

На правах рукописи

ЛАРИОНОВА
Наталья Валентиновна

**ВОЗБУДИТЕЛЬ ГРИППА:
ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ПРИРОДЕ
И ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.02.02 - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Институт экспериментальной медицины»

- Научный консультант доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией
вакцинных штаммов отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ»
Киселева Ирина Васильевна
- Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, академик РАМН,
директор ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
Зверев Виталий Васильевич
- доктор биологических наук, заведующая лабораторией
молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «Институт
полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова»
Гамбарян Александра Сергеевна
- доктор медицинских наук, руководитель лаборатории этиологии и
эпидемиологии гриппа НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского
ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
Бурцева Елена Ивановна
- Ведущая организация ФБУН Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «_____» _____ 2017 г. в _____ часов
на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ
по адресу: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17, тел. (812) 499 15 04;
e-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ
и на сайте <http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан: «_____» _____ 201_ г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 001.043.01
кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Значительные успехи вирусологии в познании структуры репродукции, генетики и иммунологии вируса гриппа не привели до сих пор к существенному прогрессу в борьбе с самим заболеванием. Ежегодные эпидемии гриппа приводят к 3-5 миллионам случаев тяжелой заболеваемости и к 250-500 тысячам смертельных исходов (WHO, 2009). Вирусная и вторичная бактериальная пневмония – серьезные осложнения гриппозной инфекции и частая причина смертности лиц пожилого возраста, маленьких детей и людей, страдающих хроническими сердечно-легочными заболеваниями. Возникновение пандемий гриппа не поддается прогнозированию, и угроза пандемии, подобной «испанке», унесшей в 1918/19 гг. 40-50 миллионов жизней, продолжает существовать (Monto, Webster, 2013).

Урон, наносимый гриппом здоровью людей и экономике государств, определяет необходимость исследования проблемы во всех ее аспектах.

Изучение разных проявлений изменчивости вируса гриппа в процессе циркуляции в восприимчивой популяции крайне важно для понимания общих закономерностей эволюции возбудителя, механизмов возникновения новых эпидемических штаммов, роли в этих процессах генов, кодирующих негликозилированные белки, и, в конечном итоге, для разработки эффективных средств профилактики гриппозной инфекции.

Вся история успеха борьбы с инфекционными заболеваниями человека и животных связана с использованием вакцин. Разработка живой гриппозной аттенуированной вакцины (ЖГВ) началась в 1937 году, вскоре после открытия вирусной этиологии заболевания. Мировой приоритет в этом направлении принадлежит коллективу отдела вирусологии Института экспериментальной медицины (ныне ФБГНУ «ИЭМ») (Сморозинцев, 1937; 1984; Александрова, 1977; Rudenko et al., 2000; Руденко и др., 2013), в котором выполнено настоящее исследование.

Степень разработанности темы. Прогрессу в создании эффективной и безопасной живой гриппозной вакцины способствовала идея, основанная на использовании уникальных особенностей вирусов гриппа: способности к реассортации между вирусами одного биологического рода и высокой мутационной изменчивости, которая дает возможность манипулировать с вирусами гриппа в лабораторных условиях и направленно формировать необходимые биологические качества. С помощью селективных условий были созданы так называемые доноры аттенуации. Это вирусы устаревшей антигенной природы, которые были адаптированы к репродукции при пониженной температуре инкубации. В результате такой «холодовой» адаптации вирусы приобрели не только способность к воспроизведению при температурах ниже физиологического оптимума – *ca* (*cold adapted*) фенотип, но утратили способность к репродукции при повышенных температурах – *ts* (*temperature sensitive*) фенотип. *Ts* фенотип доноров аттенуации сопряжен с их аттенуацией (*attenuation, att*) для лабораторных

животных и человека (Klimov et al., 2001). Генетически стабильные доноры аттенуации, являются основой 6:2 реассортантов для ЖГВ. Вместе с 6 генами, кодирующими внутренние белки вириона, они передают вакцинным штаммам *ts/ca/att* фенотип. Эпидемическая актуальность вакцинного реассортанта обеспечивается наследованием генов HA и NA, кодирующих два основных антигена вируса гриппа (Александрова, Климов, 1994).

Свойства живых гриппозных реассортантных вакцин, подготовленных на основе отечественных холодоадаптированных и температурочувствительных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (A17) и В/СССР/60/69 (В60), исследуются в России с 1977 года. Многократные клинические испытания с участием 150 тыс. детей и 500 тыс. взрослых подтвердили их безусловную безвредность и эффективность (Rudenko et al., 1993; 1996; 2000; Григорьева и др., 2009). С 1987 года реассортантная ЖГВ применяется в России для всех возрастных групп населения, начиная с 3-летнего возраста.

Все эти годы углублялись знания о молекулярно-генетических основах аттенуации доноров и созданных на их основе реассортантов. Отечественный донор А17 охарактеризован наиболее полно. Была выявлена его гетерогенность и установлены различия в иммунологической активности различных его клонов (Youil et al., 2004). Молекулярно-генетические исследования одногенных и полигенных реассортантов между клонированным донором А17 и его «диким» предшественником позволили установить определяющую роль мутантных генов полимеразного комплекса в аттенуации донора и реассортантов с различным набором «диких» генов предшественника (Klimov et al., 2000). Были охарактеризованы мутации в генах полимеразного комплекса, ответственные за проявление холодоадаптированного, температурочувствительного и непосредственно связанного с температурочувствительностью аттенуирующего фенотипа донора А17 (Klimov et al., 2000, 2001; Isakova-Sivak et al., 2011).

Установленные факты характеризуют влияние приобретенных мутаций на формирование свойств самого донора аттенуации. Однако, не менее важной представляется характеристика роли мутантных генов донора аттенуации А17, находящихся в окружении генов не собственного «дикого» предшественника А/Ленинград/134/57 (H2N2), а современных генетически удаленных от него эпидемических вирусов. Это позволит оценить взаимодействие чужеродных генов в составе изучаемых реассортантных вирусов и условия наследования реассортантами *ts*, *ca* и *att* фенотипа от донора аттенуации. К предпринятым ранее разрозненным исследованиям одногенных и полигенных реассортантов на основе донора аттенуации А17 и эпидемических вирусов требовалось подойти более системно.

Донор аттенуации В60 до настоящего исследования был слабо охарактеризован. Он не был клонирован, следовательно, можно было предполагать его генетическую неоднородность, что могло сказываться на различии в характеристиках и иммуногенности вакцинных штаммов. Не

была изучена роль отдельных мутантных генов в аттенуации. Не были описаны аттенуирующие мутации, появившиеся в результате подготовки донора В60 из «дикого» предшественника.

Метод получения вакцинных реассортантов, разработанный в 1970-х годах, основан на различиях биологических свойств созданных в лаборатории *ts/ca/att* доноров аттенуации и естественно циркулирующих эпидемических вирусов гриппа. Ко времени разработки метода все циркулирующие вирусы гриппа А и В характеризовались устойчивостью репродукции при превышающих физиологический оптимум температурах (*non-ts* фенотип), и отсутствием способности к репродукции при пониженных температурах инкубации (*non-ca* фенотип) (Oxford, 1985). Эти характеристики считались неотъемлемым признаком всех патогенных штаммов. Заложенные в метод реассортации различия в характеристиках доноров и эпидемических вирусов позволили подобрать селективные условия для успешной подготовки вакцинных штаммов и использовать *ts* и *ca* фенотип как маркеры аттенуации реассортантов.

С постепенным накоплением сведений о циркулирующих в сообществе вирусах гриппа стало очевидным, что свойства вируса, которые успешно удается видоизменять в условиях лаборатории, при естественной циркуляции вирусов также подвержены изменчивости. Среди современных возбудителей гриппозных инфекций были отмечены факты циркуляции вирусов гриппа с нехарактерными для высоковирулентных вирусов признаками. Это касается температурочувствительности, холодоустойчивости репродукции не только ряда природных изолятов, но и эталонных вирусов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для разработки актуальных вакцинных штаммов. А поскольку свойства эпидемических вирусов заложены в методику подготовки реассортантов для ЖГВ как неизменный стандарт, то выявленная их вариабельность накладывает отпечаток на процесс селекции клонов с вакцинной формулой генома, осложняя подготовку вакцинных штаммов. Часто наблюдаемая чувствительность современных вирусов к неспецифическим температуроустойчивым ингибиторам сыворотки крови также становится препятствием для стабильной подготовки вакцинных реассортантов для ЖГВ, поскольку в селекции вакцинных клонов участвует сыворотка против донора аттенуации.

Естественная изменчивость таких признаков вирусов гриппа, как температурный диапазон репродукции, чувствительность к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови, сопряженная с рецепторной специфичностью штаммов, имеет несомненное, однако до настоящего времени слабо изученное значение в эволюции вирусов гриппа.

В целях эффективной разработки сезонных живых гриппозных реассортантных вакцин, назрела необходимость введения корректив в метод подготовки вакцинных штаммов с учетом индивидуальных биологических особенностей эволюционирующих вирусов.

До представляемой работы опыт использования метода классической реассортации сводился к разработке 6:2 штаммов ЖГВ на основе дрейфовых сезонных вирусов гриппа человека.

Пандемия гриппа А(Н1N1)_{pdm09}, также как и вспышка заболеваемости людей гриппом, вызванным вирусом свиней А(Н3N2)_v, стали проверкой эффективности классического метода подготовки реассортантных аттенуированных ЖГВ на основе незнакомых человеку ранее возбудителей гриппа.

В связи с возникновением новых пандемических угроз, в частности, таких, как высоковирулентные вирусы гриппа птиц А(Н5N1), причастные к случаям летальных инфекций людей, ВОЗ разработала глобальную стратегию обеспечения готовности к пандемии (http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/201509_zoonotic_vaccinevirusupdate.pdf?ua=1). В эту стратегию входит создание коллекции кандидатных вакцинных вирусов гриппа на случай необходимости их внезапного использования. Для успешного получения ЖГВ на основе патогенных для развивающихся куриных эмбрионов вирусов гриппа птиц была необходима существенная модификация метода подготовки реассортантных штаммов.

Выше изложенное определяет актуальность представляемых исследований и позволяет сформулировать **основную цель настоящей работы**, как изучение закономерностей изменчивости биологических свойств вирусов гриппа А и В в природе и эксперименте.

В соответствии с целью, поставлены следующие **задачи исследования**:

1. Определение молекулярно-генетических механизмов индуцированной изменчивости фенотипических признаков вируса гриппа в эксперименте.
2. Характеристика закономерностей эволюционной изменчивости биологических признаков вирусов гриппа.
3. Разработка новых принципов подготовки реассортантных штаммов ЖГВ для сезонных и обладающих пандемическим потенциалом вирусов гриппа.

В рамках этих задач запланировано решение следующих вопросов:

- Клонирование и молекулярно-генетическая характеристика чистой линии донора аттенуации В/СССР/60/69.
- Установление единого генетического базиса аттенуации холодаадаптированных реассортантных штаммов вирусов гриппа А и В на основе доноров аттенуации для отечественной ЖГВ.
- Анализ закономерностей эволюционной изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В по признакам температуро- и ингибиторочувствительности.
- Проведение оценки влияния переменных биологических свойств вирусов гриппа А и В на эффективность подготовки реассортантных штаммов для ЖГВ.
- Усовершенствование методики подготовки штаммов ЖГВ к сезонным и пандемическим возбудителям гриппа человека на основе полученных фундаментальных данных. Разработка новых быстрых и надежных методов анализа состава генома реассортантов вирусов гриппа. Разработка новых принципов подготовки штаммов ЖГВ для особо опасных, имеющих пандемический потенциал, вирусов гриппа птиц А(Н5N1).

Научная новизна работы

1. Впервые установлена роль мутантных генов полимеразного комплекса в приобретении донором аттенуации для ЖГВ В/СССР/60/69 и реассортантными штаммами на его основе температурочувствительного и холодоустойчивого фенотипа.
2. Сформулировано положение о едином механизме аттенуации вирусов гриппа А и В, связанном с изменением температурного диапазона функционирования белков полимеразного комплекса.
3. Впервые прослежены закономерности эволюции вирусов гриппа А и В по признаку температурочувствительности репродукции. Продемонстрирован волнообразный (циклический) характер изменения признака устойчивости/чувствительности к температурам, превышающим физиологический оптимум, и проведена связь этого признака с изменением эпидемических потенциалов вирусов. Высказано предположение, что эволюцию вирусов гриппа следует рассматривать не только с позиции его антигенной изменчивости, но и принимать во внимание изменение других биологических признаков, в частности температурочувствительность репродукции.
4. Впервые представлены различия антигенных ветвей В/Виктория/1/87- и В/Ямагата/16/88-подобных вирусов гриппа по признаку устойчивости к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади, что является опосредованным указанием на различия в их рецепторной специфичности.
5. Продемонстрирована прямая зависимость эффективности формирования вакцинных реассортантов с формулой генома 6:2 от таких фенотипических особенностей эпидемических родительских вирусов гриппа А и В, как чувствительность к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови.
6. Впервые установлено влияние нейраминидазы устойчивого к ингибиторам сыворотки крови донора аттенуации на снижение уровня ингибиторочувствительности реассортантов, наследующих от ингибиторочувствительных «диких» вирусов гриппа А и В единственный ген гемагглютиниана. Выявленная закономерность свидетельствует о комплексном участии гемагглютиниана и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении свойства чувствительности/устойчивости к ингибиторам сыворотки крови и опосредованным указанием на взаимное участие белков HA и NA в рецепторном взаимодействии с чувствительной клеткой.
7. Установлены ограничения в способности к реассортации между донором аттенуации на основе вируса гриппа человека А(H2N2) и штаммами А(H5N1)-PR8-RG для инактивированной ЖГВ. Подобное скрещивание дает возможность получать температурочувствительные, холодоустойчивые вакцинные реассортанты на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с наследованием от высокопатогенных вирусов гриппа птиц единственного гена HA (H5) (формула генома 7:1).

8. Выявлено сцепленное наследование генов NA и PB2 родительского вируса NIBRG-23, происходящих от вируса гриппа птиц А/индюк/Турция/1/2005 (H5N1) и А/PR8/34 (H1N1) соответственно, при скрещивании его с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2).
9. Разработан новый методический подход к получению штаммов аттенуированной ЖГВ на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А(H5N1) с использованием модифицированных, сконструированных методами обратной генетики штаммов для инактивированной вакцины А(H5N1)-PR8-RG, позволяющий проводить реассортацию в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и безопасный для персонала.
10. Доклиническая характеристика авторских штаммов живой гриппозной вакцины к пандемическому вирусу гриппа А(H1N1)pdm09 и потенциально пандемическим высоковирулентным вирусам гриппа птиц А(H5N1) показала их генетическую и фенотипическую стабильность, аттенуацию, высокую иммуногенность и протективную активность для лабораторных животных.
11. Впервые на добровольцах, привитых живой гриппозной вакциной А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) на основе высоковирулентного потенциально пандемического вируса гриппа птиц, показана высокая приживляемость, фенотипическая и генетическая стабильность аттенуирующих мутаций в реизолятах вакцинного вируса от привитых, отсутствие трансмиссивности непривитым лицам группы плацебо.

Теоретическая и практическая значимость работы

В процессе работы по созданию штаммов ЖГВ накопились многолетние наблюдения за вариабельностью биологических характеристик у циркулирующих вирусов гриппа А и В, что позволило выявить определенные эволюционные закономерности. Эти исследования, наряду с молекулярно-генетической характеристикой донора аттенуации В/СССР/60/69, и формулировкой представления о единстве молекулярных основ проявления *ts/ca/att* фенотипа доноров аттенуации А и В для ЖГВ являются фундаментальным вкладом представленной работы в вирусологию гриппа.

