

УДК 578.832.1

ОДИНОЧНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В МОЛЕКУЛЕ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, ПОДГОТОВЛЕННЫХ В РАЗНЫХ СУБСТРАТАХ, И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ИММУНОГЕННОСТЬ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

Федорова Е.А., Киселева И.В., Исакова-Сивак И.Н., Дубровина И.А., Руденко Л.Г.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины»

Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук,

Санкт-Петербург, e-mail: fedorova.iem@gmail.com

Проведен анализ гетерогенности аминокислотного состава гемагглютинина (HA) в природной популяции штамма вируса гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1). Проанализирован состав аминокислотных замен в гемагглютинине холодоадаптированных реассортантов, полученных на его основе в развивающихся куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK. Обнаружены переменные аминокислоты в позициях 78, 190, 225 в HA1 и 106 в HA2 (H3-нумерация). Показано, что предварительное клонирование популяции вируса перед подготовкой вакцинного штамма снижает вероятность появления адаптационных к субстрату аминокислотных замен в гемагглютинине вакцинного штамма. Подготовленный в культуре клеток MDCK штамм, содержащий Ile¹³¹ в HA1, а также штамм, содержащий Asn¹¹² в HA2, обладали сниженной иммуногенностью для морских свинок. Наибольшие показатели гуморального иммунного ответа были достигнуты после иммунизации животных вариантами, подготовленными в развивающихся куриных эмбрионах.

Ключевые слова: вирус гриппа, живая гриппозная вакцина, гемагглютинин, мутации, иммуногенность

SINGLE AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN HAEMAGGLUTININ MOLECULE OF LIVE ATTENUATED INFLUENZA VACCINE STRAINS GENERATED IN DIFFERENT SUBSTRATES, AND THEIR INFLUENCE ON IMMUNOGENICITY (IN VIVO EXPERIMENTS)

Fedorova E.A., Kiseleva I.V., Isakova-Sivak I.N., Dubrovina I.A., Rudenko L.G.

Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, e-mail: fedorova.iem@gmail.com

Heterogeneity in amino acid composition of haemagglutinin in nature population of A/New Caledonia/20/99 (H1N1) influenza virus was studied. Amino acid substitutions in haemagglutinin of egg- and MDCK-based cold-adapted reassortants were analyzed. Variable amino acids in 78, 190, 225 (HA1) and 106 (HA2) positions (H3-numbering) were detected. It was shown that vaccine strain development based on cloned wild type virus decreased a possibility of appearance of substrate-adapted amino acid substitutions in haemagglutinin of vaccine strain. MDCK-derived strains with Ile¹³¹ in HA1, or with Asn¹¹² in HA2, had reduced immunogenicity for guinea pigs. Maximum humoral immune response values were shown after immunization of guinea pigs with egg-derived vaccine strains.

Keywords: influenza, live attenuated influenza vaccine, haemagglutinin, mutations, immunogenicity

Вакцинопрофилактика является наиболее эффективным, безопасным и экономически обоснованным средством борьбы с гриппом. В качестве приоритетного средства профилактики гриппа ВОЗ рекомендует живую гриппозную вакцину (ЖГВ) [14].

Формальным требованием, предъявляемым к гриппозным вакцинам, являются показатели прироста сывороточных антител. Состав внутренних генов вакцинных штаммов ЖГВ постоянен, поэтому основное влияние на иммуногенность вакцинного штамма оказывают свойства гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) эпидемического вируса.

Существуют два основных субстрата, в которых производится культивирование вируса гриппа и получение вакцинных штаммов: развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) и перевиваемые клеточные ли-

нии [8, 11]. Мутации, появляющиеся в поверхностных антигенах вирусов гриппа в процессе адаптации к субстрату, могут оказывать влияние на иммуногенность вакцинного штамма, поэтому исследования одиночных мутаций в молекуле HA штаммов, культивируемых в разных биологических системах, могут помочь в выборе вакцинного кандидата.

