВ основано на
62 экономически неоправданном использовании развивающихся куриных
63 эмбрионов в качестве сырья для выделения и последующего выращивания
64 вируса. Это достаточно трудоемкий процесс, поскольку каждый эмбрион
65 должен быть простерилизован, заражен вирусом и инкубирован перед сбором
66 вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Большинство инаktivированных
67 гриппозных вакцин также готовится в куриных эмбрионах. При этом для
68 одной дозы инаktivированной вакцины требуется как минимум 1–2 куриных
69 эмбриона. Из такого же количества куриных эмбрионов (1–2) можно
70 изготовить 10–15 доз живой вакцины [31]. Это в 10 раз меньше, но тоже
71 достаточно много. Для сезонного производства вакцин ежегодно требуются
72 миллионы куриных эмбрионов, а в случае возникновения пандемии их число
73 будет увеличиваться в геометрической прогрессии.

74 Отсюда следует, что разработка адекватных культуральных клеточных
75 систем, достаточно чувствительных к циркулирующим штаммам вируса
76 гриппа и способных обеспечить накопление больших количеств вирусной
77 биомассы, представляет значительный практический интерес.

78 Еще в 1990–х годах были показаны преимущества для производства
79 гриппозных вакцин вирусов, выделенных в культуре клеток, по сравнению с
80 вирусами, выделенными в куриных эмбрионах. Было высказано предложение
81 производителям, изучающим перспективы использования клеточных культур
82 для производства вакцин, свести к минимуму уровни «яичных» пассажей
83 вируса, выделенного в клетках, и по возможности избегать замены
84 «культурального» вируса на его «яичный» вариант, поскольку они могут
85 отличаться по антигенным свойствам [37].

86 Живая гриппозная вакцина стимулирует более широкий защитный
87 эффект по сравнению с инаktivированной вакциной, приготовленной против
88 того же штамма [16, 26, 29, 39]. Но даже инаktivированные вакцины,
89 подготовленные на основе выделенных в клетках млекопитающих вирусов

90 гриппа, стимулировали формирование большего количества перекрестно–
91 реагирующих сывороточных антител и защищают экспериментальных
92 животных от гриппозной инфекции лучше, чем вакцины, изготовленные из
93 вирусов, выделенных и накопленных в куриных эмбрионах [9, 24].

94 Разработчики вакцинных штаммов для отечественной ЖГВ начали
95 активно заниматься проблемой перевода подготовки живой гриппозной
96 вакцины на более выгодное и экономичное сырье – культуру клеток. Была
97 продемонстрирована принципиальная возможность использования культуры
98 клеток MDCK как альтернативного развивающимся куриным эмбрионам
99 субстрата для основных этапов подготовки и культивирования вакцинных
100 штаммов ЖГВ. Было установлено, что вакцинные штаммы отечественной
101 ЖГВ обладают уникальным свойством природной адаптации к культурам
102 клеток. Инфекционная активность вакцинных штаммов ЖГВ в
103 развивающихся куриных эмбрионах соответствовала таковой в культуре
104 клеток [1, 22, 25]. Поэтому для перевода подготовки ЖГВ в культуру клеток
105 не требовалось дополнительного пассирования вакцинных штаммов с целью
106 их адаптации к самым распространенным для производства гриппозных
107 вакцин культурам – Vero и MDCK [1, 25, 48, 49], хотя позднее такие попытки
108 были предприняты.

109 В первой половине 2000–х годов целый ряд ведущих зарубежных
110 производителей гриппозных вакцин, таких, как MedImmune [3], Novartis [43],
111 Baxter [6], GSK Vaccines GmbH [19], Flugen Ink [12], Shering–Plou Ltd [7] и др.
112 запатентовали методы накопления в культурах клеток вирусной биомассы для
113 ее последующего использования (в том числе – на территории России) в
114 качестве основы противовирусных вакцин. Эти методы обеспечивают высоко
115 воспроизводимые, эффективные и масштабируемые процессы получения
116 больших количеств вируса (в частности, вируса гриппа) или вирусного
117 антигена в биореакторах с перевиваемыми клеточными линиями для
118 профилактического, диагностического, иммунотерапевтического или

терапевтического применения. Все они с разными вариациями включают следующие основные моменты:

(1). Использование адгезионных клеток млекопитающих (MDCK или Vero), депонированных в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC).

(2). Применение бессывороточных сред, не требующих замены в биореакторах.

(3). Использование биореакторов с микроносителями или суспензионных культур, культивируемых без микроносителей.

По сравнению с технологией производства гриппозных вакцин в куриных эмбрионах, время производства культуральных вакцин и риск контаминации во время производственного процесса ниже, культуральные вакцины безопасны для людей с аллергией на яичный белок, а их производство возможно без использования животных компонентов. Кроме того, пассирование вируса в куриных эмбрионах может вызвать (и вызывает) появление адаптационных мутаций. Культуральная вакцина лишена этих недостатков. В обозримом будущем вакцины на основе клеточных культур могут заменить обычный трудоемкий способ производства «яичных» вакцин, в том числе и с использованием генно-инженерных технологий.

