

# РАЗРАБОТКА РЕАССОРТАНТНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН: КЛАССИЧЕСКОЕ СКРЕЩИВАНИЕ ИЛИ ОБРАТНАЯ ГЕНЕТИКА?



И.В. Киселева, Л.Г. Руденко

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Важной особенностью гриппозных вакцин, отличающей их от других иммунобиологических препаратов, является то, что они не имеют постоянного состава. В связи с непрерывной антигенной изменчивостью вируса гриппа производство вакцин нуждается в своевременном обеспечении актуальными вакцинными штаммами, что невозможно при отсутствии адекватного метода своевременной, быстрой и бесперебойной подготовки вакцинных штаммов. Среди лицензированных гриппозных вакцин особое место занимают классические инактивированные и живые гриппозные вакцины. Их основу составляют реассортантные вакцинные штаммы, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с так называемым донорским штаммом (холодоадаптированным донором аттенуации для живых гриппозных вакцин или донором высокой урожайности для инактивированных вакцин). Вакцинные штаммы для лицензированных живых аттенуированных гриппозных вакцин представляют собой реассортантные вирусы с так называемой формулой генома 6:2 — два гена, кодирующих гемагглютинин и нейраминидазу (НА и NA) принадлежат актуальному эпидемическому вирусу, а шесть генов, кодирующих внутренние белки (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) — холодоадаптированному донору аттенуации. Доноров аттенуации существует очень ограниченное количество. В России это холодоадаптированные вирусы А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69, в США (компания MedImmune) — вирусы А/Ann Arbor/6/60ca (H2N2) и В/Ann Arbor/1/66ca. MedImmune производит вакцинные штаммы методом обратной генетики. Для других стран использование этого подхода для получения вакцин ограничено необходимостью приобретения лицензии у патентообладателей. В России пока не разрешены генетические манипуляции со штаммами для сезонной живой гриппозной вакцины, поэтому реассортанты для отечественной живой гриппозной вакцины создаются только путем классической реассортации в куриных эмбрионах. Штаммы для инактивированной гриппозной вакцины готовят только методом классической реассортации, требования к ним более гибкие и допускают различные сочетания генов от «дикого» вируса и донорского штамма. В качестве доноров внутренних генов используют высокоурожайные вирусы, такие как А/PR/8/34 (H1N1), А/Texas/1/77 (H3N2), В/Lee/40 и некоторые другие. К сожалению, метод классической реассортации не всегда позволяет оперативно получить реассортантный вирус с формулой генома 6:2. Этому мешает ряд причин, начиная с уникальных свойств конкретного эпидемического вируса и заканчивая констелляцией генов. Метод обратной генетики на основе плазмид представляет собой альтернативный подход к созданию реассортантных вакцинных штаммов, который позволяет гарантированно и быстро получать реассортантные вирусы заданной формулы генома 6:2. Однако и этот

## Адрес для переписки:

Киселева Ирина Васильевна  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: 8 (812) 234-68-60.  
Факс: 8 (812) 234-68-68.  
E-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

## Contacts:

Irina V. Kiseleva  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Academician Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-68-60.  
Fax: +7 (812) 234-68-68.  
E-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

## Для цитирования:

Киселева И.В., Руденко Л.Г. Разработка реассортантных гриппозных вакцин: классическое скрещивание или обратная генетика? // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 209–218. doi: 10.15789/2220-7619-DOR-2449

## Citation:

Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of reassortant influenza vaccines: classical reassortment or reverse genetics? // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 209–218. doi: 10.15789/2220-7619-DOR-2449

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-25-00070.

This work was supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 23-25-00070.

© Киселева И.В., Руденко Л.Г., 2023

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-DOR-2449>

метод имеет определенные слабые места. В настоящем обзоре рассматриваются преимущества и недостатки подготовки реассортантных гриппозных вакцин методами обратной генетики и классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах.

**Ключевые слова:** грипп, профилактика, живые гриппозные вакцины, инактивированные гриппозные вакцины, реассортанты, обратная генетика.

## DEVELOPMENT OF REASSORTANT INFLUENZA VACCINES: CLASSICAL REASSORTMENT OR REVERSE GENETICS?

Kiseleva I.V., Rudenko L.G.

*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** An important feature of influenza vaccines, which distinguishes them from other immunobiological preparations, is that they have no fixed composition. Due to the constant influenza virus antigenic variability, production facilities require timely supply with relevant vaccine strains undoable due to the lack of proper method for the convenient, rapid and uninterrupted development of vaccine strains. Among the licensed influenza vaccines, classical inactivated and live influenza vaccines hold a special place. They are based on reassortant vaccine strains obtained by crossing currently circulating influenza virus with the so-called donor strain (cold-adapted attenuation donor for live influenza vaccines or high yield donor for inactivated vaccines). Vaccine strains for licensed live attenuated influenza vaccines are reassortants with the so-called 6:2 genome formula — two genes encoding hemagglutinin and neuraminidase (HA and NA) belong to the current epidemic virus, and six genes encoding internal proteins (PB2, PB1, PA, NP, M and NS) — to cold-adapted master donor virus. There is a very limited number of donors of attenuation. In Russia, there are cold-adapted viruses A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and B/USSR/60/69; in the USA (MedImmune) there are viruses A/Ann Arbor/6/60ca (H2N2) and B/Ann Arbor/1/66ca. MedImmune produces vaccine strains using reverse genetics technique. For other countries, this approach for obtaining vaccines is limited due to the need to purchase a license from the patent holders. In Russia, genetic manipulations with strains for the seasonal live influenza vaccine are not yet allowed; reassortants for the Russian live influenza vaccine are created only by classical reassortment in embryonated chicken eggs. Vaccine candidates for the inactivated influenza vaccine are prepared by the classical reassortment method, the requirements for them are more flexible and allow to use diverse genes combinations from “wild type” virus and master donor virus. High-yielding viruses such as A/PR/8/34 (H1N1), A/Texas/1/77 (H3N2), B/Lee/40 and some others are used as donors of internal genes. Unfortunately, the classical reassortment method does not always allow to promptly obtain a reassortant virus with a 6:2 genome formula. This is hindered by a number of reasons, ranging from the unique properties of a certain epidemic virus ending up with the constellation of genes. The reverse genetics method based on plasmids is an alternative approach to create reassortant vaccine strains allowing to reliably and quickly obtain reassortant viruses of a set 6:2 genome formula. However, this method also has certain weaknesses. This review discusses the advantages and disadvantages of development of conventional influenza vaccine candidates by reverse genetics and classical reassortment in developing chick embryos.