Целью исследования было изучение аминокислотного состава HA штаммов ЖГВ, подготовленных на основе вируса гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1) в разных биологических субстратах (РКЭ, культура клеток MDCK) и определение их иммуногенности в экспериментах на животных.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы полученные из ВОЗ два варианта «дикого» вируса А/Новая

Каледония/20/99 (А/NC), выделенные в РКЭ и культуре клеток MDCK, и 4 их реассортанта с доном аттенуации отечественной ЖГВ А/Ленин-

град/134/17/57 (H2N2), (табл. 1). Реассортанты были подготовлены в отделе вирусологии ФГБУ «НИИ-ЭМ» СЗО РАМН.

Таблица 1

Перечень использованных в экспериментах реассортантных штаммов

Название штамма	Система, в которой изолирован «дикий» родительский вирус	Система, в которой получен реассортант	Автор штамма
25M/1	MDCK ¹	MDCK	Киселева И.В. [12]
39E/2	РКЭ ²	MDCK	Киселева И.В. [12]
NC145 ³	РКЭ ²	РКЭ	Киселева И.В. [1]
NC84	РКЭ ⁴	РКЭ	Федорова Е.А. ⁴

Примечания: ¹№ последовательности HA ISDNAU0001 [7]. ²№ последовательности гемагглютинина AJ344014 [7]. ³Штамм коммерческой ЖГВ А/17/Новая Каледония/99/145. ⁴Клонированный вариант А/NC. Не опубликовано.

Секвенирование последовательности сегментов генома осуществляли с использованием автоматического капиллярного секвенатора 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Последующая обработка данных производилась с использованием пакета программ Lasergene 7.1 (DNASTar). Моделирование пространственной структуры молекул белков проводилось с использованием сервиса SWISS-MODEL [10], Swiss-PdbViewer 4.1.0 и сервиса ZDOCK [13].

В работе использовались морские свинки (самки-альбиносы) весом 300–350 г, полученные из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН. Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ МЗРФ № 708н от 23.08.2010).

Для исследования иммуногенности разных штаммов вируса гриппа морских свинок заражали интраназально в дозе 5 lg ЭИД₅₀ на одну особь. Забор крови и назальных смывов производили через 2, 4 и 8 недель после заражения. В сыворотках опре-

деляли содержание вирусспецифических антител к штамму А/NC методами РТГА, микронейтрализации, содержание IgG методом ИФА, в смывах – содержание IgA методом ИФА.

Результаты исследования и их обсуждение

Для изучения состава гетерогенной популяции «дикого» вируса было проведено клонирование «яичного» варианта с последующим секвенированием сегмента генома, кодирующего HA полученных клонов (табл. 2). Также было проведено секвенирование последовательности HA и NA реассортантов, перечисленных в табл. 1. Последовательность сегмента генома, кодирующего нейраминидазу изученных штаммов, не отличалась.

Таблица 2

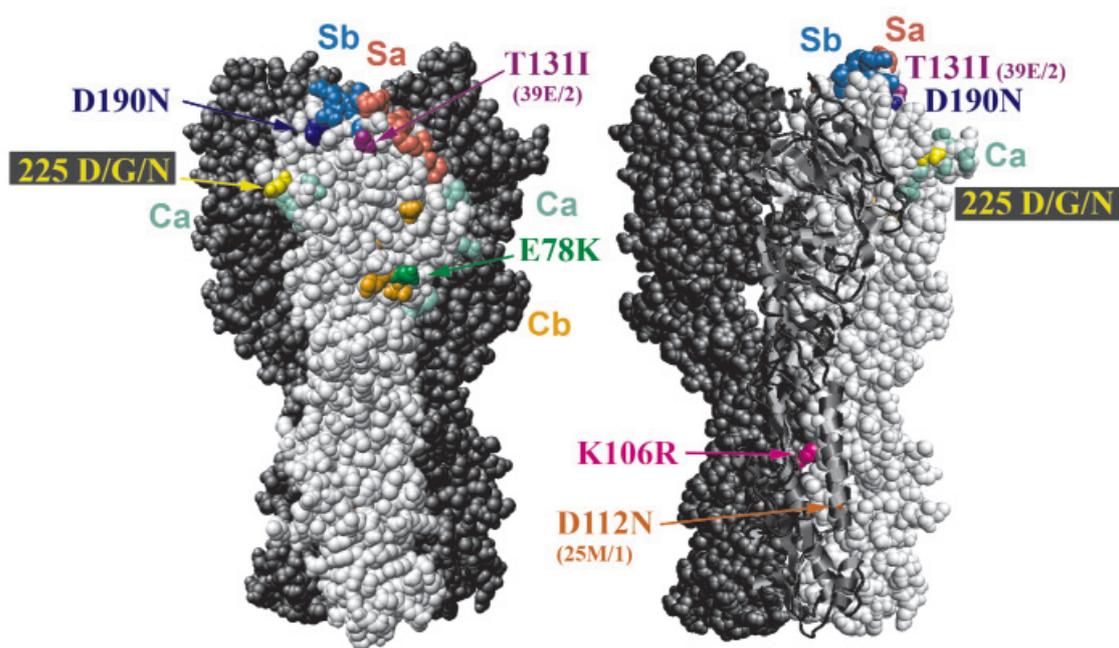
Отличия в аминокислотной последовательности гемагглютинина вакцинных штаммов на основе вируса гриппа А/NC