Aldreán с соавт. [8], проанализировав опубликованные в 2010–2020 гг. результаты восьми клинических исследований, пришли к выводу, что на сегодняшний день нет достаточных доказательств того, что с точки зрения эффективности инаktivированные культуральные вакцины превосходят вакцины, произведенные в развивающихся куриных эмбрионах. Однако ряд других исследователей, в том числе и те, чьи работы Aldreán с соавт. [8] включили в свое аналитическое исследование [13, 23], анонсируют преимущества культуральных вакцин.

ПРОЦЕСС ПОДГОТОВКИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ

Если ряд производителей инаktivированных гриппозных вакцин уже перешел на культуру клеток в качестве субстрата, то живая гриппозная

вакцина по-прежнему производится с использованием развивающихся куриных эмбрионов. В данном разделе обобщены исследования, посвященные разработке подходов к созданию живой гриппозной ХА культуральной вакцины.

Вкратце метод классической реассортации представляет собой скрещивание актуального «дикого» вируса с ХА донором аттенуации, за которым следует ряд селективных пассажей и клонирований, после которых отбираются реассортанты для ЖГВ с вакцинной формулой генома 6:2 [40, 45].

Возможны шесть основных вариантов подготовки штаммов ЖГВ методом классической реассортации (рис. 1), в которых варьируют субстраты для (а) выделения исходных изолятов, (б) непосредственно для процедуры реассортации и (в) для финальных этапов подготовки серий вакцинного препарата из вакцинного штамма (получение промежуточного продукта и готового лекарственного препарата).

Разработку культуральных вакцин можно вести в двух основных направлениях: когда все этапы приготовления вакцины производятся в клетках (вариант №6), или только некоторые (как правило – первые) этапы подготовки вакцины проводятся в куриных эмбрионах, а заключительные этапы выполняются в клетках (варианты №№2–5). Во втором случае конечный продукт трудно назвать культуральной вакциной, в лучшем случае это – имитация настоящей культуральной вакцины (ее комбинированная, или промежуточная, форма). Тут важен еще один существенный момент – какой «дикий» вирус используется для скрещивания – выделенный в культуре клеток или в куриных эмбрионах. Если вирус «яичный» (варианты №№2–5), то практически уже не имеет значения, в какой системе далее готовится реассортант – ключевые «яичные» мутации уже изначально будут присутствовать в вирусе.

ВАРИАНТ №1. «Дикий» родительский вирус выделен от больного в развивающихся эмбрионах и ХА донор аттенуации подготовлен в развивающихся эмбрионах. Все этапы реассортации проведены в

развивающихся эмбрионах. Конечный продукт – вакцинный препарат – накапливается из вакцинного штамма в развивающихся эмбрионах. Это – классическая «яичная» вакцина. Методика подготовки реассортантных штаммов для ЖГВ отработана в течение десятилетий и как правило позволяет регулярно получать кандидатные сезонные вакцины с формулой генома 6:2 [40, 45].

ВАРИАНТ №2. «Дикий» родительский вирус выделен от больного в развивающихся эмбрионах и ХА донор аттенуации подготовлен в развивающихся эмбрионах. Все этапы реассортации проведены в развивающихся эмбрионах. Конечный продукт – вакцинный препарат – накапливается из вакцинного штамма в культуре клеток [5, 34, 35].

Поскольку подготовленные в куриных эмбрионах вакцинные штаммы хорошо репродуцируются в клеточной культуре без дополнительной к ней адаптации [22, 25, 35, 49], это свойство может быть использовано на производстве для приготовления партий культуральных вакцин. Так, вакцинные штаммы как отечественной экспериментальной живой пандемической вакцины «Вектор–Флю» [5, 34, 35], так и американской инактивированной сезонной вакцины Flucelvax [32], первоначально готовятся или выращиваются в куриных эмбрионах, и только на последних этапах производственного цикла накапливаются в культуре клеток [14, 32, 34, 35]. По сути, это имитация истинной культуральной вакцины. Такой подход имеет один серьезный недостаток – вакцинные вирусы, подготовленные в куриных эмбрионах, содержат адаптированные к репродукции в куриных эмбрионах мутации, которые могут повлиять на антигенные свойства вакцинного вируса.

ВАРИАНТ №3. «Дикий» родительский вирус выделен от больного в развивающихся эмбрионах и ХА донор аттенуации подготовлен в развивающихся эмбрионах. Все этапы реассортации проведены в культуре клеток [1, 36]. Конечный продукт – вакцинный препарат – накапливается из вакцинного штамма в культуре клеток. Это – комбинированная «культурально–яичная» форма вакцинного препарата.