**Key words:** influenza, prophylaxis, live influenza vaccines, inactivated influenza vaccines, reassortants, reverse genetics.

## Введение

Способность вирусов гриппа к реассортации была установлена в середине XX в. благодаря новаторским работам таких ученых, как Frank Burnet и George Hirst, и с тех пор активно используется в научных исследованиях и практике, в частности, при подготовке гриппозных вакцин. Современные гриппозные вакцины представляют собой трех- и даже четырехкомпонентный препарат, состоящий из вирусов гриппа А(H1N1), А(H3N2) и вируса(ов) гриппа В одной или двух генетических линий. Важной особенностью гриппозных вакцин, отличающей их от любых других иммунологических препаратов, является то, что они не имеют постоянного состава штаммов. В связи с изменчивостью антигенных свойств виру-

са гриппа, для поддержания высокого уровня профилактической эффективности производство нуждается в регулярном и своевременном обеспечении новыми актуальными вакцинными штаммами.

Реассортантные вакцинные штаммы составляют основу современных живых (ЖГВ) [57] и инактивированных (ИГВ) [56] гриппозных вакцин. Эти вакцины представляют собой реассортанты, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с донорским штаммом (холодоадаптированным донором аттенуации для живых гриппозных вакцин или донором высокой урожайности для инактивированных вакцин). В настоящее время для подготовки штаммов реассортантных гриппозных вакцин используются методы классической реассортации и обратной генети-

ки [19, 58]. Метод классической реассортации не всегда позволяет получить реассортантный вирус с вакцинной формулой генома 6:2 (белки HA и NA — от эпидемического («дикого») родителя, а PB2, PB1, PA, NP, M и NS — от донорского штамма). Этому мешает ряд причин, начиная с уникальных свойств конкретного эпидемического вируса и заканчивая констелляцией генов [12, 26, 27, 49]. Все это увеличивает объем работы и отнимает много времени. Метод обратной генетики представляет собой альтернативный подход к созданию реассортантных вакцинных штаммов, который позволяет гарантированно и быстро получать реассортантные вирусы заданной формулы генома, свободные от мутаций, неизбежно появляющихся в геноме в результате пассирования вирусов в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) [8, 19].

В настоящем обзоре рассматриваются преимущества и недостатки подготовки реассортантных гриппозных вакцин методами обратной генетики и классической реассортации в РКЭ.

## Реассортантные гриппозные вакцины. Оптимальный состав генома вакцинного штамма

### Живые реассортантные гриппозные вакцины

Современные живые реассортантные гриппозные вакцины представляют собой реассортанты, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с аттенуированным холодоадаптированным (ХА) донором аттенуации. Всего четыре ХА (приспособленных к репликации при низких температурах — 25–26°C) вируса используются в мире в качестве доноров для лицензированных ЖГВ: два отечественных донора — А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 [1] и два донора для вакцины американской компании MedImmune — А/Ann Arbor/6/60са (H2N2) и В/Ann Arbor/1/66са [10].

Для получения реассортантного вакцинного штамма для ЖГВ с вакцинной формулой генома 6:2 из восьми сегментов РНК от «дикого» вируса в геноме реассортанта оставляют только гены, кодирующие HA и NA, ответственные за антигенную новизну и иммуногенность вакцины. Остальные шесть сегментов, отвечающих за безопасность ЖГВ, получают от ХА донора аттенуации; они передают кандидату ЖГВ температурную чувствительность (неспособность к репликации при температурах выше оптимального диапазона), ХА фенотип и способность к активной репликации в РКЭ при оптимальной температуре [45, 46]. Такой со-

став генома считается оптимальным для живой гриппозной вакцины. Вакцинный вирус сохраняет способность размножаться в эпителии верхних дыхательных путей и индуцировать в ходе бессимптомной инфекции все основные звенья приобретенного иммунитета.

Классический метод получения реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ с формулой генома 6:2 включает в себя скрещивание в РКЭ при 32°C родительских вирусов (ХА донора аттенуации и эпидемического вируса, взятых в равных инфекционных дозах), селективные пассажы в присутствии антисыворотки к донору аттенуации при пониженной до 25–26°C температуре с последующим клонированием предельными разведениями [45, 46]. Теоретически при скрещивании двух штаммов вируса гриппа возможно формирование 256+2 различных комбинаций генов. Использование двух мощных селектирующих факторов — антисыворотки к донору аттенуации и пониженной температуры инкубации — приводит к существенному снижению количества нежелательных комбинаций, однако в ряде случаев их число продолжает оставаться достаточно большим, о чем речь пойдет ниже.

Кандидаты для отечественной ЖГВ на основе доноров А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 получают путем классической реассортации в РКЭ [30, 46, 47, 53]. Кандидаты в ЖГВ, основанные на американских донорах А/Ann Arbor/6/60са (H2N2) и В/Ann Arbor/1/66са, конструируют с тем же составом генома 6:2, но используют для этого методы обратной генетики [6, 10, 32]. Независимо от метода получения, кандидаты в ЖГВ сохраняют полный набор аттенуирующих мутаций и, как следствие, типичный для вакцинных штаммов ЖГВ температурочувствительный и холодоадаптированный фенотип.