Позиция аминокислоты ¹	Локализация мутации в молекуле HA	Гетерогенность в исходной популяции	Штаммы			
			25M/1	39E/2	NC145	NC84
78	Глобулярная часть HA1	Glu/Lys	Glu	Glu	Glu	Lys
131		Thr	Thr	Ile	Thr	Thr
190		Asp/Asn	Asn	Asp	Asp	Asn
225		Asp/Gly	Gly	Asn	Gly	Asp
436 (HA2 106)	Ножка HA2	Arg/Lys	Arg	Arg	Lys	Arg
442 (HA2 112)		Asp	Asn	Asp	Asp	Asp

Примечание. ¹ Позиции аминокислот указаны в H3-нумерации.

В HA1 вариабельность была обнаружена в четырех аминокислотных позициях – 78, 131, 190 и 225. Еще две вариабельные позиции располагались в ножке гемагглютинина (аминокислотные остат-

ки 106 и 112) (табл. 2). Аминокислотные позиции, по которым была выявлена гетерогенность, были визуализированы с использованием компьютерного моделирования (рисунок).



Расположение переменных аминокислотных остатков в молекуле гемагглютинаина А/NC. На одном из мономеров показано расположение переменных аминокислотных остатков. Разными цветами показано расположение антигенных сайтов Ca, Cb, Sb, Sa [7]. Слева – вид со стороны одного из мономеров. Справа – один из мономеров показан в виде схемы основных элементов структуры, чтобы продемонстрировать аминокислотные позиции 106 и 112 в субъединице HA2, расположенные в центре тримера. Иллюстрация получена с использованием программы RasMol 2.7.5

Варианты вируса, выделенные в разных субстратах, отличались аминокислотной позицией 190: у MDCK-варианта в данной позиции располагается остаток Asn¹⁹⁰, у РКЭ-варианта – Asp¹⁹⁰. Замена Asn¹⁹⁰ → Asp¹⁹⁰ описана в литературе как адаптационная к куриным эмбрионам: изменяется распределение заряда и способность к взаимодействию с рецептором с α-2,3 связью [5]. Реассортанты, подготовленные на основе вирусов, выделенных в разных субстратах, сохраняли аминокислотный остаток в позиции 190: штамм 25M/1 содержал Asn¹⁹⁰, штаммы 39E/2 и NC145 – Asp¹⁹⁰. При клонировании «дикого» вируса в РКЭ нам удалось выделить компонент популяции, содержащий Asn¹⁹⁰. Данный чистый клон был использован для подготовки вакцинного штамма NC84, и Asn¹⁹⁰ сохранился после 6 пассажей в куриных эмбрионах. Это говорит о том, что влияние субстрата не однозначно определяет появление аминокислотной замены, но значительно повышает вероятность отбора субстрат-адаптированных вариантов. Это можно использовать при подготовке штаммов ЖГВ: предварительное клонирование и выбор

клона может обеспечить более предсказуемый результат.