Автором подготовлены 20 аттенуированных холодоадаптированных реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины на основе сезонных возбудителей гриппа А(H1N1, H3N2) и В и пандемического вируса гриппа А(H1N1)09pdm. На эти штаммы ЖГВ получены к настоящему времени 19 патентов на изобретение РФ.

Впервые живая гриппозная вакцина А/17/Калифорния/2009/38 на основе пандемического вируса А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm2009 зарегистрирована в России.

За разработку вакцинного штамма вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm для производства ЖГВ для взрослых и детей (патент РФ № 2413765) авторов удостоили в 2010 году диплома Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам в номинации «100 лучших изобретений России».

Подготовленные автором холодоадаптированные реассортантные штаммы ЖГВ депонированы в Государственных коллекциях вакцин на базе ФГБУ «ГИСК им. Л.А.Тарасевича» МЗ России и Института вирусологии им.Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ России: А/17/Иоганнесбург/94/1 (НЗН2) (ГИСК №391), А/17/Нанчанг/95/20 (НЗН2) (ГИСК №1001), А/47/Нанчанг/95/13 (НЗН2) (ГИСК №1002), В/60/Петербург/95/20 (ГИСК №1003), В/60/Иоханнесбург/99/50 (ГИСК №398/9), А/17/Вайоминг/03/8 (НЗН2) (ГИСК №144), В/60/Джилин/03/1(ГИСК №143), В/60/Малайзия/04/898 (НИИ вирусологии №2411, ГИСК №721), В/60/Флорида/04/181 (НИИ вирусологии №2724, ГИСК №722), А/17/Соломоновы острова/06/9 (Н1Н1) (ГИСК №751), А/17/Брисбен/07/28 (Н1Н1) (ГИСК №789), А/17/Брисбен/07/1 (НЗН2) (ГИСК №788), В/60/Брисбен/08/83 (ГИСК №796), А/17/Калифорния/2009/38 (Н1Н1)pdm09 (ГИСК №801), В/60/Висконсин/2010/125 (НИИ вирусологии №2723), А/17/Виктория/2011/89 (НЗН2) (НИИ вирусологии №2724), А/17/Индиана/11/72(НЗН2v) (НИИ вирусологии №2739), В/60/Массачусетс/2012/10 (НИИ вирусологии №2740), А/17/Техас/2012/30 (НЗН2) (НИИ вирусологии №2737) и В/60/Пхукет/2013/26 (НИИ вирусологии №2808).

Подготовленные автором штаммы ЖГВ на основе высоковирулентных вирусов гриппа птиц А(Н5Н1) А/Вьетнам/1203/2004, А/Индонезия/05/2005, А/индюк/Турция/1/2005 и вируса свиного гриппа А/Индиана/10/2011 (НЗН2)v составляют отечественный резерв вакцин к потенциально пандемическим вирусам гриппа.

Из гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69 отобрана и охарактеризована чистая линия, обладающая наиболее удачным сочетанием полезных признаков и позволяющая создавать генетически стабильные реассортантные вакцинные штаммы. Клонированный донор аттенуации В/СССР/60/69 применяется для получения штаммов ЖГВ с 2003 года.

Предложен ряд методических приемов, позволяющих максимально эффективно готовить реассортантные вакцинные штаммы на основе эпидемических вирусов, обладающих различными биологическими свойствами, в том числе не только вирусов гриппа человека, но и потенциально пандемических вирусов гриппа птиц.

Начиная с 2009 года, в соответствии с договором с ВОЗ, отдел вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» передает штаммы реассортантной ЖГВ в развивающиеся страны для производства на их основе национальных ЖГВ (Rudenko et al., 2011). ЖГВ к вирусу гриппа А(Н1Н1)pdm09, а затем и к сезонным вакцинам были переданы в Индию (СИ), где к настоящему времени выпущено 3 миллиона доз вакцины Nasovac[®], а в 2010 году было привито 2,5 млн. человек вакциной к пандемическому гриппу А(Н1Н1)pdm2009, в Тайланд (GPO), где ЖГВ к вирусу А(Н1Н1)pdm09 была зарегистрирована, и в Китай (ВСНТ), где ЖГВ на основе подготовленных в отделе вирусологии штаммов, в том числе авторских, проходят клинические испытания.

Реализация и внедрение результатов работы. Разработанная модификация метода получения аттенуированных реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе современных вирусов гриппа используется в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» и в Центре по контролю и предупреждению заболеваний (CDC, Атланта, США).

Регулярно, с 1995 года по настоящее время, штаммы ЖГВ передаются в ФГУП "НПО "Микроген" Минздрава России для промышленного производства интраназальной живой гриппозной аттенуированной вакцины для взрослых и для детей. За 1995-2015 гг. автором подготовлено и передано в «Микроген» 19 штаммов (Акт внедрения).

Переданные в ВОЗ вакцинные штаммы А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm, А/17/Виктория/2011/89 (H3N2), В/60/Висконсин/2010/125, А/17/Техас/2012/30 (H3N2), В/60/Массачусетс/2012/10, стали основой для наработки национальных живых гриппозных вакцин в развивающихся странах: Индии, Таиланде и Китае.

Методология и методы исследования

Методологической основой проведенных исследований является совокупность вирусологических и молекулярно-биологических методов. В процессе работы использовались вирусологические и молекулярно-биологические методы, как классические, так и разработанные автором.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Гены полимеразного комплекса играют определяющую роль в формировании *ts* и *ca* фенотипа вакцинных реассортантов вирусов гриппа А и В на основе отечественных доноров аттенуации. Комбинации мутантных генов PB2, PB1 и PA при обязательном участии гена PB2 ответственны за температурочувствительный фенотип реассортантов на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Мутации в генах PB2 и PA донора аттенуации В/СССР/60/69 независимо друг от друга приводят к температурочувствительности реассортантного вируса, а мутации в гене PA – и к его холодоадаптированности.

2. Эволюция признака температурочувствительности эпидемических вирусов гриппа А и В носит циклический характер. Появлению нового значимого в эпидемическом отношении вируса гриппа предшествует преобладание в циркуляции температурочувствительных штаммов, что свидетельствует о влиянии температуростойчивости на проявление эпидемических потенций вирусов гриппа.

3. По признаку чувствительности к ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади вирусы гриппа В линий В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88 четко различаются.

4. Взаимодействие генов гемагглютинина и нейраминидазы играет комплексную роль в проявлении реассортантными вирусами гриппа чувствительности/устойчивости к неспецифическим ингибиторам неиммунной сыворотки крови.

5. Реассортантные штаммы ЖГВ для сезонных и пандемических вакцин, полученные на основе холодоадаптированных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и В/СССР/60/69, безопасны, иммуногенны, нетрансмиссивны, обладают высокой генетической и фенотипической стабильностью *in ovo*, в экспериментах на лабораторных животных и в исследованиях экспериментальных ЖГВ на добровольцах.

В результате проведенных исследований:

1. Сформулировано представление о едином механизме аттенуации вирусов гриппа А и В, связанном с изменением температурного диапазона функционирования белков полимеразного комплекса.

2. Прослежены закономерности эволюционной изменчивости фенотипических признаков вирусов гриппа в природе, позволяющие утверждать, что эволюцию вируса гриппа следует рассматривать не только с позиции новизны поверхностных антигенов, но с учетом изменения такого фенотипического признака, как температурочувствительность. Факт распространения в популяции людей *ts* вариантов вирусов гриппа требует надзора и научного осмысления. Есть основания предполагать, что с учетом *ts* фенотипа можно точнее оценивать эпидемические потенции вновь появляющихся штаммов и заблаговременно формировать более обоснованный прогноз ожидаемой заболеваемости гриппом.

3. Продемонстрировано участие нейраминидазы в проявлении свойства чувствительности вирусов гриппа к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови.

4. Оптимизирован метод подготовки реассортантов для ЖГВ с учетом индивидуальных биологических свойств эпидемических и пандемических родительских вирусов.

Личный вклад автора заключается в непосредственном планировании, выполнении и обработке всех экспериментальных разделов работы. Автором лично проведен анализ литературных и собственных данных, обобщены результаты исследований и подготовлены материалы к публикациям.

Разделы работы по доклиническому изучению ЖГВ на основе пандемического А(Н1N1)09pdm и потенциально пандемических высокопатогенных штаммов А(Н5N1) на хорьках и курах проводились в совместных исследованиях в ViroClinics Biosciences, (Роттердам, Голландия), в университете Питтсбурга (США) и в Southeast Poultry Research Laboratory (Афины, США).

Клинические исследования сезонных, пандемической А(Н1N1)09pdm и потенциально пандемической А(Н5N2) вакцин проведены совместно с сотрудниками отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» и сотрудниками ФГБУ «Институт гриппа» МЗ РФ.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность и обоснованность результатов работы обеспечена использованием современных средств и методов проведения

исследований, значительным объемом работы, комплексным анализом результатов, статистической обработкой данных.

Основные положения диссертации были представлены в 45 докладах на 31 отечественной и международной научных конференциях и симпозиумах: Всероссийской научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика А.А. Смородинцева «Современные аспекты вакцинопрофилактики, химиотерапии, эпидемиологии и диагностики гриппа и других вирусных инфекций» (Санкт-Петербург, 2001), Всероссийской научно-практической конференции «Новые препараты в профилактике, терапии и диагностике вирусных инфекций» (Санкт-Петербург, 2002), V-й Международной конференции по контролю за гриппом (Окинава, Япония, 2003), Первой Европейской конференции по гриппу (Сент-Джулиан, Мальта, 2002), Международной конференции «Гриппозные вакцины для всего мира» (Лиссабон, Португалия, 2004), Международной научной конференции «Актуальные вирусные инфекции – теоретические и практические аспекты» (Санкт-Петербург, 2004), Первой Всероссийской конференции по вакцинологии «Медицинские иммунобиологические препараты для профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций» (Москва, 2004), Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (Санкт-Петербург, 2005), 3-ей Международной научной конференции по Ортомиксовирусам (Кембридж, Великобритания, 2005), 2-ой Международной научной конференции «Гриппозные вакцины для мира» (Вена, Австрия, 2006), XXXV неделе науки СПбГПУ (Санкт-Петербург, 2007), VI-й Международной конференции по контролю за гриппом (Торонто, Канада, 2007), 11-й медико-биологической Всероссийской конференции «Человек и его здоровье», 3-й европейской ESWI конференции по гриппу (Виламоура, Португалия, 2008), 12-й Всероссийской медико-биологической конференции. «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2009), Международной научной конференции «Противогриппозные вакцины нового поколения» (Санкт-Петербург, 2009), Международной научно-практической конференции, посвященной Всемирному дню здоровья (Киев, Украина, 2010), 17-м Международном конгрессе медицинских наук (ISCOMS) (Гренинген, Голландия, 2010), 14-й Международной конференции «Биология. Наука XXI века», (Пушино, 2010), VII-й Международной конференции по контролю за гриппом (Гонконг, Китай, 2010), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, 2010), 4-й европейской ESWI конференции по гриппу (Мальта, 2011), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии на современном этапе» (Москва, 2011), 2-й международной конференции. Биотех-2011 (Астана, Казахстан, 2011), Всероссийской конференции-школе «Нейробиология интегративных функций мозга», посвященной 120-летию создания Физиологического отдела под руководством И.П. Павлова в Императорском институте

экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, 2011), Научно–практической конференции по проблеме «Грипп: эпидемиология, профилактика, лечение» (Санкт-Петербург, 2011), всемирном конгрессе «Человеческие факторы риска» (Лондон, Великобритания, 2012), Юбилейной научно-практической конференции к 45-летию НИИ гриппа «Грипп: эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение» (СПб, 2012), VIII-й Международной конференции по контролю за гриппом (Кейптаун, ЮАР, 2013), научно–практической конференции НИИ им. Пастера «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2014), 5-й европейской ESWI конференции по гриппу (Рига, Латвия, 2014), 9-м конгрессе « Vaccine & ISV» (Сеул, Ю. Корея, 2015).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 49 научных статей, включая 16 в журналах, рекомендованных ВАК, и 14 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования. Получено 19 патентов на изобретения РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа содержит введение, основную часть, включающую обзор литературы, материалы и методы исследования, три главы собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы и приложения. Работа изложена на 336 страницах машинописного текста. Включает 89 таблиц, 23 рисунка и 3 приложения. Список цитируемой литературы включает 548 источников.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. а). Вирусы гриппа, полученные из Центра по контролю и предупреждению заболеваемости (CDC, США), из коллекции NIBSC (Великобритания), из Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), из коллекции отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», из коллекции ФГБУ «НИИ Гриппа» МЗРФ, включают: эталонные эпидемические и пандемические штаммы А (H1N1, H2N2, H3N2) и В; современные кандидаты в вакцинные штаммы; эпидемические изоляты разных лет; пандемические и потенциально пандемические вирусы гриппа: А(H1N1)pdm09: А/Калифорния/07/2009, А/Северная Каролина/39/2009; H5N1: А/Вьетнам/1203/2004 (клайд 1), А/Вьетнам/1194/2004 (клайд 1), А/Индонезия/5/2005 (клайд 2.1), А/лебедь-кликун/Монголия /244/2005 (клайд 2.2), А/индюк/Турция/01/2005 (клайд 2.2), А/горный гусь/Монголия /1/2005 (клайд 2.2), А/Аньхой/1/2005 (клайд 2.3); генно-инженерные реассортанты для инактивированных вакцин со структурным составом А/H5N1–PR8–RG: VN/1203/PR8–IBCDC–RG(VN–PR), Indo/05/2005(H5N1)/PR8–IBCDC–RG (Indo–PR), NIBRG–23 (Turkey–PR). Реассортанты содержат 6 генов, кодирующих внутренние белки, от вируса А/PR/8/34 (H1N1) (А/Puerto Rico/8/34), а гены HA и NA - от высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1 А/Вьетнам/1203/2004 (клайд 1), А/Индонезия/05/2005 (клайд 2.1) и А/индюк/Турция/1/2005 (клайд

2.2) соответственно. Сайт рестрикции HA (H5) реассортантов модифицирован за счет удаления триплетов, кодирующих 4 основных аминокислоты, чем обеспечивается снижение патогенности.

б) Доноры аттенуации для отечественной ЖГВ: А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69, являющиеся собственностью ФГБНУ «ИЭМ» (Санкт–Петербург);

в) Реассортантный штамм ЖГВ А/17/Вьетнам/1203/04-RG (H5N1) на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), созданный методами обратной генетики на основе плазмидной технологии, являющийся собственностью отдела вирусологии ИЭМ.

Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах. Для накопления вирусы инкубировали в 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) при 32-33°C. В зависимости от задач исследования инфицированные эмбрионы инкубировали также при пониженной температуре 25-26°C (5-6 суток) и повышенных температурах, 37, 38, 39 и 40°C (2 суток – вирусы гриппа А, 3 суток – вирусы гриппа В).

Температурочувствительность вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров (RCT, reproductive capacity at different temperatures) при оптимальной (32-33°C) и повышенной до 37, 38, 39 или 40°C температуре инкубации. Вирусы считали температурочувствительными при RCT не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, температуроустойчивыми – при RCT не более 3,5 lg ЭИД₅₀/мл. Вирусы оценивали как «±ts» при RCT в пределах 3,5–4,5 lg ЭИД₅₀/мл.

