

УДК 578.832.1

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ

¹Киселева И.В., ¹Дубровина И.А., ¹Ларионова Н.В., ¹Исакова-Сивак И.Н., ¹Федорова Е.А., ¹Баженова Е.А., ²Стукова М.А., ²Ерофеева М.К., ¹Руденко Л.Г.

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины»

Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург;

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, e-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

В настоящей работе представлены результаты изучения генетической стабильности клинических изолятов, полученных в двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом клиническом исследовании от взрослых здоровых волонтеров, привитых живой гриппозной вакциной (ЖГВ) против потенциально пандемического вируса гриппа птиц серотипа H5. H5-ЖГВ кандидат был подготовлен в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) методом классической реассортации вируса гриппа H5 с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и обладал необходимыми для ЖГВ свойствами температурочувствительности и холодоадаптированности (*ts/ca* фенотип). Выделение вакцинного вируса осуществляли путем культивирования носовых смывов от волонтеров в РКЭ. Изучение *ts/ca* фенотипа изолятов проводили в РКЭ, инкубированных при 33, 26 и 40 °С. Секвенирование производилось с помощью автоматического секвенатора 3130xl (Applied Biosystems). Все изоляты были получены в первый день после вакцинации и сохранили *ts/ca* фенотипические характеристики и полный набор аттенуирующих мутаций, характерный для донора аттенуации. Спонтанные мутации, появившиеся в гемагглютинине в процессе производства вакцины и ее репликации в верхних дыхательных путях волонтеров, не повлияли на фенотипические свойства изолятов. Таким образом, результаты клинического исследования продемонстрировали фенотипическую и генетическую стабильность потенциально пандемической H5-ЖГВ.

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина, вирус гриппа птиц, мутации, генетическая стабильность, фенотип

ASSESSMENT OF GENETIC AND PHENOTYPIC STABILITY OF LIVE ATTENUATED VACCINE AGAINST POTENTIALLY PANDEMIC AVIAN INFLUENZA VIRUS

¹Kiseleva I.V., ¹Dubrovina I.A., ¹Larionova N.V., ¹Isakova-Sivak I.N., ¹Fedorova E.A., ¹Bazhenova E.A., ²Stukova M.A., ²Erofeeva M.K., ¹Rudenko L.G.

¹Institute of Experimental Medicine, St Petersburg;

²Institute of Influenza, St Petersburg, e-mail: irina.v.kiseleva@mail.ru

This study describes the results of virus shedding and clinical isolates' testing of a double-blinded randomized placebo-controlled clinical trial of LAIV against potentially pandemic H5 influenza virus in healthy adults. LAIV candidate was generated in eggs by classical reassortment of potentially pandemic H5N1 influenza virus with A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) master donor virus (H5-LAIV) and displayed temperature sensitive and cold-adapted phenotypes typical for LAIV. Vaccine virus shedding was measured by culture of nasal specimens in chicken eggs. Determination of *ts/ca* phenotypes of LAIV isolates was performed by titration in eggs at 33, 26 and 40 °C. Nucleotide sequencing was performed using a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). All virus-positive specimens were detected for the first day following vaccination, retained the *ts/ca* phenotypic characteristics and were shown to preserve all attenuating mutations described for master donor virus. During manufacture process the acquisition of a few additional mutations in the hemagglutinin of manufacture vaccine lot of H5N2-LAIV was detected, but they didn't affect its attenuated phenotype. CONCLUSION. Our clinical trials confirmed phenotypic and genetic stability of the H5-LAIV viruses after replication in humans.

Keywords: live attenuated influenza vaccine, avian influenza virus, mutations, genetic stability, phenotype

Высоко патогенные вирусы гриппа птиц могут представлять угрозу как потенциальные источники пандемии. Опасность их распространения в человеческой популяции остается реальной. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 27 июля 2014 года в мире зарегистрировано уже 667 случаев заражения вирусами гриппа птиц H5N1, из которых 393 (59%) закончились летально [1]. Вак-

цинопрофилактика остается основным средством борьбы с гриппом. В последние годы интерес к живой гриппозной вакцине (ЖГВ) значительно возрос. Отчасти это связано с тем, что ВОЗ признала преимущества применения ЖГВ по сравнению с инактивированной вакциной в случае наступления пандемической ситуации и включила ЖГВ в глобальный план ВОЗ по гриппозным вакцинам [6].