Наибольшие различия по показателям иммунного ответа были обнаружены между штаммами, подготовленными в культуре клеток MDCK (25M/1 и 39E/2) и подготовленными в РКЭ (NC145, NC84) (табл. 3). Значения титров антител были наиболее низкими у штамма 25M/1: средние значения титров антител у животных, вакцинированных штаммом 25M/1, статистически достоверно отличались от значений титров антител в сыворотках животных, вакцинированных штаммами NC145 и NC84, на всех сроках, по результатам всех исследований. Штамм 39E/2 был более иммуногенен, значения титров антител в данной группе статистически достоверно превышали титры, полученные в результате вакцинации 25M/1, на сроке 8 недель по результатам исследований сывороток тремя методами. Штаммы NC145 и NC84 вызывали статистически достоверно более высокие приросты титров антител, чем штаммы 25M/1 и 39E/2. Между группами NC145 и NC84 статистически значимых различий обнаружено не было.

Две переменные позиции в HA1 не оказали значительного влияния на иммуноген-

ность: это гетерогенная позиция 78 (табл. 2), относящаяся к антигенному сайту Сb [7], и позиция 225, расположенная в петле 220 ре-

цептор-связывающего кармана. 225 позиция, по данным литературы, является вариабельной среди вирусов подтипа Н1 [3].

Таблица 3

Среднегеометрические титры антител против вируса гриппа А/НС в сыворотках и назальных смывах морских свинок

Препарат	Метод учета	Срок после вакцинации, недели			Метод учета	Срок после вакцинации, недели		
		2	4	8		2	4	8
25М/1	РТГА, сыворотки	5,0	9,6	12,9	ИФА IgG ³ , сыворотки	72,5	262,5	951,0
39Е/2		5,0	10,0	29,7		390,1	1159,3	2826,5
NC145		13,5	65,6	144,9		7608,3	20480,0	22611,8
NC84		15,9	40,0	80,0		6450,8	10240,0	16255,0
Плацебо		< 10	< 10	< 10		< 10	< 10	< 10
Н ¹		22,29	11,01	13,39		20,99	19,15	20,14
p ²		0,0001	0,0117	0,0039		0,0001	0,0003	0,0002
25М/1	РМН, сыворотки	10,0	16,4	40,0	ИФА IgA, смывы ⁴	< 2	< 2	< 2
39Е/2		10,0	26,9	215,3		2,5	2,0	1,6
NC145		195,0	2100,0	5120,0		12,6	32,0	20,0
NC84		50,4	1015,9	2031,9		8,0	10,1	6,3
Плацебо		< 10	< 10	< 10		< 2	< 2	< 2
Н		22,90	20,91	21,70		4,21	5,93	6,12
p		0,0001	0,0001	0,0001		0,2362	0,1152	0,1050

Примечания:

¹ значение критерия Краскела – Уоллеса.

² уровень статистической значимости;

³ определение содержания сывороточных иммуноглобулинов класса G методом ИФА;

⁴ определение содержания иммуноглобулинов класса A в назальных смывах методом ИФА.

Штамм 39Е/2 за счет замены Thr¹³¹ → Pe¹³¹ в HA1 потерял потенциальный сайт гликозилирования. Подобная замена описана в исследовании [4] как влияющая на способность HA вируса к связыванию с рецептором. Возможно, именно это стало причиной сниженной иммуногенности данного реассортанта, поскольку по остальным позициям 39Е/2 не отличается от более иммуногенных штаммов на основе А/НС.

