

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

Ларионова Н. В. ¹,
Киселева И. В. ¹,
Баженова Е. А. ¹,
Степанова Е. А. ¹,
Руденко Л. Г. ¹

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

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

Larionova N. V. ^a,

Kiseleva I. V. ^a,

Bazhenova E. A. ^a,

Stepanova E. A. ^a,

Rudenko L. G. ^a

^aInstitute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia.

Резюме

Классическая реассортация в развивающихся куриных эмбрионах является хорошо отработанной методикой для получения штаммов живой гриппозной вакцины. Сформированные естественным путем реассортантные вакцинные штаммы характеризуются высокой репродуктивностью, генетически стабильными признаками температурочувствительности и холодоустойчивости, полностью соответствующими характеристикам донора аттенуации, участвующего в скрещивании с эпидемическим вирусом. Наряду с антигенной актуальностью, естественная реассортация гарантирует аттенуацию вакцинных штаммов, хорошую репродуктивность в клетках верхних дыхательных путей и неспособность к репродукции в нижних отделах респираторного тракта. Однако при классической реассортации скорость и эффективность получения вакцинных реассортантов в существенной степени зависят от уникальных свойств эпидемического вируса, и поэтому не могут быть стабильными. Возможности генно-инженерных технологий привлекают тем, что позволяют получать вакцинные реассортанты быстро и эффективно, снижают вероятность появления спонтанных мутаций, позволяют работать с высокопатогенными вирусами, однако вакцинный штамм лишается преимуществ естественного отбора, при котором происходит селекция наиболее жизнеспособных клонов. В настоящем исследовании представлены результаты сравнительной оценки штаммов живой гриппозной вакцины А(Н3N2), полученных параллельно методами классической реассортации и генно-инженерной сборки по критериям, подтверждающим наследование вакцинными штаммами необходимых свойств, гарантирующих их безвредность и высокую репродуктивность в куриных эмбрионах. Реассортантные штаммы для живой гриппозной вакцины, полученные обоими методами, сохраняли все аттенуирующие мутации, унаследованные от донора аттенуации, были высокорепродуктивными при оптимальной температуре, их

температурочувствительность соответствовала этому признаку у донора аттенуации. Однако у штаммов, полученных методом обратной генетики, наблюдалась частичная утрата холодоустойчивости по сравнению с холодоустойчивостью донора аттенуации и реассортантов из классического скрещивания. Снижение холодоустойчивости может негативно повлиять на эффективность вакцины. Важно, что за несколько дополнительных пассажей в куриных эмбрионах при пониженной температуре холодоустойчивость вакцинного реассортантного штамма, собранного генно-инженерным путем, удалось повысить. Из этого следует, что холодоустойчивость вирусов является фенотипическим признаком, степень проявления которого зависит от температурных условий культивирования вируса. При конструировании реассортантов методами обратной генетики отсутствует необходимый селективный фактор пониженная температура инкубации. Чтобы холодоустойчивый фенотип реализовался в полной мере, необходимо дополнительное культивирование генно-инженерных реассортантов при пониженной температуре. Таким образом, метод обратной генетики с использованием плазмидной технологии дает возможность эффективной подготовки реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины. Важным этапом получения вакцинных штаммов с помощью генно-инженерных приемов должен быть контроль их холодоадаптированного фенотипа и, при необходимости, оптимизация холодоустойчивого фенотипа дополнительными пассажами при пониженной температуре.

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

Abstract

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

incubation temperature is missing in reverse genetics. In order for the cold-adapted phenotype to be fully realized, additional passages at low temperature of RG-reassortants are necessary. Thus, the reverse genetics method using plasmid technology allows to effectively prepare reassortant strains for LAIV. An important stage in obtaining vaccine strains using genetic engineering techniques should be the control of their cold-adapted phenotype and its optimization by additional passages at low temperature.

Keywords: influenza virus; live attenuated influenza vaccine (LAIV); cold adaptation (ca-sign); temperature sensitivity (ts-sign); attenuation; natural reassortment (NR); reverse genetic reassortment (RGR).

1 1 ВВЕДЕНИЕ

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

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

17 В настоящее время известны два методических приема получения
18 реассортантных штаммов для ЖГВ: 1. Метод классической реассортации в
19 развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) [1, 23]; 2. Метод обратно-генетической
20 сборки с использованием плазмид [10, 11, 25].

