

**ВЛИЯНИЕ ЯИЧНО-АДАПТАЦИОННОЙ ЗАМЕНЫ G141R В
ГЕМАГГЛЮТИНИНЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА В ЛИНИИ В/ВИКТОРИЯ**

Степанова Е. А. ¹,

Баженова Е. А. ¹,

Чистякова А. К. ¹,

Вонг П. Ф. ¹,

Ларионова Н. В. ¹,

Кузьмичева В. В. ¹,

Руденко Л. Г. ¹,

Киселева И. В. ¹

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

**THE EFFECT OF THE G141R EGG-ADAPTIVE SUBSTITUTION ON THE
BIOLOGICAL PROPERTIES OF CURRENTLY CIRCULATING
B/VICTORIA-LINEAGE INFLUENZA B VIRUSES**

Stepanova E. A. ^a,

Bazhenova E. A. ^a,

Chistyakova A. K. ^a,

Wong P. F. ^a,

Larionova N. V. ^a,

Kuzmicheva V. V. ^a,

Rudenko L. G. ^a,

Kiseleva I. V. ^a

^a Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Невзирая на неиссякаемый интерес к гриппу и его возбудителям, значительное число публикаций на эту тему посвящено вирусам гриппа А, а вирусам гриппа В уделяется меньше внимания. Только в одной поисковой системе по биомедицинским исследованиям PubMed о вирусах гриппа В представлено статей в 10 раз меньше, чем о вирусах гриппа А. Тем не менее, несмотря на полное исчезновение вирусов гриппа линии В/Yamagata в постпандемический по COVID-19 период, вирусы линии В/Victoria продолжают циркулировать, представляя собой проблему для здравоохранения. То, что сегодня в человеческой популяции циркулируют только викторианские вирусы гриппа В, дает повод считать, что нужно сосредоточить внимание на свойствах представителей этой линии. Среди доминирующих свойств гемагглютинина (НА) вируса гриппа важное место принадлежит его ответственности за антигенное разнообразие. Достоверно доказано, что мутации в определенных позициях рецептор-связывающего сайта NA1 влияют на антигенную специфичность. Поэтому исследование ключевых аминокислотных позиций, располагающихся в этой области, представляет существенный научный и практический интерес. Это особенно важно на практике, например, при производстве гриппозных вакцин, в технологию изготовления которых включено пассирование вирусов гриппа человека в чувствительном субстрате (как правило – в развивающихся куриных эмбрионах). При пассировании могут возникнуть адаптационные к субстрату замены в области рецептор-связывающего кармана, которые могут привести к нежелательным изменениям антигенных и биологических свойств вакцинного препарата. Изучению возможной роли одной из таких яично-адаптационных замен (G141R) посвящено наше исследование. Было установлено, что пассирование в развивающихся куриных эмбрионах двух современных викторианских вирусов гриппа В, В/Austria/1359417/2021 и В/Catalonia/2279261NS/2023, и вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на

их основе, приводило к появлению в HA1 замены G141R. Эта замена повышала холодоустойчивость вакцинных штаммов ЖГВ, но не влияла на их антигенные свойства, температурочувствительный фенотип и степень термостабильности гемагглютиниона. Представленные в статье данные свидетельствуют о том, что необходимо уделять пристальное внимание появлению мутаций в геноме вакцинных штаммов гриппозных вакцин в процессе их подготовки с контролем за их возможным воздействием на маркерные свойства этих штаммов.

Ключевые слова: вирусы гриппа В; Викторианская линия; мутации в гемагглютинине; адаптация к субстрату; яично–адаптационная замена G141R; антигенные свойства; биологические свойства.

Abstract

Despite the continuing interest in influenza infection and relevant pathogens, a significant number of publications in this field are devoted to influenza A viruses, while influenza B viruses receive less attention. In PubMed database, there are 10 times fewer articles on influenza B vs. influenza A viruses. However, despite the complete disappearance of influenza B/Yamagata lineage viruses in the post-COVID-19 pandemic period, B/Victoria lineage viruses continue to circulate, posing a problem for national health. The fact that only B/Victoria lineage circulate currently in human population gives a reason to believe that it should be closely investigated. An important place among the major properties of influenza virus hemagglutinin (HA) is referred to its potential to shape antigenic diversity of influenza viruses. It has been reliably proven that mutations in specific positions of HA1 receptor-binding site affect antigenic specificity. Therefore, assessing key amino acid positions located in this area is of substantial scientific and practical interest. This is especially important in practice, e.g., in influenza vaccine production that includes passaging in a sensitive substrate (usually in developing chicken embryos) within manufacturing technology. During passaging, substrate-adapting substitutions may occur in the region of the receptor-binding pocket, which may lead to undesirable changes in antigenic and biological properties of vaccine preparation. Our study is aimed at assessing a role of one of such egg-adapting substitutions (G141R). It was found that passaging of two currently circulating influenza B/Victoria viruses, B/Austria/1359417/2021 and B/Catalonia/2279261NS/2023, and LAIV vaccine strains prepared on their platform in developing chicken embryos resulted in HA1 G141R substitution that increased cold-adaptation of LAIV candidates, but not affecting their antigenic properties, temperature-sensitive phenotype, or degree of HA thermostability. The data presented in the article indicate that it is necessary to pay close attention to the emergence of mutations in the genome of influenza vaccine strains during their preparation, monitoring their possible impact on the key properties of such strains.

Keywords: influenza B viruses; B/Victoria lineage; substitutions in hemagglutinin; adaptation to substrate; G141R egg-adaptive mutation; antigenic properties; biological properties.

1 Введение

Вспышки заболеваемости гриппом в ежегодно регистрируют в разных странах. Осложненному течению инфекции наиболее подвержены уязвимые группы населения – дети, пожилые люди и лица с ослабленным иммунитетом [37]. В отдельные эпидемические сезоны в ряде стран вирус гриппа в был доминирующим в статистике заболеваемости орви [8]. В случае ошибочно выбранного компонента вируса гриппа в для гриппозной вакцины в мире неоднократно регистрировали резкие подъемы заболеваемости и значительное количество осложнений после перенесенного гриппа в [11]. В связи с этим, воз постоянно производит мониторинг эпидемической ситуации в мире, что позволяет ежегодно обновлять состав гриппозных вакцин наиболее актуальными штаммами.

Известно, что при пассировании вируса гриппа в развивающихся куриных эмбрионах (ркэ), в его гемагглютанине (на) возникают адаптационные аминокислотные замены, позволяющие вирусу более эффективно связывать рецепторы, доминирующие в тканях ркэ [9]. В некоторых случаях, особенно, если эти замены располагаются в или в непосредственной близости от рецептор–связывающего сайта, они могут влиять на антигенную специфичность вируса, в связи с чем необходимо оценивать его антигенные свойства и мониторировать появление такого рода замен в случае выявленных антигенных отличий [19, 35].

В настоящее время одна из двух известных генетических линий вирусов гриппа в – b/yamagata – полностью исчезла из циркуляции [15]. Поэтому изучение особенностей эволюционирования оставшейся викторианской ветви представляет особый интерес.

В сентябре 2021 года [33] для включения в состав противогриппозных вакцин, производимых в развивающихся куриных эмбрионах, для профилактики гриппа в линии в/victoria в южном полушарии был рекомендован представитель клайда v1a.3a.2, антигенно отличающийся от

вирусов, циркулировавших в предыдущие годы – вирус b/austria/1359417/2021. Подобные вирусы включали в состав вакцин на протяжении нескольких последующих лет, вплоть до эпидемического сезона 2025–2026 гг. В северном полушарии. Этот вирус явился одним из объектов настоящего исследования. Второй викторианский вирус, которому было уделено внимание в нашей работе – дрейфовый вариант вируса b/austria/1359417/2021 – b/catalonia/2279261ns/2023, который в настоящее время циркулирует наряду с другими вирусами гриппа в клайда v1a.3a.2 [25].

Поскольку доказано, что мутации в определенных позициях рецептор–связывающего сайта na1 влияют на антигенную специфичность вируса гриппа, исследование ключевых аминокислотных позиций, располагающихся в этой области, представляет существенный научный и практический интерес. Это особенно важно на практике, в частности, при подготовке гриппозных вакцин, в технологию изготовления которых включено пассирование в чувствительном субстрате (как правило – в ркэ). При пассировании могут возникнуть адаптационные к субстрату замены в области рецептор–связывающего кармана, которые могут привести к крайне нежелательным изменениям антигенных и биологических свойств вакцинного препарата.