К сожалению, отработанная годами стандартная схема реассортации, позволяющая эффективно получать в системе куриных эмбрионов реассортанты с вакцинной формулой генома 6:2, оказалась малоэффективна при получении вакцинных штаммов в культуре клеток MDCK [1]. При переводе процесса реассортации в другую систему – с куриных эмбрионов в культуру клеток MDCK процент выхода реассортантов с желаемой формулой генома 6:2 резко снижается, иногда до нуля. Так, в куриных эмбрионах частота получения реассортантов с вакцинной формулой генома составляла 44% и 67% соответственно для вирусов гриппа А и В. При скрещивании в культуре клеток MDCK вакцинные реассортанты типа А получали только в 5,7% случаев, а вакцинные штаммы типа В не удалось получить вообще [1].

ВАРИАНТ №4. «Дикий» родительский вирус выделен от больного в развивающихся эмбрионах, а ХА донор аттенуации был выделен и подготовлен в развивающихся эмбрионах или исходно выделен в них, но затем прошел ряд пассажей в культуре клеток для дополнительной адаптации. Все этапы реассортации «дикого» вируса с адаптированным к клеткам донором аттенуации проведены в культуре клеток. Конечный продукт – вакцинный препарат – накапливается из вакцинного штамма в культуре клеток [21, 38]. Такой вариант является комбинированной «культурально-яичной» формой вакцинного препарата.

Было показано, что после 8 пассажей ХА доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 в культуре клеток MDCK в генах, кодирующих внутренние белки и нейраминидазу, не было выявлено никаких изменений. В гемагглютанине донора А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) появились две новые аминокислотные замены – Met-240-Ile и Thr-329-Ala, а в гемагглютанине донора В/СССР/60/69 – замены Asp-221-Glu и His-237-Tyr. При этом инфекционная активность в культуре клеток у непассированных доноров аттенуации и их пассажных «культуральных» вариантов существенно не отличалась, но у пассажных вариантов на 3–4 lg ЭИД₅₀/мл снизились титры, определяемые в развивающихся куриных эмбрионах. Пассирование доноров в

культуре клеток не привело к повышению % выхода реассортантных штаммов с вакцинной формулой генома. При скрещивании в культуре клеток MDCK «диких» вирусов с пассированными донорами вакцинные реассортанты типа А получали в 2–3% случаев, а вакцинные штаммы типа В получить не удалось (И.В. Киселева. Личное сообщение). Все это говорит о том, что по эффективности (весьма низкой) реассортации третий и четвертый варианты практически не отличаются между собой, и нет никакой необходимости в дополнительной адаптации к культуре клеток доноров аттенуации отечественной лицензированной «яичной» ЖГВ.

Такой проблемы с получением 6:2 реассортантов не было отмечено в работе [38], где в качестве клеточного субстрата использовали другую перевиваемую линию клеток – Vero. В культуре клеток Vero был создан ХА донор для культуральной живой гриппозной вакцины A/Singapore/1/57ca (H2N2), а сам «дикий» вирус A/Singapore/1/57 (H2N2), использованный для пассирования в клетках при пониженной температуре для получения ХА донора, был изолирован в развивающихся куриных эмбрионах. Однако позднее новой информации об этой культуральной ЖГВ в доступной научной литературе не появлялось.

ВАРИАНТ №5. «Дикий» родительский вирус выделен от больного в культуре клеток, а ХА донор аттенуации подготовлен в развивающихся эмбрионах. Реассортация проводится в культуре клеток. Конечный продукт – вакцинный препарат – накапливается из вакцинного штамма в культуре клеток [36].

Было проведено сравнительное изучение защитной эффективности ЖГВ, подготовленной в культуре клеток MDCK на основе выделенного в культуре клеток MDCK вируса A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (вариант №5) с вариантом №1, где в качестве «дикого» родителя был взят тот же вирус A/New Caledonia/20/99 (H1N1), но выделенный в куриных эмбрионах (мазок от одного больного был помещен параллельно в два субстрата – куриные эмбрионы и клетки MDCK) [36]. Исследования подтвердили сопоставимые

уровни защиты хорьков, вакцинированных полностью «яичной» или культуральной вакциной, от инфекции, вызванной вирусом гриппа «дикого» типа.

ВАРИАНТ №6. «Дикий» родительский вирус выделен от больного в культуре клеток и ХА донор аттенуации подготовлен в культуре клеток. Все этапы реассортации проведены в культуре клеток. Конечный продукт – вакцинный препарат – накапливается из вакцинного штамма в культуре клеток. Таким образом, весь процесс разработки вакцины, начиная от выделения вируса «дикого» типа, осуществляется в культуре ткани. В этом случае вакцинный штамм будет свободен от адаптационных «яичных» мутаций. Использование культуры ткани в качестве субстрата может сделать производство вакцины против гриппа независимым от глобальной поставки яиц и позволит легко наращивать производственный процесс.

Это аутентичная живая гриппозная культуральная вакцина, которую пока не удалось создать.