В нашей стране накоплен бесценный опыт конструирования и внедрения в практику здравоохранения живых гриппозных вакцин для всех возрастных групп населения [3–4]. Для сохранения национального здоровья и безопасности страны представляется важным иметь в наличии запас резервных вакцинных штаммов против таких пандемически опасных агентов, как вирусы гриппа птиц, поскольку сезонная ЖГВ не может обеспечить полноценную защиту от птичьего гриппа [5]. Отсюда следует, что обеспечение населения России собственной ЖГВ против потенциально опасных вирусов гриппа имеет важное стратегическое значение.

Целью исследования явилось изучение генетической стабильности клинических изолятов, полученных от волонтеров, привитых ЖГВ против потенциально пандемического вируса гриппа птиц серотипа H5, для подтверждения безопасности ее массового применения при наступлении пандемической ситуации.

Материал и методы исследования

В ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН методом классического скрещивания в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) донора аттенуации отечественной ЖГВ, А/Ленинград/134/17/57 (Лен/17) и вируса NIBRG-23 (H5N1) был подготовлен реассортантный вакцинный штамм пандемической ЖГВ серотипа

H5 (H5–ВШ), а ФГУП НПО «Микроген» по существующей технологии подготовил из него живую моновалентную гриппозную вакцину (H5–ЖГВ). Сорок здоровых добровольцев мужского и женского пола в возрасте от 18 до 49 лет были рандомизированы в соотношении 3:1 для иммунизации H5–ЖГВ или плацебо. Приживляемость вакцинного вируса оценивали по результатам его выделения в РКЭ, зараженных материалом носовых мазков вакцинированных лиц. Секвенирование изолятов проводили с помощью автоматического секвенатора 3130x1 (Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя, а их способность расти при оптимальной (33°C), пониженной (26°C, *ca* фенотип) и повышенной (40°C, *ts* фенотип) температурах определяли титрованием в РКЭ. Вирус обладал *ts* фенотипом, если его титр в РКЭ при 40°C был $\leq 4,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$, и *ca* фенотипом, если его титр при 26°C составлял $\geq 5,7 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$.

Результаты исследования и их обсуждение

От волонтеров было выделено 16 изолятов, все – только в первый день после вакцинации. При этом вакцинный вирус не был обнаружен ни у одного добровольца группы плацебо, что свидетельствует об отсутствии трансмиссивных потенциалов у вакцины H5–ЖГВ.

Было показано, что изоляты сохранили все аттенуирующие мутации, описанные для внутренних генов донора Лен/17 (табл. 1). Эти данные указывают на высокий уровень генетической стабильности вакцинного вируса после репликации в организме человека.

Таблица 1

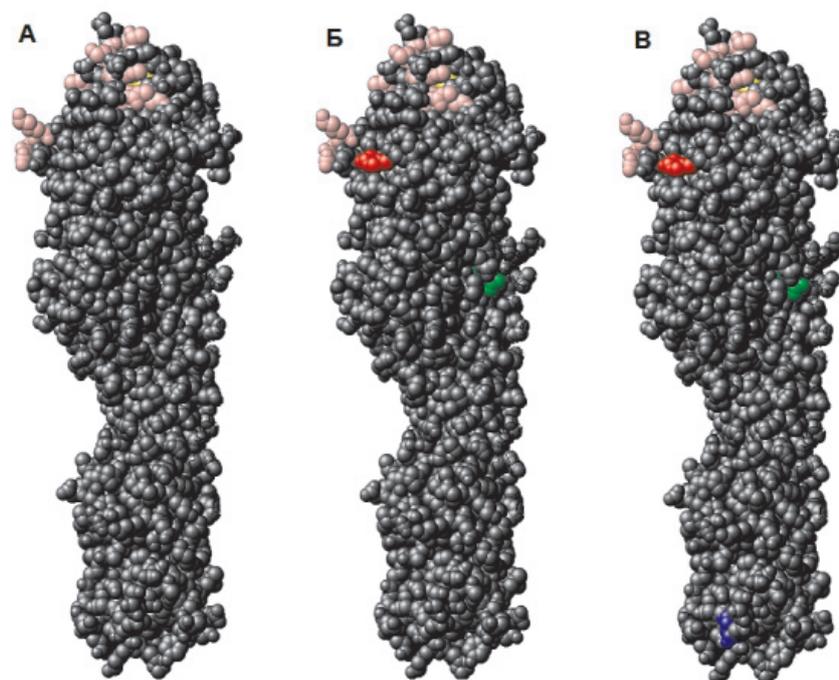
Генетическая стабильность аттенуирующих мутаций в генах, кодирующих внутренние белки изолятов H5–ЖГВ, выделенных от добровольцев