Холодоустойчивость вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32-33°C) и пониженной до 25-26°C температуре инкубации. Вирусы считали холодочувствительными при RCT₂₅ не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, холодоустойчивыми – при RCT₂₅ не более 3,5 lg ЭИД₅₀/мл. Вирусы оценивали как «±ca» при RCT₂₅ в пределах 3,5–4,5 lg ЭИД₅₀/мл.

Получение реассортантных штаммов. С целью получения вакцинных штаммов для ЖГВ на основе ежегодных рекомендаций ВОЗ, реассортацию эпидемических вирусов с донорами аттенуации для отечественной ЖГВ проводили в 10-11 дневных РКЭ по стандартной методике (Александрова, 1977). В зависимости от фенотипических характеристик эпидемического компонента скрещивания в схему реассортации вводились модификации согласно собственным методическим подходам автора.

Реассортацию «дикого» вируса с донором аттенуации для получения вирусного потомства различного генотипа проводили при пониженной или оптимальной температуре. Для большего разнообразия генотипов проводили скрещивание уже имеющихся реассортантов с одним из родительских вирусов.

Культивирование вирусов в культуре клеток. Использовали перевиваемую линию клеток MDCK (линия NBL-2). Вирусы выращивали в среде DMEM с добавлением 0,6 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma-Aldrich Co., USA). Через 48-72 часов инкубации при 33°C визуально оценивали цитопатическое действие вируса и определяли в РГА его титр.

Изоляция вакцинных вирусов от привитых лиц при клинических исследованиях на ограниченных контингентах добровольцев. Выделение вирусов из носовых ходов лиц, привитых гриппозной ЖГВ производства НПО «Микроген», проводили с 1 по 7 день после вакцинации. Материалом мазков заражали РКЭ и культуру MDCK (в некоторых исследованиях), которые инкубировали при 32-33°C в течение 48-72 часов. При отрицательном результате РГА проводили два дополнительных пассажа исследуемого материала. Выделенные вирусы проверяли серологически, проводили фенотипическое подтверждение *ts/ca* фенотипа и полное секвенирование генома для определения сохранности аттенуирующих мутаций и регистрации появления возможных новых мутаций.

Серологические методы исследований. Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили в соответствии с Методическими указаниями (МУ 3.3.2.1758-03; WHO, 2011) для определения антигенной принадлежности НА штаммов вируса гриппа со специфическими иммунными крысиными сыворотками, используя 1% взвесь эритроцитов кур или человека.

Чувствительность вирусов гриппа к неспецифическим термостабильным ингибиторам сыворотки крови проводили в РТГА, используя в качестве источника ингибиторов прогретую неиммунную сыворотку крови лошади (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург) и морской свинки. Вирусы считали ингибитороустойчивыми (*ir*) при титре сыворотки в РТГА $\leq 1:40$ и ингибиторочувствительными (*is*) при титре $\geq 1:80$.

Исследования на лабораторных животных проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (2010) и были одобрены локальным этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ». Использовались крысы, белые беспородные самцы с массой тела 200-250 г; мыши *BALB/c* и беспородные белые, 6-8 недельные самцы массой 17-20 г; морские свинки с массой тела 250-350 г разводки ФГУП «Питомника лабораторных животных «Рапполово»; 6-12-недельные хорьки, самки, разводки фермы Triple-F, Sayre, Пенсильвания, США; 5- и 6-недельные SPF-куры из Северо-Восточной исследовательской птицеводческой лаборатории, Джорджия, США.

Определение состава генома реассортантных штаммов вируса гриппа А и В проводили методом RT-ПЦР-рестрикционного анализа, модифицированного за счет подобранного набора праймеров и рестриктаз, а также с помощью метода мультиплекс-ПЦР, отработанного для специфических задач исследования, и секвенирования ДНК-копий генов.

Статистическая обработка результатов. Достоверность различий оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента для зависимых переменных и критерия χ^2 . Для обработки данных использовали программы «MS Office Excel», «Statistica 6.0» и «SPSS». Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 РОЛЬ ГЕНОВ В АТТЕНУАЦИИ ВИРУСА ГРИППА

2.1.1 РОЛЬ ГЕНОВ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А/ЛЕНИНГРАД/134/17/57 (H2N2) В ФОРМИРОВАНИИ *ts* ФЕНОТИПА РЕАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ

В характеристике донора аттенуации А17 для живых гриппозных вакцин типа А до конца не выясненным оставался вопрос о стабильности наследования *ts*-признака, обусловленного мутантными генами донора, когда они находятся в окружении генов эволюционно удаленных современных эпидемических вирусов. В исследованиях подобных реассортантов, проведенных ранее (Киселева, 2001), набор комбинаций генов не позволял однозначно оценить их взаимовлияние. Некоторые комбинации генов разных «диких» вирусов были представлены единственными вариантами, что не давало уверенности в воспроизводимости характеристик температурочувствительности подобных реассортантов, полученных на других вирусах. Кроме того, выводы делались на характеристиках реассортантов, полученных в определенных комбинациях в культуре клеток, в других комбинациях - в РКЭ. Поскольку штаммы ЖГВ по существующим нормативам должны быть получены в куриных эмбрионах, для понимания роли мутантных генов донора важно убедиться в достоверности и воспроизводимости характеристик реассортантов при передаче им разных комбинаций генов донора в системе РКЭ. В настоящем исследовании в РКЭ изучен *ts* фенотип представительной коллекции реассортантов, унаследовавших разные комбинации генов. Одна группа, из 38 реассортантов, получена при скрещивании донора А17 с высоко температуроустойчивым вирусом А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), другая группа, из 187 реассортантов, – при скрещивании донора с двенадцатью температуроустойчивыми вирусами серотипов А(H1N1) и А(H3N2), разных лет циркуляции.

Анализ *ts* фенотипа реассортантов между донором аттенуации А17 (H2N2) и эпидемическими вирусами гриппа А(H1N1) и А(H3N2), выделенными в различные годы, показал обязательное участие белка полимеразного комплекса PB2 донора в проявлении признака температурочувствительности. Однако, во всех случаях было необходимо комплексное взаимодействие белка PB2 с еще одним белком полимеразного комплекса – либо с белком PB1, либо с белком PA. Детальная характеристика комбинаций «диких» генов с мутантными генами донора аттенуации А17, как на примере набора реассортантов одного эпидемического вируса, так и различных современных вирусов подтверждает, что не только установленная ранее констелляция мутантных белков полимеразного комплекса донора PB2+PB1, но и мутантные белки в сочетании PB2+PA, способны обуславливать температурочувствительный фенотип реассортантов вируса гриппа А в РКЭ (рис. 1).

2.1.2 РОЛЬ ГЕНОВ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69 В ФОРМИРОВАНИИ *ts* ФЕНОТИПА РЕАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ

Для установления роли мутантных генов донора аттенуации В60 была изучена коллекция из 36 реассортантов с разным набором генов от донора и термостойких эпидемических вирусов эволюционных ветвей «В/Виктория/2/87» и «В/Ямагата/16/88». Результаты исследования свидетельствуют, что полимеразные гены PB2 и PA донора В60 в составе генома реассортантных вирусов, независимо друг от друга определяют формирование *ts* фенотипа. Замена PB2 или PA генов, принадлежащих вирусу «дикого» типа, на соответствующий ген донора аттенуации приводила к резкому снижению способности реассортантных вирусов к репродукции при повышенной температуре. И наоборот, включение в состав генома реассортантов PB1, NP, M или NS генов от донора не изменяло их способности к репродукции за пределами температурного оптимума (рис. 1).

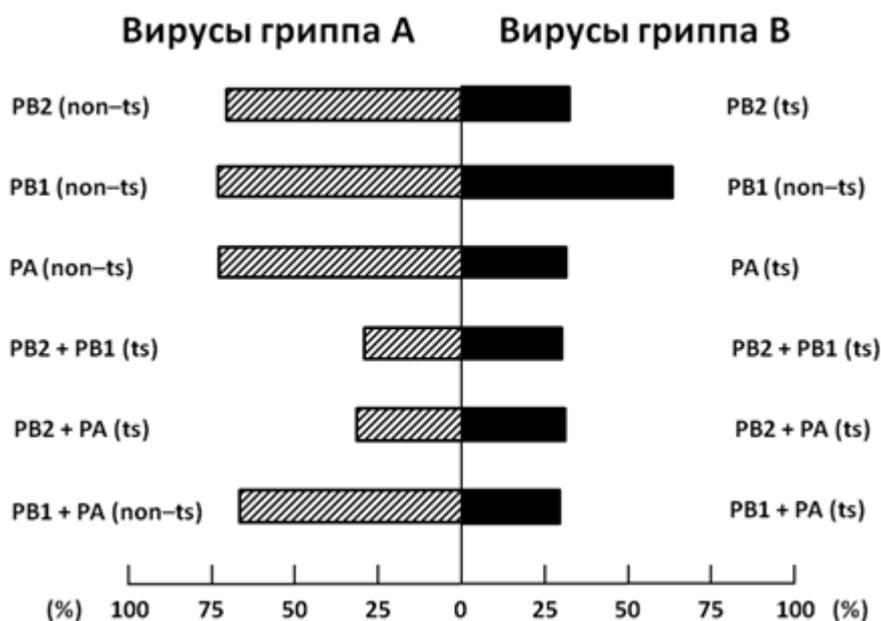


Рисунок 1 - Роль мутантных генов доноров аттенуации А17 и В60 в проявлении *ts* фенотипа реассортантных вирусов. *Обозначения.* Инфекционный титр реассортантного вируса при повышенной температуре, выраженный в % от его титра при оптимальной температуре.

2.1.3 РОЛЬ ГЕНОВ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69 В ФОРМИРОВАНИИ *ca* ФЕНОТИПА РЕАССОРТАНТНЫХ ВИРУСОВ

Анализ *ca* фенотипа 35 реассортантов с разными комбинациями генов донора В60 и 8 *non-ca* эпидемических вирусов показал, что реассортанты наследуют признак холодоустойчивости с приобретением от донора аттенуации мутантного гена PA (рис. 2).

Включение в геном «диких» вирусов различных комбинаций других генов донора не меняло их природную холодоустойчивость.

Таким образом, анализ реассортантов на основе доноров аттенуации для ЖГВ позволил установить определяющую роль мутантных генов полимеразного комплекса доноров

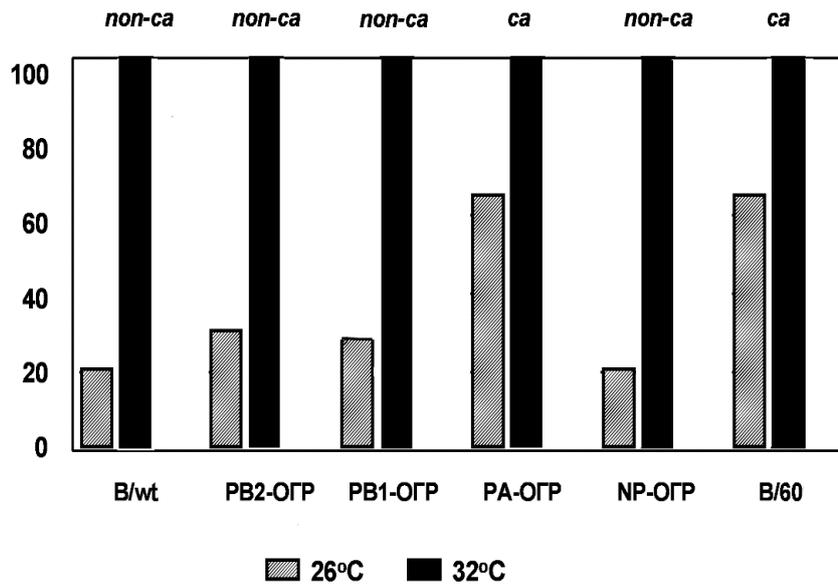


Рисунок 2 - Роль мутантных генов донора аттенуации В60 в проявлении признака холодоустойчивости у реассортантных вирусов гриппа. (Обозначения. Инфекционный титр реассортантного вируса при пониженной до 25-26°C температуре в % от его титра при оптимальной температуре. ОГР – «одногенный» реассортант, содержит один ген от *ca* донора, остальные гены от «дикого» вируса; B/wt – «дикий» вирус гриппа).

А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 в формировании температурочувствительного фенотипа как вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2), так и В. Формирование холодоустойчивости репродукции реассортантов вируса гриппа В на основе донора В/СССР/60/69 определялось мутантным геном полимеразного комплекса РА. *Ca* фенотип реассортантов на основе донора А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), как ранее было продемонстрировано, связан с кооперацией мутантных генов донора PB2 и РА (Klimov et al., 2001).

2.1.4 ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЧИСТОЙ ЛИНИИ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ В/СССР/60/69

Характеристика биологических свойств гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69. В результате двукратного клонирования донора аттенуации В/СССР/60/69 в РКЭ методом предельных разведений при оптимальной температуре инкубации 32°C были изолированы 18 клонов. Все клоны, как и исходный донор В60, обладали *ts* и *ca* фенотипом при 38°C и 25°C соответственно. Однако, при снижении температуры инкубации до 37°C клоны по способности к репродукции четко распределились на две группы. Одна группа обладала низкой репродуктивностью при 37°C ($RCT_{37} = 7,1 \pm 0,3$; *ts* фенотип), а клоны другой группы проявляли температуроустойчивость ($RCT_{37} = 1,3 \pm 0,6$; *non-ts* фенотип). Неклонированный донор аттенуации В60 по своему отношению к температуре инкубации 37°C занял промежуточное положение между двумя выявленными группами ($RCT_{37} = 5,7 \pm 2,0$; *ts/±ts* фенотип). Такой статистический разброс

величины титра репродукции у неклонированного донора как раз и может быть объяснен проявлением влияния клонов, составляющих гетерогенную популяцию.

Молекулярно-генетический анализ клонов из гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69. Из популяции донора В60 были отобраны два типичных клона: клон В60/252, обладающий температурочувствительностью репродукции в РКЭ при 37°C ($ts37^0$), и клон В60/525, обладающий температуроустойчивостью при 37°C ($non-ts37^0$). При этом, оба клона характеризовались температурочувствительностью репродукции при 38°C. Результаты сравнительного молекулярно-генетического анализа двух этих клонов показали, что они различаются лишь по одному аминокислотному остатку в белке РВ1 – у клона В60/252 имеется дополнительная мутация Пе-644-Val. Можно полагать, что формирование более выраженной температурочувствительности клона В60/252 связано именно с этой мутацией.

Таким образом, все гены, кодирующие белки полимеразного комплекса РВ2, РВ1 и РА, вносят вклад в адаптацию донора аттенуации и реассортантов на его основе к репродукции в куриных эмбрионах за верхним и нижним пределами температурного оптимума. Пассирование при пониженной температуре приводит к смещению температурного диапазона репродукции вируса, в результате чего вместе с *ca* вирус приобретает *ts* фенотип. Продолжительное культивирование «дикого» предшественника в куриных эмбрионах на пути к созданию донора аттенуации В/СССР/60/69 при пониженной температуре 25-28°C (60 пассажей) привело к накоплению адаптивных мутаций, что привело к формированию в популяции *ts/ca* донора гетерогенных клонов, обладающих различной степенью температурочувствительности. Если чувствительность к температуре 38°C у донора аттенуации В60 обусловлена мутациями в генах РВ2 или РА, то дополнительная мутация в гене РВ1 привела к существенному понижению репродуктивности уже при 37°C. Мутантный ген РА также обуславливает способность донора В60 и реассортантов на его основе к репродукции при температурах ниже оптимальных значений.