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

28 Опыт использования в нашей стране и в мире генно-инженерных вакцин, в
29 частности против SARS-CoV-2 [18], открывает перспективы для использования

30 технологии обратной генетики также при разработке штаммов ЖГВ, что может дать
31 возможность получать штаммы ЖГВ существенно быстрее.

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

36 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

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

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

52 *Температурочувствительность вирусов гриппа* оценивали в РКЭ по разности
53 инфекционных титров при оптимальной (32-33°C) и повышенной до 39°C
54 температуре инкубации. Вирусы считали температурочувствительными, т.е.
55 демонстрирующими *ts* признак, если эта разница (RCT – reproductive capacity at
56 different temperatures) составляла не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, и
57 температуроустойчивыми (*non-ts* признак), если RCT не превышала 3,5 lg ЭИД₅₀/мл.

58 *Степень холодоустойчивости вирусов гриппа* оценивали в РКЭ по разности

59 инфекционных титров при оптимальной (32-33°C) и пониженной до 26°C
60 температуре инкубации. Вирусы считали холодочувствительными, т.е.
61 демонстрирующими *non-ca* признак, если RCT₂₆ составляла не менее 4,5 lg
62 ЭИД₅₀/мл, и холодоустойчивыми (*ca* признак), если RCT₂₆ не превышала 3,5 lg
63 ЭИД₅₀/мл.

64 *Получение штаммов ЖГВ методом классической реассортации в РКЭ.*
65 Реассортацию эпидемических вирусов гриппа А с отечественным донором
66 аттенуации А/Ленинград/134/17/59 (H2N2) для получения NR-вакцинных штаммов
67 проводили в 10-11 дневных РКЭ по стандартной методике [1, 23]. Этапы работы
68 включали: одновременное инфицирование РКЭ при оптимальной температуре
69 рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения актуальным
70 эпидемическим вирусом и донором аттенуации А/Ленинград/134/57 (H2N2),
71 селективные пассажи и клонирование в присутствии селектирующих факторов:
72 пониженной до 25-26°C температуры и нейтрализующих антител против
73 поверхностных гликопротеинов донора аттенуации, последующие 1-2
74 дополнительных клонирования при оптимальной температуре и накопление готового
75 вакцинного NR-штамма.

76 *Генно-инженерная сборка штаммов ЖГВ с помощью плазмид.* RG-
77 реассортанты получали по протоколу Isakova-Sivak с соавт. [13] с использованием
78 комплекта плазмид, кодирующих гены донора аттенуации А/Ленинград/17/134/57.
79 Гены НА и NA эпидемически актуального вируса клонировали в вектор для
80 обратной генетики вируса гриппа (pCIPolISapIT) по сайтам рестрикции SapI. Для
81 этого из биоматериала, содержащего вирус гриппа, выделяли РНК набором Ампли-
82 Прайм РИБО-ПРЕП (Россия), постановку ПЦР осуществляли с использованием
83 набора OneTaq One-Step (New England Biolabs) и комплекта специфических
84 праймеров, вносящих на концы сегментов сайты для клонирования генов
85 эндонуклеазой SapI [11]. Фрагменты очищали из геля, производили рестрикцию
86 эндонуклеазой SapI (New England Biolabs) и лигировали в вектор pCIPolISapIT,
87 обработанный рестриктазой SapI с использованием лигазы T4 (Евроген, Россия).

88 Полученным материалом трансформировали клетки *E. coli*, и производили скрининг
89 колоний. Отбирали колонии бактерий, содержащие плазмиды, кодирующие гены HA
90 и NA целевого вируса, и не содержащие замен в последовательности. Из колоний
91 накапливали биомассу и выделяли пДНК в препаративных количествах наборами
92 Биолабмикс макси-преп (Новосибирск, Россия). Контроль последовательности
93 вставки в плазмиду осуществляли методом сэнгеровского секвенирования [21]
94 (детали метода приведены ниже).