### Инактивированные реассортантные гриппозные вакцины

Штаммы для ИГВ готовят методом классической реассортации [35]. В отличие от ЖГВ, требования к штаммам для ИГВ более гибкие и допускают разнообразные сочетания генов от «дикого» вируса и донорского штамма. В качестве доноров внутренних генов используют высокоурожайные вирусы А/PR/8/34 (H1N1), А/Texas/1/77 (H3N2), В/Lee/40 или реассортантные вакцинные штаммы для ИГВ [35]. В последнем случае в состав генома реассортанта для ИГВ могут входить гены от трех разных родительских вирусов [35]. При подготовке вакцинных штаммов для ИГВ должны соблюдаться два важных условия: 1) гены, кодирующие поверхностные белки HA и NA, принадлежат эпидемическому вирусу и 2) в состав генома

входят гены (донора или эпидемического вируса), обеспечивающие высокую урожайность реассортанта. В частности, для получения реассортантов-кандидатов в ИГВ типа А с высокими титрами гемагглютинина необходим М-ген от донора А/PR/8/34 (H1N1) [7, 14, 20], а для кандидатов в ИГВ типа В – ген NP от донора В/Lee/40 [28, 36].

### Особенности классической реассортации

При классической реассортации в РКЭ природа создает реассортанты, содержащие оптимальные жизнеспособные сочетания родительских генов; как правило, 6:2 реассортанты получаются достаточно легко. Однако иногда при классическом скрещивании в РКЭ желаемый состав генома 6:2 оказывается неоптимальным. Определенные композиции генома, и в том числе 6:2, могут оказаться функционально несовместимыми и имеют пониженную жизнеспособность. Как результат, в вирусном потомстве будут преобладать другие, более жизнеспособные комбинации. Целый ряд публикаций подтверждает это предположение. Так, Subbarao и др. [49] не удалась реассортация вирусов гриппа человека А(H1N1) с вирусами гриппа чаек А(H13N6) с желаемым составом генома 6:2. Реассортанты вирусов гриппа А(H5N2) [42] или А(H1N1)pdm09 [17, 54] с формулой генома 5:3, полученные классическим способом, оказались более высокоурожайными, чем их 6:2 аналоги. Gilbertson и др. [15] продемонстрировали, что 5:3 реассортанты, содержащие ген PB1 от «дикого» вируса А(H1N1)pdm09, а HA и NA — от вирусов А(H5N1) или А(H7N9), обеспечивали более высокую урожайность, чем 6:2 варианты. Авторы предположили, что PB1 ген «дикого» вируса А(H1N1)pdm09 обеспечивает реассортантным вирусам преимущества в росте. В 2009 г. для улучшения репликационных свойств кандидатов в ИГВ были подготовлены два классических реассортантных вируса для ИГВ с формулой генома 5:3 (X-181 и X-181A) с тремя генами (PB1, HA и NA) от пандемического вируса А/California/07/2009 (H1N1)pdm09 и пятью — от донора А/PR/8/34 [17, 54]. Вероятно, для данных пар родительских вирусов формула 6:2 не была оптимальной.

5:3 реассортант для ЖГВ (гены HA, NA и M происходили от родителя «дикого» типа) по данным РТГА оказался более иммуногенным для мышей, чем его 6:2 аналог [59]. Классическая реассортация не привела и к получению 6:2 кандидатов в ЖГВ на основе вирусов гриппа птиц H5N2 или H5N1 и ХА донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2); авторами были получены только 7:1 реассортанты, унаследовавшие от «дикого» родителя единственный ген — HA [12, 26, 27]. Однако

в клинических испытаниях живые гриппозные вакцины против потенциально пандемического гриппа H5N1, подготовленные на основе таких 7:1 реассортантов, были безопасны и иммуногенны [40, 41], не уступая в выраженности иммунного ответа сезонным ЖГВ.

### Биологические свойства «дикого» родительского вируса, влияющие на эффективность его классической реассортации с донорским штаммом

Эпидемические вирусы гриппа обладают целым рядом уникальных биологических свойств, таких как термостойкость/термолабильность репродукции при температурах, находящихся за верхними пределами температурного оптимума (38–40°C) [3, 4], чувствительность гемагглютинина к рН и высоким температурам [11, 33, 48], непосредственным образом связанная с его стабильностью, холодоустойчивость/холодостойкость репродукции при температурах, находящихся за нижними пределами температурного оптимума (25–26°C) [4], чувствительность к неспецифическим гамма-ингибиторам сыворотки крови [3, 24, 31, 43], способность агглютинировать эритроциты определенных видов животных (современные вирусы гриппа А(H1N1)pdm09 и В агглютинируют эритроциты широкого спектра видов животных и птиц, таких как куры, индейки, лошади, морские свинки и человека 0 (I) группы крови, в то время как вирусы А(H3N2) вступают в реакцию гемагглютинации только с эритроцитами морской свинки и человека) [18, 51, 55].

Из-за особенностей селективирующих факторов классического скрещивания эпидемических вирусов с ХА донорами аттенуации живой гриппозной вакцины, два момента оказывают существенное влияние на эффективность реассортации — холодоустойчивость/холодостойкость репродукции эпидемических вирусов и их чувствительность к неспецифическим гамма-ингибиторам сыворотки крови. Под эффективностью реассортации в данном контексте мы подразумеваем эффективность (%) выхода реассортантов с формулой генома 6:2.

В схему подготовки реассортантов для инактивированной гриппозной вакцины входят пассажи только при оптимальной температуре инкубации [35], поэтому здесь фактор устойчивости/чувствительности «дикого» родительского вируса к пониженной температуре роли не играет. В данном случае остается только одно свойство «дикого» родительского вируса, которое может повлиять на эффективность реассортации — его ингибиторочувствительность.