2 Заключение

Можно полагать, что для ХА донора внутренних генов не так важно иметь «культуральные» мутации, поскольку они возникают в гемагглютанине, который в процессе реассортации заменяется на гемагглютинин «дикого» родителя. Таким образом, вариант №5, в котором для подготовки реассортантных вакцинных штаммов классическим методом в качестве источника внутренних генов используется «яичный» донор аттенуации, является весьма перспективным. Если же учитывать, какой низкий выход реассортантов с вакцинной формулой генома получается при классическом скрещивании «дикого» вируса с ХА донором аттенуации в культуре клеток, то в этом случае необходима разработка принципиально новых методических приемов. В частности, проблемы с трудностями реассортации могут быть решены с помощью методов обратной генетики. Обратно-генетический подход позволяет собирать в культуре клеток высоко репродуктивные

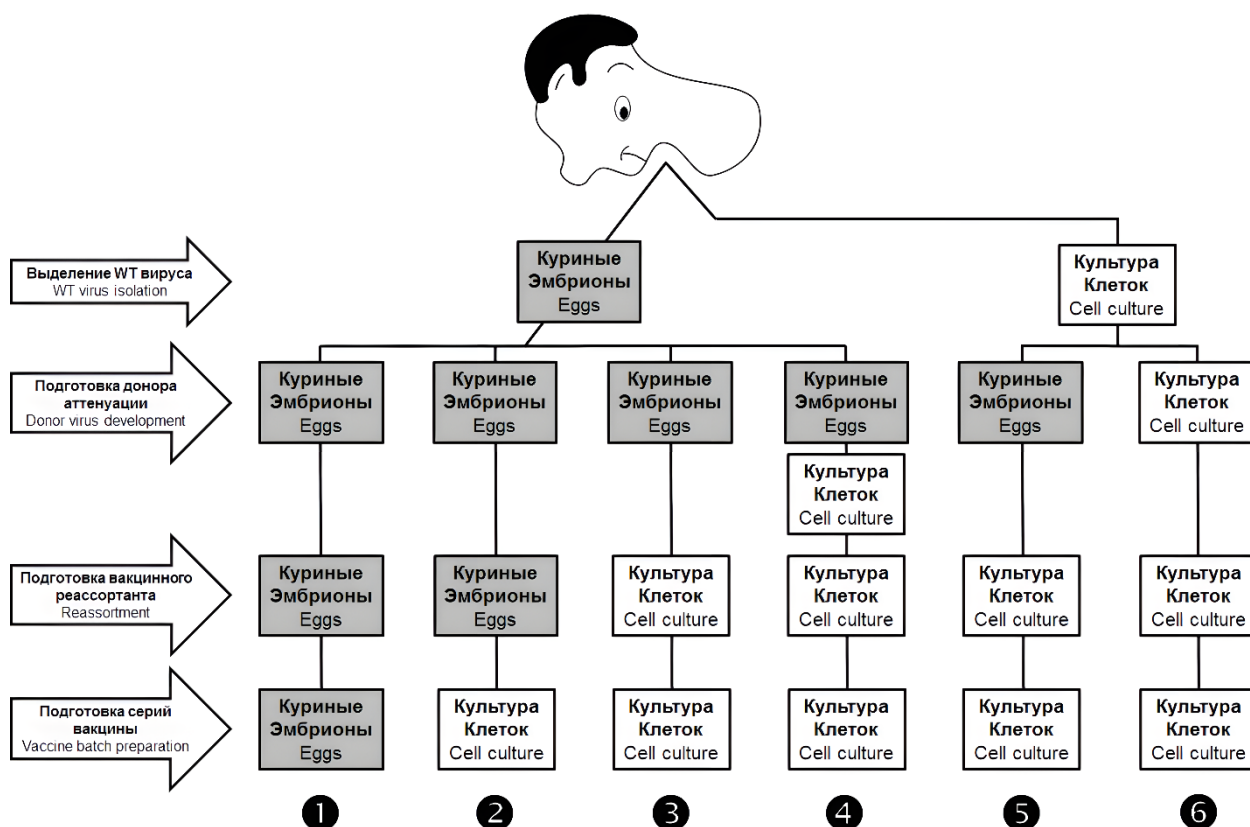
298 вакцинные штаммы заданной формулы генома 6:2, не содержащие
299 нежелательные мутации.

300 **Финансирование.** Работа подготовлена в рамках государственного
301 задания ФГБНУ «ИЭМ» FGWG–2025–0015.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Шесть возможных вариантов подготовки живой гриппозной холодоадаптированной реассортантной вакцины методом классической реассортации в зависимости от используемого субстрата.

Figure 1. Six possible options for producing a live, cold-adapted reassortant influenza vaccine using the classical reassortment method, depending on the substrate used.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Киселева И.В., доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

адрес: ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт–Петербург, Россия;

факс: +7(812)2346868;

телефоны: +7(812)2346860, +7(911)2247462;

e-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru.