Среди исследованных нами штаммов были два варианта, содержавшие уникальные замены в HA2 – NC145 и 25М/1. Штамм NC145, обладавший наиболее высокой иммуногенностью по показателям гуморального иммунного ответа, содержал Lys¹⁰⁶ в HA2, у остальных исследованных штаммов в данной позиции располагается остаток Arg¹⁰⁶. Гетерогенность Arg/Lys в данной позиции характерна для Н1-вирусов [15]. Позиция 106 располагается в области оси симметрии тримера HA, в непосредственной близости от пептида слияния, в точке, где длинный α-спиральный участок подвергается анфолдингу при низких pH [2]. Остаток Lys¹⁰⁶ формирует водородные свя-

зи с Glu¹⁰³ и взаимодействует с анионами, что стабилизирует структуру в области оси тримера. Arg¹⁰⁶ формирует солевые мостики с Glu¹⁰⁵, но ионные взаимодействия в области оси тримера значительно слабее [6]. Возможно, Lys¹⁰⁶ стабилизировал структуру HA штамма NC145, что и привело к его наибольшей иммуногенности среди исследованных штаммов.

Замена Asp¹¹² → Asn¹¹² в HA2 была обнаружена у штамма 25М/1, обладавшего самой низкой иммуногенностью среди исследованных штаммов, а также сниженными показателями репродукции в развивающихся куриных эмбрионах. По данным литературы, Asp¹¹² формирует 4 водородных связи, стабилизирующих пептид слияния, и мутации в этой позиции приводят к изменению конформации при менее кислых pH [9]. Вероятно, данная мутация изменила свойства HA штамма 25М/1, что привело к более низкой иммуногенности.

Заключение

Вакцинные штаммы на основе вируса гриппа А/Новая Каледония/20/99 (H1N1),

содержавшие отдельные аминокислотные замены в НА, обладали разной иммуногенностью по показателям гуморального иммунного ответа в эксперименте на морских свинках. Наиболее высокие показатели гуморального иммунного ответа были достигнуты после иммунизации штаммами, подготовленными в развивающихся куриных эмбрионах. Штаммы, подготовленные в культуре клеток, приобрели уникальные аминокислотные замены в гемагглютинине и вызывали гуморальный иммунный ответ меньшей степени выраженности.

Работа выполнена при поддержке гранта № 14-15-00034 Российского Научного Фонда (Москва, Россия).

Список литературы

1. Патент РФ № 2183672. 08.12.2000. Киселева И.В., Александрова Г.И., Руденко Л.Г., Климов А.И. Штамм вируса гриппа А/17/Новая Каледония/99/145 (H1N1) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых // БИ. – 2002. – № 17.
2. Bullough P.A., Hughson F.M., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. – *Nature*. – 1994. – Vol. 371, № 6492. – P. 37–43.
3. Das S.R., Puigbo P., Hensley S.E., Hurt D.E., Benink J.R., Yewdell J.W. Glycosylation focuses sequence variation in the influenza A virus H1 hemagglutinin globular domain // *PLoS Pathog.* – 2010. – Vol. 6, № 11. – P. e1001211.
4. Gambaryan A.S., Marinina V.P., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Rudneva I.A., Sinitsyn B.V., Shilov A.A., Matrosovich M.N. Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties on H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs // *Virology*. – 1998. – Vol. 247, № 2. – P. 170–177.
5. Gambaryan A.S., Robertson J.S., Matrosovich M.N. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses // *Virology*. – 1999. – Vol. 258, № 2. – P. 232–239.
6. Ha Y., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C. H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes // *EMBO J.* – 2002. – Vol. 21, № 5. – P. 865–875.
7. Influenza Research Database. Available at <http://www.fludb.org> (accessed 1.10.2014).
8. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Bourgeois M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Heldens J.G., van den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N.J., Donis R.O. Characterization of reverse genetics-derived cold-adapted master donor virus A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and reassortants with H5N1 surface genes in a mouse model // *Clin Vaccine Immunol.* – 2014. – Vol. 21, № 5. – P. 722–731.
9. Isin B., Doruker P., Bahar I. Functional motions of influenza virus hemagglutinin: a structure-based analytical approach // *Biophys J.* – 2002. – Vol. 82, № 2. – P. 569–581.
10. Kiefer F., Arnold K., Kunzli M., Bordoli L., Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – P. D387–92.
11. Kiseleva I., Su Q., Toner T.J., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rudenko L., Shaw A.R., Youil R. Cell-based assay for the determination of temperature sensitive and cold adapted phenotypes of influenza viruses // *J Virol Methods*. – 2004. – Vol. 116, № 1. – P. 71–78.
12. Palker T., Kiseleva I., Johnston K., Su Q., Toner T., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rubin B., Petrukhin L., Wlochowski J., Monteiro J., Kraiouchkine N., DiStefano D., Rudenko L., Shaw A., Youil R. Protective efficacy of intranasal cold-

adapted influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) vaccines comprised of egg- or cell culture-derived reassortants // *Virus Res.* – 2004. – Vol. 105, № 2. – P. 183–194.