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

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

110 *Полногеномное секвенирование вирусов гриппа.* Кандидатные штаммы в ЖГВ
111 подвергали полногеномному секвенированию. Выделение вирусной РНК проводили
112 при помощи набора Ампли-прайм РИБО-ПРЕП (Россия). Амплификацию генов
113 перед секвенированием осуществляли одношаговым набором для ОТ-ПЦР ОТ-ПЦР
114 Биомастер (Биолабмикс, Россия), фрагменты разделяли в 1% агарозном геле, после
115 чего производили очистку набором Claen-Up (Евроген, Россия). Полученные
116 фрагменты секвенировали с помощью капиллярного секвенатора 3130xl Genetic

117 Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя с
118 использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
119 (ThermoFischer Scientific). Анализ последовательности производили в программе
120 Unipro Ugene [19]. Последовательности эпидемических вирусов гриппа получали из
121 базы данных GISAID (<https://gisaid.org/>).

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

124 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

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

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

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

137 *Активность репродукции вакцинных реассортантов в РКЭ при разных*
138 *температурах инкубации.* Сравнение ростовых характеристик реассортантных
139 штаммов ЖГВ проводили при оптимальной 32°C и пограничных температурах:
140 пониженной до 26°C и повышенной до 39°C. Исследовали NR-штаммы ЖГВ,
141 которые прошли 7-8 пассажей в РКЭ в процессе их получения и RGR штаммы ЖГВ,
142 которые после сборки в клетках Vero, из-за особенностей методики, прошли в РКЭ
143 всего 2-3 пассажа.

144 Результаты оценки характеристик репродуктивности вакцинных штаммов,
145 полученных по NR и RGR технологиям, при разных температурах представлены в

146 таблице 2.

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

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

153 Все штаммы ЖГВ-NR обладали выраженными *ts*- и *ca*-характеристиками,
154 соответствующими *ts/ca* характеристикам донора аттенуации (Табл. 2). Следует
155 заметить, что все исследованные вирусы, независимо от их принадлежности к
156 определенной субкладе, оказались природно температурочувствительными, но в
157 меньшей степени, чем донор аттенуации А/Ленинград/134/157 (H2N2). Степень
158 температурочувствительности штаммов ЖГВ-NR и ЖГВ-RGR соответствовала
159 температурочувствительности донора аттенуации.

160 Что же касается оценки репродукции RG-реассортантов при пониженной
161 температуре, то все они отличались сниженной холодоустойчивостью по сравнению
162 с холодоустойчивостью донора аттенуации и реассортантов из классического NR-
163 скрещивания. Четыре из семи RGR-штаммов для ЖГВ по использованным
164 критериям, прописанным в разделе Материалы и методы, не могли быть отнесены к
165 обладающим *ca*-фенотипом, у остальных трех сохранилась холодоустойчивость, но
166 она была снижена в сравнении со штаммами ЖГВ-NR и с донором аттенуации. В
167 среднем, штаммы ЖГВ-RGR были менее холодоустойчивы на 0,5 – 2,1 lg ЭИД₅₀ по
168 сравнению со штаммами ЖГВ-NR. Все эпидемические вирусы обладали *non-ca*
169 фенотипом.

170 Поскольку уровень холодоустойчивости RG-вакцинных штаммов не
171 соответствовал стандартным значениям, принятым для характеристики штаммов
172 ЖГВ [5], на модели вакцинного реассортанта А/Darwin/09/2021-RG (H3N2) была
173 исследована возможность оптимизировать *ca*-фенотип штаммов ЖГВ-RG. Были
174 проведены его последовательные пассажи в РКЭ при 26°C. У штамма ЖГВ на основе

175 A/Darwin/09/2021-RG (H3N2), который характеризовался недостаточной
176 холодоустойчивостью ($RCT_{26}=4,6 \lg ЭИД_{50}$), постепенно повышалась способность к
177 репродукции при 26°C, и за три пассажа в РКЭ при пониженной температуре
178 инкубации его *sa*-фенотип практически сравнился с *sa*-фенотипом NR-аналога (Рис.
179 1).

180 4 ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

200 Приемы обратной генетики позволяют получать вакцинные реассортанты
201 быстро и эффективно, снижают вероятность появления спонтанных мутаций,
202 позволяют работать с высокопатогенными вирусами, однако вакцинный штамм
203 лишается преимуществ естественного отбора, при котором происходит селекция

204 наиболее жизнеспособных клонов, способных, в частности, эффективно
205 размножаться РКЭ [4, 25].