Изучение приживляемости и иммуногенности клонов донора аттенуации В60/252 и В60/525 в опытах на экспериментальных животных. Оценку возможных различий в прививочных свойствах клонов из гетерогенной популяции донора В60, отличающихся по $ts37^0$ маркеру, проводили на морских свинках. По 5 животных на группу иммунизировали вирусосодержащим материалом гетерогенного донора В60 и его чистых клонов - В60/252 и В60/525 в титре 8,0 lg ЭИД₅₀/мл. Носовые смывы, взятые на третий день после иммунизации, титровали в РКЭ. Вне зависимости от использованного варианта донора В60, вирус прижился у 100% подопытных животных. В пересчете титра вируса в смывах на группу выявилось, что клон В60/252 выделялся из носовых ходов несколько хуже, чем неклонированный донор аттенуации или клон В60/525 (1,2 lg ЭИД₅₀/мл против 1.8 и 1.6 lg ЭИД₅₀/мл соответственно).

Через 3 недели после заражения у свинок была взята кровь из сердца. Исследование сывороток крови в РТГА с эритроцитами человека показало, что наиболее высокий гуморальный

ответ наблюдался при интраназальном введении экспериментальным животным клона В60/525 (титр сывороточных антител 1:1000). Клон В60/252 демонстрировал более низкую иммуногенность (титр сывороточных антител 1:400), и это коррелировало с его более низкой приживляемостью в носовых ходах. Неклонированный донор по иммуногенности занял промежуточное положение между двумя клонами. Можно предположить, что клон В60/252, обладающий более выраженной температурочувствительностью по сравнению с клоном В60/525, оказался гиператтенуированным, что проявилось в снижении его иммуногенности для морских свинок. Вероятно, отмеченная гиператтенуация клона В60/252, в связке с его более выраженной температурочувствительностью, обусловлена дополнительной мутацией Pe-644-Val в гене, кодирующем субъединицу РВ1 РНК-зависимой-РНК-полимеразы.

Представленные результаты не только свидетельствуют о гетерогенности популяции донорского штамма В/СССР/60/69, но и о том, что использование неклонированного донора может привести к получению вакцинных штаммов со сниженной иммуногенностью.

Таким образом, по генетическим, биологическим характеристикам, по результатам изучения приживляемости и иммуногенности был отобран клон В/СССР/60/69/525. Во всех дальнейших исследованиях и в создании вакцинных реассортантов с 2001 года в нашей работе использовался В/СССР/60/69 исключительно в клонированном варианте.

Идентификация уникальных мутаций в геноме донора аттенуации В/СССР/60/69/525.

Для выявления уникальных *ts/ca* мутаций в геноме донора аттенуации необходимо его сравнение с исходным эпидемическим вирусом, из которого он был получен. К сожалению, «дикий» предшественник донора аттенуации В/СССР/60/69 не сохранился, и попытки его поиска не увенчались успехом. Однако, сохранился промежуточный вариант на пути от «дикого» вируса к современному донору аттенуации – вирус В/СССР/17/69. Этот вирус был подготовлен в результате 17 последовательных пассажей в куриных эмбрионах при оптимальной температуре 32°C исходного «дикого» вируса и использовался в СССР в начале 1970-х годов в производстве живой гриппозной вакцины для взрослых. Для получения вакцины для детей штамм В/СССР/17/69 был дополнительно аттенуирован 60-кратным пассированием в РКЭ при 25-28°C. Впоследствии этот штамм стал применяться в качестве донора аттенуации В/СССР/60/69 для реассортантной ЖГВ (Александрова, Климов, 1994).

Исходя из наших многочисленных наблюдений, можно полагать, что общий предшественник вакцинного штамма В/СССР/17/69 и донора аттенуации В60 обладал *non-ts/non-ca* фенотипом, как и другие эпидемические вирусы гриппа В тех лет выделения. Вирус В/СССР/17/69 в результате 17 пассажей при оптимальной температуре приобрел свойство температурочувствительности репродукции, но сохранил присущий «дикому» родителю *non-ca* фенотип. Сравнительный молекулярно-генетический анализ *ts/non-ca* и *ts/ca* вариантов дает возможность выявить, по крайней мере, мутации, определяющие холодоустойчивость репродукции донора аттенуации В60.

Чтобы определить уникальные мутации, специфичные для становления температурочувствительности донора В60, было проведено сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей донора аттенуации с соответствующими последовательностями эпидемических вирусов гриппа В, выделенных в период с 1940 до 2006 года и депонированных в Базах данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html> и <http://www.flu.lanl.gov>). Для сравнения первичных последовательностей «диких» и мутантных вирусов гриппа В использован вирус гриппа В/Яманаши/166/98. Количество проанализированных сиквенсов и результаты анализа отражены в таблице 1.

Таблица 1 - Уникальные аминокислотные замены во внутренних белках донора аттенуации *ca/ts* В/СССР/60/69/525 в сравнении с *non-ca/ts* В/СССР/17/69, отстоящим на 17 пассажей от утраченного исходного родительского вируса, и «дикими» вирусами гриппа В разных лет циркуляции

Белок	а.к.	<i>non-ca/non-ts wt вирус*</i>	<i>non-ca/ts</i> В17	<i>ca/ts</i> В60	Кодирующая мутация			роль гена в проявлении <i>ts/ca</i> фенотипа
					появилась после пассирования при t°	не обнаружена у <i>wt</i> вируса ¹	уникальность мутации	
PB2	319	Leu	Gln	Gln	32°C	45/45 ²	Да	<i>ts</i>
	467	Glu	Gly	Gly	32°C	45/45	Да	
	639	Arg	Arg	Lys	25°C	15/45 ³	Нет	
PB1	–	–	–	–	–	69/69	–	–
PA	149	Ser	Asn	Asn	32°C	57/57	Да	<i>ts/ca</i>
	524	Thr	Lys	Lys	32°C	57/57	Да	
NP	–	–	–	–	–	108/108	–	–
M1	167	Arg	Lys	Lys	32°C	31/31	Да	<i>иная</i> ⁴
BM2	87	Ile	Ile	Val	25°C	28/31	нет	–
NS1	104	Cys	Ser	Ser	32°C	87/87	Да	<i>иная</i> ⁴
NS2	–	–	–	–	–	90/90	–	–

*Вирус гриппа В/Яманаши/166/98 использован для сравнения аминокислотных последовательностей «диких» и мутантных вирусов гриппа В.

Сиквенсы «диких» (*wt*) вирусов получены из баз данных <http://www.flu.lanl.gov> и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>.

¹Количество «диких» вирусов гриппа В, аминокислотные последовательности белков которых выровнены с последовательностями соответствующих белков вакцинного штамма В/СССР/69/17 (В17) и холодоадаптированного донора аттенуации В/СССР/60/69 (В60);

²подобная аминокислотная замена не обнаружена у 45 из 45 проанализированных *wt* вирусов;

³не уникальная мутация, встречается у 33% изученных «диких» вирусов более позднего периода циркуляции, поэтому ее роль в проявлении *ca* фенотипа, так же, как и в проявлении *ts* фенотипа, не однозначна; ⁴мутация, не связанная напрямую с приобретением *ts/ca* фенотипа.

В первичной структуре генома донора В60/525 установлено восемь кодирующих мутаций, предположительно появившихся в результате пассирования эпидемического родительского вируса в РКЭ при оптимальной и пониженной до 25°C температуре. В гене PB2 - три мутации, в PA - две, в М - две, приведшие к одной аминокислотной замене в белке М1 и одной в белке BM2, в NS1 - одна мутация. Две из восьми мутаций: в белке PB2 (Arg–639–Lys), и в белке BM2 (Ile–87–Val), не

могут считаться абсолютно уникальными, так как присутствуют у некоторых более поздних эпидемических вирусов. С другой стороны, они не были обнаружены у вирусов, циркулировавших в тот же временной период – в 1960-1970-х годах (вирусы В/Энн Арбор/1/66, В/Россия/69, В/Гонконг/5/72, В/Гонконг/8/73, В/Сингапур/222/79). В общей сложности гены, кодирующие РНП комплекс клонированного донора аттенуации В60, содержат четыре уникальных и одну неуникальную мутацию.

Не было обнаружено ни одной кодирующей мутации ни в гене PB1, ни в гене NP донора аттенуации В60. Эти результаты коррелируют с фенотипическим анализом реассортантов, свидетельствующим о том, что гены PB1 и NP не участвуют в формировании *ts/ca* фенотипа. Роль мутаций в генах M и NS1 пока не ясна, возможно, они имеют значение для аттенуации донора, но не связаны с его температурными характеристиками.

Заключение. Представлены результаты клонирования гетерологичной популяции донора аттенуации для компонента ЖГВ на основе вирусов гриппа В. Клонированный донор аттенуации В/СССР/60/69 имеет восемь специфичных мутаций, в том числе четыре уникальные мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса PB2 и PA.

Представлена концепция единого механизма аттенуации реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины на основе отечественных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69, суть которой состоит в том, что молекулярные основы формирования *ts/ca* фенотипа реассортантных вакцинных вирусов гриппа А и В едины и определяются мутантными генами, кодирующими белки полимеразного комплекса.

2.2 ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ШТАММОВ ВИРУСОВ ГРИППА

2.2.1 ИЗМЕНЕНИЕ ПРИЗНАКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТЕМПЕРАТУРЕ РЕПРОДУКЦИИ КАК ОТРАЖЕНИЕ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА

Характеристика вирусов гриппа с позиции такого их биологического свойства, как способность к репродукции при температурных режимах за верхним и нижним пределом оптимальных значений имеет фундаментальный научный интерес, углубляющий знания о закономерностях эволюционной изменчивости вирусов гриппа. В прикладном аспекте, при разработке аттенуированных штаммов ЖГВ, характеристика температурного диапазона репродукции эпидемического вируса, как компонента скрещивания, важна для выбора рациональной стратегии эффективного получения вакцинных реассортантов.

Проведен ретроспективный анализ эпидемических вирусов гриппа А и В человека, выделенных разных регионах, в различные эпидемические и пандемические циклы и в рамках единичных локальных эпидемий, по способности к репродукции в РКЭ при температурах за пределами оптимальных.

Изучен фенотип 65 вирусов А(Н1N1), 23 вирусов А(Н2N2), 84 вирусов А(Н3N2) и 62 вирусов В.

Результаты ретроспективного исследования признака температурочувствительности репродукции «диких» вирусов гриппа свидетельствуют о том, что температурный диапазон репродукции подвержен значительной изменчивости в ходе естественного дрейфа возбудителей гриппа А (Н1N1, Н2N2 и Н3N2) и В линий «Виктория» и «Ямагата». На рисунках 3 и 4, как пример, представлена характеристика эволюции признака температурочувствительности у вирусов гриппа А (Н3N2) и обеих линий вируса гриппа В.

Начало пандемического цикла у вирусов гриппа А(Н3N2) и А(Н2N2), а также у ранних представителей вирусов гриппа А (Н1N1) и В, неизменно характеризовалось циркуляцией температуроустойчивых возбудителей. Дальнейшая эволюция приводила к попеременной циркуляции *non-ts* и *ts* вирусов, которые со временем окончательно вытеснялись температурочувствительными. Каждый сероподтип вируса гриппа А(Н1N1 и Н3N2) и обе линии вируса гриппа В прошли несколько циклов волнообразного изменения признака температурочувствительности. Даже вирусы «азиатского» гриппа А(Н2N2), несмотря на непродолжительный, всего одиннадцатилетний период циркуляции, характеризовались эволюцией от *non-ts* к *ts* фенотипу. Зафиксированы факты изменчивости *ts* фенотипа и у антигенно однородных вирусов. О том, что в некоторых случаях среди антигенно однородных вирусов можно изолировать различающиеся по температурочувствительности варианты, свидетельствуют также результаты характеристики по этому признаку эпидемических штаммов вируса гриппа А и В, выделенных во время одной эпидемии или локальной вспышки («В/Ямагата»-подобные вирусы, «В/Виктория»-подобные вирусы, А/Новая Каледония (Н1N1)-подобные вирусы, А/Панама (Н3N2)-подобные вирусы, А/Берн (Н3N2)-подобные вирусы).

Эволюция антигенных и биологических свойств вирусов гриппа, по-видимому, взаимосвязанные процессы, при этом темпы эволюции температурочувствительности могут опережать антигенную изменчивость.

При исследованиях вирусов гриппа в лабораторных условиях можно направленно сформировать те же виды изменчивости, которые наблюдаются у вирусов в природе. Лабораторные работы в этом направлении позволяют приблизиться к пониманию глубинных механизмов эволюционной изменчивости вируса гриппа. Анализ полученных селективным путем доноров аттенуации и реассортантных штаммов ЖГВ на их основе позволяет предположить, что температурочувствительность вирусов является свидетельством их аттенуации для экспериментальных животных и человека. Температурочувствительность не позволяет вирусу проникать в нижние отделы респираторного тракта и ограничивает его репродукцию носоглоткой, где температура ниже. Если температурочувствительность циркулирующих вирусов гриппа также

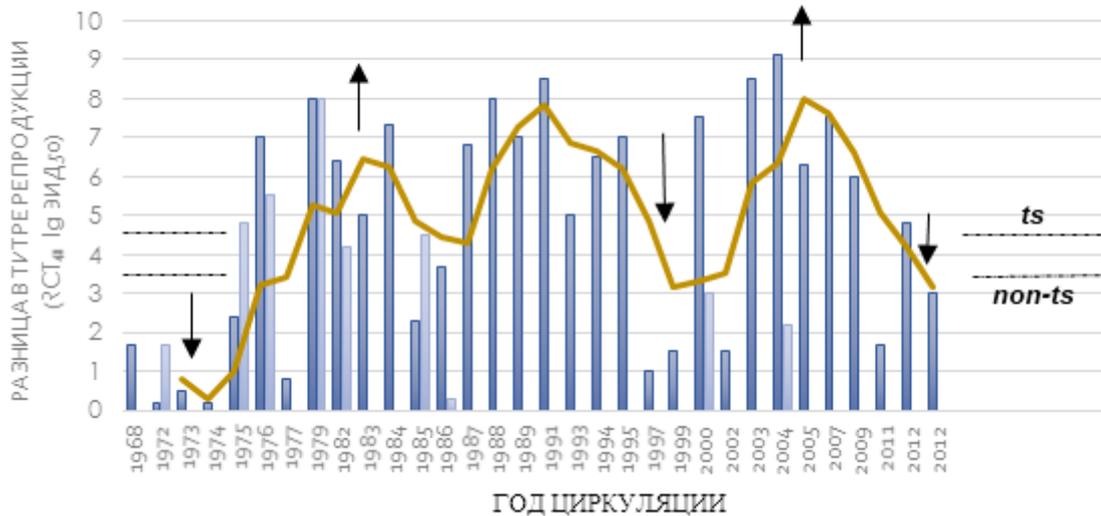


Рисунок 3 - Эволюция вирусов гриппа А(Н3N2) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах

По оси абсцисс – годы циркуляции возбудителя, по оси ординат – разница в репродукции вируса при 33°C и 40°C, выраженная в lg ЭИД₅₀/мл (RST₄₀).

Здесь и на рис 4: Направление стрелки вверх - тенденция усиления температурочувствительности вирусов, вниз – температуроустойчивости.