### Чувствительность вирусов «дикого» типа к неспецифическим термостабильным сывороточным гамма-ингибиторам

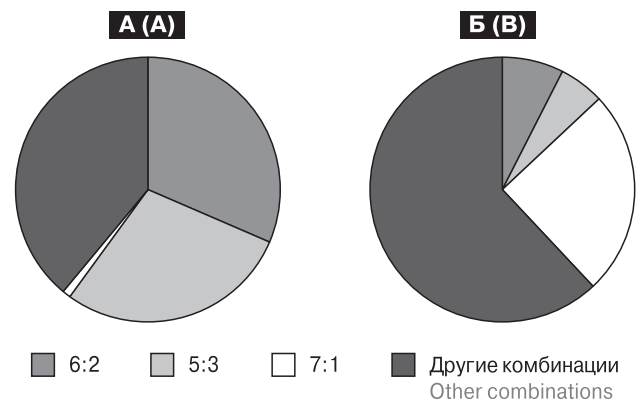
Среди биологических свойств вирусов гриппа особое место занимает их чувствительность к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам сыворотки [24, 31, 43]. Из-за различной рецепторной специфичности вирусы гриппа «дикого» типа проявляют заметные различия в ингибиторочувствительности. Вирусы гриппа А(Н3N2), которые преимущественно связываются с рецепторами альфа-2,6, высокочувствительны к сывороточным термостабильным гамма-ингибиторам, в то время как штаммы А(Н1N1) с альфа-2,3 или смешанной альфа-2,3/альфа-2,6 специфичностью проявляют устойчивый к гамма-ингибиторам фенотип [21, 37, 38]. Что касается вирусов гриппа В, то до 1970–80-х гг. подавляющее их большинство обладало ингибиторостойчивым фенотипом. После разделения в 1980-х гг. вирусов гриппа В на две генетические линии, В/Victoria и В/Yamagata [39], викторианские вирусы сохранили высокий уровень устойчивости к ингибиторам, а вирусы линии В/Yamagata приобрели к ним высокую чувствительность [5].

Использование антидонорской сыворотки при приготовлении вакцинных штаммов методом классического скрещивания в РКЭ [46, 47, 53] обеспечивает избирательное преимущество реассортантов в наследовании HA и NA от антигенно релевантного вируса «дикого» типа. Однако получение 6:2 реассортантов на основе ингибиторочувствительных «диких» вирусов может быть существенно затруднено неспецифическим связыванием их HA с термостабильными гамма-ингибиторами, сохраняющимися в любой сыворотке после ее обработки рецептор-разрушающим ферментом и, таким образом, постоянно присутствующими и в сыворотке против донорского вируса [2, 21].

Данные, представленные в [2, 21], были использованы нами для построения рисунка. Анализ состава генома 883 реассортантов, полученных методом классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах ХА доноров аттенуации с 40 вирусами гриппа «дикого» типа, обладающими разной степенью чувствительности к неспецифическим гамма-ингибиторам, выявил следующую закономерность: вне зависимости от чувствительности или устойчивости эпидемических родительских штаммов к ингибиторам все реассортанты унаследовали HA от «дикого» родителя; при этом принадлежность остальных генов варьировала. Большинство реассортантов на основе ингибиторостойчивых вирусов «дикого» типа (89%) унаследовали «дикую» NA; при этом около трети полученных реассортантов (31%) обладали вакцинной формулой генома 6:2 (рис., А).

Напротив, эффективность получения 6:2 реассортантов была значительно ниже (7%), если «дикий» родительский вирус обладал высокой степенью чувствительности к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам. В этом случае наблюдалось нарушение конstellации генов, кодирующих HA и NA — только четверть всех реассортантов унаследовали от «дикого» вируса одновременно и HA, и NA, а три четверти — «дикий» HA и донорскую NA. При этом 25% составили реассортанты с формулой генома 7:1 (рис., Б).

Таким образом, чувствительность вирусов «дикого» типа к ингибиторам становится серьезным препятствием для эффективного пригото-



**Рисунок. Геномный состав реассортантов (в %), полученных методом классической реассортации ХА доноров аттенуации для ЖГВ с (А) 20 резистентными или (Б) 20 чувствительными к неспецифическим термостабильным гамма-ингибиторам «дикими» вирусами гриппа А(Н1N1), А(Н2N2), А(Н3N2), В/Victoria и В/Yamagata (по материалам [2, 21])**

Figure. Genome composition (%) of reassortant influenza virus strains derived by classical reassortment of cold-adapted master donor viruses with A(H1N1), A(H2N2), A(H3N2), B/Victoria lineage, and B/Yamagata lineage wild type influenza viruses: (A) 20 resistant or (B) 20 sensitive to nonspecific thermostable gamma-inhibitors (based on [2, 21])

**Примечание.** Состав генома 6:2 — HA и NA унаследованы от «дикого» родителя, а 6 внутренних генов унаследованы от донора; состав генома 5:3 — HA, NA и один из внутренних генов унаследованы от «дикого» родителя, остальные пять внутренних генов унаследованы от донора; состав генома 7:1 — HA унаследован от «дикого» родителя, все внутренние гены и NA унаследованы от донора.

Note. 6:2 genome composition — HA and NA are inherited from the wild type parent, and 6 internal genes are inherited from master donor virus; 5:3 genome composition — HA, NA and one of the internal genes are inherited from the wild type parent virus strain, the other five internal genes are inherited from master donor virus; 7:1 genome composition — HA is inherited from wild type parent, all internal genes and NA are inherited from master donor virus.

ления методом классической реассортации вакцинных реассортантов 6:2 для ЖГВ, поскольку в процессе скрининга участвует иммунная сыворотка против донорского штамма, содержащая значительное количество термостабильных гамма-ингибиторов. Наоборот, устойчивость к ингибиторам гарантирует более быстрый и стабильный результат при получении вакцинных штаммов. Разработка ЖГВ на основе классического метода реассортации выиграла бы, если бы ВОЗ рекомендовала для производства вакцин вирусы с высоким уровнем устойчивости к ингибиторам. С другой стороны, чувствительные к ингибиторам вирусы предпочитают альфа-2,6-связи [38], более характерные для вирусов гриппа млекопитающих. Поэтому на данный момент вопрос, каким должен быть вакцинный штамм — чувствительным или устойчивым к ингибиторам, остается открытым.