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

212 Наши исследования показали, что оба методических приема получения
213 вакцинных штаммов NR и RGR позволяют получать высокорепродуктивные при
214 оптимальной температуре штаммы ЖГВ. При обоих способах получения вакцинных
215 штаммов обеспечивается генетическая стабильность аттенуирующих мутаций, а *ts*-
216 фенотип штаммов ЖГВ-RGR в полной мере соответствует *ts*-фенотипу штаммов
217 ЖГВ-NR.

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

229 Частичная утрата *ca*-фенотипа штаммами, полученными генно-инженерными
230 методами, может повлиять на эффективность ЖГВ. Однако представленные в работе
231 результаты быстрой и эффективной адаптации RG-реассортанта А(Н3N2) к
232 репродукции при 26°C свидетельствуют о том, что холодоустойчивость легко

233 удастся повысить за несколько последовательных пассажей при пониженной
234 температуре.

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

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

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

261 Одна из причин, по которой традиционный метод классической реассортации

262 при получении штаммов ЖГВ-NR предпочтительней для качества вакцинного
263 препарата в сравнении с RG-технологией, заключается в том, что он предполагает
264 естественный отбор таких вариантов, которые имеют констелляцию генов,
265 оптимизирующую ростовые свойства вируса в РКЭ, что является важнейшим
266 аспектом производственного процесса. Отсутствие естественной селекции может
267 отрицательно сказываться на биологических характеристиках RG-реассортантов для
268 ЖГВ. Однако, новаторские RG-технологии бесспорно являются привлекательными,
269 поскольку позволяют гарантированно получать реассортантные вирусы вакцинной
270 формулы генома, свободные от ненужных мутаций, которые могут появиться в
271 геноме в результате серийного пассирования в РКЭ. Представленные данные
272 подтверждают перспективность RG-вакцинных штаммов ЖГВ, однако их
273 подготовка должна осуществляться под строгим контролем и, при необходимости,
274 коррекции фенотипа полученных реассортантов.

275 Таким образом, метод обратной генетики с использованием плазмидной
276 технологии (1) дает возможность эффективной подготовки реассортантных штаммов
277 для ЖГВ. По характеристикам репродукции при повышенной и оптимальной
278 температурах штаммы ЖГВ-RG сравнимы с вакцинными штаммами, полученными в
279 результате классической реассортации, что гарантирует их аттенуацию и важную
280 для производства высокую репродуктивность. (2) Стабильности генотипа RG
281 реассортантов оказалось недостаточно для оптимального проявления их *sa*
282 фенотипа. (3) Важным этапом получения штаммов ЖГВ-RG должен быть контроль
283 их холодадаптированного фенотипа и, при необходимости, оптимизация *sa*
284 фенотипа дополнительными пассажами в РКЭ при пониженной температуре.

ТАБЛИЦЫ

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

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

Белок Protein	Позиция амино- кислоты Amino acid position	<i>non-ts/ non-ca</i> Len/wt*	<i>ts/ca</i> Len17	Аминокислотные замены в генах, кодирующих внутренние белки вакцинных реассортантов, полученных на основе указанных эпидемических вирусов А(H3N2) Amino acid substitutions in genes encoding internal proteins of vaccine reassortants obtained based on the indicated epidemic A(H3N2) viruses													
				A/Singapore/ GPO454/2018		A/Kansas/ 14/2017		A/Brisbane/ 190/2017		A/Switzerland/ 8060/2017		A/Abu Dhabi/ 240/2018		A/SouthAustralia/ 34/2019		A/Darwin/ 09/2021	
				NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR	NR	RGR
PB2	478	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
PB1	265	Lys	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	
	591	Val	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	
PA	28	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	
	341	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
NP	ген NP донора аттенуации Лен17 не содержит кодирующих мутаций the NP gene of the MDV Len17 does not contain coding mutations																
M1	15	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
M2	86***	Ala	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	
NS2	100	Met	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	