Irina V. Kiseleva, Ph.D., D.Sci., Professor, Head of the Laboratory, Institute of Experimental Medicine;

address: 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia;

fax: +7(812)2346868;

telephones: +7(812)2346860, +7(911)2247462;

e-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru.

Блок 2. Информация об авторах

Ларионова Н.В., доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия.

Тел.: +7(921)3328061

E-mail: nvlarionova@mail.ru

Natalie V. Larionova, Ph.D., D.Sci., Leading Research Associate, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia.

Phone: +7(921)3328061.

E-mail: nvlarionova@mail.ru

Блок 3. Метаданные статьи

АУТЕНТИЧНАЯ ЖИВАЯ ГРИППОЗНАЯ КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ВАКЦИНА И
ЕЕ ИМИТАЦИИ

THE AUTHENTIC LIVE INFLUENZA CELL-BASED VACCINE AND ITS
IMITATIONS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ГРИППОЗНЫЕ ВАКЦИНЫ
CELL-BASED FLU VACCINES

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина; реассортанты; субстраты;
развивающиеся куриные эмбрионы, культура клеток.

Keywords: live influenza vaccine; reassortants; substrates; developing chicken
embryos, cell culture.

Обзоры.

Количество страниц текста – 11,

количество таблиц – 0,

количество рисунков – 1.

18.04.2025.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или DOI
1.	Киселева И.В., Исакова И.Н., Ларионова Н.В., Олейник Е.С., Руденко Л.Г. Эффективность получения реассортантов между эпидемическими и холодоадаптированными вирусами гриппа в развивающихся куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK // ЖМЭИ. 2007. № 6. С. 40–45.	[Kiseleva I.V., Isakova I.N., Larionova N.V., Oleĭnik E.S., Rudenko L.G. Efficacy of production of reassortant of epidemic strains and cold-adapted influenza viruses in chicken embryo and MDCK cells. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 2007, 6:40-45. (in Russ.)]	PMID: 18283733
2.	Ларионова Н.В., Киселева И.В., Александрова Г.И., Руденко Л.Г. Штамм вируса гриппа	[A/17/California/2009/38 (H1N1) influenza virus strain for	https://www1.fips.ru/registers-doc-

	А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей. Патент РФ №2315101 от 16.09.2009. Оpubл. БИ 2011. №7.	the production of live influenza intranasal vaccine for adults and children. Patent of the Russian Federation No. 2315101. Published 2011 in Invention Bulletin no. 7. Effective date for property rights 16.09.2009 (in Russ.)]	view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2413765&TypeFile=html
3.	Лю Д., Томпсон М., Маранга Л.Ж., Катаниаг Ф., Сюй С.С. Способы культивирования клеток, размножения и очистки вирусов. Патент РФ №2547587 от 24.09.2009. Оpubл. БИ 2015, № 10	[Lu D.L., Tompson M., Maranga L.Zh., Kataniag F., Xu S.S. Methods for cell culture, virus replication and purification. Patent of the Russian Federation No. 2547587. Published in Invention Bulletin, 2015, no 10. Effective date for property rights 24.09.2009 (in Russ.)]	https://patentimages.storage.googleapis.com/a7/89/86/417cb8e9b1cce6/RU2547587C2.pdf

4.	Нечаева Е.А., Сенькина Т.А., Радаева И.Ф., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Жилина Н.В., Думченко Н.Б., Руденко Л.Г., Киселева И.В., Исакова–Сивак И.Н. Способ получения микрокапсулированной формы живой культуральной вакцины против сезонного и пандемического гриппа для интраназального применения. Патент №2617051 от 04.05.2016. Оpubл. БИ 2017, №11.	[Nechaeva E.A., Senkina T.A., Radaeva I.F., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Zhilina N.V., Dumchenko N.B., Rudenko L.G., Kiseleva I.V., Isakova–Sivak I.N. Method for obtaining a microencapsulated form of a live culture vaccine against seasonal and pandemic influenza for intranasal use. Patent of the Russian Federation No. 2617051. Published in Invention Bulletin, 2017, no. 11. Effective date for property rights 04.05.2016. (in Russ.)]	https://www1.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/617/051/%D0%98%D0%97-02617051-00001/document.pdf
5.	Нечаева Е.А., Радаева И.Ф., Сенькина Т.Ю., Герасименко Н.Б., Богрянцева М.П., Костылева Р.Н., Жилина Н.В., Свириденко Н.М., Зубарева	[Nechaeva E.A., Radaeva I.F., Sen'kina T.Yu., B gerasimenko N., Bogryantseva M.P.,	https://elibrary.ru/download/elibrary_23515897_84010445.pdf