В предварительных экспериментах в na1 эпидемического штамма b/austria/1359417/2021 и подобному ему b/catalonia/2279261ns/2023, выделенных в ркэ из соответствующих клинических изолятов, после дополнительного серийного пассирования в ркэ нами была обнаружена аминокислотная замена g141r, расположенная в области рецептор–связывающего сайта. Поэтому целью данной работы была оценка яично–адаптационных изменений в гемагглютанине вирусов, подобных b/austria/1359417/2021, и вакцинных штаммов, подготовленных на их основе, а также анализ возможного влияния выявленных изменений на биологические и антигенные свойства штаммов живой гриппозной вакцины (жгв).

2 Материалы и методы

Вирусы. Вирус гриппа b/austria/1359417/2021 (линия v/victoria) генетической сублинии v1a.3a.2 (с), был получен из центра воз по гриппу (the crick worldwide influenza centre, london, uk). Вирус гриппа b/catalonia/2279261ns/2023 (линия v/victoria) генетической сублинии v1a.3a.2 (с), был получен из центра воз по гриппу (cdc, atlanta, ga, usa). Пассажная история обоих «диких» вирусов в ркэ составляла е3. В работе также использовали вакцинные штаммы жгв, полученные на основе указанных выше «диких» вирусов методом классической реассортации в ркэ – жгв_{ркэ} – или методом обратной генетики – жгв_{гг}. Полный список использованных в работе вирусов и их пассажная история представлены в таблице 1.

Накопление вирусного материала производилось в ркэ по стандартной методике [32]. Сток вируса осветляли центрифугированием, фильтровали и хранили в аликвотах при температуре –70⁰с. Для оценки инфекционного титра вируса использовали однократно размороженный материал.

Подготовка вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины. Для оценки возможного влияния замены g141r в ha1 на биологические свойства вирусов, в гемагглютанине которых она появляется после пассирования в ркэ, методом обратной генетики либо классической реассортацией были подготовлены две пары вакцинных штаммов: (1) в60/au/141g и в60/au/141r и (2) в60/cat/141g и в60/cat/141r. Вирусы представляют собой холодоадаптированные 6:2 реассортанты на основе донора аттенуации живой гриппозной вакцины b/ссср/60/69 и содержат гены pb2, pb1, pa, np, m, ns от данного вируса. На реассортантов идентична и соответствует на клинического изолята вируса au/wt/141g (epi_isl_825949) и клинического изолята вируса cat/wt/141g (epi_isl_17211611), соответственно. Ген ha пар вакцинных штаммов отличается нуклеотидной позицией 499, что соответствует аминокислотному остатку g или r в 141 позиции ha1 (табл. 1).

Для получения вышеуказанных вакцинных штаммов методами генной инженерии гены pa и двух вариантов ha каждого «дикого» вируса, au/wt/141g

и cat/wt/141g, содержащие в позиции 141 на1 g либо r, были клонированы из биологического материала, содержащего разные варианты вирусов, в вектор pсipolisapit по сайтам эндонуклеазы sapI по методике, аналогичной описанной ранее [36]. Комплект векторов, кодирующих гены вируса b/ссср/60/69, был получен в рамках предыдущих исследований [36]. Вирусы получали методом трансфекции комплектом из 8 плазмид, кодирующих полный набор генов вируса, в клеточной линии vero ccl-81 (atcc). Трансфекцию проводили методом электропорации в режиме 2 импульсов по 1150 в, 20мс (подробно описано в [36]). Далее материал трансфекции вводили в ркэ и производили первичное накопление вирусного материала, который затем дважды клонировали методом предельных разведений в ркэ и отобранный клон накапливали в ркэ (e4) (табл. 1).

Для скрещивания в ркэ донора аттенуации в/ссср/60/69 и «дикого» родительского вируса использовали классическую методику, описанную в [28]. В процессе реассортации вакцинный штамм в60/au/141r прошел 7 пассажей – скрещивание, два селективных пассажа, три клонирования и одну амплификацию (e7) (табл. 1).

Последовательности генов ha и na оценивали классическим **методом секвенирования** по sanger с соавт. [26]. Рнк выделяли из вируссодержащей хориоаллантоисной жидкости набором рибо–преп (амплисенс®, россия), от–пцр проводили набором биомастер премиум от–пцр (биолабмикс, россия) с комплектом специфических праймеров (табл. 2).

После разделения продуктов в 1% агарозном геле осуществляли их очистку набором clean-up s-cup (евроген, россия) и постановку реакции с набором bigdye™ terminator v3.1 cycle sequencing kit (thermofischer scientific, usa) с последующей очисткой и анализом с помощью капиллярного секвенатора applied biosystems 3130/3130xl (thermofischer scientific, usa). Последовательности анализировали с помощью пакета lasergene v. 7.1 (dnastar, usa). Референсные последовательности и выборку последовательностей

современных изолятов вирусов гриппа в получали из базы данных gisaid (<https://gisaid.org/>), выравнивания выполняли и анализировали с помощью пакета unipro ugene v. 50.0 (<https://ugene.net/>).

Для **оценки ростовых характеристик** вирусы титровали в ркэ и культуре клеток mdck в трех повторях, титр вычисляли по методу reed и muench [21] и выражали в lg эид₅₀/мл (50%–ная инфицирующая доза для ркэ) и в lg тид₅₀/мл (50%–ная инфицирующая доза для культуры клеток), соответственно. Определяли способность вирусов к репродукции при оптимальной (в ркэ и клетках mdck) и субоптимальных (в ркэ) температурах. В настоящем исследовании за температуру инкубации, оптимальную для эпидемических и вакцинных штаммов вирусов гриппа, приняли 33°с в соответствии с [14]. Способность/неспособность вирусов к размножению за верхним (temperature sensitivity, ts–фенотип) и нижним (cold–adaptation, ca–фенотип) пределами температурного оптимума оценивали при 38°с и 26°с, соответственно.

Для **оценки антигенных свойств** вирусосодержащим материалом, накопленным в ркэ, иммунизировали крыс, после чего оценивали титр гипериммунных сывороток с тестируемыми вирусами гриппа в реакции торможения гемагглютинации (ртга) с 1% куриными эритроцитами по стандартному протоколу [32].

Для **оценки термостабильности** гемагглютинирина вирусы инкубировали в течение 20 мин при температурах от 37°с до 70°с, как описано в [27]. Затем проводили реакцию гемагглютинации (рга) с использованием 1,0% куриных эритроцитов. Контрольные образцы инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Гемагглютинин считали низко стабильным, если он терял активность при температуре до 58°с включительно. Если гемагглютинин сохранял свою гемагглютинирующую активность после прогревания при 60°с и выше, его считали термостабильным.

3 Результаты

(1). Молекулярно–генетический анализ «диких» вирусов

b/austria/1359417/2021 и b/catalonia/2279261ns/2023 (по данным, представленным в базе данных gisaid.org)

Для выявления яично–адаптационных замен в генах, кодирующих поверхностные белки «диких» вирусов au/wt/141g и cat/wt/141g, прежде всего был проведен анализ последовательностей на из различных пассажных вариантов, доступных в базе данных gisaid.org. Из 22–х имеющихся в этой базе сиквенсов на1 вируса au/wt/141g и реассортантов на его основе, в 9 случаях выявлена замена глицина на аргинин (g141r). Как правило, это были вирусы, имеющие длительную пассажную историю в ркэ (от 6 до 12) (табл. 3).

Варианты, пассированные в культуре клеток (seat, mdck) либо прошедшие ограниченное количество пассажей в ркэ (не больше 5–6), сохранили присущий клиническому изоляту глицин (g). Пассажная история единственного варианта, имеющего смешанную популяцию по этой позиции (g/r), к сожалению, не известна.

Гемагглютинин вируса cat/wt/141g представлен в базе данных gisaid.org только пятью сиквенсами (табл. 3). Клинический изолят и три его низкопассажных варианта (1–2 пассажа в культуре клеток), равно как и пятый пассаж в ркэ, содержат в 141 позиции глицин, что подтверждает сказанное выше о вирусе au/wt/141g.

(2). Молекулярно–генетический анализ пассажных вариантов «диких» вирусов b/austria/1359417/2021 и b/catalonia/2279261ns/2023 и вакцинных штаммов жгв, подготовленных на их основе

На следующем этапе исследований исходные популяции эпидемических вирусов au/wt/141g и cat/wt/141g, полученных нами из центров воз по гриппу и содержащих аргинин в позиции 141 ha1, были подвергнуты серийному пассированию, используя высокую заражающую дозу вируса (5,0 lg эид₅₀/мл). Было продемонстрировано, что исходно на1 эпидемических вирусов содержал аминокислотный остаток 141g. К 7 пассажи в ркэ (включая три пассажа,

которые эти вирусы прошли в центрах воз по гриппу) «дикие» вирусы приобретали в позиции 141 ha1 вместо остатка глицина (g) остаток аргинина (r) (табл. 1). Пространственно–структурная организация молекулы гемагглютиниона вируса гриппа в и расположение в ней аминокислотного остатка 141 представлены на рисунке 1.