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

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

Вирус A(H3N2) Virus A(H3N2)	Клада Clade	WT*/ Реассортант WT*/ Reassortant	Инфекционный титр (lg ЭИД ₅₀ /мл) **** Infectious titer (log ₁₀ EID ₅₀ /mL)****			RCT ***** (lg ЭИД ₅₀) (log ₁₀ EID ₅₀)		Фенотип Phenotype	
			32°C	26 °C	39 °C	26 °C	39 °C		
A/Singapore/GPO454/2018	3C.2a1	WT	7,8±0,1	2,0±0,1	1,7±0,3	5,8	6,1	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
		NR**	8,6±0,2	6,2±0,1	1,2±0,0	2,4	7,4	<i>ca</i>	<i>ts</i>
		RGR***	9,1±0,2	5,7±0,2	≤1,2±0,0	3,4	≥7,9	<i>ca</i>	<i>ts</i>
A/Kansas/14/2017	3C.3a	WT	7,7±0,3	2,0±0,2	2,1±0,1	5,6	≥5,6	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
		NR	8,0±0,2	4,9±0,3	≤1,2±0,0	3,1	≥6,8	<i>ca</i>	<i>ts</i>
		RGR	8,0±0,2	3,4±0,1	≤1,2±0,0	4,6	≥6,8	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
A/Brisbane/190/2017	3C.2a2	WT	7,7±0,3	2,0±0,1	1,2±0,0	5,7	≥6,5	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
		NR	8,5±0,1	5,5±0,2	≤1,2±0,0	3,0	≥7,3	<i>ca</i>	<i>ts</i>
		RGR	7,9±0,2	4,7±0,1	≤1,2±0,0	3,2	≥6,7	<i>ca</i>	<i>ts</i>
A/Switzerland/8060/2017	3C.2a2	WT	6,8±0,4	1,2±0,1	2,5±0,2	5,6	4,3	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
		NR	9,2±0,1	6,2±0,2	1,2±0,1	3,0	8,0	<i>ca</i>	<i>ts</i>
		RGR	9,2±0,1	5,5±0,2	≤1,2±0,0	3,7	≥8,0	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
A/Abu Dhabi/240/2018	3C.2a1b	WT	6,8±0,2	2,0±0,1	2,2±0,3	4,8	4,6	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
		NR	9,1±0,1	6,7±0,1	1,7±0,2	2,4	7,4	<i>ca</i>	<i>ts</i>
		RGR	8,5±0,1	4,0±0,2	1,2±0,1	4,5	7,3	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
A/South Australia/34/2019	3C.2a1b	WT	7,7±0,1	2,7±0,1	1,2±0,0	5,0	≥6,5	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
		NR	8,2±0,2	6,0±0,4	≤1,2±0,0	2,2	≥7,0	<i>ca</i>	<i>ts</i>
		RGR	8,9±0,1	6,2±0,2	≤1,2±0,0	2,7	≥7,7	<i>ca</i>	<i>ts</i>
A/Darwin/09/2021	3C.2a1b.2a.2	WT	8,2±0,2	2,2±0,0	1,7±0,4	6,0	6,5	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
		NR	9,2±0,1	6,3±0,2	1,2±0,0	2,9	8,0	<i>ca</i>	<i>ts</i>

		RGR	9,0±0,1	4,4±0,2	1,2±0,1	4,6	7,8	<i>non-ca</i>	<i>ts</i>
A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) MDV		NR	9,4±0,1	7,4±0,0	≤1,2±0,0	2,0	≥7,4	<i>ca</i>	<i>ts</i>

Примечания: *Len/wt - эпидемический вирус А/Ленинград/134/57 (H2N2) является «диким» предшественником донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Len17);

*WT – (wild type) эпидемический вирус.

**NR – (Natural Reassortment) полученные классическим методом реассортации.

***RGR – (Reverse Genetic Reassortment) полученные обратно-генетическими методом.

****ЭИД₅₀/мл – 50% эмбриональная инфекционная доза вируса.

*****RСТ – (Reproductive Capacity at Different Temperatures) разность репродуктивной активности при оптимальной 32°C и при пониженной до 26°C температуре.

**Популяция донора аттенуации Лен17 гетерогенна по этой позиции, часть ее не содержит мутацию Ala–86–Thr [13, 15].

Notes: *Len/wt - epidemic virus A/Leningrad/134/57 (H2N2) is a “wild” precursor of the MDV A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) (Len17).

**The population of MDV Len17 is heterogeneous for this position; part of it contains no the mutation Ala–86–Thr [13, 15];

*WT – wild type virus.

**NR – (Natural Reassortment) obtained by classical reassortment method.

***RGR – (Reverse Genetic Reassortment) obtained using reverse genetic method.

****ЭИД₅₀ – 50% embryo infective dose.

*****RСТ – (Reproductive Capacity at Different Temperatures) the difference in reproductive capacity at an optimal temperature of 32°C and at a temperature reduced to 26°C.