Ген	Аминокислотные замены			16 изолятов H5–ЖГВ
	а.к. ¹	Лен/WT ²	Лен/17	
PB2	478	Val	Leu	Leu
PB1	265	Lys	Asn	Asn
	591	Val	Ile	Ile
PA	28	Leu	Pro	Pro
	341	Val	Leu	Leu
NP	341	Leu	Leu	Leu
M1	15	Ile	Val	Val
	144	Phe	Leu	Leu
M2	86	Ala	Thr	Thr
NS2	100	Met	Ile	Ile

Примечания: ¹Аминокислотный остаток. ²«Дикий» предшественник донора Лен/17, вирус А/Ленинград/134/57 (H2N2).

Что касается гена, кодирующего поверхностный белок гемагглютинин, то у вакцины H5–ЖГВ его последовательность была неоднородной по двум позициям: аминокислотные остатки 145 (субъединица HA1) и 64 (HA2 субъединицы). Как результат, 7 из 16 вакцинных изолятов содержали Arg в обеих позициях, а у остальных изолятов в этих по-

ложениях присутствовал Lys (рисунок, табл. 2). Кроме того, у трех вакцинных изолятов отмечена замена Glu на Lys в позиции 143 (субъединица HA2). Важно отметить, что сам H5–ВШ, который был использован для производства вакцины H5–ЖГВ, был однородным в положениях 145 (HA1, Arg), 64 (HA2, Arg) и 143 (HA2, Glu), как и вирус NIBRG–23.



Локализация аминокислотных замен в молекуле гемагглютинина клинических изолятов, полученных от волонтеров, вакцинированных H5-ЖГВ. Структурная модель гемагглютинина построена на основе кристаллической структуры гемагглютинина вируса А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1) [7] с использованием программы RasMol, версия 2.7.5. Розовый цвет – антигенные сайты; красный цвет – Arg-145-Lys в HA1; зеленый цвет – Arg-64-Lys в HA2; синий цвет – Gly-143-Lys в HA2. (А). Гемагглютинин родительского вируса NIBRG-23, вакцинного штамма H5-VIII и изолятов №№ 1-7. (Б). Гемагглютинин изолятов №№ 8-13. (В). Гемагглютинин изолятов №№ 14-16

Таблица 2

Мутации в молекуле гемагглютинина изолятов от привитых лиц и клонов вакцинного вируса H5-ЖГВ, полученных после клонирования препарата H5-ЖГВ

Изолят / клон	а.к. ⁴ (HA1)	а.к. (HA2)	а.к. (HA2)
	145	64	143
Вирусы			
NIBRG-23 ¹	Arg	Arg	Glu
H5-VIII ²	Arg	Arg	Glu
H5-ЖГВ ³	Arg/Lys	Arg/Lys	Glu
Изоляты вакцинного вируса H5-ЖГВ от привитых лиц			
№№ 1-7	Arg	Arg	Glu
№№ 8-13	Arg	Arg	Glu
№№ 14-16	Lys	Lys	Lys
Клоны вакцинного вируса H5-ЖГВ, полученные после клонирования в РКЭ препарата H5-ЖГВ, группа (а)			
№№ 17-20	Arg	Arg	Glu
№№ 21-31	Lys	Lys	Glu
Клоны вакцинного вируса H5-ЖГВ, полученные после клонирования препарата H5-ЖГВ, который предварительно прошел 10 пассажей в РКЭ, группа (б)			
№№ 32-43	Lys	Lys	Glu

Примечания: ¹Реассортант, содержащий внутренние гены от вируса А/PR/8/34 (H1N1), а поверхностные гены – от вируса А/индус/Турция/1/2005 (H5N1), использованный нами в качестве источника поверхностных антигенов при подготовке H5-VIII. ²Вакцинный штамм ЖГВ. ³Подготовленная из H5-VIII ФГУП НПО «Микроген» пандемическая ЖГВ, которая использовалась в клинических испытаниях. ⁴Аминокислотный остаток.

Теоретически каждый пассаж вируса гриппа может приводить к появлению новых мутаций [2], именно поэтому ВОЗ настоятельно рекомендует при производстве ЖГВ проводить ее полногеномное секвенирование, чтобы картировать аттенуирующие мутации.