#### **Холодоустойчивость репродукции эпидемических вирусов при температурах, находящихся за нижними пределами температурного оптимума**

В природе циркулируют не только термочувствительные вирусы, которых достаточно много, но иногда появляются и холодоустойчивые вирусы, размножающиеся при температуре инкубации, пониженной до 25–26°C [23]. Для «диких» вирусов использование термина «ХА» (холодоадаптированные) не совсем корректно, так как эти вирусы не были адаптированы к низким температурам путем искусственных лабораторных манипуляций. Уместнее было бы говорить о вирусах «дикого» типа, обладающих естественной устойчивостью к низким температурам.

ХА-фенотип природно устойчивых к холоду эпидемических вирусов гриппа нарушает те этапы процесса подготовки ХА вакцинных штаммов для ЖГВ, которые осуществляются при пониженной до 25–26°C температуре. Потеря ХА-селективного фактора может привести к значительному увеличению общего числа ХА-реассортантов, но количество реассортантов для ЖГВ с желаемым составом генома 6:2 уменьшится.

Поскольку этап холодовой инкубации в процессе подготовки вакцинных штаммов ИГВ отсутствует, свойство природной холодоадаптированности, присущее отдельным «диким» вирусам, не отражается негативно на эффективности приготовления вакцинного штамма.

### **Плюсы и минусы обратной генетики**

#### **Преимущества метода обратной генетики при подготовке гриппозных вакцин**

Открытие полимеразной цепной реакции [44] и технологии обратной генетики на основе плазмид [16] дали возможность не только

реконструировать реликтовые [50, 52] и современные эпидемические вирусы гриппа, но и быстро и бесперебойно создавать реассортантные штаммы для гриппозных вакцин [9, 16, 34]. Обратной-генетический подход имеет ряд неоспоримых преимуществ при получении вакцинных штаммов. Технологии обратной генетики позволяют искусственно манипулировать геномом вируса гриппа и являются мощным инструментом для создания «суррогатного» реассортантного вируса с любым желаемым геномным составом. Кроме того, обратная-генетический подход снижает вероятность спонтанного появления нежелательных мутаций [13, 17, 34]. Во время пандемии гриппа, когда необходимо очень быстро произвести большое количество вакцин, метод обратной генетики может быть предпочтительнее классического подхода. Более того, только он позволяет получать кандидатные реассортантные вакцины против высокопатогенных вирусов птичьего гриппа с делецией детерминант высокой патогенности в гене, кодирующем гемагглютинин (многоосновный сайт расщепления) [17].

Говоря о преимуществах обратной-генетических технологий не следует забывать, что круг гриппозных вакцин очень широк и не ограничивается только лицензированными классическими реассортантными вакцинами, ИГВ и ЖГВ. В настоящее время активно разрабатываются вакцины нового поколения, такие как разнообразные универсальные вакцины, основанные на векторных и других технологиях, и их конструирование невозможно без методов обратной генетики [25, 29].

#### **Недостатки метода обратной генетики при подготовке реассортантных гриппозных вакцин**

Все вышесказанное касалось неоспоримых преимуществ метода обратной генетики. Однако у него есть и другая сторона. Теоретически этот метод кажется быстрее, так как в этом случае нет необходимости тратить время на первые этапы классической реассортации. На самом деле качество этого метода не всегда может быть удовлетворительным; реассортанты, принудительно полученные искусственным путем, могут оказаться менее жизнеспособными, обладающими невысокой репродуктивной активностью, из-за чего могут потребоваться дополнительные пассажи вирусного потомства в РКЭ для достижения дополнительной адаптации и повышения инфекционных титров вируса [8].

Одна из причин, по которой классический метод реассортации для производства гриппозных вакцин может быть предпочтительнее подходов обратной генетики, заключается в том, что он позволяет осуществлять естественный отбор

вариантов с оптимальным набором мутаций, улучшающим ростовые свойства реассортанта в РКЭ [14, 60]. Это важно, поскольку производство живых гриппозных вакцин базируется на использовании РКЭ. При реассортации, проводимой методом классического скрещивания вируса «дикого» типа с донорским штаммом, вирусное потомство проходит не менее 7 пассажей в РКЭ (скрещивание родительских вирусов, два селективных пассажа, при необходимости — 1–2 слепых пассажа, 2–3 клонирования и накопление отобранного реассортанта) [22, 30, 46, 47, 53]. Следует также учитывать и те пассажи, которые осуществляются уже на производстве. В результате вирусное потомство приобретает дополнительные адаптационные к репродукции в РКЭ мутации, что приводит к преимущественному отбору быстрорастущих реассортантов, эффективно размножающихся в РКЭ. Это можно сравнить с процессом микроэволюции вируса, в результате которой в куриных эмбрионах происходит естественный отбор наиболее жизнеспособных и наиболее приспособленных к репликации в РКЭ клонов.

Известны случаи, когда методом классической реассортации вообще не удавалось получить реассортанты с желаемой формулой генома 6:2 [26, 27, 49]. В такой ситуации на помощь может прийти обратная генетика, которая позволит принудительно сконструировать реас-

сортант с нужной формулой генома. Однако следует учитывать, что природа не терпит насилия. Будет ли такой реассортант 6:2 достаточно хорош? Нужно ли идти против природы, если оптимальная конstellляция генов для данной пары родительских вирусов не 6:2, а, например, 5:3 или 7:1? Что лучше — генно-инженерная 6:2 конструкция сомнительного качества или высокопродуктивный реассортант 7:1, полученный естественным путем? Эти вопросы все еще ждут ответов.