РИСУНКИ

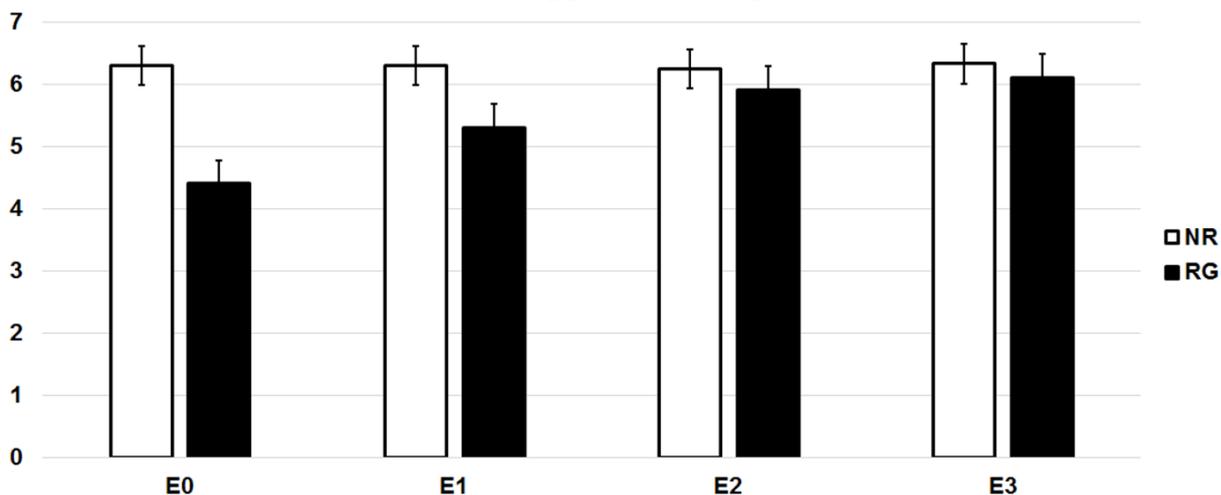
Рисунок 1. Изменение *ca*-фенотипа штаммов ЖГВ-NR и ЖГВ-RG на основе эпидемического вируса A/Darwin/09/2021 (H3N2) при последовательных пассажах в развивающихся куриных эмбрионах при 26°C.

По оси абсцисс: Число дополнительных пассажей штаммов ЖГВ в РКЭ при 26°C.

По оси ординат: Инфекционный титр вируса в РКЭ при 26°C, lg EID₅₀/mL.

Figure 1. Changes in the *ca*-phenotype of LAIV-NR and LAIV-RG strains based on A/Darwin/09/2021 (H3N2) wild type virus during successive passages in developing chicken embryos at 26°C.

x-axis: The number of additional passages of LAIV strains in eggs at 26°C. On the y-axis: Infectious titer of the virus in eggs at 26°C, lg EID₅₀/mL.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

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

телефон: 8(812)234-42-92 / 8(921)332-80-61;

факс: 8(812)234-68-68;

e-mail: nvlarionova@mail.ru

Natalie V. Larionova – Ph.D., D. Sci., Leading Research Associate, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, Saint Petersburg, Russia;
telephone: 8(812)234-42-92 / 8(921)332-80-61;

fax: 8(812)234-68-68;

e-mail: nvlarionova@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Киселева И. В. – доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия.

Kiseleva I. V. – Ph.D., D.Sci., Professor, Head of the Laboratory, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, Saint Petersburg, Russia.

Баженова Е. А. – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия.

Bazhenova E. A. – Ph.D., Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, Saint Petersburg, Russia.

Степанова Е. А. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия.

Stepanova E. A. – Ph.D., Leading Research Associate, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197376, Saint Petersburg, Russia.

Руденко Л. Г. – доктор медицинских наук, профессор, зав. отделом, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ул. академика Павлова, 12, 197022, Санкт-Петербург, Россия.

Rudenko L. G. – Ph.D., D.Sci., Professor, Head of the Department, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197022, Saint Petersburg, Russia.