	К.Э., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Киселева И.В., Ларионова Н.В., Руденко Л.Г. Разработка опытно–промышленной технологии производства живой культуральной вакцины против пандемического гриппа. Биотехнология. 2013. № 6. С. 23–34.	Kostyleva R.N., Zhilina N.V., Sviridenko T.M., Zubareva K.E., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Kiseleva I.V., Larionova N.V., Rudenko L.G. Development of pilot technology for cell-based anti-influenza live attenuated pandemic vaccine manufacturing. Biotechnology in Russia. 2013, no. 6, pp. 23–34. (in Russ.)]	
6.	Райтер М., Мундт В. Способ крупномасштабного производства вирусного антигена. Патент РФ №2314344 от 10.12.2002. Оpubл. БИ 10.01.2008, № 1.	[Rajter M., Mundt V. Method for large-scale production of viral antigen. Patent of the Russian Federation No. 2314344 dated 10.12.2002. Published in Invention Bulletin, 2008, No 1.	https://patentimages.storage.googleapis.com/df/59/44/4a5e02cfd5dd6/RU2314344C2.pdf

		Effective date for property rights 10.12.2002. (in Russ.)]	
7.	Уесмоен Т.Л., Гао П., Эдди Б.А., Абдельмагид О.Ю. Способ репликации вируса гриппа в культуре. Патент РФ №2491339 от 14.12.2007. Оpubл. БИ 20.01.2011, № 2.	[Uesmoen T.L., Gao P., Ehddi B.A., Abdel'magid O.J. Method of replication of influenza virus in culture. Patent of the Russian Federation No. 2491339 dated 14.12.2007. Published in Invention Bulletin, 2011, No 2. Effective date for property rights 14.12.2007. (in Russ.)]	https://patentimages.storage.googleapis.com/ba/39/39/2895a7916bb5b8/RU2491339C2.pdf
8.	Aldeán Á.J., Salamanca I., Ocaña D., Barranco J.L., Walter S. Effectiveness of cell culture-based influenza vaccines compared with egg-based vaccines: What does the literature say? Rev. Esp. Quimioter., 2022, vol. 35, no. 3, pp. 241–248.	–	DOI: 10.37201/req/117.2021
9.	Alymova I.V., Kodihalli S., Govorkova E.A., Fanget B., Gerdil C., Webster R.G. Immunogenicity	–	DOI: 10.1128/JVI.72.5.4472-4477.1998

	and protective efficacy in mice of influenza B virus vaccines grown in mammalian cells or embryonated chicken eggs. J. Virol., 1998, vol. 72, no. 5, pp. 4472–4477.		
10.	Andrianov, A. K., Chen, J. Preparation of ionically cross-linked polyphosphazene microspheres by coacervation. US Patent No. 5807757. Effective date for property rights 02.07.1996. Published 15.09.1998.	–	https://patentimages.storage.googleapis.com/07/3b/a5/8f03b042ac2cab/US5807757.pdf
11.	Audsley J.M., Tannock G.A. Cell-based influenza vaccines: progress to date. Drugs, 2008, vol. 68, no. 11, pp. 1483–1491.	–	DOI: 10.2165/00003495-200868110-00002
12.	Bilsel P., Kawaoka Y. Cell-based systems for producing influenza vaccines. International Patent No. 2351300. Effective date for property rights 11.06.2008. Published 09.06.2009.	–	https://patentimages.storage.googleapis.com/37/4f/9e/fb6b8b9029071a/WO2009152181A1.pdf
13.	Boikos C., Sylvester G.C., Sampalis, J.S., Mansi J.A. Relative Effectiveness of the Cell-Cultured	–	DOI: 10.1093/cid/ciaa371

	Quadrivalent Influenza Vaccine Compared to Standard, Egg-derived Quadrivalent Influenza Vaccines in Preventing Influenza-like Illness in 2017–2018. Clin. Infect. Dis., 2020, vol. 68, no. 11, pp. e665–e671.		
14.	CDC. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. United States, 2013–2014. MMWR Recomm. Rep., 2013, 62, pp. 1–43.	–	PMID: 24048214
15.	CDC. 2025. Cell-based flu vaccines. [Online].	–	https://www.cdc.gov/flu/vaccine-types/cell-based.html
16.	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

17.	FDA. 20 November 2012. Approval Letter – Flucelvax. [Online].	–	https://web.archive.org/web/20160310193425/http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm328684.htm
18.	Feng S.Z., Jiao P.R., Qi W.B., Fan H.Y., Liao M. Development and strategies of cell–culture technology for influenza vaccine. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, vol. 89, no. 4, pp. 893–902.	–	DOI: 10.1007/s00253-010-2973-9
19.	Frech C., Lubben H., Vorlop J., Gregersen J–P. Procedure for the industrial-scale preparation of vaccines. European Patent No. 2351300. Effective date for property rights 12.09.2001. Published 02.02.2011.	–	https://patentimages.storage.googleapis.com/d8/48/2d/ddb1caaa817bcb/ES2351300T3.pdf
20.	Genzel Y., Dietzsch C., Rapp E., Schwarzer J, Reichl U. MDCK and Vero cells for influenza virus vaccine production: a one–to–one comparison up to	–	DOI: 10.1007/s00253-010-2742-9