## Заключение

Оба описанных в обзоре метода имеют свои сильные и слабые стороны, свои достоинства и недостатки. В каких случаях лучше использовать методы классической реассортации, а в каких — обратно-генетические подходы? Очевидно, что если речь идет о, например, создании векторных вакцин, когда нужно изменить антигенную структуру вируса-носителя путем встраивания в него антигенно-значимых эпитопов чужеродного патогена, то это возможно только с использованием методов обратной генетики. В случае же создания классических гриппозных вакцин, живых или инактивированных, методы обратной генетики и классической реассортации могут эффективно дополнять друг друга.

## Список литературы/References

1. Жданов В.М., Александрова Г.И., Гендон Ю.З. Живая гриппозная рекомбинантная вакцина в СССР: Разработка, изучение и практическое использование // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1986. № 7. С. 3–14. [Zhdanov V.M., Alexandrova G.I., Ghendon Y.Z. Live influenza recombinant vaccine in the USSR: Development, study and practical use. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1986, no. 7, pp. 3–14. (In Russ.)]
2. Киселева И.В., Баженова Е.А., Ларионова Н.В., Федорова Е.А., Дубровина И.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. Особенности реассортации современных штаммов вируса гриппа с донорами аттенуации живой гриппозной вакцины // Вопросы вирусологии. 2013. Т. 58, № 5. С. 26–31. [Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Larionova N.V., Fedorova E.A., Dubrovina I.A., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. Peculiarity of reassortment of current wild type influenza viruses with master donor viruses for live influenza vaccine. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, vol. 58, no. 5, pp. 26–31. (In Russ.)]
3. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Влияние биологических свойств сезонных вирусов гриппа на эффективность подготовки штаммов живой гриппозной вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2019. № 5. С. 24–34. [Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Grigorieva E.P., Rudenko L.G. The influence of seasonal influenza viruses biological features on the effectiveness of development strains for live influenza vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 5, pp. 24–34. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2019-5-24-34
4. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Эволюция вирусов гриппа по признаку чувствительности к температуре репродукции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2019. № 6. С. 47–55. [Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Evolution of influenza viruses based on sensitivity to temperature of replication. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 6, pp. 47–55. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2019-6-47-55
5. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Исакова И.Н., Литвинова О.М., Руденко Л.Г. Фенотипические особенности эпидемических штаммов вируса гриппа В разных лет выделения // Вопросы вирусологии. 2006. № 5. С. 38–41. [Larionova N., Kiseleva I., Isakova I., Litvinova O., Rudenko L. Naturally occurring temperature-sensitive strains of influenza B virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2006, vol. 51, no. 5, pp. 38–41. (In Russ.)]
6. Ambrose C.S., Luke C., Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2008, vol. 2, no. 6, pp. 193–202. doi: 10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x
7. Baez M., Palese P., Kilbourne E.D. Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination. *J. Infect. Dis.*, 1980, vol. 141, no. 3, pp. 362–365. doi: 10.1093/infdis/141.3.362