Блок 3. Метаданные статьи

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

OPTIMIZATION OF THE PROPERTIES OF REASSORTANT STRAINS OF LIVE INFLUENZA VACCINE OBTAINED BY REVERSE GENETICS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

МЕТОД ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ ДЛЯ ЖГВ

REVERSE GENETICS FOR LAIV STRAINS

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

Keywords: influenza virus; live attenuated influenza vaccine (LAIV); cold adaptation (ca-sign); temperature sensitivity (ts-sign); attenuation; natural reassortment (NR); reverse genetic reassortment (RGR).

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 13, количество таблиц – 2, количество рисунков – 1.

04.11.2023

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Поряд- ковый №	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
1	Александрова Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа // Вопр. Вирусол. 1977. № 4. С. 387-395.	Alexandrova G.I. Use of the genetic recombination method for obtaining vaccinal strains of the influenza virus. Vopr Virusol., 1977, no. 4, pp. 387-395.	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/335659/ PMID: 335659 .
2	Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. СПб: Наука, 1994.152 с.	Alexandrova G.I., Klimov A.I. Live influenza vaccine. St. Petersburg: Nauka, 1994.152 p.	-
3	Киселева И.В., Ларионова Н.В., Исакова И.Н., Руденко Л.Г. Генетическая стабильность холодаадаптированных вирусов гриппа // Вопросы вирусологии, 2006, т. 51, №4, с.13-16.	Kiseleva I.V., Larionova N.V., Isakova I.N., Rudenko L.G. Genetic stability of cold-adapted influenza viruses. Vopr. Virusol., 2006, vol. 51, no. 4, pp. 13-16.	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16929592/ EDN HTUWQP. УДК: 571.831.1:571.1].083.2 PMID: 16929592.

4	Киселева И.В., Руденко Л.Г. Разработка реассортантных гриппозных вакцин: классическое скрещивание или обратная генетика? // Инфекция и иммунитет. 2023. Т, 13, № 2. С. 209–218.	Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of reassortant influenza vaccines: classical reassortment or reverse genetics? Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 209–218.	https://iimmun.ru/iimm/article/view/2449 [doi: 10.15789/2220-7619-DOR-2449]
5	Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Влияние биологических свойств сезонных вирусов гриппа на эффективность подготовки штаммов живой гриппозной вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019, т. 96, № 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 // Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. -2019, vol. 96, no. 5, P. 24-34.	Allen J.D., Ross T.M. H3N2 influenza viruses in humans: viral mechanisms, evolution, and evaluation. Hum Vaccin Immunother, 2018, vol. 14, no 8, pp.1840-1847.

6	Степанова Е.А., Крутикова Е.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Разработка протокола пиросеквенирования для анализа происхождения генов реассортантов при подготовке штаммов живой гриппозной вакцины // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2018, №2, С. 101-107.	Stepanova E.A., Krutikova E.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Development of pyrosequencing-based assay for analyzing the origin of genes in preparing reassortant LAIV candidates. Molecular genetics, microbiology and virology. 2018, no. 2, pp. 101-107.	[DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-98-103]
7	Allen J.D., Ross T.M. H3N2 influenza viruses in humans: viral mechanisms, evolution, and evaluation. Hum Vaccin Immunother, 2018, vol. 14, no 8, pp.1840-1847.	-	https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2018.1462639 [doi:10.1080/21645515.2018.1462639]
8	Cheng X., Zengel J.R., Suguitan A.L. Jr, Xu Q., Wang W., Lin J., Jin H. Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in	-	https://academic.oup.com/jid/article/208/4/594/919102?login=false [doi: 10.1093/infdis/jit207].

	heterologous protection in ferrets. <i>J Infect Dis.</i> , 2013, vol. 208, no. 4, pp. 594-602.		
9	Herlocher, M.L., Clavo A.C., Maassab H.F. Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses: mutations, which may contribute to attenuation. <i>Virus Res.</i> , 1996, vol. 42 no.1-2. pp. 11-25.	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170296012920?via%3Dihub [doi.org/10.1016/0168-1702(96)01292-0]
10	Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 2000, vol. 97, no.11, pp. 6108-6113.	-	https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.100133697 [doi: 10.1073/pnas.100133697].
11	Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. <i>Vaccine</i> , 2002, vol. 20, no. 25-26, pp. 3165-3170.	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X02002682?via%3Dihub [doi: 10.1016/s0264-410x(02)00268-2]