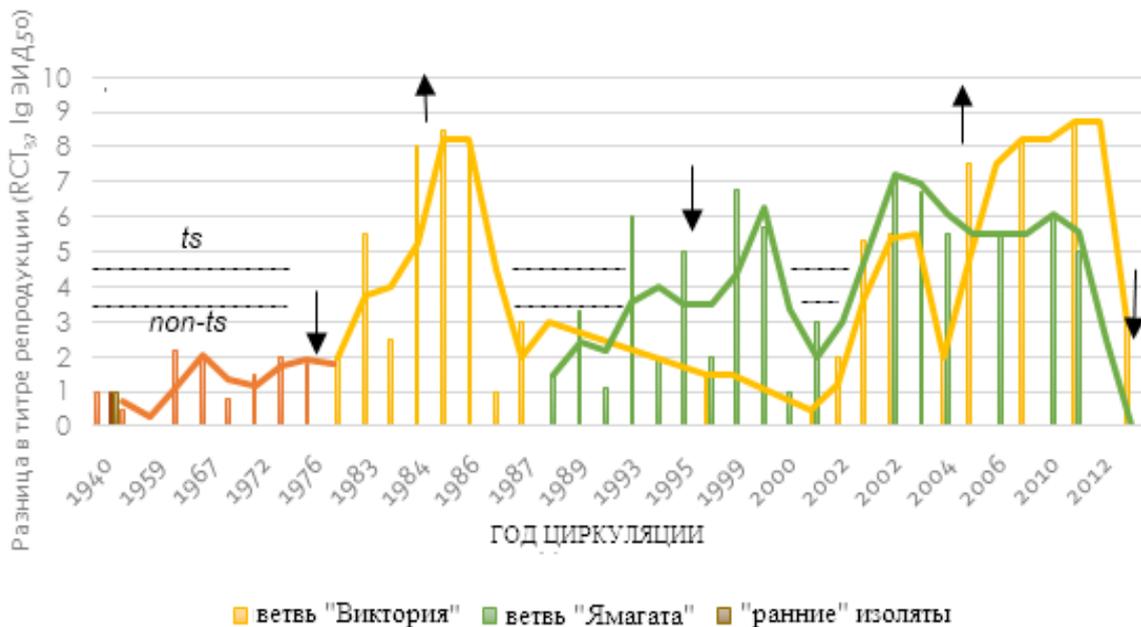


Рисунок 4 - Эволюция вирусов гриппа В по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах

По оси абсцисс – годы циркуляции возбудителя, по оси ординат – разница в репродукции вируса при 33°C и 37°C, выраженная в lg ЭИД₅₀/мл (RST₃₇).

в определенной мере указывает на снижение вирулентности, а вместе с ростом коллективного иммунитета в сообществе снижает их эпидемические потенции, то факт стабильной циркуляции температурочувствительных вирусов можно рассматривать как предпосылку появления нового дрейфового или шифтового антигенного варианта. Это предположение подтверждается

следующим наблюдением: накануне пандемии, вызванной вирусом А(Н1N1)pdm2009, регистрировался период длительной социркуляции температурочувствительных вирусов гриппа А (Н1N1), А (Н3N2) и В. Пандемический вирус А/Калифорния/07/09 (Н1N1)pdm открыл очередной цикл циркуляции *non-ts* вирусов, он обладает высокой репродуктивностью при 40°C ($RCT_{40}=1,2$ Ig ЭИД₅₀/мл). Антигенно близкородственные А(Н1N1)pdm09 вирусы до сих пор сохраняют температуроустойчивый фенотип (например, штамм А/Боливия/559/13).

Заключение. Таким образом, есть основания полагать, что с учетом *ts* фенотипа можно точнее оценивать эпидемические потенции вновь появляющихся штаммов и заблаговременно формировать более обоснованный прогноз ожидаемой заболеваемости гриппом и даже прогнозировать возможность появления антигенно обновленного возбудителя.

Эволюцию вируса гриппа следует рассматривать не только с позиции новизны поверхностных антигенов, но и принимать во внимание изменение таких фенотипических признаков, как температурочувствительность репродукции.

Отмечены спорадические случаи циркуляции эпидемических вирусов А и В, обладающих устойчивостью к пониженной до 25°C температуре инкубации ($RCT_{25} \leq 3,5$ IgЭИД₅₀/мл). Роль выявленной нами холодоустойчивости некоторых природных изолятов и даже эталонных вирусов гриппа не исследована, однако сопоставление с селективно полученными *ts/ca* донорами аттенуации дает основания полагать, что *ca* фенотип «диких» вирусов в сочетании с температурочувствительностью, является опосредованным указанием на их естественную аттенуацию. Вирусы же, проявляющие *non-ts/ca* фенотип, вероятно, способны к репродукции в широком диапазоне температур, позволяющей им инфицировать как верхние, так и нижние отделы респираторного тракта.

2.2.2 ИЗМЕНЕНИЕ ПРИЗНАКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ИНГИБИТОРАМ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ВИРУСОВ ГРИППА В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Гликаны с сиалил α -2,6 галактозной специфичностью на поверхности клетки распознаются гемагглютинином вирусов гриппа человека в качестве рецепторов для прикрепления. Вирусы гриппа птиц для рецепторного взаимодействия используют гликаны с сиалил α -2,3 галактозной специфичностью. Сыворотка крови лошади содержит большое количество α_2 -макроглобулинов с углеводными компонентами, включающими сиалил α -2,6 галактозные остатки, которые имитируют клеточные рецепторы для вирусов гриппа человека и за счет этого способны ингибировать вирус. Поэтому фактор чувствительности/устойчивости к термостабильным ингибиторам (*is/ir* фенотип) служит маркером α -2,6/ α -2,3 рецепторной специфичности вирусов.

При подготовке реассортантов ЖГВ ингибиторочувствительность эпидемического родителя может приводить к неспецифическому связыванию его гемагглютининов с используемой в методике сывороткой к донору аттенуации, что затрудняет селекцию вариантов с вакцинной

формулой генома. Поэтому характеристику эпидемических вирусов по признаку чувствительности к ингибиторам необходимо учитывать для выбора правильной стратегии в работе.

Для выделения и воспроизводства антигенно актуальных вирусов гриппа кандидатов в вакцину разрешено использовать только РКЭ (WHO, 2013), а на клетках хориоаллантоисных оболочек РКЭ преобладают α -2,3-специфичные рецепторы. Поэтому культивирование в РКЭ вирусов гриппа человека способствует появлению в гене НА мутаций, направленных на распознавание рецепторов с α -2,3 типом связи (Ryan-Poirier et al., 1998). Этот нежелательный процесс может повлиять на успех репродукции штаммов ЖГВ в клетках респираторного тракта человека и снижать иммуногенность вакцины.

Мы провели ретроспективную оценку чувствительности к термостабильным ингибиторам выделенных в РКЭ эпидемических эталонных вирусов гриппа А и В и изолятов из разных эпидемий. Исследуемые штаммы вирусов гриппа прошли в РКЭ от 2 до 5 пассажей. Равные условия культивирования в РКЭ позволяют сравнить исследуемые вирусы по признаку ингибиторочувствительности, и возможно также провести оценку тенденций эволюции признака у разных сероподтипов и линий вирусов гриппа А и В. Тем более, что распознавание α -2,6 или α -2,3 связей у вирусов гриппа сероподтипов H1N1 и H3N2 может не полностью коррелировать с чувствительностью к ингибиторам сыворотки крови лошади (Rogers, 1989, Ryan-Poirier 1998).

В качестве источника термостабильных ингибиторов использовали прогретую (80-100°C, 10 мин) неиммунную сыворотку крови лошади.

Ретроспективный анализ вирусов гриппа по признаку чувствительности к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади. Анализ чувствительности к термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади 48 эпидемических вирусов гриппа А, выделенных с 1934 по 2012 гг., показал, что все исследованные вирусы гриппа А(H1N1) проявляли устойчивость к термостабильным ингибиторам. Вирусы гриппа А(H2N2) и А(H3N2) значительно варьировали по исследуемому признаку. Из 24 исследованных вирусов А(H3N2) около 46% обладали чувствительностью к сывороточным ингибиторам.

Анализ 76 вирусов гриппа В продемонстрировал, что эволюция, результатом которой стало появление двух циркулирующих линий вирусов гриппа В, привела к отличию вирусов разных линий по признаку чувствительности к термостабильным сывороточным ингибиторам. Так, «ранние» вирусы гриппа В, были устойчивы к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади. Дальнейшее расхождение на две линии В/Виктория/02/87- и В/Ямагата/16/88-подобных вирусов отразилось на чувствительности к неспецифическим термостабильным ингибиторам. Все изученные вирусы линии «Ямагата» оказались ингибиторочувствительными. Напротив, вирусы линии «Виктория» выделенные с 1987 по 2013 гг. были ингибиторочувствительными, лишь в эпидемический сезон 2011/12 года среди представителей

«Викторианской» линии появились ингибиторочувствительные вирусы, как, например, вирус В/Невада/3/11, показавший титр в РТГА с сывороткой лошади 1:640 (рис. 5).



Рисунок 5 - Эволюция вирусов гриппа В по признаку чувствительности к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови

По оси абсцисс – годы выделения эпидемических вирусов гриппа В. По оси ординат – титр неиммунной сыворотки крови лошади в РТГА. Стрелкой обозначен момент расхождения НА вируса гриппа В на ветви В/Виктория/1/87- и В/Ямагата/16/88-подобных вирусов.

2.2.3 РОЛЬ НЕЙРАМИНИДАЗЫ В ПРОЯВЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА К НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ИНГИБИТОРАМ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Чувствительность/устойчивость вирусов гриппа к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови определяется свойствами его НА (Matrosovich et al., 1998). Соответственно, при получении штаммов ЖГВ с формулой генома 6:2, этот признак переходит к реассортантными вирусами с генами эпидемического родителя. В литературе высказано предположение об участии также нейраминидазы в проявлении ингибиторочувствительности вирусов гриппа (Gimsa et al., 1996).

Для того, чтобы оценить возможное индивидуальное участие НА в наследовании реассортантными вирусами чувствительности к термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови, мы сравнили чувствительность к сывороточным ингибиторам родительских вирусов и реассортантов с формулой генома 6:2 и 7:1. В исследовании были использованы реассортанты, полученные на основе устойчивых к сывороточным ингибиторам доноров аттенуации А17 и В60 и отличающихся по температурочувствительности эпидемических вирусов гриппа А и В.

При скрещивании доноров *att* с устойчивыми к ингибиторам эпидемическими вирусами гриппа А и В все реассортанты, независимо от формулы генома 6:2 или 7:1, характеризовались такой же высокой устойчивостью к ингибиторам. Однако, степень ингибиторочувствительности реассортантных вирусов с формулой генома 6:2 и 7:1 существенно отличалась, если в качестве источника поверхностных антигенов использовали *is* «дикий» вирус (рис. 7). Отмечено, как минимум, 8–кратное (3-4 Ig₂ СГТ) снижение титра в РТГА с неиммунной сывороткой морской

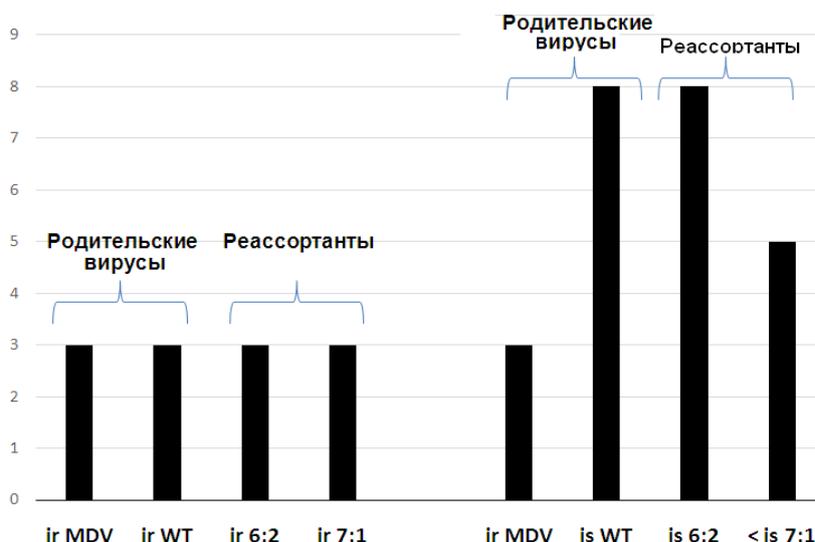
Титр ингибирования вирусав РТГА с неиммунной сывороткой крови морской свинки, \log_2 СГТ

Рисунок 7 - Влияние нейраминидазы устойчивых к ингибиторам неиммунной сыворотки крови морской свинки доноров аттенуации на ингибиторочувствительность реассортантных штаммов в реакции торможения гемагглютинации. *Обозначения:* СГТ- средний геометрический титр в РТГА.

свинки у всех 7:1 реассортантов, унаследовавших НА от *is* родителя, а NA – от *ir* донора аттенуации, по сравнению с аналогичными 6:2 реассортантами и/или родительскими вирусами ($t = 11.09$; $p < 0,0001$).

Установленный факт свидетельствует о комплексном участии белков НА и NA во взаимодействии с неспецифическими ингибиторами сыворотки крови и о вкладе нейраминидазы в проявление ингибиторочувствительного фенотипа вирусов гриппа.

Заключение. Таким образом, проведенный анализ чувствительности к термостабильным ингибиторам сыворотки крови ряда эпидемических вирусов гриппа А и В, выделенных с 1934 по 2012 гг., позволил сделать некоторые обобщения о циркуляции *is* и *ir* штаммов вируса гриппа. Вирусы гриппа А(Н1N1) устойчивы к термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади и морской свинки. Вирусы гриппа А(Н2N2) и (Н3N2) варибельны по ингибиторочувствительности. Эволюция вирусов гриппа В, результатом которой стало появление двух ветвей «Ямагата»- и «Виктория»-подобных вирусов привела к их разделению по признаку чувствительности к термостабильным сывороточным ингибиторам. Показано комплексное участие белков НА и NA в проявлении вирусами гриппа ингибиторочувствительного фенотипа.

2.3 ПОДГОТОВКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫХ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ДЛЯ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ СОВРЕМЕННЫХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА

С 1995 года автором было передано в производство 19 холодоадаптированных реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ, а также подготовлены 4 вакцинных штамма к

потенциально-пандемическим вирусам гриппа: свиней А (H3N2)v и высокопатогенным вирусам гриппа птиц А (H5N1) (табл. 2).

Реассортантные штаммы живой гриппозной вакцины наследуют от донора аттенуации такие свойства, как холодоадаптированность, температурочувствительность и безвредность для человека, от эпидемически актуального родителя – антигенную специфичность HA и NA, а также устойчивость/чувствительность к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови.

Таблица 2 - Реассортантные вакцинные штаммы, подготовленные для сезонных, пандемической и потенциально пандемических аттенуированных ЖГВ с 1995 по 2015 гг.