Затем аналогичные эксперименты были проведены с вакцинной генно–инженерной конструкцией в60/au/141g, заведомо содержащей в 141 позиции остаток аминокислоты, представленный в клинических изолятах, на основе которых конструировались эти вакцинные кандидаты – глицин (g). На 2 дополнительном пассаже (e3/e4/e2) в популяции вакцинного штамма в60/au/141g треть клонов уже содержала адаптационную замену 141r, а к 5 пассажу (e3/e4/e5) вариантов, содержащих 141g, выявлено уже не было. Пассажному варианту была присвоена аббревиатура в60/au/141g(r) (табл. 1). В то же время после дополнительного пассирования в ркэ вакцинного штамма в60/cat/141g в его популяции на 2 пассаже (e3/e4/e2) еще отсутствовала адаптационная замена 141r, но к 5 пассажу (e3/e4/e5) она уже выявлялась у всех клонов. Пассажному варианту была присвоена аббревиатура в60/cat/141g(r).

Что касается вакцинного штамма в60/au/141r, подготовленного в ркэ методом классической реассортации вируса au/wt/141g и донора аттенуации в/ссср/60/69, то в процессе реассортации штамм прошел 7 пассажей (табл. 1). Готовый вакцинный штамм содержал в na1 141r.

(3). Оценка репродуктивной активности в культуре клеток mdck «диких» вирусов b/austria/1359417/2021 и b/catalonia/2279261ns/2023 и полученных на их основе вакцинных штаммов, отличающихся по 141–й аминокислотной позиции в na1, при оптимальной температуре инкубации 33°с

При 33°с все исследованные вакцинные реассортанты, как и их «дикие» родители, активно репродуцировались в культуре клеток mdck. Величина

инфекционного титра в этом субстрате составляла 8,6 lg тид₅₀/мл и выше вне зависимости от присутствия в позиции 141 на1 глицина или аргинина (табл. 4).

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что адаптационная к клеткам птиц (в данном случае – к ркэ) мутация g141r не влияет на репродуктивную активность штаммов жгв в другом субстрате – культуре клеток млекопитающих.

(4). Оценка репродуктивной активности в ркэ при температурах за пределами оптимальных значений (*ts/ca* фенотип) «диких» вирусов b/austria/1359417/2021 и b/catalonia/2279261ns/2023 и полученных на их основе вакцинных штаммов, отличающихся по 141–й аминокислотной позиции в на1

В ходе дальнейшего исследования было проведено сравнение ростовых характеристик в ркэ при оптимальной и пограничных температурах эпидемических вирусов au/wt/141g и cat/wt/141g и вакцинных реассортантов, полученных на их основе. Результаты представлены в таблице 4. В ркэ картина наблюдалась несколько отличная от того, что было отмечено в клетках mdck. Было показано, что эпидемические вирусы гриппа au/wt/141g и cat/wt/141g обладают более низкой репродуктивной активностью при оптимальной температуре 33°с по сравнению с вакцинными реассортантами. Все вакцинные штаммы характеризовались высокой репродуктивностью, но по величинам инфекционных титров отличались между собой на 0,6–1,0 lg эид₅₀/мл в пользу более репродуктивных реассортантов с адаптационной «яичной» мутацией.

Все вакцинные реассортанты продемонстрировали неспособность к репродукции при температуре инкубации, повышенной до 38°с, то есть выраженный *ts*–фенотип, унаследованный от донора аттенуации в/ссср/60/69. Отмечена интересная тенденция усиления свойства холодоустойчивости вакцинных штаммов жгв с мутацией в 141 позиции на (в60/cat/141r и

в60/au/141r) – она была выше на 1,2–2,4 lg ЭИД₅₀/мл, чем у реассортантов без мутации.

Более того, вакцинный штамм генно–инженерной сборки в60/au/141g, первоначально содержащий 141g, после 5 дополнительных пассажей в ркэ (е3/е4/е5) приобрел в на1 замену 141r, параллельно с появлением которой свойства его холодовой адаптации усилились (табл. 4).

(5). Антигенные свойства «диких» вирусов b/austria/1359417/2021 и b/catalonia/2279261ns/2023 и полученных на их основе вакцинных штаммов, отличающихся по 141–й аминокислотной позиции в на1 (по данным ртга)

Анализ антигенных свойств эпидемических родителей au/wt/141g и cat/wt/141g и вакцинных штаммов, полученных на их основе, проведенный с помощью двустороннего теста ртга, подтвердил их антигенное соответствие. При этом сыворотки, полученные к вариантам, содержащим 141g, более эффективно подавляли как варианты 141g, так и 141r. Сыворотка, полученная к вариантам 141r, подавляла вирусы, содержащие 141g, несколько хуже, чем 141r (табл. 5).

(6). Термостабильность гемагглютинирина

Еще одно важное биологическое свойство вирусов гриппа – это устойчивость или чувствительность их гемагглютинирина к нагреванию при высоких температурах. Эксперименты показали, что, вне зависимости от исходной (до прогревания) гемагглютинирующей активности тестируемых вирусов и от аминокислоты в 141 позиции гемагглютинирина (глицина или аргинина), она (активность в рга) в той или иной степени сохранялась даже при нагревании вирусов до 60°С (табл. 6). Таким образом, термостабильность этого поверхностного белка эпидемических вирусов au/wt/141g и cat/wt/141g и вакцинных штаммов, подготовленных на их основе, была высокой.

4 Обсуждение

Причины ухода из циркуляции вирусов гриппа линии b/yamagata не ясны до сих пор. Если сравнивать между собой вирусы линий b/victoria и b/yamagata, викторианские вирусы подвержены более быстрому антигенному дрейфу, чем вирусы линии b/yamagata [30], то есть эволюционируют быстрее. Предполагают, что это может быть обусловлено разницей в предпочтительном связывании на с клеточным рецептором. Если вирусы гриппа линии b/yamagata в качестве клеточных рецепторов распознают сиалил–содержащие гликопротеины, связанные с галактозой посредством альфа–2,6 связи, то спектр предпочтений викторианских вирусов шире – они способны связываться с рецепторами, содержащими не только альфа–2,6, но и альфа–2,3 связи [22]. Возможно, именно это свойство дает викторианским вирусам определенное преимущество. То, что вирусы линии b/yamagata исчезли из циркуляции как раз к моменту окончания пандемии covid–19, еще не означает наличия причинно–следственной связи между двумя этими событиями. Но факт остается фактом – сегодня среди человеческой популяции циркулируют только вирусы гриппа викторианской линии, что дает повод считать, что этой линии нужно уделять самое пристальное внимание.

Механизмы адаптационной изменчивости вируса гриппа связаны с накоплением мутаций при его пассировании в определенном субстрате, в результате чего репродуктивная активность вируса в этой системе повышается. При репродукции вируса гриппа в в ркэ в гене, кодирующем на, возможно появление адаптационных мутаций, приводящих к появлению аминокислотных замен вблизи рецептор–связывающего сайта молекулы гемагглютинина и усилению связывания вирионов с гликопротеинами с α –2,3 гликозидной связью. Рецептор–связывающий сайт головки гемагглютинина вирусов гриппа в образован несколькими аминокислотами: y98, s136, w153, h183, q190, l194, y195 [18]. Также было установлено, что количество заряженных замен преобладает над нейтральными [23]. В на1–субъединице вируса гриппа в было обнаружено несколько адаптационных замен. Например,

замена в аминокислотных позициях 197–199 вирусов линии v/victoria приводила к потере n-связанного сайта гликозилирования, что может изменить антигенные свойства вируса [24]. Также в другой работе [17] к 30 пассажу в ркэ вирусов гриппа в было обнаружено появление аминокислотных замен в положениях 141, 162 и 196 гемагглютиниона и установлено их влияние на ростовые характеристики и антигенность. С другой стороны, chen с соавт. [9] показали, что при переадаптации вируса гриппа в к ркэ в на1 появляется аминокислотная замена g141r, которая может стабилизировать вышеназванный сайт и при этом существенно не влиять на антигенность вируса. Эта замена располагается в «головке» ha и входит в состав области рецептор–связывающего кармана [6].