12	Isakova-Sivak I., Matyushenko V., Stepanova E., Matushkina A., Kotomina T., Mezhenskaya D., Prokopenko P., Kudryavtsev I., Kopeykin P., Sivak K., Rudenko L. Recombinant Live Attenuated Influenza vaccine viruses carrying conserved T-cell epitopes of human Adenoviruses induce functional cytotoxic T-Cell responses and protect mice against both infections. <i>Vaccines</i> , 2020, vol.8, no. 2, pp.196, 1-21.	-	[doi: 10.3390/vaccines8020196]. PMID: 32344618; PMCID: PMC7349758.
13	Isakova-Sivak I., Chen L-M., Matsuoka Yu., Voeten J.T.M., Kiseleva I., Heldens J.G.M., van den Bosch H., Klimov A., L. Rudenko, Cox N.J., Donis R.O. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines:	-	https://link.springer.com/article/10.3103/S0891416819010087 [doi: 10.1016/j.virol.2011.01.004]

	A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). <i>Virology</i> , 2011, vol. 412, no. 2, pp. 297–305.		
14	Jin, H., Lu, B., Zhou H., Ma C., Zhao J., Yang C.F., Kemble G., Greenberg H. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. <i>Virology</i> , 2003, vol. 306, no. 1, pp. 18-24.	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682202000351?via%3Dihub [doi: 10.1016/s0042-6822(02)00035-1]
15	Klimov, A.I., Kiseleva I.V., Desheva J.A., Cox N.J., Alexandrova G.I., Rudenko L.G. Live attenuated reassortant influenza vaccine prepared using A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) donor strain is genetically stable after replication	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0531513101000206?via%3Dihub [doi.org/10.1016/S0531-5131(01)00020-6]

	in children 3-6 years of age. International Congress Series. 2001. vol. 1219. pp. 951-954.		
16	Klimov A.I., Kiseleva I.V., Alexandrova G.I., Cox N.J. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. International Congress Series. 2001, vol. 1219, pp. 955-959.	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0531513101003697 [doi.org/10.1016/S0531-5131(01)00369-7]
17	Kiseleva I. Current Opinion in LAIV: A Matter of Parent Virus Choice. Int J Mol Sci. 2022, vol. 23, no.12, pp. 6815.	-	https://www.mdpi.com/1422-0067/23/12/6815 [doi: 10.3390/ijms23126815].
18	Kurhade C, Xie X, Shi PY. Reverse genetic systems of SARS-CoV-2 for antiviral research. Antiviral Res. 2023, vol. 210, no.105486.	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354222002558?via%3

			Dihub. [doi: 0.1016/j.antiviral.2022.105486].
19	Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166-1167.	-	https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/8/1166/195474?login=false [doi:10.1093/bioinformatics/bts091]
20	Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American J. Epidemiol. 1938, vol. 27, no. 3, pp. 493–497.	-	http://aje.oxfordjournals.org/content/27/3/493.extract [doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408]
21	Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467.	-	https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.74.12.5463 [doi: 10.1073/pnas.74.12.5463]

22	Smolonogina, T. A., Isakova-Sivak I.N., Kotomina T.S., Evsina A.S., Stepanova E.A., Prokopenko P.I., Leontieva G.F., Suvorov A.N., Rudenko L.G. Generation of a Vaccine against Group B Streptococcal Infection on the Basis of a Cold-Adapted Influenza A Virus. Mol. Genet. Microbiol. Virol., 2019, vol. 34, pp. 25–34.	-	https://link.springer.com/article/10.3103/S0891416819010087 [doi.org/10.3103/S0891416819010087] .
23	Wareing M.D., Marsh G.A., Tannock G.A. Preparation and characterization of attenuated cold-adapted influenza A reassortants derived from the A/Leningrad/134/17/57 donor strain. Vaccine, 2002, vol. 20, no. 16, pp. 2082–2090.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11972977/ [doi: 10.1016/s0264-410x(02)00056-7] PMID: 11972977.
24	WHO. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza 12–13 June 2007.	—	http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_120707/en/index.html . Accessed 18.10.2023

25	Wong S.S., Webby R.J. Traditional and new influenza vaccines. Clin Microbiol Rev. 2013, Vol.26, no. 3, pp. 476-92.	—	https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00097-12 . [doi: 10.1128/CMR.000,97-12].
----	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------