Вакцинный штамм	Сероподтип (линия)	Родительские вирусы		Применялся в эпидсезоны
		донор	эпидемический вирус	
Вакцинные штаммы, переданные в производство				
A/17/Иоганнесбург/94/1	H3N2	A17	A/Иоганнесбург/33/94	1995-1996 гг.
A/17/Нанчанг/95/4	H3N2	A17	A/Нанчанг/933/95	1996-1998 гг.
A/47/Нанчанг/95/13 ¹	H3N2	A47	A/Нанчанг/933/95	1996-1998 гг.
B/60/Петербург/95/20	Ямагата	B60	B/Петербург/92/95	1997-2001 гг.
B/60/Иоганнесбург/99/50	Ямагата	B60	B/Иоганнесбург/05/99	2001-2002 гг.
A/17/Вайоминг/03/8	H3N2	A17	A/Вайоминг/3/03	2004-2005 гг.
B/60/Джилин/03/1	Ямагата	B60	B/Джилин/20/03	2004-2006 гг.
B/60/Малайзия/04/898	Виктория	B60	B/Малайзия /2506/04	2006-2008 гг.
B/60/Флорида/04/181	Ямагата	B60	B/Флорида/07/04	2008-2009 гг.
A/17/Соломоновы острова/06/9	H1N1	A17	A/Соломоновы острова/03/06	2007-2008 гг.
A/17/Брисбен/07/28	H1N1	A17	A/Брисбен/59/07	2008-2010 гг.
A/17/Брисбен/07/1	H3N2	A17	A/Брисбен/10/07	2008-2010 гг.
B/60/Брисбен/08/83	Виктория	B60	B/Брисбен/60/08	2009-2011 гг.
A/17/Калифорния/09/38	H1N1pdm09	A17	A/Калифорния/07/09	2009-2016 гг.
B/60/Висконсин/10/125	Ямагата	B60	B/Висконсин/1/10	2012-2013 гг.
A/17/Виктория/11/89	H3N2	A17	A/Виктория/361/11	2012-2013 гг.
A/17/Техас/12/30	H3N2	A17	A/Техас/50/12	2013-2015 гг.
B/60/Массачусетс/12/10	Ямагата	B60	B/Массачусетс/2/12	2013-2015 гг.
B/60/Пхукет/2013/26	Ямагата	B60	B/Пхукет/3073/2013	2015-2016 гг.
Резервные вакцинные штаммы, подготовленные к потенциально пандемическим вирусам гриппа				
A/17/Индиана/11/72	H3N2v	A17	A/Индиана/10/11 ²	
A/17/Вьетнам/04/65107	H5N2	A17	VN-PR (H5N1) ²	
A/17/индюк/Турция/05/133	H5N2	A17	NIBRG-23 (H5N1) ³	
A/17/Индонезия/05/4241	H5N2	A17	INDO-PR (H5N1)	

¹Вакцинный штамм для детей. До 2004 г. штаммы ЖГВ для детей готовились на доноре аттенуации А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) (A47), прошедшем 30 дополнительных пассажей при 25°C (Александрова, Климов, 1994).²Закончены доклинические испытания. ³Закончена I-II фаза клинических испытаний.

2.3.1 РЕАССОРТАНТНЫЕ ШТАММЫ ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ СЕЗОННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА

Все штаммы, стабильно характеризовались необходимыми для реассортантной ЖГВ показателями:

- Обладали признаком высокой репродуктивности, размножаясь в РКЭ при оптимальной температуре до 8,2-10,2 lg ЭИД₅₀/мл.

- Обладали признаком холодоустойчивости (*ca* маркер) в опытах на РКЭ, т.е. активно репродуцировались при пониженной до 25°C температуре.

- Обладали признаком температурочувствительности в опытах на РКЭ (*ts* маркер), т.е. плохо репродуцировались при повышенной до 40°C (вирусы гриппа В - до 38°C) температуре инкубации.

- Были полностью нетоксичными для экспериментальных животных при введении массивных доз вируса в тестах на острую и подострую токсичность.

В исследованиях *in ovo* и изолятов от привитых лиц характеризовались стабильностью фенотипических и генетических признаков. При вакцинации детского контингента отмечена хорошая приживляемость компонентов сезонной трехвалентной вакцины и отсутствие трансмиссивности детям группы плацебо.

Заключение. Все штаммы ЖГВ, подготовленные на основе сезонных вирусов гриппа, характеризуются сочетанием полезных признаков необходимых вакцинным штаммам: антигенной специфичностью эпидемических вирусов, структурой генома 6:2, оптимальной для реассортантных вакцинных штаммов, характерной для доноров аттенуации температурочувствительностью, холодоадаптированностью и безвредностью для лабораторных животных, что коррелирует с аттенуацией для человека. По биологическим свойствам вакцинные реассортанты соответствуют требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам на живую гриппозную вакцину для интраназального применения для взрослых и для детей (Фармакопейная статья (ФСП: Р N003224/01–270313) на Ультравак[®], вакцину гриппозную аллантоисную живую для интраназального применения для взрослых и для детей).

2.3.2 РЕАССОРТАНТНЫЕ ШТАММЫ ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ ПАНДЕМИЧЕСКОГО И ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА

Вирусы гриппа птиц и животных спорадически могут передаваться людям, вызывая вспышки различной степени тяжести. Как правило, дальнейшая передача вируса от человека к человеку, не происходит, и вспышка затухает. В других ситуациях трансмиссивность приобретает устойчивый характер, что может привести к пандемии гриппа. Заблаговременная подготовка к возможной будущей пандемии является важной глобальной стратегией общественного здравоохранения. Основная цель подготовки вакцин к вирусам гриппа с высоким пандемическим потенциалом, заключается в подборе оптимального метода разработки эффективной вакцины, тестирования ее и создания коллекции вакцин, которые могут быть использованы в условиях экстренной необходимости.

В соответствии с этой целью были подготовлены вакцинные штаммы к пандемическому вирусу гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm, экспериментальные вакцины к потенциально пандемическим вирусам гриппа свиней А/Индиана/10/2011(H3N2)v и высокопатогенным вирусам гриппа птиц (HPAIV) А(H5N1).

Задача подготовки вакцинных штаммов для HPAIV H5N1 потребовала разработки метода, позволяющего преодолеть патогенность вирусов для куриных эмбрионов. Использование в качестве источника поверхностных антигенов вирусов гриппа птиц реассортантных штаммов для инактивированных вакцин A(H5N1)-PR8-RG с генами HA и NA от вирусов H5N1 и генами внутренних белков от вируса A/PR8/34, сконструированных генно-инженерными методами, и аттенуированных за счет удаления полиосновного сайта рестрикции, позволило приемами классической реассортации провести замену внутренних генов штаммов A(H5N1)-PR8-RG на гены донора аттенуации для ЖГВ. При этом были выявлены ограничения в конstellации генов вируса человека A(H2N2) и вирусов птиц A(H5N1), из-за которых NA N1 вирусов птиц переходила в состав реассортантов только с белком PB2/PR8, что не давало возможность получить вакцинные реассортанты для ЖГВ с формулой генома 6:2. Были получены реассортанты с геном HA H5 вирусов птиц, а гены NA N2 и внутренних белков унаследовавшие от донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57. Наследование от HPAIV единственного гена HA со сниженной вирулентностью за счет удаления полиосновного сайта рестрикции, может расцениваться благоприятно в случае использования ЖГВ к высокопатогенным вирусам

Согласно требованиям, разработанным для вакцинных штаммов на основе пандемических и потенциально пандемических вирусов гриппа, проведены их доклинические испытания. ЖГВ на основе штаммов A/17/Калифорния/2009/38(H1N1)pdm, A/17/Индиана/2011/72 (H3N2)v, A/17/Вьетнам/04/65107 (H5N2), A/17/индюк/Турция/05/133(H5N2) характеризуются аттенуацией, высокой иммуногенностью и протективной активностью для лабораторных животных. По основным биологическим свойствам, изученным в доклинических экспериментах *in vitro* и *in vivo*, они соответствуют требованиям, предъявляемым к штаммам ЖГВ «Фармакопейной статьей на вакцину гриппозную аллантоисную живую для интраназального применения для взрослых и для детей».

2.3.3 ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОДГОТОВКИ РЕАССОРТАНТНЫХ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ ВИРУСОВ ГРИППА А И В

Метод получения реассортантных штаммов для аттенуированной реассортантной ЖГВ был разработан и до сих пор успешно применяется на модели эпидемических вирусов гриппа, обладающих классическими характеристиками вирулентных штаммов: *non-ts/non-ca* фенотипом. Когда «дикий» вирус обладает *non-ts/non-ca* характеристиками, и при этом устойчив к термостабильным ингибиторам, проблем в разработке вакцинных 6:2 реассортантов не возникает. В такой ситуации четко работают все, предусмотренные методикой, селективные факторы: пониженная температура дает селективные преимущества генам *ca* донора аттенуации, а гипериммунная сыворотка против донора способствует формированию реассортантов с антигенно актуальными гемагглютинином и нейраминидазой «дикого» родителя. При

температууроустойчивости «дикого» вируса пониженная температура также обеспечивает преимущества внутренним генам *ts/ca* донора, у которого смещен температурный диапазон репродукции. Ингибитороустойчивость вируса к макроглобулинам лошадиной сыворотки свидетельствует о его α -2,3 сиалилгалактозной рецепторной специфичности, что способствует хорошей репродукции «дикого» вируса в РКЭ. Это дает эпидемическому вирусу равные с *ir* донором аттенуации репродуктивные возможности. Важно также, что не происходит неспецифического ингибирования «дикого» вируса гипериммунной сывороткой к донору аттенуации, используемой как селективный фактор для преимущественного включения в состав реассортанта актуальных НА и НА.

Как было продемонстрировано выше, фенотипические свойства современных естественно циркулирующих «диких» вирусов существенно различаются.

Реассортация донора аттенуации с природно холодоустойчивым «диким» вирусом сводит «на нет» роль пониженной температуры, как селективного фактора, а также лишает возможности использования *ca* фенотипа в качестве *ca* маркера аттенуации.

Широкое распространение в циркуляции *ts* вирусов обесценило также роль *ts* маркера аттенуации.

Существенное влияние на успех реассортации оказывает устойчивость эпидемического родителя к сывороточным ингибиторам. Геномный анализ 684 реассортантов на основе сезонных вирусов гриппа А и В показал, что только 19,5% от общего числа (401) клонов ингибиторочувствительного «дикого» родителя на следовали НА «дикого» типа, тогда как среди (283) *ir* реассортантов их количество возрастало до 92,2% (рис. 8).

Способы преодоления сложностей при создании реассортантов для ЖГВ

Оценка эпидемических вирусов по признаку чувствительности к термостабильным ингибиторам позволяет подобрать наиболее рациональные мероприятия для успешного получения вакцинных реассортантов на основе актуального *is* вируса. Такими мероприятиями должны быть: подбор оптимального соотношения родительских вирусов, взятых в скрещивание (превалирование *is* родителя над донором аттенуации), подбор оптимальной рабочей концентрации антисыворотки к донору, которая не должна превышать 50 ГАЕ. В этой ситуации особенно важно использование максимально высокотитражной сыворотки, что позволяет снизить концентрацию неспецифических ингибиторов в рабочем разведении сыворотки.

Неиммунная сыворотка крови лошади богата ингибиторами, связывающимися с α -2,6 сиалилгалактозными рецепторами, поэтому ингибиторочувствительность вируса является опосредованным показателем того, что его НА обладает α -2,6 рецепторной специфичностью. Поскольку куриные эмбрионы на хориоаллантоисной оболочке преимущественно содержат α -2,3 рецепторы, то при реассортации эпидемического ингибиторочувствительного родителя с донором

аттенуации, преимущество будет иметь хорошо адаптированный к репродукции в РКЭ *ir* донор аттенуации.

Поэтому для обеспечения равных возможностей обоих родительских вирусов на этапе скрещивания следует давать множественное преимущество эпидемическому вирусу.

Кроме того, *is* штаммы, как обладающие α -2,6 рецепторной специфичностью, должны хуже репродуцироваться в РКЭ, где преобладают α -2,3 рецепторы, а, следовательно, при скрещивании донор, хорошо адаптированный к РКЭ, будет обладать селективным преимуществом перед штаммами с α -2,6 рецепторной специфичностью. Для поддержания успешной реассортации такие «дикие» вирусы надо брать в скрещивание в большей инфекционной множественности.

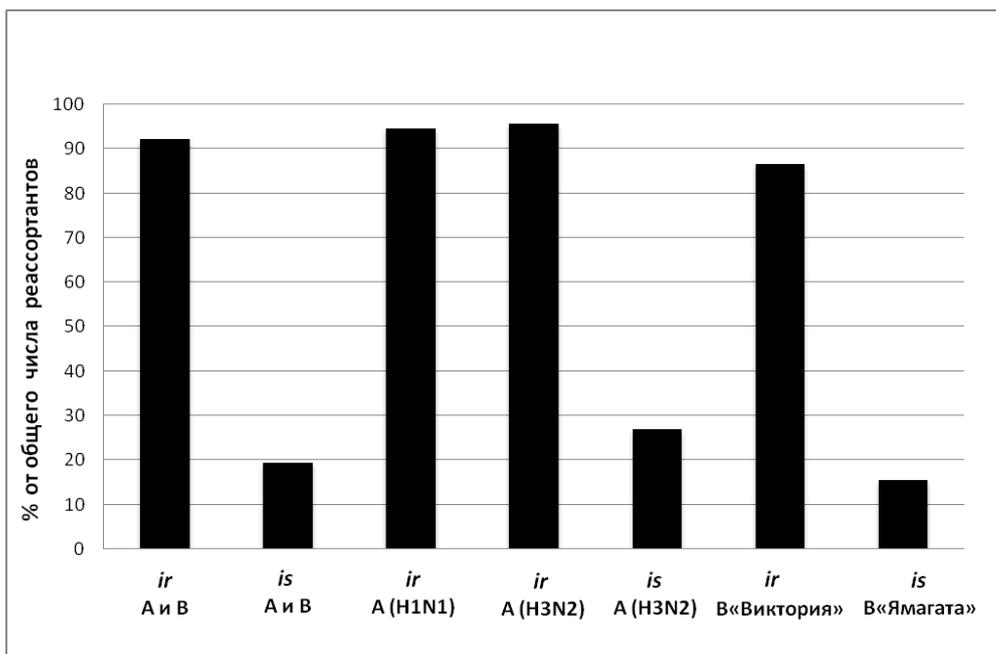


Рисунок 8 - Наследование реассортантами нейраминидазы от эпидемического родителя при скрещивании с донорами аттенуации ингибиторочувствительных (*is*) и ингибиторостойчивых (*ir*) вирусов гриппа А и В (% от общего числа реассортантов)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что определяющую роль в аттенуации холодоустойчивых реассортантов, полученных на основе доноров аттенуации А и В для отечественной ЖГВ играют мутантные гены полимеразного комплекса. За температурочувствительный фенотип реассортантов на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) отвечают мутантные гены донора PB2, PB1 и PA, как совместно, так и попарно при обязательном участии гена PB2.

Мутантные гены PB2 и PA донора аттенуации В/СССР/60/69 независимо друг от друга обеспечивают формирование *ts* фенотипа реассортантов. Мутация в гене PB1 приводит к усилению температурочувствительности клона из гетерогенной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69. За проявление *sa* фенотипа ответственны мутации в гене PA.

2. Обнаружено существование закономерности в эволюции вирусов гриппа А и В по признаку температурочувствительности (*ts*) репродукции. Продемонстрирован волнообразный

(циклический) характер изменения признака устойчивости/чувствительности к температурам, превышающим физиологический оптимум, и проведена связь этого признака с изменением эпидемических потенциалов вирусов. Эволюция вируса гриппа по признаку температурочувствительности позволяет точнее оценивать эпидемические потенциалы вновь появляющихся штаммов и заблаговременно формировать более обоснованный прогноз ожидаемой заболеваемости гриппом.

3. Выявлены различия между вирусами гриппа В антигенных ветвей В/Виктория/1/87- и В/Ямагата/16/88-подобных, по признаку устойчивости к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади. Вирусы эволюционной ветви «Виктория» сохранили устойчивость к неспецифическим термостабильным ингибиторам, присущую ранним известным вирусам гриппа В, а вирусы эволюционной линии «Ямагата» приобрели высокую ингибиторочувствительность. Это наблюдение опосредованно свидетельствует об эволюционном изменении рецепторной специфичности у вирусов гриппа В линии «Ямагата».