8. Bazhenova E., Kiseleva I., Isakova-Sivak I., Kotomina T. Two alternative approaches to generate live attenuated influenza vaccine candidates against potentially pandemic avian influenza H7N9 virus. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 3363–3365. doi: 10.26717/BJSTR.2018.03.000925
9. Blanco-Lobo P., Nogales A., Rodríguez L., Martínez-Sobrido L. Novel approaches for the development of live attenuated influenza vaccines. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 2: 190. doi: 10.3390/v11020190
10. Carter N.J., Curran M.P. Live attenuated influenza vaccine (Flumist®; FluenzTM): A review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults. *Drugs*, 2011, vol. 71, no. 12, pp. 1591–1622. doi: 10.2165/11206860-000000000-00000
11. Costello D.A., Whittaker G.R., Daniel S. Variations in pH sensitivity, acid stability, and fusogenicity of three influenza virus H3 subtypes. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 1, pp. 350–360. doi: 10.1128/jvi.01927-14
12. Desheva J.A., Lu X.H., Rekstin A.R., Rudenko L.G., Swayne D.E., Cox N.J., Katz J.M., Klimov A.I. Characterization of an influenza A/H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic H5N1 viruses with pandemic potential. *Vaccine*, 2006, vol. 24, no. 47–48, pp. 6859–6866. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.06.023
13. Fodor E., Devenish L., Engelhardt O.G., Palese P., Brownlee G.G., García-Sastre A. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, no. 11, pp. 9679–9682. doi: 10.1128/jvi.73.11.9679-9682.1999
14. Fulvini A.A., Ramanunnair M., Le J., Pokorny B.A., Arroyo J.M., Silverman J., Devis R., Bucher D. Gene constellation of influenza A virus reassortants with high growth phenotype prepared as seed candidates for vaccine production. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 6: e20823. doi: 10.1371/journal.pone.0020823
15. Gilbertson B., Zheng T., Gerber M., Printz-Schweigert A., Ong C., Marquet R., Isel C., Rockman S., Brown L. Influenza NA and PB1 gene segments interact during the formation of viral progeny: localization of the binding region within the PB1 gene. *Viruses*, 2016, vol. 8, no. 8: 238. doi: 10.3390/v8080238
16. Hoffmann E., Krauss S., Perez D., Webby R., Webster R.G. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine*, 2002, vol. 20, no. 25–26, pp. 3165–3170. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00268-2
17. Hussain S., Turnbull M.L., Pinto R.M., McCauley J.W., Engelhardt O.G., Digard P. Segment 2 from Influenza A(H1N1) 2009 pandemic viruses confers temperature-sensitive haemagglutinin yield on candidate vaccine virus growth in eggs that can be epistatically complemented by PB2 701D. *J. Gen. Virol.*, 2019, vol. 100, no. 7, pp. 1079–1092. doi: 10.1099/jgv.0.001279
18. Ito T., Suzuki Y., Mitnaul L., Vines A., Kida H., Kawaoka Y. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology*, 1997, vol. 227, no. 2, pp. 493–499. doi: 10.1006/viro.1996.8323
19. Jin H., Subbarao K. Live attenuated influenza vaccine. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, vol. 386, pp. 181–204. doi: 10.1007/82\_2014\_410
20. Johansson B.E., Bucher D.J., Pokorny B.A., Mikhail A., Kilbourne E.D. Identification of PR8 M1 protein in influenza virus high-yield reassortants by M1-specific monoclonal antibodies. *Virology*, 1989, vol. 171, no. 2, pp. 634–636. doi: 10.1016/0042-6822(89)90638-7
21. Kiseleva I., Larionova N., Fedorova E., Bazhenova E., Dubrovina I., Isakova-Sivak I., Rudenko L. Contribution of neuraminidase of influenza viruses to the sensitivity to sera inhibitors and reassortment efficiency. *Open Microbiol. J.*, 2014, vol. 8, pp. 59–70. doi: 10.2174/1874285801408010059
22. Kiseleva I.V., Larionova N.V., Fedorova E.A., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. New methodological approaches in the development of Russian live attenuated vaccine for pandemic influenza. *Translational Biomedicine*, 2015, vol. 6, no. 2: 13, pp. 1–9. doi: 10.21767/2172-0479.100013
23. Kiseleva I.V., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Larionova N.V., Drieszen-van der Crujisen S.K.M., Basten S.M.C., Heldens J.G.M., van den Bosch H., Rudenko L.G. PB2 and PA genes control the expression of the temperature-sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus. *J. Gen. Virol.*, 2010, vol. 91, pt 4, pp. 931–937. doi: 10.1099/vir.0.017996-0
24. Krizanová O., Rathová V. Serum inhibitors of myxoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1969, vol. 4, pp. 125–151. doi: 10.1007/978-3-642-46160-6\_6
25. Kumar A., Meldgaard T.S., Bertholet S. Novel platforms for the development of a universal influenza vaccine. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: pp. 600. doi: 10.3389/fimmu.2018.00600
26. Larionova N., Kiseleva I., Dubrovina I., Bazhenova E., Rudenko L. Peculiarities of reassortment of a cold-adapted influenza a master donor virus with influenza A viruses containing hemagglutinin and neuraminidase of avian H5N1 origin. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2011, vol. 5, suppl. 1, pp. 346–349.
27. Larionova N., Kiseleva I., Isakova-Sivak I., Rekstin A., Dubrovina I., Bazhenova E., Ross T.M., Swayne D., Gubareva L., Tsvetnitsky V., Fedorova E., Doroshenko E., Rudenko L. Live attenuated influenza vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza: development and preclinical characterization. *J. Vaccines Vaccin.*, 2013, vol. 4, no. 8, pp. 1–11. doi: 10.4172/2157-7560.1000208
28. Le J., Orff E.J., Fulvini A.A., Huang L., Onodera S., Pokorny B.A., Malewicz A., Primakov P., Bucher D.J. Development of high yield reassortants for influenza type B viruses and analysis of their gene compositions. *Vaccine*, 2015, vol. 33, no. 7, pp. 879–884. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.12.027
29. Looi Q.H., Foo J.B., Lim M.T., Le C.F., Show P.L. How far have we reached in development of effective influenza vaccine? *Int. Rev. Immunol.*, 2018, vol. 37, no. 5, pp. 266–276. doi: 10.1080/08830185.2018.1500570
30. Maassab H.F., Bryant M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol.*, 1999, vol. 9, no. 4, pp. 237–244. doi: 10.1002/(sici)1099-1654(199910/12)9:4<237::aid-rmv252>3.0.co;2-g
31. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, no. 8, pp. 6373–6380. doi: 10.1128/jvi.72.8.6373-6380.1998
32. Mohn K.G., Smith I., Sjursen H., Cox R.J. Immune responses after live attenuated influenza vaccination. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2018, vol. 14, no. 3, pp. 571–578. doi: 10.1080/21645515.2017.1377376
33. Nakowitsch S., Wolschek M., Morokutti A., Ruthsatz T., Krenn B.M., Ferko B., Ferstl N., Triendl A., Muster T., Egorov A., Romanova J. Mutations affecting the stability of the haemagglutinin molecule impair the immunogenicity of live attenuated