У эпидемических вирусов au/wt/141g и cat/wt/141g, выделенных в ркэ из соответствующих клинических изолятов, после их серийного пассирования в ркэ при высокой заражающей дозе в на1 появилась аминокислотная замена g141r, известная из работы [9]. Теоретически это можно было ожидать, поскольку вирусы прошли три пассажа в ркэ в центрах воз по гриппу, откуда были нами получены; их популяции уже были гетерогенными и могли содержать в минорных количествах яично–адаптационную мутацию g141r, которая при дальнейшем пассировании в ркэ, имея адаптационные преимущества к этому субстрату, вытеснила клоны, содержащие глицин. Поскольку штаммы для живых гриппозных вакцин в россии готовятся классической реассортацией в ркэ эпидемического вируса и донора аттенуации, то в процессе подготовки они вполне могут приобрести эту мутацию. Свойства эпидемических вирусов интересовали нас не только сами по себе, но и применительно к свойствам вакцинных штаммов жгв, получаемых на их основе. В задачу нашего исследования входило понять, является ли мутация g141r нежелательной и как она может повлиять на свойства вакцинного штамма.

Для оценки влияния выявленной замены на биологические свойства вакцинных штаммов, в гемагглютанине которых она может появиться, методом обратной генетики либо классической реассортацией были подготовлены две пары вакцинных штаммов: (1) в/60/au/141g и в/60/au/141r и (2) в/60/cat/141g и в/60/cat/141r. Вирусы представляют собой холодоадаптированные 6:2 реассортанты на основе донора аттенуации живой гриппозной вакцины b/ссср/60/69, и содержат внутренние белки от донора аттенуации, а na и na – от эпидемических родителей. При этом na реассортантов идентична нейраминидазе соответствующего клинического изолята, а ген ha пар вакцинных штаммов отличается позицией 499 (g/a), что соответствует аминокислотному остатку в 141 позиции ha1 g или r. Произведенные генно–инженерным путем вакцинные штаммы в60/au/141g и в60/cat/141g содержали в 141 позиции na1 глицин, а вакцинный штамм в60/cat/141r – ячно–адаптационную замену глицина на аргинин. Аналогичный реассортант на основе вируса au/wt/141g, также содержащий 141r, был подготовлен методом классической реассортации в ркэ.

Интересно, что заведомо гомогенные по аминокислотной позиции 141 популяции вакцинных штаммов в60/au/141g и в60/cat/141g, собранных генно–инженерным путем, после дополнительного пятикратного пассирования в ркэ (e3/e4/e5) также приобрели ячно–адаптационную замену g141r. Это совпадает с данными, представленными в базе данных gisaid.org, из которых следует, что для вируса au/wt/141g необходимо пройти от 6 до 15 пассажей в ркэ, чтобы приобрести замену g141r.

По данным воз, вирусы гриппа в, принадлежащие к сублинии v1a.3a.2, хорошо распознаются антисыворотками, полученными против au/wt/141g–подобных вирусов. При этом сыворотки к вирусам, которые содержат «ячную» замену 141r, несколько хуже работают с вариантами, которые содержат 141g [34]. В наших экспериментах сыворотки, полученные к вариантам, содержащим 141r, хуже подавляли вирусы, содержащие 141g, чем

141r, но в допустимых пределах – разница в титрах была, но менее четырехкратной, считающейся статистически достоверной. Эти имеющиеся незначительные несовпадения в титрах укладываются в рамки различий, разрешенных воз, при которых вирусы считаются антигенно близкими.

Известно, что замены аминокислотных остатков в положении 141, 136, 237, 240 и ряд других аминокислотных остатков находятся в рецептор–связывающем кармане гемагглютиниона вируса гриппа и могут оказывать влияние на его антигенную специфичность [6]. Однако в наших экспериментах замена g141r на антигенной специфичности вакцинных штаммов жгв, подготовленных на основе викторианских вирусов au/wt/141g и cat/wt/141g, существенно не отразилась.

Ранее было показано, что при инкубации в интервале 32°с–35°с и эпидемические, и холодоадаптированные вакцинные штаммы одинаково хорошо размножаются как в культуре клеток mdck, так и в ркэ [14]. В настоящем исследовании все проанализированные вакцинные реассортанты, как и их «дикие» родители, активно репродуцировались при оптимальной температуре инкубации 33°с в перевиваемой культуре клеток mdck вне зависимости от присутствия глицина или аргинина в позиции 141 на1. Это вполне объяснимо, поскольку культура клеток mdck получена из тканей млекопитающего, то есть является субстратом, имеющим рецепторы с альфа–2–6 связью, специфичной для вирусов гриппа человека.

В ркэ картина была несколько иной. Было показано, что эпидемические вирусы гриппа cat/wt/141g и au/wt/141g проявили более низкую репродуктивную активность при температуре 33°с по сравнению с вакцинными реассортантами, которые характеризовались более высокой репродуктивностью, но по величинам инфекционных титров отличались между собой на 0,6–1,0 lg эид₅₀/мл в пользу реассортантов с адаптационной «яичной» мутацией. Эти результаты вполне закономерны и свидетельствуют о более высокой адаптации к клеткам птиц вирусов, содержащих 141r

375 мутацию. Более высокая репродуктивность обоих реассортантов в сравнении
376 с эпидемическим вирусом – также закономерное явление, она обеспечивается
377 наследованием этого признака от донора аттенуации и меньшей адаптацией
378 эпидемического вируса человека к репликации в клетках птиц.

379 Сегодня уже никого не удивляет присутствие в циркуляции
380 температурочувствительных или холодоустойчивых вирусов гриппа, хотя в
381 прошлые годы *non-ts* и *non-ca* признаки считались неотъемлемым свойством
382 эпидемических вирусов. Особое значение придавали
383 температуроустойчивости репродукции. Предполагалось, что «дикие» вирусы
384 гриппа человека всегда обладают *non-ts* фенотипом, что коррелирует с их
385 способностью проникать в нижние отделы респираторного тракта и с
386 вирулентностью для организма хозяина [1,5]. Однако в конце 1970–х гг. В
387 циркуляции появились первые температурочувствительные варианты сначала
388 вирусов гриппа а [4, 20], а позже и в [16]. Чувствительные к повышенной
389 температуре инкубации вирусы гриппа выделялись даже из секционного
390 материала [2]. В конце 1990–х гг. В циркуляции превалировали
391 температурочувствительные вирусы гриппа в [1], и эта ситуация продолжается
392 до сих пор. В настоящее время репродукция практически всех современных
393 эпидемических вирусов гриппа в резко снижена при их инкубации за
394 верхними пределами температурного оптимума. Не являются исключением и
395 вирусы cat/wt/141g и au/wt/141g, поэтому установить возможное влияние
396 аминокислотной замены g141r на этот показатель не представляется
397 возможным. Ни один из исследуемых в настоящей работе вирусов не
398 репродуцировался в ркэ при 38°С, демонстрируя таким образом выраженный
399 *ts*–фенотип.

400 Неспособность вакцинных штаммов жтв к репродукции при повышенных
401 температурах инкубации (*ts*–фенотип) и способность к размножению при
402 температурах, пониженных до 26°С (*ca*–фенотип) являются маркерами
403 аттенуации – важными показателями, определяющими стабильность

аттенуирующих свойств вакцинных штаммов. Утеря одного из этих признаков может нарушить баланс свойств, определяющих безопасность вакцинных штаммов для человека. В литературе описаны случаи, когда вакцинные штаммы для жгв, собранные методами обратной генетики, частично утрачивали *sa*-фенотип [3, 13]. Поэтому вопрос о том, не повлияет ли мутация 141r на *ts/ca* фенотип вакцинных штаммов, представляется весьма существенным.

Интересно, что такая характеристика вакцинных штаммов, как их *sa*-фенотип, не только не была утрачена с появлением мутации 141r, но наоборот, наблюдалась определенная тенденция к его усилению у вариантов, несущих в 141-й аминокислотной позиции гемагглютиниона аргинин.

Таким образом, мутация 141r повышает репродуктивную активность штаммов вируса гриппа в в ркэ при оптимальной и пониженной температурах, давая вирусу преимущество при репродукции в птичьих клетках в сравнении с вирусами, не имеющими этой мутации.