13. Pierce B., Tong W., Weng Z. M-ZDOCK: a grid-based approach for Cn symmetric multimer docking // *Bioinformatics*. – 2005. – Vol. 21, № 8. – P. 1472–1478.

14. Rudenko L., van den Bosch H., Kiseleva I., Mironov A., Naikhin A., Larionova N., Bushmenkov D. 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*. – 2011. – Vol. 29 Suppl 1 – P. A40–4.

15. Thoennes S., Li Z.N., Lee B.J., Langley W.A., Skehel J.J., Russell R.J., Steinhauer D.A. Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion // *Virology*. – 2008. – Vol. 370, № 2. – P. 403–414.

References

1. Kiseleva I.V., Alexandrova G.I., Rudenko L.G., Klimov A.I. Influenza virus strain A/17/New Caledonia/99/145 (H1N1) for influenza live intranasal vaccine for adults development. Russian Federation Patent no. 2183672. 08.12.2000. Bull no. 17, 2002.
2. Bullough P.A., Hughson F.M., Skehel J.J., Wiley D.C. *Nature*, 1994, 371(6492): pp. 37–43.
3. Das S.R., Puigbo P., Hensley S.E., Hurt D.E., Benink J.R., Yewdell J.W. *PLoS Pathog.* 2010, 6(11): pp. e1001211.
4. Gambaryan A.S., Marinina V.P., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Rudneva I.A., Sinitsyn B.V., Shilov A.A., Matrosovich M.N. *Virology*, 1998, 247(2): pp. 170–7.
5. Gambaryan A.S., Robertson J.S., Matrosovich M.N. *Virology*, 1999, 258(2): pp. 232–9.
6. Ha Y., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C. *EMBO J.* 2002, 21(5): pp. 865–75.
7. Influenza Research Database. Available at <http://www.fludb.org> (accessed 1.10.2014).
8. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Bourgeois M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Heldens J.G., van den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N.J., Donis R.O. *Clin Vaccine Immunol.* 2014, 21(5): pp. 722–31.
9. Isin B., Doruker P., Bahar I. *Biophys J.* 2002, 82(2): pp. 569–81.
10. Kiefer F., Arnold K., Kunzli M., Bordoli L., Schwede T. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37: pp. D387–92.
11. Kiseleva I., Su Q., Toner T.J., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rudenko L., Shaw A.R., Youil R. *J Virol Methods*, 2004, 116(1): pp. 71–8.
12. Palker T., Kiseleva I., Johnston K., Su Q., Toner T., Szymkowiak C., Kwan W.S., Rubin B., Petrukhin L., Wlochowski J., Monteiro J., Kraiouchkine N., DiStefano D., Rudenko L., Shaw A., Youil R. *Virus Res.* 2004, 105(2): pp. 183–94.
13. Pierce B., Tong W., Weng Z. *Bioinformatics*, 2005, 21(8): pp. 1472–8.
14. Rudenko L., van den Bosch H., Kiseleva I., Mironov A., Naikhin A., Larionova N., Bushmenkov D. *Vaccine*, 2011, 29 Suppl 1: pp. A40–4.
15. Thoennes S., Li Z.N., Lee B.J., Langley W.A., Skehel J.J., Russell R.J., Steinhauer D.A. *Virology*, 2008, 370(2): pp. 403–14.

Рецензенты:

Жилинская И.Н., д.б.н., ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, г. Санкт-Петербург;
Рябчикова Е.И., д.б.н., профессор, ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 27.10.2014.