Обращает на себя внимание, что Arg → Lys является синонимичной мутацией, поэтому ее влияние на свойства вакцины маловероятно, тогда как свойства аминокислот Glu и Lys отличаются значительно. Однако мутация Glu-143-Lys находится в субъединице HA2 и не должна влиять на антигенные, иммуногенные и другие свойства вакцины.

Обнаруженные нами две мутации в гемагглютинине Arg-145-Lys (HA1) и Arg-64-Lys (HA2) могут быть следствием адаптации вакцинного вируса к репродукции в РКЭ, а мутация Gly-143-Lys – либо проявившейся минорной заменой, которую чувствительность метода секвенирования не позволила обнаружить, либо результатом адаптации вируса к репликации у человека. Чтобы понять природу этих мутаций, ампула Н5-ЖГВ была (а) сразу расклониро-

вана методом предельных разведений и (б) до клонирования предварительно прошла 10 последовательных пассажей в РКЭ. Всего было выделено 27 клонов, 15 из группы (а) и 12 – из группы (б).

Было установлено, что 11 из 15 клонов, изолированных непосредственно из ампулы Н5-ЖГВ, содержали две добавочные кодирующие мутации в HA, которые были обнаружены и у части изолятов от привитых добровольцев – Arg-145-Lys (HA1) и Arg-64-Lys (HA2). Четыре клон не содержали дополнительных мутаций и были идентичны Н5-ВШ.

Интересно, что после 10 пассажей препарата Н5-ЖГВ в РКЭ все 12 клонов содержали обе мутации в молекуле HA (табл. 2). Наиболее вероятно, что эти аминокислотные замены появились во время пассажей в РКЭ и представляют собой адаптивные мутации «круга хозяев». Замена же Glu-143-Lys (HA2), обнаруженная у трех изолятов от привитых, не проявилась ни в одном из 27 клонов вакцинного препарата. Возможно, что эта мутация возникла в результате адаптации вакцинного вируса к репродукции в человеке.

Таблица 3

Репликация изолятов Н5N2 при разных температурах инкубации

Вирус гриппа/изолят	Титр вируса при 32°C, lg ЭИД ₅₀ /мл	Снижение титра вируса ¹ , lg (ЭИД ₅₀ /мл) при:		Фенотип
		33/40°C	33/26°C	
Контроль				
Донор аттенуации ²	9,0	9,0	2,5	ts, ca
Н5-ВШ	9,2	9,2	1,5	ts, ca
Н5-ЖГВ	10,2	10,2	2,5	ts, ca
HA изолятов идентичен HA вируса NIBRG-23 и вакцинного штамма Н5-ВШ				
№ 1	9,2	9,2	2,0	ts, ca
№ 2	9,7	9,7	2,5	ts, ca
№ 3	8,2	8,2	1,5	ts, ca
№ 4	9,2	9,2	2,5	ts, ca
№ 5	10,7	10,7	3,0	ts, ca
HA изолятов содержит кодирующие мутации, появившиеся при производстве вакцины Н5-ЖГВ или после репликации в ВДП волонтеров				
№ 6	10,7	10,7	2,5	ts, ca
№ 7	9,2	9,2	2,0	ts, ca
№ 8	8,7	8,7	1,5	ts, ca
№ 9	10,2	10,2	2,5	ts, ca
№ 10	8,2	8,2	1,5	ts, ca
№ 11	9,2	9,2	3,0	ts, ca
№ 12	10,2	10,2	2,5	ts, ca
№ 13	10,2	10,2	2,5	ts, ca
№ 14	9,7	9,7	2,5	ts, ca
№ 15	10,2	10,2	3,0	ts, ca
№ 16	9,2	9,2	2,5	ts, ca

Примечания: ¹По сравнению с титром при перmissive температуре инкубации (33°C).
²Донор аттенуации Лен/17 использовался в качестве положительного контроля ts и ca фенотипа.

Вне зависимости от наличия или отсутствия добавочных мутаций в НА все 16 изолятов от привитых лиц обладали *ts/ca* фенотипом, характерным для донора аттенуации (табл. 3). ВШ–Н5 и Н5–ЖГВ не отличались от донора Лен/17 по фенотипическим свойствам. Снижение вирусного титра при разнице температур 33/40°C составляло 8,2–10,7 log₁₀ ЭИД₅₀/мл, а при 33/25°C составляло 1,5–3,0 log₁₀ ЭИД₅₀/мл. Таким образом, изоляты вакцинного вируса от привитых лиц сохранили такие присущие донору аттенуации фенотипические характеристики, как холодоустойчивость и температурочувствительность.

