

УДК 615.371:578.832 (015.46.076.9)

РАЗРАБОТКА ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА

© 2016 г. С.Г. Маркушин, А.А. Ртищев

*Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова, Москва
E-mail: s.g.markushin@rambler.ru*

Поступила в редакцию 16.03.2016 г.

Введение в практику получения гриппозных живых вакцин генно-инженерных подходов позволяет значительно оптимизировать отдельные этапы этого процесса. В последний период большой интерес среди исследователей вызывает метод, предполагающий прямое включение заранее известных и хорошо охарактеризованных мутаций в геном эпидемического варианта вируса гриппа, который таким образом приобретает ts- и att-фенотип и может использоваться в качестве кандидата в живые гриппозные вакцины. Рассмотрены возможности данного методического подхода и проблемы, связанные с его использованием в медицинской и ветеринарной вакцинологии.

Ключевые слова: живые гриппозные вакцины, ts-мутации, обратная генетика, иммунитет.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа занимает важное место в инфекционной патологии человека. Гриппозные эпидемии причиняют значительный ущерб здоровью населения и экономике большого количества стран. По данным Всемирной организации здравоохранения в период сезонных эпидемий каждый год в мире заболевает гриппом до 20% населения земного шара. При этом тяжелые формы заболевания наблюдаются в 4–5 млн случаев, а летальность колеблется в пределах 250 000–400 000 смертельных исходов в год (Bhat et al., 2005; Molinari et al., 2007). Гриппозные эпидемии влекут за собой значительные экономические затраты, связанные с временной потерей трудоспособности работающего населения и прямыми и косвенными расходами на лечение. Важно также отметить, что гриппозные эпидемии нередко сопровождаются тяжелыми клиническими осложнениями (Shah et al., 2015).

Вирус гриппа относится к семейству Orthomyxoviridae, которое включает шесть родов (*Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Influenza virus C*, *Isavirus*, *Thogotovirus*, *Quarjanavirus*). Род *Influenza virus A*, представляющий наибольшую опасность для здоровья населения, имеет геном, состоящий из восьми сегментов одноцепочечной

РНК негативной полярности, кодирующих в общей сложности 12 белков, из которых только три: NS1, NS2 и PB1-F2 – не входят в состав вириона. Установлено, что у вирусов гриппа А наиболее крупные РНК-сегменты 1, 2 и 3 кодируют белки полимеразного комплекса (PB1, PB2, PA); гены 4 и 6 – поверхностные гликопротеины HA и NA; ген 5 – нуклеопротеин NP. Ген 7 кодирует матриксный белок M1 и мембранный белок M2 (Lamb et al., 1989). Ген 8 кодирует два неструктурных белка NS1 и NS2, обнаруживаемых в клетке (Porter et al., 1980).

Наиболее эффективным средством борьбы с гриппозными эпидемиями является вакцинация. За последние полвека создано много живых и инактивированных гриппозных вакцин, тем не менее, гриппозные инфекции остаются и по сей день наименее контролируемые инфекционными заболеваниями. Имеющийся к настоящему времени опыт применения холодоадаптированной (ХА) живой гриппозной вакцины в России и США показал, что этот препарат обладает наибольшей эффективностью при массовой вакцинации против гриппа, особенно детей. Следует отметить, что в отличие от инактивированных гриппозных вакцин живая вакцина способна защитить от инфекции антигенными вариантами вируса гриппа. Будущее гриппозной вакциноло-

гии в значительной степени будет связано с дальнейшим усовершенствованием живых гриппозных вакцин.

На данный момент практика получения производственных реассортантов для живой гриппозной вакцины в нашей стране ограничивается устаревшей методикой реассортации родительских вариантов в куриных эмбрионах с последующей селекцией полученных вариантов и их отбором после геномного анализа.

Введение в практику получения гриппозных живых вакцин генно-инженерных подходов позволяет значительно оптимизировать отдельные этапы этого процесса. В частности, после разработки техники “обратной генетики” (Luytjens et al., 1989; Enami et al., 1990; Neumann et al., 1994, 1999; Palese et al., 1996; Fodor et al., 1999; Hoffmann et al., 2000a, b) стало возможно “собрать” рекомбинантные вирионы заданного белкового состава, трансфицируя клетку плазмидными векторами, включающими гены вируса гриппа нужных штаммов. При необходимости один или несколько вирусных генов можно мутировать в заданных позициях методом сайт-направленного мутагенеза.

Одно из направлений, взятых на вооружение фирмами-производителями, предполагает получение рабочего комплекса из шести плазмид, содержащих “внутренние” гены ХА штамма – донора аттенуации, несущие охарактеризованные ts-мутации, ответственные за аттенуацию этого штамма, и двух плазмид, содержащих гены, кодирующие поверхностные белки вириона (гемагглютинин и нейраминидаза), от антигенно-актуального эпидемического варианта. Совместная трансфекция с использованием всех восьми плазмид позволяет получить требуемые реассортанты – кандидаты в живые гриппозные вакцины, минуя весьма трудоемкую стадию анализа генома реассортантов (Maassab, Bryant, 1999; Murphy, Coelingh, 2002).