Существует два важных признака, присущих вирусам гриппа, которые так или иначе сопряжены с их устойчивостью или чувствительностью к повышенным температурам. Это термостойкость репродукции и термостабильность гемагглютиниона. В первом случае (о чем уже говорилось выше) это способность реплицироваться *in vitro* и/или *in ovo* при температурах за верхними пределами температурного оптимума (свыше 38°с), что определенным образом связано со способностью вируса размножаться в нижних отделах респираторного тракта. Во втором случае это верхний температурный предел, при нагревании вируса до которого все еще сохраняется его гемагглютинирующая активность. По данным литературы степень термостабильности варьирует у разных вирусов гриппа [7, 10, 27]. С другой стороны, показана корреляция термостабильности гемагглютиниона с вирулентностью и рецепторной специфичностью [12, 27, 29]. Также для некоторых сероподтипов вирусов гриппа а выявлены аминокислотные

замены, изменяющие чувствительность гемагглютини́на к повышенным температурам и кислой среде, и доказано их влияние на термостабильность и иммуногенность вакцинных препаратов. Так, wen с соавт. [31] при помощи обратной генетики экспериментально выявили аминокислотную замену y161f в гемагглютинине, которая не только повышала репродуктивность вирусов a/h1n1pdm09 в клетках mdck и vero, но и повышала их термостабильность без изменения антигенных свойств. Также ими было показано, что вакцинные штаммы, полученные на основе мутанта y161f a/h1n1pdm09, полностью защищали мышей от заражения пандемическим вирусом гриппа a/h1n1pdm09. Данной группой ученых было также продемонстрировано, что введение мутации y161f в гемагглютинин сезонных вирусов гриппа a/h3n2 повышало их термостабильность и репродуктивность в клетках mdck и куриных эмбрионах. В связи с этим можно предположить, что вакцинные штаммы с высокими термостабильными свойствами более иммуногены. По вирусам гриппа в таких данных пока не опубликовано, но можно полагать, что это универсальное явление и термостабильность вирусов в, как и вирусов а, определенным образом связана с их иммуногенностью, а сам показатель степени термостабильности вирусного гемагглютини́на может являться маркером иммуногенности.

В наших экспериментах, независимо от аминокислоты в 141 позиции гемагглютини́на (глицина или аргинина), термостабильность этого поверхностного белка эпидемических вирусов au/wt/141g и cat/wt/141g и вакцинных штаммов, подготовленных на их основе, была высокой. Таким образом, адаптационная замена g141r не влияет на термостабильность на вирусов гриппа в.

5 Выводы

(1). Пассирование в ркэ викторианских вирусов гриппа и вакцинных штаммов жгв, подготовленных на их основе, приводит к появлению в na1 ячно–адаптационной замены g141r.

(2). Выявленная замена g141r усиливает свойство холодовой адаптации вакцинных штаммов жгв, но не влияет на температурочувствительность их репродукции и на степень термостабильности гемагглютиниона.

(3). Получение вакцинного штамма жгв генно–инженерным путем под контролем секвенирования позволяет изолировать чистый клон без яично–адаптационных замен, что дает возможность избежать неконтролируемого появления мутаций при реассортации *in ovo*. Это важно в том случае, если спонтанно возникшие мутации изменяют антигенный профиль вакцинного штамма или его биологические свойства. Это бесспорно является «плюсом» генно–инженерной сборки. Тем не менее, на производстве в любом случае необходимо провести ограниченное количество пассажей вакцинного вируса в ркэ для получения производственных серий, поэтому строгий контроль за появлением яично–адаптационных замен в финальных сериях вакцинного препарата необходим.

Финансирование

Работа подготовлена в рамках государственного задания фгбну «изм» fgwg–2025–0015.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Пассажная история вирусов гриппа линии B/Victoria, использованных в работе.

Table 1. Passage history of B/Victoria influenza viruses used.

Оригинальное название штамма вируса гриппа В генетической линии V1a.3a.2 (C) Designation of the influenza B virus of genetic group V1a.3a.2 (C)		Число пассажей в РКЭ No passages in eggs	141* *	Использованная аббревиатура Abbreviation
B/Austria/1359417/2021	WT	E3	G	AU/WT/141G
B/60/Austria/2021/92	ЖГВ_{RG} LAIV _R G	E3/E4*	G	B60/AU/141G
B/60/Austria/2021/92 (пассажный вариант) B/60/Austria/2021/92 (passaged variant)	ЖГВ_{RG} LAIV _R G	E3/E4/E5	R	B60/AU/141G(R)
B/60/Austria/2021/711	ЖГВ_{PK} э LAIV _{eg} gs	E3/E7	R	B60/AU/141R
B/Catalonia/2279261NS/2023	WT	E3	G	CAT/WT/141G
B/60/Catalonia/2279261NS/2023/141G	ЖГВ_{RG} LAIV _R G	E3/E4	G	B60/CAT/141G
B/60/Catalonia/2279261NS/2023/141G (пассажный вариант)	ЖГВ_{RG} LAIV _R G	E3/E4/E5	R	B60/CAT/141G(R)

B/60/Catalonia/2279261NS/2023/141G (passaged variant)				
B/60/Catalonia/2279261NS/2023/8121/141R	ЖГВ_{RG} LAIV _R G	E3/E4	R	B60/CAT/141R

Примечания: *Дополнительное число пассажей в РКЭ вируса, первоначальная пассажная история которого при получении из Центра ВОЗ по гриппу составляла E3, или реассортантного вируса в процессе подготовки вакцинного кандидата.

**Остаток аминокислоты в 141–й позиции HA1.

Notes: *Additional number of passages in eggs of a virus whose initial passage history when received from the Worldwide Influenza Centre, WHO was E3, or of a reassortant virus during preparation of a vaccine candidate.

**Amino acid residue at position 141 of HA1.

Таблица 2. Праймеры для секвенирования HA и NA вирусов гриппа B/Austria/1359417/2021, B/Catalonia/2279261NS/2023 и вакцинных штаммов для ЖГВ, подготовленных на их основе.

Table 2. Primers for sequencing HA and NA of influenza viruses B/Austria/1359417/2021, B/Catalonia/2279261NS/2023 and LAIV candidates developed on their basis.

Ген Gene	Фрагмент Fragment	Праймеры для ОТ–ПЦР Primers for RT–PCR	
		Позиция Position	Последовательность олигонуклеотидов, 5'→3' Oligonucleotide sequence, 5'→3'
HA	№1	F1	GATCGCTCTTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATC
		R 1102	TTGCAGGAGGTCTATATTTGGTTC
	№2	F1090	AGACCTCCTGCAAAACTATT
		R1873	GCTGGCTCTTCTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTCAAT
NA	№1	F1	ATAGCTCTTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATCTTCTC
		R873	TGTGTTTTACTCTTCCTGTTG
	№2	F711	AAAATCCTAAGAACACAAGAAAGT
		R1561	ACTGGCTCTTCTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTTCAGA
Ген	Фрагмент	Праймеры для секвенирования	

Gene	Fragment	Primers for sequencing	
		Позиция Position	Последовательность олигонуклеотидов, 5'→3' Oligonucleotide sequence, 5'→3'
HA	№1	F310	TCGGCAAGAGTTTCAATAC
		R466	CATTTTCTGCATTGATAACG
		R1102	TTGCAGGAGGTCTATATTTGGTTC
		F780	AACAGAAGACGGAGGACTACCACA
	№2	F1430	AAGGAATAATAAACAGTGAAGATG
		F1090	AGACCTCCTGCAAACTATT
		R1503	GGTTTCGAAGCATCCATTT
NA	№1	R497	CTTCTTGTTCCATTGTAGTATCC
		F312	TGCCCCGGGCTCAACCTT
		R873	TGTGTTTTACTCTTCCTGTTG
	№2	F711	AAAATCCTAAGAACAAGAAAGT
		F1146	TACTCTCGAACGATGTCTAAACT
		R1242	TAAAAGCTAGGGCATCACT
		R1561	ACTGGCTCTTCTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTTCAGA

Таблица 3. Аминокислотная позиция 141 гемагглютиниона разных пассажных вариантов вирусов гриппа В/Austria/1359417/2021 и В/Catalonia/2279261NS/2023 (по материалам базы данных GISAID).

Table 3. Amino acid position of residue 141 of hemagglutinin of different passaged variants of influenza viruses В/Austria/1359417/2021 and В/Catalonia/2279261NS/2023 (based on the GISAID database).

Представленные в базе данных варианты Variants presented in the GISAID database	EX*; CX**	Идентификационный номер штамма в базе данных Virus ID in the GISAID database	141***
Вирус В/Austria/1359417/2021 (линия В/Victoria) В/Austria/1359417/2021 (В/Victoria lineage)			
Клинический изолят Clinical sample	–	EPI_ISL_825949	G
Пассажные варианты «дикого» вируса и вакцинные штаммы для ИГВ на его основе Passaged variants of WT virus and vaccine candidates for IIV	E3–6; C1–6	EPI_ISL_983345, EPI_ISL_1519459, EPI_ISL_6307006, EPI_ISL_16967998, EPI_ISL_5332900, EPI_ISL_16967997, EPI_ISL_18879404, EPI_ISL_12141693, EPI_ISL_2378894, EPI_ISL_3355461, EPI_ISL_13660190	G
	E6–15; C2–3	EPI_ISL_10265907, EPI_ISL_12709844, EPI_ISL_5195882, EPI_ISL_18420061,	R

		EPI_ISL_16899231, EPI_ISL_15158311, EPI_ISL_5196190, EPI_ISL_18419386, EPI_ISL_13633122	
	EX	EPI_ISL_5933268	G/R
Вирус В/Catalonia/2279261NS/2023 (линия В/Victoria) B/Catalonia/2279261NS/2023 (B/Victoria lineage)			
Клинический изолят Clinical sample	–	EPI_ISL_17211611	G
Пассажные варианты «дикого» вируса Passaged variants of WT virus	E5; C1–3	EPI_ISL_17608896, EPI_ISL_17981482, EPI_ISL_18109004, EPI_ISL_18879402	G

Примечания: Количество пассажей вируса в РКЭ* и культуре клеток**.