Заключение

Результаты клинического исследования продемонстрировали фенотипическую и генетическую стабильность потенциально пандемической Н5–ЖГВ. Вакцинные изоляты сохранили все аттенуирующие мутации, специфичные для донора аттенуации, что подтверждает высокий уровень генетической стабильности вакцинного вируса после репликации в организме человека. При репродукции вакцинного вируса *in vivo* не происходит реверсии характерных аттенуирующих мутаций в «дикий» тип. Изоляты различались по наличию или отсутствию точечных мутаций в молекуле НА, однако дополнительные мутации не повлияли на аттенуированный фенотип изолятов.

Работа выполнена при поддержке гранта № 14–15–00034 Российского Научного Фонда (Москва, Россия) и Программы развития новых технологий в здравоохранении (Сиэтл, США).

Список литературы

1. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. available at: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20140727CumulativeNumberH5N1cases.pdf?ua=1 (Accessed 19 October 2014).
2. Proposed WHO recommendations to assure the quality, safety and efficacy of influenza vaccines (human, live attenuated) for intranasal administration. Available at: http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/influenza/TRS_977_Annex_4.pdf (Accessed 19 October 2014).
3. Rudenko L., Kiseleva I., Naykhin A.N., Erofeeva N., Stukova M., Donina S. et al. Assessment of human immune responses to H7 avian influenza virus of pandemic potential: Results from a placebo-controlled, randomized, double-blind Phae 1 study of live attenuated H7N3 influenza vaccine // PLoS Med. – 2014. – № 9. – P. e87962.
4. Rudenko L., van den Bosch H., Kiseleva I., Mironov A., Naikhin A., Larionova N. et al. 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 // Vaccine. – 2014. – № 29(Suppl 1). – P. A40–A44.

5. Schultz-Cherry S., Jones J.C. Influenza vaccines: the good, the bad, and the eggs // Adv Virus Res. – 2010. – № 77. – P. 63–84.

6. WHO global action plan to increase vaccine supply for influenza vaccines. – 2006. – Geneva, Belgium. WHO/IVB/06.13. WHO/ODS/EPR/GIP/2006.1. available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.13_eng.pdf (Accessed 19 October 2014).

7. Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M.Q., Nidom C.A., Sakai-Tagawa Y. et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors // Nature. – 2006. – № 444(7117). – P. 378–382.

References

1. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. available at: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20140727CumulativeNumberH5N1cases.pdf?ua=1 (Accessed 19 October 2014).
2. Proposed WHO recommendations to assure the quality, safety and efficacy of influenza vaccines (human, live attenuated) for intranasal administration. Available at: http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/influenza/TRS_977_Annex_4.pdf (Accessed 19 October 2014).
3. Rudenko L., Kiseleva I., Naykhin A.N., Erofeeva N., Stukova M., Donina S. et al. Assessment of human immune responses to H7 avian influenza virus of pandemic potential: Results from a placebo-controlled, randomized, double-blind Phae 1 study of live attenuated H7N3 influenza vaccine. PLoS Med. 2014; 9: e87962.
4. Rudenko L., van den Bosch H., Kiseleva I., Mironov A., Naikhin A., Larionova N. et al. 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. Vaccine. 2014; 29(Suppl 1): A40–A44.
5. Schultz-Cherry S., Jones J.C. Influenza vaccines: the good, the bad, and the eggs. Adv Virus Res. 2010; 77: 63–84.
6. WHO global action plan to increase vaccine supply for influenza vaccines. 2006, Geneva, Belgium. WHO/IVB/06.13. WHO/ODS/EPR/GIP/2006.1. available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_IVB_06.13_eng.pdf (Accessed 19 October 2014).
7. Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M.Q., Nidom C.A., Sakai-Tagawa Y. et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. Nature. 2006; 444(7117): 378–382.

Рецензенты:

Суворов А.Н., д.м.н., профессор, зав. отделом молекулярной микробиологии, ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург;
Мазуркова Н.А., д.б.н., зав. лаб. препаратов природного происхождения отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», г. Кольцово.

Работа поступила в редакцию 28.10.2014.