4. Показано, что впервые полученные реассортантные штаммы ЖГВ к новому пандемическому вирусу гриппа А(Н1N1)рdm09 и потенциально пандемическому вирусу гриппа свиней А(Н3N2)v являются генетически стабильными, безвредными и высоко иммуногенными для лабораторных животных, как и штаммы ЖГВ к сезонным вирусам гриппа.

5. Продемонстрировано влияние нейраминидазы устойчивого к сывороточным ингибиторам донора аттенуации на уменьшение ингибиторочувствительности гемагглютинина вирусов гриппа А и В у реассортантов, наследующих ингибиторочувствительный НА и ингибитороустойчивую НА донора. Выявленная закономерность является свидетельством комплексного участия гемагглютинина и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении свойства чувствительности/устойчивости к сывороточным ингибиторам и опосредованным указанием на взаимное участие белков НА и NA в рецепторном взаимодействии с чувствительной клеткой.

6. Разработан новый методический подход к получению штаммов аттенуированной ЖГВ для высокопатогенных вирусов гриппа птиц А (H5N1), основанный на реассортации с донором аттенуации А(Н5N1)-PR8-RG штаммов для инактивированной вакцины, позволяющий проводить реассортацию в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и безопасный для персонала. Выявлены ограничения в способности к реассортации *ts/ca* вируса гриппа человека А (H2N2), и А(Н5N1)-PR8-RG штаммов, имеющих гемагглютинин H5 и нейраминидазу N1 птичьего вируса гриппа и внутренние белки вируса А/PR8/34 (H1N1).

В результате классического скрещивания в РКЭ не удастся получить реассортанты с вакцинной формулой генома 6:2, которые наследовали бы гемагглютинин H5(НА) и нейраминидазу N1(NA) птичьего вируса гриппа и основу из внутренних белков от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Любые варианты наследования нейраминидазы N1 птичьего вируса сопровождались включением в состав реассортанта как минимум гена PB2, происходящего

от A/PR8/34, и, наоборот, встраивание в геном реассортанта гена PB2 донора аттенуации влечет за собой передачу реассортанту донорской NA. Скрещивание донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с A(H5N1)-PR8-RG штаммами дает возможность получать *ts/ca* реассортанты с формулой генома 7:1, которые наследуют от высокопатогенных вирусов гриппа птиц единственный ген HA(H5).

Поскольку в гемагглютинине HA1 штаммов A(H5N1)-PR8-RG для снижения вирулентности вырезан полиосновный фрагмент, то, наследуя от патогенного H5N1 родителя единственный «аттенуированный» ген гемагглютинина H5, H5N2 ЖГВ приобретают дополнительные аттенуирующие свойства, что может расцениваться благоприятно при вакцинации живыми гриппозными вакцинами к высокопатогенным вирусам.

7. Доклиническая характеристика A (H5N2) ЖГВ на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц A/индюк/Турция/1/2005 (H5N1) и A/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) показала их аттенуацию для лабораторных животных (хорьков, цыплят), высокую иммуногенность и протективную активность для хорьков.

8. Результаты доклинических исследований позволили перейти к изучению свойств 7:1 вакцины A/17/индюк/Турция//133 (H5N2) на людях. Показаны высокая репродуктивность вакцинного вируса у привитых добровольцев, отсутствие трансмиссивности непривитым лицам группы плацебо, сохранность *ts/ca* фенотипа и генетическая стабильность аттенуирующих мутаций в реизолятах вакцинного вируса от привитых. Эти исследования вносят новый вклад в многолетние наблюдения за свойствами штаммов ЖГВ на основе отечественных доноров аттенуации, и демонстрируя что высокая генетическая и фенотипическая стабильность холодоадаптированных вакцинных реассортантов имеет универсальный характер и присуща не только штаммам ЖГВ на основе эпидемических вирусов гриппа человека, но и на основе не изученных ранее высокопатогенных вирусов гриппа птиц сероподтипа H5N1.

9. Проведена оценка эффективности получения реассортантных штаммов ЖГВ на основе современных штаммов вирусов гриппа. Продемонстрировано, что фенотипические свойства эволюционирующих вирусов гриппа, такие как температурочувствительность репродукции, ингибиторочувствительный фенотип, осложняют получение вакцинных 6:2 реассортантов. Предложены методические рекомендации для наиболее эффективного и быстрого получения реассортантов ЖГВ на основе вирусов гриппа, обладающих разными биологическими характеристиками.

Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации. На основании результатов диссертационного исследования планируется провести анализ роли выявленных мутаций донора В/СССР/60/69 в аттенуации с помощью реконструирования донора методами обратной генетики и введения в его гены определенных нуклеотидных замен. Исследование влияния аминокислотных замен в гемагглютинине, связанных с адаптацией к куриным эмбрионам, на рецепторные

взаимодействия штаммов ЖГВ с клетками млекопитающих и индукцию иммунного ответа даст направление путей усовершенствования ЖГВ. Выявление мутаций, связанных с природной температурочувствительностью изолятов, позволит исследовать молекулярные основы этого признака, их эволюцию и, возможно, эпидемические потенции вирусов гриппа. При получении новых реассортантных штаммов для ЖГВ предполагается использовать приведенные в диссертационном исследовании рекомендации.

ВЫВОДЫ

1. Гены, кодирующие белки полимеразного комплекса холодаадаптированных доноров аттенуации А и В, играют определяющую роль в аттенуации штаммов живой гриппозной вакцины, полученных на их основе.

За температурочувствительный фенотип реассортантов на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) отвечают разные комбинации его генов PB2, PB1 и PA при обязательном участии гена PB2. У донора аттенуации В/СССР/60/69 мутантные гены PB2 и PA обеспечивают формирование температурочувствительного фенотипа реассортантов независимо друг от друга. Дополнительная мутация Пе-644-Val в гене PB1 одного из клонов исходной популяции донора аттенуации В/СССР/60/69 приводит к повышению его температурочувствительности. За проявление *sa* фенотипа донора аттенуации В/СССР/60/69 ответственен мутантный ген PA.

2. Эволюция признака температурочувствительности репродукции вирусов гриппа А и В подвержена закономерной цикличности. В смене температурочувствительного фенотипа вирусов прослеживается связь с изменением их эпидемических потенций.

3. Выявлены различия между В/Виктория/2/87- и В/Ямагата/16/88-подобными вирусами гриппа по признаку устойчивости к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади. Вирусы эволюционной ветви «Виктория» сохранили устойчивость к неспецифическим термостабильным ингибиторам, присущую вирусам, циркулировавшим до дивергенции на две ветви, а «Ямагата»-подобные вирусы приобрели высокую ингибиторочувствительность.

4. Показано наличие прямой зависимости эффективности наследования реассортантами гена, кодирующего нейраминидазу эпидемического родительского вируса, от его ингибитороустойчивости при скрещивании с донорами аттенуации.

5. Продемонстрировано комплексное участие гемагглютинаина и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении их чувствительности/устойчивости к сывороточным ингибиторам. Выявленный феномен является опосредованным указанием на взаимное участие белков HA и NA в рецепторном взаимодействии с чувствительной клеткой.

6. Предложены модификации метода получения вакцинных штаммов, способствующие эффективной разработке реассортантов для живой гриппозной вакцины на основе современных вирусов гриппа, различающихся по биологическим свойствам.
7. Впервые метод классической реассортации применен для разработки живой гриппозной вакцины на основе пандемического вируса гриппа А (H1N1)pdm09 и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Родительские вирусы легко вступали в реассортацию, а *non-ts/non-ca/ir* фенотип пандемического вируса А (H1N1)pdm09 позволил успешно и в кратчайшие сроки получить 6:2 реассортант для живой гриппозной вакцины.
8. Разработан метод получения реассортантов для живой гриппозной вакцины в системе развивающихся куриных эмбрионов на основе высоковирулентных потенциально пандемических вирусов гриппа птиц А(H5N1) и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Использование в качестве источника гена НА реассортантных штаммов для инактивированных вакцин А(H5N1)-PR8-RG, аттенуированных за счет удаления полиосновного сайта рестрикции, позволяет получать реассортанты, по свойствам температурочувствительности, холодоустойчивости, безвредности и иммуногенности для лабораторных животных соответствующие всем критериям, предъявляемым к вакцинным штаммам живой гриппозной вакцины.
9. Реассортантные штаммы на основе холодаадаптированных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и В/СССР/60/69/525 не только для сезонных, но и пандемических и зоонозных потенциально пандемических живых гриппозных вакцин полностью сохраняют аттенуирующий фенотип, присущий донорам аттенуации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

(жирным шрифтом отмечены публикации в рецензируемых изданиях: рекомендованных ВАК РФ, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, патенты РФ)

1. Городкова (Ларионова), Н.В. К вопросу о происхождении эпидемических штаммов вируса гриппа / Н.В. Городкова (Ларионова), А.К. Климов // Известия АН Латв ССР. - 1983. - 5. - С.71-77.
2. Ghendon, Y. Genome analysis of influenza A virus strains isolated during an epidemic of 1979 - 1980 / Y. Ghendon, A. Klimov, N. Gorodkova (Larionova), L. Dohner // **Journal of General Virology**. - 1981. - 56. - P.303-313.
3. Klimov, A. Genome analysis of epidemic influenza A virus strains isolated in 1979-1983 / A. Klimov, A. Tichonova, N. Gorodkova (Larionova), L. Dohner // **Acta Virol**. - 1984. - 28. - P.479-486.
4. Гендон, Ю. Сравнительный анализ геномов эпидемических штаммов вирусов гриппа / Ю. Гендон, А. Климов, Н. Городкова (Ларионова), Л. Деннер, А. Тихонова // **Молекулярная генетика, микробиология и вирусология**. - 1984. - 12. - С.24-29.
5. Киселева, И.В. Изменение признака температурочувствительности как отражение эволюционной изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, О.М. Литвинова, В.В. Иванова, И.Н. Исакова, Т.Е. Медведева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко // Медицинский Академический Журнал. - 2002. - 2 (3). - С.49-57.
6. Киселева, И.В. Температурочувствительность эпидемических вирусов гриппа А как возможный маркер иммуногенности реассортантных вакцинных штаммов / И.В. Киселева, Е.П. Григорьева, А.Н. Найхин, В.В. Иванова, Н.В. Ларионова, С.А. Донина, О.М. Литвинова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко // **Вопросы вирусологии**. - 2003. - 4. - С.26-29.

7. Rudenko, L.G. Analysis of some factors influencing immunogenicity of live cold-adapted reassortant influenza vaccines / L.G. Rudenko, I.V.Kiseleva, N.V. Larionova, E.P. Grigorieva, A.N. Naikhin, G.I. Alexandrova // Proceedings of Options for the Control of Influenza V. Okinawa. - Amsterdam, 2003. - P.542-546.
8. Larionova, N. Naturally occurring temperature-sensitive strains of influenza B virus / N. Larionova, I. Kiseleva, I. Isakova, O.Litvinova, A.Klimov, L. Rudenko // Abstract book of "IVW-2004 Conference". Lisbon, Portugal. - 2004. - P.92-97.
9. Киселева, И.В. Генетический и фенотипический анализ гетерогенной популяции холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и реассортантных вакцинных штаммов, подготовленных на его основе/ И.В. Киселева, А.И.Климов, Е.П. Григорьева, Н.В.Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко // **Вопросы вирусологии.** - 2005.- №2. - С.14-18.
10. Ларионова, Н.В. Фенотипические особенности эпидемических штаммов вируса гриппа В разных лет выделения / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, И.Н. Исакова, О.М. Литвинова, Л.Г. Руденко // **Вопросы вирусологии.** - 2006.-5. - С.38-41.
11. Исакова, И.Н. Генетическая стабильность холодоадаптированных вирусов гриппа / И.Н. Исакова, Н.В.Ларионова, Е.С. Олейник, И.В. Киселева // **Вопросы вирусологии.** - 2006. - 4. - С.13-16.
12. Сдобнова, М.Г. Фенотипические особенности вирусов гриппа А(H3N2), выделенных в период одной эпидемии / М.Г. Сдобнова, Н.В.Ларионова // Человек и его здоровье: материалы 79-ой конференции СНО СПбГМА им. И.И. Мечникова. - Санкт-Петербург, 2006. - С.338-340.
13. Исакова, И.Н. Лабораторные маркеры аттенуации вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины / И.Н. Исакова, И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Е.С. Олейник, Л.Г. Руденко // **Вопросы вирусологии.** - 2007. - Т.52, №4. С. 22-26.
14. Киселева, И.В. Эффективность получения реассортантов между эпидемическими и холодоадаптированными вирусами гриппа в развивающихся куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK / И.В. Киселева, И.Н. Исакова, Н.В. Ларионова, Е.С. Олейник, Л.Г. Руденко // **ЖМЭИ.** - 2007. - 6. - С.40-45.
15. Kiseleva, I. MDCK cells as a tool for screening temperature sensitive live influenza vaccine candidate reassortants / I. Kiseleva, N. Larionova, I. Isakova, E. Oleynik, L. Rudenko // Proceedings of Options for the Control of Influenza VI. Toronto, Ontario, Kanada, 2007. - P.588-590.
16. Larionova, N. Phenotypic and genetic peculiarities of influenza B/USSR/60/69 master donor strain based reassortants/ N. Larionova, I. Kiseleva, L. Rudenko // Proceedings of Options for the Control of Influenza VI. Toronto, Ontario, Kanada, 2007. - P.415-416.
17. Степанянц, Н.А. Характеристика ингибиторочувствительности вирусов гриппа типов А и В разных лет выделения / Н.А. Степанянц, Н.В.Ларионова // XXXV неделя науки СПбГПУ20-25.11. 2006 г., часть IV: материалы межвузовской научной конференции СПбГПУ. - 2007. - С.22-23.
18. Киселева, И.В. Генетические основы аттенуации холодоадаптированных вирусов гриппа / И.В. Киселева, Н.В.Ларионова, Е.П. Григорьева, Л.Г. Руденко // Медицинский Академический Журнал. - 2008. - 3. - С.15-27.
19. Киселева, И.В. Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации отечественной живой гриппозной вакцины А и В/ И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, J.T.M. Voeten, L.C.P. Teley, S.K.M. Drieszen-van der Cruijsen, J.G.M. Heldens, J.F. Van den Bosch, Л.Г.Руденко// **ЖМЭИ.** - 2010. - 6. - С.41-47.
20. Kiseleva, I. Phenotypic characteristics of novel swine-origin influenza A/California/07/2009 (H1N1) virus / I. Kiseleva, N. Larionova, V. Kuznetsov, L. Rudenko // **Influenza and Other Respiratory Viruses.**- 2009. - 4. - P.1-5.
21. Kiseleva, I. PB2 and PA genes control the expression of the temperature sensitive phenotype of cold-adapted B/USSR/60/69 influenza master donor virus / I. Kiseleva, J.T.M. Voeten, L.C.P. Teley, N. Larionova, S.K.M. Drieszen-van der Cruijsen, S.M.C. Basten, J.G.M. Heldens, J.F. van den Bosch, L. Rudenko // **Journal of General Virology.** - 2010.- 91. - P.931-937.
22. Руденко, Л.Г. Живая гриппозная вакцина, итоги разработок и перспективы применения / Л.Г. Руденко, Н.В.Ларионова, И.В. Киселева, И.Н. Исакова-Сивак // Медицинский Академический Журнал. - 2010. - 4(10). - С.235-239.