***Остаток аминокислоты в 141–й позиции HA1.

Notes: Number of passages in eggs* and tissue culture**.

***Amino acid residue at position 141 of HA1.

Таблица 4. Ростовые характеристики «диких вирусов» В/Austria/1359417/2021 и В/Catalonia/2279261NS/2023 и полученных на их основе вакцинных штаммов, отличающихся по 141-й аминокислотной позиции в HA1, в культуре клеток MDCK и развивающихся куриных эмбрионах

Table 4. Growth characteristics of WT influenza B/Austria/1359417/2021 and B/Catalonia/2279261NS/2023 viruses and vaccine candidates, differing in the amino acid residue at position 141 of HA1, in MDCK cells and eggs

Вирус Virus designation	141 *	Число пассажей в РКЭ No passages in eggs	Титр в MDCK***, lg ТИД ₅₀ /мл lg TCID ₅₀ /mL in MDCK***	Титр в РКЭ**** при оптимальной и субоптимальных температурах инкубации, lg ЭИД ₅₀ /мл			
			33°C	33° C	38°C	26°C	фенотип
CAT/WT/141 G	G	E3/E1**	8,6	6,2	≤1,2	≤1,2	<i>ts, non-ca</i>
B60/CAT/141 G	G	E3/E4	9,7	7,3	≤1,2	5,4	<i>ts, ca</i>
B60/CAT/141 R	R	E3/E4	9,5	7,9	≤1,2	6,6	<i>ts, >ca</i>
AU/WT/141G	G	E3/E1	9,0	7,2	≤1,2	≤1,2	<i>ts, non-ca</i>
B60/AU/141G	G	E3/E4	9,2	8,0	≤1,2	5,2	<i>ts, ca</i>
B60/AU/141G(R)	R	E3/E4/E5	9,3	9,2	≤1,2	7,8	<i>ts, >ca</i>

B60/AU/141R	R	E3/E7	9,0	9,0	$\leq 1,2$	7,6	<i>ts, >ca</i>
-------------	---	-------	-----	-----	------------	-----	-------------------

Примечания: **Дополнительное число пассажей в РКЭ вируса, первоначальная пассажная история которого при получении из Центра ВОЗ по гриппу составляла E3, или реассортантного вируса в процессе подготовки вакцинного кандидата.

В таблице приведены результаты титрования вирусов в культуре клеток MDCK*** и в РКЭ**** в трех повторях.

Notes: **Additional number of passages in eggs of a virus whose initial passage history when received from the Worldwide Influenza Centre, WHO was E3, or of a reassortant virus during preparation of a vaccine candidate.

The table contains the results of virus titration in MDCK cells*** and in eggs**** in triplicate.

Таблица 5. Антигенный анализ вирусов гриппа В линии В/Victoria, отличающихся по 141–й аминокислотной позиции в гемагглютанине

Table 5. Antigenic analyses of influenza B viruses (B/Victoria lineage) differing in the amino acid residue at position 141 of HA1

Антиген Antigen	141*	Титр сыворотки в РТГА Hemagglutination inhibition titre		
		Крысиная гипериммунная сыворотка Rat antiserum		
		AU/WT/141G (anti-141G)	B60/AU/141G (anti-141G)	B60/AU/141R (anti-141R)
AU/WT/141G	G	<u>1280</u>	640	320
B60/AU/141G	G	640	<u>1280</u>	320
B60/AU/141R	R	320	320	<u>1280</u>
Антиген Antigen	141*	Титр сыворотки в РТГА Hemagglutination inhibition titre		
		Крысиная гипериммунная сыворотка Rat antiserum		
		CAT/WT/141G (anti-141G)	B60/CAT/141G (anti-141G)	B60/CAT/141R (anti-141R)
CAT/WT/141G	G	<u>1280</u>	1280	320
B60/CAT/141G	G	1280	<u>1280</u>	640
B60/CAT/141R	R	320	320	<u>1280</u>

Примечания: *Остаток аминокислоты в 141–й позиции HA1

Notes: *Amino acid residue at position 141 of HA1

Таблица 6. Гемагглютинирующая активность вирусов гриппа В при термической обработке (по данным РГА)

Table 6. Hemagglutinating activity of influenza B viruses against heat treatment

Вирус Virus designation	Титр вируса в РГА ($\log_2$)* после его прогревания при HAU ($\log_2$)* after heat treatment at								
	RT* *	37° C	50° C	54° C	56° C	58°	60° C	65° C	70° C
CAT/WT/141G	5	5	5	5	5	4	3	0***	0
B60/CAT/141R	8	8	8	8	8	7	5	0	0
B60/CAT/141G	8	8	8	8	7	7	3	0	0
AU/WT/141G	5	5	5	5	5	5	2	0	0
B60/AU/141R	7	7	7	7	7	6	5	0	0
B60/AU/141G	8	8	8	8	8	8	5	0	0

Примечания: *Все варианты проставляли в РГА в трех параллельных рядах.

**Постановка РГА при комнатной температуре.

***Гемагглютинирующая активность необратимо нарушена.

Notes: *The table contains the results of HA test in triplicate.

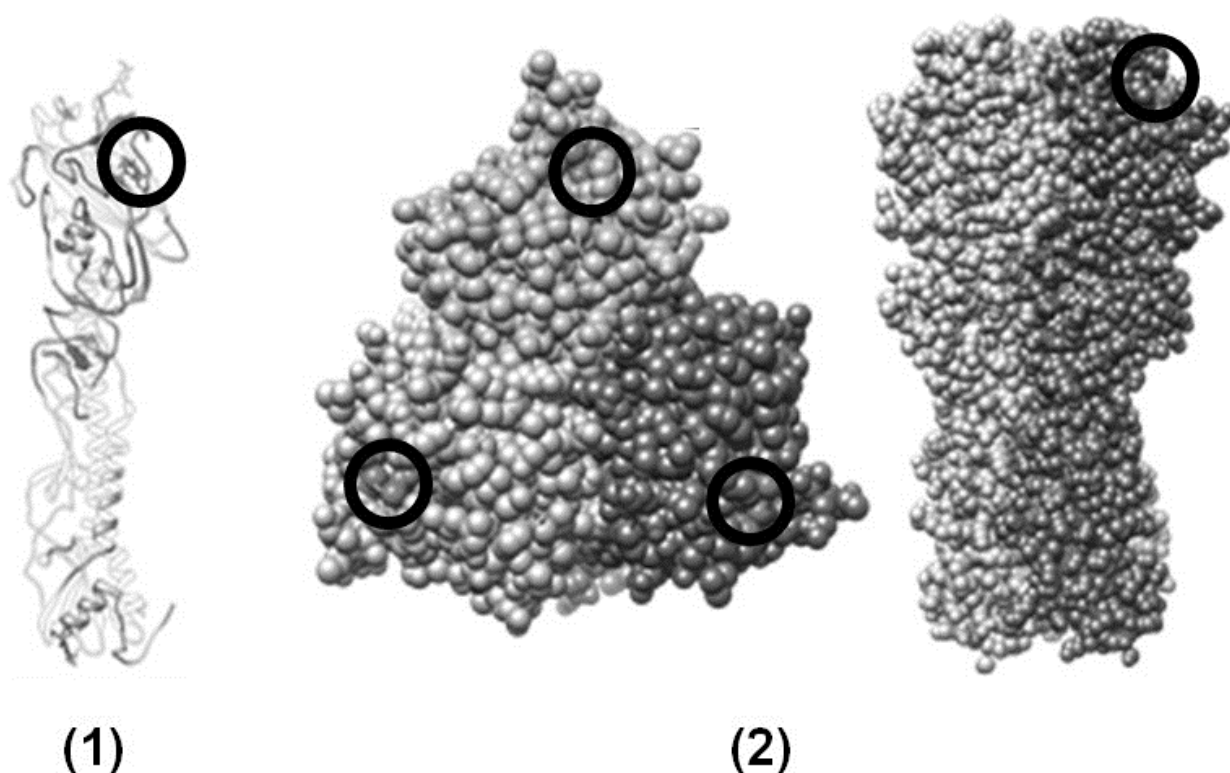
**HA test at RT.