	lab-scale bioreactor cultivation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010, vol. 88, no. 2, pp. 461–475.		
21.	Heldens J., Hulskotte E., Voeten T., Breedveld B., Verweij P., Van Duijnhoven W., Rudenko L., Van Damme P., Van Den Bosch H. Safety and immunogenicity in man of a cell culture derived trivalent live attenuated seasonal influenza vaccine: a Phase I dose escalating study in healthy volunteers. Vaccine, 2014, vol. 32, no. 39, pp. 5118–5124.	–	DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.05.030
22.	Hussain A. I., Cordeiro M., Sevilla E., Liu J. Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: in vitro cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells. Vaccine, 2010, vol. 28, no. 22, pp. 3848–3855.	–	DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.03.005

23.	Izurieta H.S., Chillarige Y., Kelman J., Wei Y., Lu Y., Xu W., Lu M., Pratt D., Chu S., Wernecke M., Macurdy T., Forshee R. Relative Effectiveness of Cell-Cultured and Egg-Based Influenza Vaccines Among Elderly Persons in the United States, 2017–2018. J. Infect. Dis., 2019, vol. 220, no. 8, pp. 1255–1264.	–	DOI: 10.1093/infdis/jiy716
24.	Katz J.M., Webster R.G. Efficacy of inactivated influenza A virus (H3N2) vaccines grown in mammalian cells or embryonated eggs. J Infect Dis, 1989, vol. 160, no. 2, pp. 191–198.	–	DOI: 10.1093/infdis/160.2.191
25.	Kiseleva I., Su Q., Toner T.J., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rudenko L., Shaw A. R., Youil R. Cell-based assay for the determination of temperature sensitive and cold adapted phenotypes of influenza viruses. J. Virol. Methods, 2004, vol. 116, no. 1, pp. 71–78.	–	DOI: 10.1016/j.jviromet.2003.10.012

26.	Lanthier P.A., Huston G.E., Moquin A., Eaton S.M., Szaba F.M., Kummer L.W., Tighe M.P., Kohlmeier J.E., Blair P.J., Broderick M., Smiley S.T., Haynes L. Live attenuated influenza vaccine (LAIV) impacts innate and adaptive immune responses. <i>Vaccine</i> , 2011, vol. 29, no. 44, pp. 7849–7856.	–	DOI: 10.1128/mbio.01040-13
27.	Lee M.S., Hu A.Y. A cell-based backup to speed up pandemic influenza vaccine production. <i>Trends Microbiol.</i> , 2012, vol. 20, no. 3, pp.103–105.	–	DOI: 10.1016/j.tim.2011.12.002
28.	Liu J., Shi X., Schwartz, R., Kemble, G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. <i>Vaccine</i> , 2009, vol. 27, no. 46, pp. 6460–6463.	–	DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.024
29.	Mahallawi W.H., Zhang Q. Live attenuated influenza vaccine induces broadly cross-reactive mucosal antibody responses to different influenza	–	DOI: 10.1016/j.sjbs.2023.103809

	strains in tonsils. Saudi J. Biol. Sci., 2023, vol. 30, no. 10 , pp. 103809.		
30.	Manini, I., Trombetta, C. M., Lazzeri, G., Pozzi, T., Rossi, S. & Montomoli, E. Egg-independent influenza vaccines and vaccine candidates. Vaccines, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 18.	–	DOI: 10.3390/vaccines5030018
31.	Montomoli E., Khadang B., Piccirella S., Trombetta C., Mennitto E., Manini I., Stanzani V., Lapini G. Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production. Expert Rev. Vaccines, 2012, vol. 11, no. 5, pp. 587–594.	–	DOI: 10.1586/erv.12.24
32.	Moro P.L., Winiecki S., Lewis P., Shimabukuro T.T., Cano M. Surveillance of adverse events after the first trivalent inactivated influenza vaccine produced in mammalian cell culture (Flucelvax®) reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), United States, 2013–2015. Vaccine, 2015, vol. 33, no. 48, pp. 6684–6688.	–	DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.10.084