23. Киселева, И.В. Трансмиссивность вируса гриппа (экспериментальные данные) / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Е.А. Баженова, И.А. Дубровина, И.Н. Исакова-Сивак, Е.П. Григорьева, С.А. Донина, Л.Г. Руденко // Медицинский Академический Журнал. - 2010. - 4(10).- С.240-248.
24. Rudenko, L. Live attenuated pandemic influenza vaccine: clinical studies on A/17/California/2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries / L. Rudenko, H. Van den Bosch, I. Kiseleva, A. Mironov, A. Naikhin, N. Larionova, D. Bushmenkov // Supplement Vaccine.- 2011. - 29. - S.1. - P.A40-A44.
25. Киселева, И.В. Метод рестрикционного анализа состава генома штаммов живой гриппозной вакцины / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, L.C.P.Teley, Л.Г. Руденко // **Вопросы вирусологии.** - 2011. - 3. - С.28-32.
26. Kiseleva, I. Study of transmissibility of wild type and cold-adapted influenza viruses in guinea pigs / I. Kiseleva, N. Larionova, E. Bazhenova, I. Dubrovina, L. Rudenko // In: Options for the control of influenza VII. Proceedings of the International conference. Hong Kong, SAR, China, **Influenza and Other Respiratory Viruses.** - 2011.-5(suppl.1). - P.304-307.
27. Larionova, N. Peculiarities of reassortment of cold-adapted influenza A master donor virus with viruses possessed avian origin HA and NA H5N1 / N. Larionova, I. Kiseleva, I. Dubrovina, E. Bazhenova, L. Rudenko //In: Options for the control of influenza VII. Proceedings of the International conference. Hong Kong, SAR, China, **Influenza and Other Respiratory Viruses.** - 2011.-5(suppl.1).-P. 347-349.
28. Rudenko, L. Development of pandemic Live Attenuated Influenza vaccine (LAIV) in Russia / L. Rudenko, I. Kiseleva, A. Mironov, J. Desheva, N. Larionova, S. Donina, G. Petuchova, D.Korenkov, A. Rekstin, A. Naikhin // In: Options for the control of influenza VII. Proceedings of the International conference. Hong Kong, SAR, China, **Influenza and Other Respiratory Viruses.** - 2011.-5(suppl.1).-P.333-337.
29. Stittelaar, K. J. Efficacy of live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 influenza in ferrets / K. J. Stittelaar, E. J.B. V. Kroeze, L. de Waal, G. van Amerongen, J. M.A. van den Brand, J.H. Simon, I.Kiseleva, N. Larionova, L. Rudenko, R. Dhere, S. Thirapakroomanunt, M.P. Kieny, A.D.M.E. Osterhaus // **Vaccine.** - 2011. - 29. - P.9265- 9270.
30. Киселева, И.В. Анализ состава генома штаммов сезонной и пандемической живой гриппозной вакцины / И.В. Киселева, J.T.M. Voeten, L.C.P. Teley, Н.В. Ларионова, И.А. Дубровина, Ж.А. Бердыгулова, Е.А. Баженова, H. van denBosch, J.G.M. Heldens, Л.Г. Руденко // **Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.** - 2011. - 4. - С.29-36.
31. Ларионова, Н.В. Живая гриппозная вакцина из реассортантного штамма A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) - эффективный препарат для профилактики пандемического гриппа / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, А.Н. Миронов, Д.С. Бушменков, С.А. Донина, Г.Д. Петухова, Д.А. Кореньков, А.Н. Найхин, Л.Г. Руденко // Медицинский Академический Журнал. - 2011. -.11. - 4. - С.3-12.
32. Дубровина, И.А. Живая гриппозная вакцина для детей и взрослых: трансмиссивность в экспериментах *in vivo* / И.А. Дубровина, Е.А. Баженова, И.В. Киселева, Ж.А. Бердыгулова, Н.В. Ларионова, Л.Г. Руденко // **Эпидемиология и инфекционные болезни.** - 2011. - 6. - С.14-18.
33. Ларионова, Н.В. Живая гриппозная вакцина для детей и взрослых: Трансмиссивность вакцины в наблюдениях на детях 3-6 лет / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Е.П. Григорьева, И.Н. Исакова-Сивак, С.А. Донина, Л.Г. Руденко // **Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.** - 2012. - №1. - с.25-29.
34. Баженова, Е.А. Проблемы подготовки вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины на основе потенциально пандемических вирусов гриппа / Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко // **Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.** -2012.- 6. - С. 16-20.
35. Федорова, Е.А. Реассортация эпидемических и вакцинных штаммов вируса гриппа в эксперименте / Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, Е.А. Баженова, Е.В. Иванова, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Л.Г Руденко. // Юбилейный сборник, посвященный 45-летию НИИ гриппа. Грипп, эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение. СПб, 2012. С.28-38.

36. Дубровина, И.А. Изучение возможности реассортации эпидемических и вакцинных штаммов вируса гриппа в экспериментах *in vivo* / И.А. Дубровина, Е.А. Баженова, Е.А. Федорова, Е.В. Иванова, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева // Медицинский Академический Журнал. - 2012. - 12. - 4. - С.45-47.
37. Kiseleva, I. Live cold-adapted attenuated vaccine against H5N1 influenza viruses / I. Kiseleva, N. Larionova, E. Fedorova, I. Dubrovina, E. Bazhenova, T. M. Ross, L. Rudenko // Journal of Medical Safety. - 2013. - P.36-41.
38. Руденко, Л.Г. Разработка и клиническое изучение отечественной живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа / Л.Г. Руденко, И.Н. Исакова-Сивак, А.Н. Найхин, Ю.А. Дешева, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, М.А. Стукова, М.К. Ерофеева, А.Н. Никифорова, А.Н. Миронов // **Эпидемиология и Вакцинопрофилактика**. - 2013. - 71.- 4. - С.74-81.
39. Larionova, N. Live attenuated influenza vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza: development and preclinical characterization / N. Larionova, I. Kiseleva, I. Isakova-Sivak, A. Rekestin, I. Dubrovina, E. Bazhenova, T. M. Ross, D. Swayne, L. Gubareva, V. Tsvetnitsky, E. Fedorova, E. Doroshenko, L. Rudenko // **Journal of Vaccines and Vaccination**.- 2013.-4(8).- P.1-11. doi: 10.4172/2157-7560.1000208.
40. Киселева, И.В. Особенности реассортации современных штаммов вируса гриппа с донорами аттенуации живой гриппозной вакцины / И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г. Руденко // **Вопросы вирусологии**. - 2013. - 5. - С.26-31.
41. Larionova, N. Contribution of neuraminidase of influenza viruses to the sensitivity to sera inhibitors and reassortment efficiency / N. Larionova, I. Kiseleva, E. Fedorova, E. Bazhenova, I. Dubrovina, I. Isakova-Sivak, L. Rudenko // The Open Microbiology Journal. - 2014. - 8. - P.1-8.
42. Shcherbik, S. Application of real time RT-PCR for the genetic homogeneity and stability tests of the seed candidates for live attenuated influenza vaccine production / S. Shcherbik, S.B.Sergent, W.G. Davis, B. Shu, J. Barnes, I. Kiseleva, N. Larionova, A. Klimov, T. Bousse // **Journal of Virological Methods**. - 2014. - 195. - P.18-25.
43. Федорова, Е.А. Факторы, влияющие на иммуногенность вируса гриппа и гриппозных вакцин / Е.А. Федорова, И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Е.П. Григорьева, С.А. Дониная, Е.А. Баженова, И.А.Дубровина, М.К. Ерофеева, В.П. Дринецкий, Л.Г. Руденко // **Эпидемиология и вакцинопрофилактика**. - 2014. - 3(76). - С.70-83.
44. Larionova, N.V. Contribution of neuraminidase of influenza viruses to the sensitivity to serum inhibitors and reassortment efficiency / N.V. Larionova, I.V. Kiseleva, E.A. Bazhenova, E.A. Fedorova, I.A. Dubrovina, I.N. Isakova-Sivak, L.G. Rudenko // **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**. - 2014. -29 (3). - P. 130-138.
45. Rudenko, L. 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 / L. Rudenko, I. Kiseleva, M. Stukova, M. Erofeeva, A. Naykhin, S. Donina, N. Larionova, M. Pisareva, V. Krivitskaya, J. Flores, I. Dubrovina, I. Isakova-Sivak, G. Petukhova, E. Bazhenova, T. Smolonogina, V. Kuznetsova, A. Nikiforova, O. Kiselev, M. Power, V. Tsvetnitsky, J. C. Victor, K. M. Neuzil // **Vaccine**.- 2015. - 33 (39). -P.5110-5117.
46. Киселева, И.В. Оценка генетической и фенотипической стабильности живой гриппозной вакцины против потенциально пандемического вируса гриппа птиц / И.В.Киселева, И.А. Дубровина, Н.В. Ларионова, И.Н. Исакова-Сивак, Е.А. Федорова, Е.А. Баженова, М.А. Стукова, М.К. Ерофеева, Л.Г. Руденко// **Фундаментальные исследования**. - 2014. - 11 (6). - С. 1301-1305.
47. Kiseleva, I. New Methodological Approaches in the development of Russian live attenuated vaccine for pandemic influenza / I. Kiseleva, N. Larionova, E. Fedorova, I. Isakova-Sivak, L. Rudenko // **Translational Biomedicine**. -2015. - 6. - 2(13). - P.1-9.
48. Shcherbik, S. Implementation of new approaches for generating conventional reassortants for live attenuated influenza vaccine based on Russian master donor viruses /S. Shcherbik, N. Pearce, I. Kiseleva, N. Larionova, L. Rudenko, X. Xu, D. E. Wentworth, T. Bousse // **Journal of Virological Methods**. - 2016. - 227. - P. 33-39. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.10.009.

49. Kiseleva, I. Genetic stability of live attenuated vaccines against potentially pandemic influenza viruses / I. Kiseleva, I. Dubrovina, E. Fedorova, N. Larionova, I. Isakova-Sivak, E. Bazhenova, M. Pisareva, V. Kuznetsova, J. Flores, L. Rudenko // **Vaccine**. - 2015. - 33. - P.7008-7014.

Патенты на изобретения Российской Федерации

1. **Патент 2110277 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм А/17/Иоганнесбург/94/1 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых [Текст] / Ю.Р. Романова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Н.В. Ларионова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №96110707; заявл. 30.05.1996; опубл. 10.05.1998. Бюл. №13.
2. **Патент 2128223 РФ**, МПК А61К С12N.Штамм А/17/Нанчанг/95/4(H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых [Текст] / И.В. Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, А.И. Климов, Н.В. Ларионова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №97107558; заявл. 07.05.1997; опубл.27.03.1999.
3. **Патент 2127757 РФ**, МПК А61К С12N.Штамм А/47/Нанчанг/95/13 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, А.И. Климов, И.В.Киселева; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №97107583; заявл. 07.05.1997; опубл. 20.03.1999.
4. **Патент 2128224 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм В/60/Петербург/95/20 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей [Текст] / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Г.И Александрова, Л.Г.Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №97107583; заявл. 07.05.1997; опубл. 20.03.1999.
5. **Патент 2215786 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Иоханнесбург/99/50 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Ю.А. Дешева, Н.В. Ларионова, А.И.Климов; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2002107089; заявл. 19.03.2002; опубл. 10.11.2003, Бюл. № 31.
6. **Патент 2285723 РФ**, МПК А61К С12N С12R. Штамм вируса гриппа А/17/Вайоминг/03/8 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей [Текст] / И.В.Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко, Н.В. Ларионова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2004137762/13; заявл. 23.12.2004; опубл. 20.10.2006, Бюл. № 29.
7. **Патент 2307161 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Джилин/03/1 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова, Н.В. Ларионова, А.Н.Климов; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». -№ 2005134836; заявл. 09.11.2005; опубл. 27.09.2007, Бюл. № 27.
8. **Патент 2416639 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Малайзия/04/898 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - № 2009149606; заявл. 30.12.2009; опубл.20.04.2011, Бюл. № 11.
9. **Патент 2422519 РФ**, МПК А61К С12N.Штамм вируса гриппа В/60/Флорида/04/181 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2010100711; заявл. 11.01.2010; опубл. 27.06.2011, Бюл. № 18.
10. **Патент 2422518 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа для А/17/Соломоновы острова/06/9 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2010100709; заявл. 11.01.2010; опубл. 27.06.2011, Бюл. № 18.
11. **Патент 2285723 РФ**, МПК А61К С12N.Штамм вируса гриппа для А/17/Брисбен/07/28 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2010100523; заявл. 11.01.2010; опубл. 20.04.2011, Бюл. № 11.
12. **Патент 2285723 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа для А/17/Брисбен/07/1 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / И.В. Киселева, Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». -№ 2010100524/10; заявл. 11.01.2010; опубл. 20.04.2011, Бюл. № 11.

13. **Патент 2422517 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа В/60/Брисбен/08/83 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №20102912; заявл. 28.01.2010; опубл. 27.06.2011, Бюл. № 18.
14. **Патент 2413765 РФ**, МПК А61К С12N. Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, Л.Г. Руденко, Г.И.Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2009134769; заявл.16.09.2009; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 7.
15. **Патент 2545695 РФ**, МПКА61К С12N. Вакцинный штамм вируса гриппа В/60/Висконсин/2010/125 [Текст] / Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, И.В. Киселева, И.А. Дубровина, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2012130552/10; заявл.17.07.2012; опубл. 27.01.2014, Бюл. № 3.
16. **Патент 2532844 РФ**, МПК А61К С12N. Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Виктория/2011/89 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей [Текст] / Н.В. Ларионова, И.А. Дубровина, И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Г.И. Александрова, Л.Г. Руденко; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2012130551/10; заявл. 17.07.2012; опубл. 10.11.2014, Бюл. № 31.
17. **Патент 2545706 РФ**, МПК А61К С12N. Штамм вируса гриппа А/17/Индиана/11/72(H3N2)v для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Н.В. Ларионова, Е.А. Баженова, И.В. Киселева, В.А. Кузнецова, И.А. Дубровина, Л.Г. Руденко, Г.И. Александрова; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2013149106/10; заявл. 05.11.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10.
18. **Патент 2563352 РФ**, МПКС12N 7/00, А61К 39/145, А61Р 31/16. Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Техас/2012/30 (H3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Дубровина И.А., Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2013149196; заявл. 5.11.2013; опубл.20.09.2015, Бюл. № 26.
19. **Патент 2546190РФ**, МПК А61К С12N. Вакцинный штамм вируса гриппа В/60/Массачусетс/2012/10 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Баженова Е.А., Ларионова Н.В., Дубровина И.А., Киселева И.В., Руденко Л.Г., Александрова Г.И.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - №2013149470/10; заявл. 06.11.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10.
20. Штамм вируса гриппа В/60/Пхукет/2013/26 для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей [Текст] / Киселева И.В., Крутикова Е.В., Дубровина И.А., Баженова Е.А., Ларионова Н.В., Руденко Л.Г.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «ИЭМ». - № 2015 122 376 заявл. 17.04.2015.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я искренне благодарна д.м.н., профессору, заслуженному деятелю науки РФ Л.Г. Руденко и д.б.н., доценту И.В. Киселевой за квалифицированное консультирование, постоянное внимание и поддержку.

Я благодарна всем соавторам моих печатных работ за участие и помощь в проведении исследований. Особую признательность хочу выразить сотрудникам отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» Е.А. Баженовой, И.А. Дубровиной, Е.А. Федоровой, И.А. Исаковой-Сивак, Е.П. Григорьевой, С.А. Дониной, В.А., Матюшенко и А.Р. Рекстину за помощь и участие в настоящей работе, проф. А.Н. Найхину - за ценные советы и плодотворные научные дискуссии.

Я благодарю своих официальных оппонентов и рецензентов за внимательное прочтение работы и ценные замечания.