*** Hemagglutinating activity irreversibly destroyed

РИСУНКИ

Рисунок 1. Пространственно–структурная организация молекулы гемагглютинирина вируса гриппа В и расположение в ней аминокислотного остатка 141. (1) – мономер НА. (2) – тример НА. Черными кругами показано расположение 141 аминокислотной позиции НА в структуре рецептор–связывающего кармана. Для картирования использована структура PDB 3bt6. Иллюстрация подготовлена в Chimera 1.14.

Figure 1. Spatial and structural organization of the influenza B virus hemagglutinin molecule and the location of amino acid residue 141 in it. (1) – HA monomer. (2) – HA trimer. Black circles show the location of amino acid position 141 of HA in the structure of the receptor-binding pocket. The PDB 3bt6 structure was used for mapping. The illustration was prepared in Chimera 1.14.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Киселева И.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт–Петербург, Россия;

факс: +7(812)2346868;

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

fax: +7(812)2346868;

telephone: +7(911)2247462;

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

Блок 2. Информация об авторах

Степанова Е.А., к.б.н., в.н.с., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт–Петербург, Россия. Тел.

+7(921)5950370. E–mail: fedorova.iem@gmail.com

Ekaterina A. Stepanova, PhD, Leading Researcher, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia. Phone:

+7(921)5950370. E–mail: fedorova.iem@gmail.com

Баженова Е.А., к.б.н., с.н.с., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт–Петербург, Россия. Тел.:

+7(911)7488033, E–mail: sonya.01.08@mail.ru

Ekaterina A. Bazhenova, PhD, Senior Research Fellow, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia. Phone:

+7(911)7488033. E–mail: sonya.01.08@mail.ru

Чистякова А.К., н.с., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия. Тел.: +7(921)3138740, E-mail: anna.k.chistiakova@gmail.com

Anna K. Chistyakova, Researcher, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia. Phone: +7(921)3138740. E-mail: anna.k.chistiakova@gmail.com

Pei-Fong Wong, н.с., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия. Тел.: +7(969)7153322, E-mail: po333222@gmail.com

Pei-Fong Wong, Researcher, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia. Phone: +7(969)7153322. E-mail: po333222@gmail.com

Ларионова Н.В., д.б.н., в.н.с., 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 Researcher, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia. Phone: +7(921)3328061. E-mail: nvlarionova@mail.ru

Кузьмичева В.В., лаборант-исследователь, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия. Тел.: +7(963)3441743, E-mail: veralynx178@gmail.com

Vera V. Kuzmicheva, Laboratory Research Assistant, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia. Phone: +7(963)3441743, E-mail: veralynx178@gmail.com

Руденко Л.Г., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия. Тел. +7(921)9318396, E-mail: vaccine@mail.ru

Rudenko L.G., Ph.D., D.Sci., Professor, Chief Researcher, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, St Petersburg, Russia. Phone: +7(921)9318396, E-mail: vaccine@mail.ru

Блок 3. Метаданные статьи

ВЛИЯНИЕ ЯИЧНО–АДАПТАЦИОННОЙ ЗАМЕНЫ G141R В
ГЕМАГГЛЮТИНИНЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА В ЛИНИИ В/ВИКТОРИЯ
THE EFFECT OF THE G141R EGG–ADAPTIVE SUBSTITUTION ON THE
BIOLOGICAL PROPERTIES OF CURRENTLY CIRCULATING INFLUENZA
B VIRUSES OF THE B/VICTORIA LINEAGE

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ G141R
THE EFFECT OF THE G141R SUBSTITUTION

Ключевые слова: вирусы гриппа В; Викторианская линия; мутации в
гемагглютинине; адаптация к субстрату; яично–адаптационная замена G141R;
антигенные свойства; биологические свойства.

Keywords: influenza B viruses; B/Victoria lineage; substitutions in hemagglutinin;
adaptation to substrate; G141R egg–adaptive mutation; antigenic properties;
biological properties.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 16,

количество таблиц – 5,

количество рисунков – 1.

26.07.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Номер и ссылка	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., Ларионова Н.В., Желтухина, А.И. Эволюция вируса гриппа В: разнообразие биологических свойств сквозь призму генетической изменчивости // <i>Инфекция и иммунитет</i> . 2024. Т. 14. № 5. С. 845–861.	[Kiseleva I.V., Larionova N.V., Zheltukhina A.I. Evolution of the influenza B virus: diversity of biological properties through the prism of genetic variability. <i>Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity</i> , 2024, vol. 14. no 5, pp. 845–861. (in Russ.)]	doi: 10.15789/2220-7619-IBV-17624
2.	Киселева И.В., Ларионова Н.В., Литвинова О.М., Иванова В.В., Исакова И.Н., Медведева Т.Е.,	[Kiseleva I.V., Larionova N.V., Litvinova O.M., Ivanova V.V.,	–

	Александрова Г.И., Руденко Л.Г. Изменение признака температурочувствительности как отражение эволюционной изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа // <i>Медицинский академический журнал</i> . 2002. Т. 2. № 3. С. 49–57.	Isakova I.N., Medvedeva T.E., Alexandrova G.I., Rudenko L.G. Change of temperature sensitivity as a reflection of evolutionary variability of wild-type influenza viruses. <i>Medical Academic Journal</i> , 2002, vol. 2, no 3, pp. 49–57. (in Russ.)]	
3.	Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Степанова Е.А., Руденко Л.Г. Оптимизация свойств реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины, полученных методами обратной генетики // <i>Инфекция и иммунитет</i> . 2023. Т. 13. № 6. С. 1018–1026.	[Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Stepanova E.A., Rudenko L.G. Optimization of the properties of reassortant strains of live influenza vaccine obtained by reverse genetics. <i>Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and</i>	doi: 10.15789/2220-7619-DOR-2449

		<i>Immunity, 2023, vol. 13. no 6, pp. 1018–1026. (in Russ.)]</i>	
4.	Полежаев Ф.И., Александрова Г.И. Выделение температурочувствительных штаммов вируса гриппа в эпидемию, вызванную вирусом А/Виктория в 1975–1976 гг. // <i>Вопросы вирусологии. 1979. Т. 24. № 4. С. 430.</i>	[Polezhaev F.I., Aleksandrova G.I. Isolation of temperature-sensitive strains of the influenza virus in the epidemic caused by the A/Victoria virus in 1975–1976. <i>Voprosy Virusologii = Vopr Virusol</i> , 1979, vol. 24, no. 4, P. 430. (in Russ.)]	PMID: 483779 URL: https://translated.turbopages.org/proxy_u/en-ru.ru.719debc3-65f40b2b-c55bdeef-74722d776562/https/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/483779/
5.	Полежаев Ф.И., Смородинцев А.А. Роль температурочувствительных мутантов в естественной эволюции вируса гриппа // <i>Вопросы вирусологии. 1986. Т. 31. № 2. С. 148–152.</i>	[Polezhaev F.I., Smorodintsev A.A. Role of temperature-sensitive mutants in the natural evolution of the influenza virus]. <i>Voprosy Virusologii = Vopr Virusol</i> , 1986, vol. 31, no. 2, pp. 48–152. (in Russ.)]	PMID: 3524000 URL: https://translated.turbopages.org/proxy_u/en-ru.ru.34a3a6c7-65f40d78-3b222086-74722d776562/https/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3524000/

6.	Сорокин Е.В., Иванова А.А., Царева Т.Р., Комиссарова К.С., Амосова И.В., Комиссаров А.Б., Грудинин М.П.. Антигенная структура гемагглютини́на вируса гриппа В/Массачусетс/02/2012 // <i>Международный научно–исследовательский журнал</i> . 2023. Т. 12. №. 138. С. 1–13.	[Sorokin E.V., Ivanova A.A., Tsareva T.R., Komissarova K.S., Amosova I.V., Komissarov A.B., Grudinin M.P. Antigenic structure of the haemagglutinin of influenza virus B/Massachusetts/02/2012. <i>International Research Journal</i> , 2023, vol. 12, no 138, pp. 1–13. (in Russ.)]	doi: 10.23670/IRJ.2023.138.217
7.	Beigel J.H., Farrar J., Han A.M., Hayden F.G., Hyer R., de Jong M.D., Lochindarat S., Nguyen T.K., Nguyen T.H., Tran T.H., Nicoll A., Touch S., Yuen K.Y. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. <i>N Engl J Med</i> , 2005, 353(13):1374–1385.	–	doi: 10.1056/NEJMra052211
8.	Chang D., Lin M., Song N., Zhu Z., Gao J., Li S., Liu H., Liu D., Zhang Y., Sun W., Zhou X., Yang B., Li	–	doi: 10.1186/s12985-023-02115-x