33.	Morokutti A., Muster T., Ferko B. Intranasal vaccination with a replication-deficient influenza virus induces heterosubtypic neutralising mucosal IgA antibodies in humans. Vaccine, 2014, vol. 32, no. 17, pp. 1897–900.	–	DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.009
34.	Nechaeva E.A., Ryzhikov A.B., Pyankova O.G., Radaeva I.F., Pyankov O.V., Danilchenko N.V., Agafonov A.P., Kiseleva I.V., Larionova N.V., Rudenko L.G. Study of immunogenicity and protective efficacy of live MDCK-derived pandemic influenza vaccine. Glob. J. Infect. Dis. Clin. Res., 2019, vol. 5, no. 1, pp. 010–015.	–	DOI: 10.17352/2455-5363.000023
35.	Nechaeva E.A., Sen'kina T.Y., Ryzhikov A.B., Radaeva I.F., P'yankova O.G., Danil'chenko N. V., Sviridenko T.M., Bogryantzeva M.P., Gilina N.V., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of live cultural	–	DOI: 10.1186/1753-6561-5-S8-P104

	pandemic influenza vaccine Vector-Flu. BMC Proc., 2011, vol. 5, Suppl 8, p.104.		
36.	Palker T., Kiseleva I., Johnston K., Su Q., Toner T., Szymkowiak C., Kwan W. S., Rubin B., Petrukhin L., Wlochoski J. , Monteiro J., Kraiouchkine N., Distefano D., Rudenko L., Shaw A., Youil R. Protective efficacy of intranasal cold-adapted influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) vaccines comprised of egg- or cell culture-derived reassortants. Virus Res., 2004, vol. 105, no. 2, pp. 183–194.	–	DOI: 10.1016/j.virusres.2004.05.009
37.	Robertson J. S., Cook P., Attwell A.M., Williams S.P. Replicative advantage in tissue culture of egg-adapted influenza virus over tissue-culture derived virus: implications for vaccine manufacture. Vaccine, 13, 1995, no. 6, pp. 1583–1588.	–	DOI: 10.1016/0264-410x(95)00085-f
38.	Romanova J., Katinger D., Ferko B., Vcelar B., Sereinig S., Kuznetsov O., Stukova M., Erofeeva	–	DOI: 10.1016/j.

	M., Kiselev O., Katinger H., Egorov A. Live cold-adapted influenza A vaccine produced in Vero cell line. Virus Res., 2004, vol.103, no. 1-2, pp.187–193.		
39.	Sasaki S., Holmes T.H., Albrecht R.A., García-Sastre A., Dekker C.L., He X.S., Greenberg H.B. Distinct cross-reactive B-cell responses to live attenuated and inactivated influenza vaccines. J. Infect. Dis., 2014, vol. 210, no. 6, pp. 865–874.	–	DOI: 10.1093/infdis/jiu190
40.	Shcherbik S., Pearce N., Kiseleva I., Larionova N., Rudenko L., Xu X., Wentworth D. E. Bousse T. Implementation of new approaches for generating conventional reassortants for live attenuated influenza vaccine based on Russian master donor viruses. J. Virol. Methods, 2016, vol. 227, pp. 33–39.	–	DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.10.009
41.	Tapia F., Vazquez-Ramirez D., Genzel Y., Reichl U. Bioreactors for high cell density and continuous	–	DOI: 10.1007/s00253-015-7267-9

	multi-stage cultivations: options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2016, vol. 100, pp. 2121–2132.		
42.	Tree J.A., Richardson C., Fooks A.R., Clegg J.C., Looby D. 2001. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. Vaccine, 19, 3444–3450.	–	DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00053-6
43.	Tsai T.F., Heidi T. Making influenza virus vaccines without using eggs. Patent of the USA No. US 2016/0193321 A1. Effective date for property rights 05.11.2015. Published 07.07.2016.	–	https://patentimages.storage.googleapis.com/d8/48/2d/ddb1caaa817bcb/ES2351300T3.pdf
44.	Wacheck V., Egorov A., Groiss F., Pfeiffer A., Fuereder T., Hoeflmayer D., Kundi M., Popow-Kraupp T., Redlberger-Fritz M., Mueller C. A., Cinatl J., Michaelis M., Geiler J., Bergmann M., Romanova, J., Roethl E., Morokutti A., Wolschek	–	DOI: 10.1086/649428

	M., Ferko B., Seipelt, J., Dick–Gudenus R., Muster T. A novel type of influenza vaccine: Safety and immunogenicity of replication–deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. J. Infect. Dis., 2010, vol. 201, pp. 354–362.		
45.	Wareing M.D., Marsh G.A., Tannock G.A. Preparation and characterisation 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
46.	WHO. 2006. Global action plan to increase vaccine supply for influenza vaccines. [Online].	–	http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.13_eng.pdf
47.	WHO. 2018. 27 September 2018. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season [Online].	–	https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2019-southern-hemisphere-influenza-season

48.	Youil R., Kiseleva I., Kwan W.S., Szymkowiak C., Toner T.J., Su Q., Klimov A., Rudenko L. Shaw A.R. Phenotypic and genetic analyses of the heterogeneous population present in the cold-adapted master donor strain: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). Virus Res., 2004a, vol.102, pp. 165–176.	–	DOI: 10.1016/j.virusres.2004.01.026
49.	Youil R., Su Q., Toner T.J., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rubin B., Petrukhin L., Kiseleva I., Shaw A.R., Distefano D. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. J. Virol. Methods, 2004b, vol. 120, pp. 23–31.	–	DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.03.011