- H3N2 intranasal influenza vaccine candidates lacking NS1. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 19, pp. 3517–3524. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.100
34. Neumann G., Watanabe T., Ito H., Watanabe S., Goto H., Gao P., Hughes M., Perez D.R., Donis R., Hoffmann E., Hobom G., Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, no. 16, pp. 9345–9350. doi: 10.1073/pnas.96.16.9345
  35. NIBSC. Candidate influenza vaccine viruses. 2022. Accessed 21 January 2023. URL: [https://www.nibsc.org/science\\_and\\_research/virology/influenza\\_resource/\\_full\\_reagent\\_update.aspx](https://www.nibsc.org/science_and_research/virology/influenza_resource/_full_reagent_update.aspx)
  36. NIBSC. Influenza reagents. 2022. Accessed 21 January 2023. URL: [https://nibsc.org/products/brm\\_product\\_catalogue/influenza\\_reagents.aspx](https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/influenza_reagents.aspx)
  37. Rogers G.N., D'Souza B.L. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology*, 1989, vol. 173, no. 1, pp. 317–322. doi: 10.1016/0042-6822(89)90249-3
  38. Rogers G.N., Pritchett T.J., Lane J.L., Paulson J.C. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: Selection of receptor specific variants. *Virology*, 1983, vol. 131, no. 2, pp. 394–408. doi: 10.1016/0042-6822(83)90507-x
  39. Rota P.A., Wallis T.R., Harmon M.W., Rota J.S., Kendal A.P., Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*, 1990, vol. 175, no. 1, pp. 59–68. doi: 10.1016/0042-6822(90)90186-u
  40. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S., Mironov A., Rekestin A., Grigorieva E., Donina S., Gambaryan A., Katlinsky A. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I-II clinical trials). *Influenza Other Respir. Viruses*, 2008, vol. 2, no. 6, pp. 203–209. doi: 10.1111/j.1750-2659.2008.00064.x
  41. Rudenko L., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Larionova N., Pisareva M., Krivitskaya V., Flores J. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study. *Vaccine*, 2015, vol. 33, no. 39, pp. 5110–5117. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.08.019
  42. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Varich N.L., Ilyushina N.A., Gambaryan A.S., Krylov P.S., Kaverin N.V. Effect of gene constellation and postreassortment amino acid change on the phenotypic features of H5 influenza virus reassortants. *Arch. Virol.*, 2007, vol. 152, no. 6, pp. 1139–1145. doi: 10.1007/s00705-006-0931-8
  43. Ryan-Poirier K.A., Kawaoka Y. Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. *J. Virol.*, 1991, vol. 65, no. 1, pp. 389–395. doi: 10.1128/jvi.65.1.389-395.1991
  44. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, vol. 230, no. 4732, pp. 1350–1354. doi: 10.1126/science.2999980
  45. Shcherbik S., Pearce N., Carney P., Bazhenova E., Larionova N., Kiseleva I., Rudenko L., Kumar A., Goldsmith C.S., Dugan V., Stevens J., Wentworth D.E., Bousse T. Evaluation of A(H1N1)Pdm09 LAIV vaccine candidates stability and replication efficiency in primary human nasal epithelial cells. *Vaccine X*, 2019, vol. 2: 100031. doi: 10.1016/j.jvax.2019.100031
  46. 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
  47. Shcherbik S.V., Pearce N.C., Levine M.L., Klimov A.I., Villanueva J.M., Bousse T.L. Rapid strategy for screening by pyrosequencing of influenza virus reassortants-candidates for live attenuated vaccines. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 3: e92580. doi: 10.1371/journal.pone.0092580
  48. Singanayagam A., Zambon M., Barclay W.S. Influenza virus with increased pH of hemagglutinin activation has improved replication in cell culture but at the cost of infectivity in human airway epithelium. *J. Virol.*, 2019, vol. 93, no. 17: e00058–19. doi: 10.1128/jvi.00058-19
  49. Subbarao K., Webster R.G., Kawaoka Y., Murphy B.R. Are there alternative avian influenza viruses for generation of stable attenuated avian-human influenza A reassortant viruses? *Virus Res*, 1995, vol. 39, no. 2–3, pp. 105–118. doi: 10.1016/0168-1702(95)00082-8
  50. Taubenberger J.K., Reid A.H., Krafft A.E., Bijwaard K.E., Fanning T.G. Initial genetic characterization of the 1918 Spanish influenza virus. *Science*, 1997, vol. 275, no. 5307, pp. 1793–1796. doi: 10.1126/science.275.5307.1793
  51. Trombetta C.M., Ulivieri C., Cox R.J., Remarque E.J., Centi C., Perini D., Piccini G., Rossi S., Marchi S., Montomoli E. Impact of erythrocyte species on assays for influenza serology. *J. Prev. Med. Hyg.*, 2018, vol. 59, no. 1, pp. E1–E7. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2018.59.1.870
  52. Tumpey T.M., Basler C.F., Aguilar P.V., Zeng H., Solórzano A., Swayne D.E., Cox N.J., Katz J.M., Taubenberger J.K., Palese P., Garcia-Sastre A. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 2005, vol. 310, no. 5745, pp. 77–80. doi: 10.1126/science.1119392
  53. Wareing M.D., Marsh G.A., Tannock G.A. Preparation and characterisation of attenuated cold-adapted influenza 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
  54. WHO. Availability of two new candidate reassortant vaccine viruses for pandemic (H1N1) 2009 virus vaccine development. 14 September 2009. URL: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/vaccines/who-recommendations/candidate-vaccine-viruses/docs/default-source/influenza/cvvs/archive-2009/200908-1> (Accessed 21 January 2023)
  55. WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. URL: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1) (Accessed 4 December 2020)
  56. WHO. Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated). Annex 3. TRS No 977. 2013. URL: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-quality/recommendations-for-the-production-and-control-of-influenza-vaccine-\(inactivated\)b0ed4c58-8154-496d-bf91-624734826500.pdf?sfvrsn=cfd1432\\_1&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-quality/recommendations-for-the-production-and-control-of-influenza-vaccine-(inactivated)b0ed4c58-8154-496d-bf91-624734826500.pdf?sfvrsn=cfd1432_1&download=true) (Accessed 21 January 2023)

57. WHO. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of influenza vaccines (human, live attenuated) for intranasal administration. Annex 4, TRS No 977. 2013. URL: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/influenza/trs\\_977\\_annex\\_4.pdf?sfvrsn=92690fd7\\_3&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/influenza/trs_977_annex_4.pdf?sfvrsn=92690fd7_3&download=true) (Accessed 21 January 2023)
58. WHO. Vaccines against Influenza: WHO position paper. 2022. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/354264/WER9719-eng-fre.pdf> (Accessed 21 January 2023)
59. Wolkerstorfer A., Katinger D., Romanova J. Factors affecting the immunogenicity of the live attenuated influenza vaccine produced in continuous cell line. *Microbiology Independent Research Journal*, 2016, no. 3, pp. 13–24. doi: 10.18527/2500-2236-2016-3-1-13-24
60. Wong S.S., Webby R.J. Traditional and new influenza vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 3, pp. 476–492. doi: 10.1128/cmr.00097-12

---

**Авторы:**

**Киселева И.В.**, д.б.н., профессор, зав. лабораторией общей вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**Руденко Л.Г.**, д.м.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Kiseleva I.V.**, DSc (Biology), Professor, Head of the Laboratory of General Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Rudenko L.G.**, DSc (Medicine), Professor, Head of the A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 23.01.2023  
Принята к печати 04.03.2023

Received 23.01.2023  
Accepted 04.03.2023