	Y., Wang L., Xiao Z., Li K., Xing L., Xie L., Sharma L. The emergence of influenza B as a major respiratory pathogen in the absence of COVID-19 during the 2021–2022 flu season in China. <i>Virol J</i> , 2023, 20(1):189.		
9.	Chen Z., Aspelund A., Jin H. Stabilizing the glycosylation pattern of influenza B hemagglutinin following adaptation to growth in eggs. <i>Vaccine</i> , 2008, 26(3):361–371.	–	doi: 10.1016/j.vaccine.2007.11.013
10.	Galloway S.E., Reed M.L., Russell C.J., Steinhauer D.A. Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. <i>PLoS Pathog</i> , 2013, 9(2):e1003151.	–	doi: 10.1371/journal.ppat.1003151
11.	Heikkinen T., Ikonen N., Ziegler T. Impact of influenza B lineage-level mismatch between trivalent seasonal influenza vaccines and circulating	–	doi: 10.1093/cid/ciu664

	viruses, 1999–2012. <i>Clin Infect Dis</i> , 2014, 59(11):1519–1524.		
12.	Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., L, C., Kawakami E., Yamada S., Kiso M., Suzuki Y., Maher E.A., Neumann G., Kawaoka Y. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. <i>Nature</i> , 2012, 486(7403):420–428.	–	doi: 10.1038/nature10831
13.	Isakova–Sivak I., Matyushenko V., Stepanova E., Matushkina A., Kotomina T., Mezhenkaya 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	–	doi: 10.3390/vaccines8020196

	cytotoxic T–cell responses and protect mice against both infections. <i>Vaccines (Basel)</i> , 2020, 8(2):196.		
14.	Kiseleva I., Sua Q., Toner T.J., Szymkowiak C., Kwan W.-S., Rudenko L., Shawa A.R., Youil R. Cell–based assay for the determination of temperature sensitive and cold adapted phenotypes of influenza viruses. <i>J Virol Methods</i> , 2004, 116(1):71–78.	–	doi: 10.1016/j.jviromet.2003.10.012
15.	Koutsakos M., Wheatley A.K., Laurie K., Kent S.J., Rockman S. Influenza lineage extinction during the COVID–19 pandemic? <i>Nat Rev Microbiol</i> , 2021, 19(12):741–742.	–	doi: 10.1038/s41579-021-00642-4
16.	Larionova N., Kiseleva I., Isakova I., Litvinova O., Klimov A., Rudenko L. Naturally occurring temperature–sensitive strains of influenza B virus. <i>International Journal of Recent Scientific Research</i>	–	doi: 10.1016/j.virusres.2004.11.016

	(the 1 st IVW–2004 Conference proceedings). 2004, pp. 92–97.		
17.	Lugovtsev V.Y., Vodeiko G.M., Levandowski R.A. Mutational pattern of influenza B viruses adapted to high growth replication in embryonated eggs. <i>Virus Res</i> , 2005. 109(2):149–157.	–	
18.	Martín J., Wharton S.A., Lin Y.P., Takemoto D.K., Skehel J.J., Wiley D.C., Steinhauer D.A. Studies of the binding properties of influenza hemagglutinin receptor–site mutants. <i>Virology</i> , 1998, 241(1):101–111.	–	doi: 10.1006/viro.1997.8958
19.	Ortiz de Lejarazu–Leonardo R., Montomoli E., Wojcik R., Christopher S., Mosnier A., Pariani E., Trilla Garcia A., Fickenscher H., Gärtner B.C., Jandhyala R., Zambon M., Moore C. Estimation of reduction in influenza vaccine effectiveness due to egg–adaptation changes–systematic literature review	–	doi: 10.3390/vaccines9111255

	and expert consensus. <i>Vaccines (Basel)</i> , 2021, 9(11):1255.		
20.	Oxford J.S., Corcoran T., Schild G.C. Naturally occurring temperature-sensitive influenza A viruses of the H1N1 and H3N2 subtypes. <i>J Gen Virol</i> , 1980, 48(pt. 2):383–389.	–	doi: 10.1099/0022-1317-48-2-383
21.	Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. <i>Am J Epidemiol</i> , 1938, 27(3):493–497.	–	doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
22.	Reina J. The Victoria and Yamagata lineages of influenza B viruses, unknown and undervalued. <i>Rev Esp Quimioter</i> , 2022, 35(3):231–235.	–	doi: 10.37201/req/159.2021
23.	Robertson J. Clinical influenza virus and the embryonated hen's egg. <i>Rev Med Virol</i> , 1993, 3:97–106.	–	doi: 10.1002/rmv.1980030206
24.	Robertson J.S., Naeve C.W., Webster R.G., Bootman J.S., Newman R., Schild G.C. Alterations in the	–	doi: 10.1016/0042-6822(85)90105-9

	hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. <i>Virology</i> , 1985, 143(1):166–174.		
25.	Rose A.M., Lucaccioni H., Marsh K., Kirsebom F., Whitaker H., Emborg H.D., Bolt Botnen A., O'Doherty M.G., Pozo F., Hameed S.S., Andrews N., Hamilton M., Trebbien R., Lauenborg Møller K., Marques D.F., Murphy S., McQueenie R., Lopez–Bernal J., Cottrell S., Bucholc M., Kissling E. Interim 2024/25 influenza vaccine effectiveness: eight European studies, September 2024 to January 2025. <i>Euro Surveill</i> , 2025, 30(7):2500102.	–	doi: 10.2807/1560-7917.ES.2025.30.7.2500102
26.	Sanger F., Nicklen S., Coulson A R. DNA sequencing with chain–terminating inhibitors. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 1977, 74(12):5463–5467.	–	doi: 10.1073/pnas.74.12.5463

27.	Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. <i>Vaccine</i> , 1985, 3(suppl. 3):215–218.	–	doi: 10.1016/0264-410x(85)90109-4
28.	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. <i>J Virol Methods</i> , 2016, 227:33–39.	–	doi: 10.1016/j.jviromet.2015.10.009
29.	Shelton H., Roberts K.L., Molesti E., Temperton N., Barclay W.S. Mutations in haemagglutinin that affect receptor binding and pH stability increase replication of a PR8 influenza virus with H5 HA in the upper respiratory tract of ferrets and may contribute to transmissibility. <i>J Gen Virol</i> , 2013, 94(Pt 6):1220–1229.	–	doi: 10.1099/vir.0.050526-0 .

30.	Vijaykrishna D., Holmes E.C., Joseph U., Fourment M., Su Y.C., Halpin R., Lee R.T., Deng Y.M., Gunalan V., Lin X., Stockwell T.B., Fedorova N.B., Zhou B., Spirason N., Kühnert D., Bošková V., Stadler T., Costa A.M., Dwyer D.E., Huang Q.S., Jennings L.C., Rawlinson W., Sullivan S.G., Hurt A.C., Maurer–Stroh S., Wentworth D.E., Smith G.J., Barr I. G. The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. <i>Elife</i> , 2015, 4:e05055.	–	doi: 10.7554/eLife.05055
31.	Wen F., Li L., Zhao N., Chiang M.J., Xie H., Cooley J., Webby R., Wang P.G., Wan, X.F. A Y161F hemagglutinin substitution increases thermostability and improves yields of 2009 H1N1 influenza A virus in cells. <i>J Virol</i> , 2018, 92(2):e01621–17.	–	doi: 10.1128/jvi.01621-17
32.	WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. 153 p.	–	URL: https://www.who.int/publications/i/item/manual-for-the-

			laboratory-diagnosis-and-virological-surveillance-of-influenza
33.	WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2022 southern hemisphere influenza season.	–	URL: https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2022-southern-hemisphere-influenza-season
34.	WHO. Report prepared for the WHO Consultation on the composition of influenza virus vaccines for the Northern Hemisphere 2024/2025. Vaccine Composition Meeting: Montreux, 19–22 February 2024.	–	URL: https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2024-05/WIC-VCM-NH202425.pdf
35.	Wilson J., Zhou R., Liu H., Rothman R., Fenstermacher K., Pekosz A. Antigenic alteration of	–	doi: 10.3389/fviro.2022.933440

	2017–2018 season influenza B vaccine by egg–culture adaption. <i>Frontiers in Virology</i> , 2022, 2:933440.		
36.	Wong P.F., Isakova–Sivak I., Stepanova E., Krutikova E., Bazhenova E., Rekstin A., Rudenko L. Development of cross–reactive live attenuated influenza vaccine candidates against both lineages of influenza B virus. <i>Vaccines (Basel)</i> , 2024, 12(1):95.	–	doi: 10.3390/vaccines12010095
37.	Zaraket H., Hurt A.C., Clinch B., Barr I., Lee N. Burden of influenza B virus infection and considerations for clinical management. <i>Antiviral Res</i> , 2021, 185:104970.	–	doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104970