Второе направление является пока предметом лабораторных исследований. Оно предполагает прямое включение заранее известных и изученных ts-мутаций, взятых из геномов штаммов – доноров аттенуации, в геном эпидемического варианта вируса гриппа (Subbarao et al., 1993, 1995; Parkin et al., 1997; Song et al., 2007; Hickman et al., 2008; Pena et al., 2011; Solorzano et al., 2010; Zhou et al., 2012). В качестве наиболее доступного источника охарактеризованных ts-мутаций обычно используется штамм – донор аттенуации А/Энн Арбор/6/60(Н2N2), используемый фирмой MedImmune для получения коммерческой живой гриппозной вакцины FluMist. Этот штамм-донор

был получен серийными пассажами исходного дикого варианта А/Энн Арбор/6/60(Н2N2) в первичной культуре почек цыплят при постепенно понижающейся температуре (Maassab, 1967). Штамм эффективно размножался при 25 °С (sa-фенотип), но его рост был ограничен при 38 °С и 39 °С (ts-фенотип). Он не реплицировался в легких инфицированных хорьков (att-фенотип) и был аттенуирован для детей и взрослых (Belshe et al., 1998).

В настоящем обзоре мы покажем, как введение ts- и att-мутаций в гены, кодирующие белки полимеразного комплекса штаммов вируса гриппа человека, помогает создавать эффективные вакцины для профилактики заболевания гриппом, а в случае вирусов гриппа животных – для нужд ветеринарии. Кроме того, мы коротко остановимся на использовании в вакцинопрофилактике делеционных мутантов гена *NS1* и мутантов по белкам M1 и NP. Будут суммированы успехи, достигнутые исследователями – разработчиками актуальных живых противогриппозных вакцин, освещены проблемы, с которыми они сталкиваются, а также предложены пути дальнейшего развития генно-инженерных подходов для нужд современной вакцинологии.

ВКЛЮЧЕНИЕ TS- И АТТ-МУТАЦИЙ В ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ПОЛИМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ЧЕЛОВЕКА

Генетическую основу ts-фенотипа штамма А/Энн Арбор/6/60 составляет набор ts- мутаций, локализованных в PB1-белке (K391E; E581G; A661T), PB2-белке (N265S), NP-белке (D34G) (таблица). Интересно отметить, что все данные ts-мутации являются А-G или G-А заменами и все они, за исключением мутаций N265S и A661T, являются результатом модификации заряженных аминокислот. Неудивительно, что эти ts-мутации локализованы в белках полимеразного комплекса вируса гриппа, поскольку вполне вероятно, эти аминокислотные замены нарушают белок-белковые взаимодействия вирусной полимеразы при непермиссивной температуре (Jin et al., 2003). Генетическая стабильность ts-фенотипа, наблюдаемая у холодоадаптированных (ХА) штаммов – доноров аттенуации, могла объясняться коэволюцией изменений, наблюдаемых среди отдельных белков вириона, работающих в кооперации друг с другом.

Одна из первых попыток получения аттенуированного варианта вируса гриппа А путем последовательного включения мутаций в состав PB2-гена

Мутационные изменения в генах, кодирующих “внутренние” белки холодоадаптированного (ХА) штамма вируса гриппа А/Энн Арбор/6/60

Нуклеотидные замены					Замены аминокислот		
Ген Длина	Белок	Позиция	Дикий штамм	ХА штамм	Позиция	Дикий штамм	ХА штамм
1 2341	PB2	141	aga	agg	–	–	–
		426	gtt	gtc	–	–	–
		821	aac	agc	265	Asp	Ser
		1182	att	att	–	–	–
2 2341	PB1	1195	aaa	gaa	391	Lys	Glu
		1395	gag	gat	457	Glu	Asp
		1766	gag	ggg	581	Glu	Gly
		2005	gct	act	661	Ala	Thr
3 2233	PA	20	U	C	Utr	–	–
		1861			613	Lys	Glu
		2168	tta	cca	715	Leu	Pro
5 1565	NP	113	act	aat	23	Thr	Asn
		146	gat	ggg	34	Asp	Gly
		1545	a(5)	a(6)	utr	–	–
7 1027	M1	–	–	–	–	–	–
	M2	969	gct	act	86	Ala	Ser
8 890	NS1	483	gcg	acg	153	Ala	Ser
	NS2	813	cta	ctg	–	–	–

была сделана на модели вирулентного штамма вируса гриппа А/Лос Анжелес/2/87(Н1N1) (Jin et al., 2003). Было неясно, могут ли две мутации (или более), которые независимо переносят ts-фенотип вирусу-трансфектанту, дополнять друг друга и способствовать появлению вируса, который будет более аттенуированным, чем вирус, несущий только одну мутацию. Из литературы было известно, что в некоторых случаях удовлетворительный уровень аттенуации мог быть достигнут комбинированием двух генов, несущих аттенуирующие мутации в одном вирусе-доноре, однако аттенуационный фенотип не сохранялся в процессе репликации в серонегативных пациентах (Kim et al., 1976; Murphy, Coelingh, 2002; Tolpin et al., 1981). Использование новой генно-инженерной технологии предполагало последовательное включение мутаций в позиции 112, 556 и 658, отвечающих за проявление ts- и att-фенотипа, в кДНК копию *PB2*-гена штамма А/Энн Арбор/6/60, уже имеющую мутацию в позиции 265 с целью получения трех двойных мутантных копий *PB2*-гена, каждая из которых была затем включена в вирус-трансфектант (Subbarao et al., 1995). Было показано

что вирусы-трансфектанты, несущие *PB2*-ген А/Энн Арбор/6/60 с двумя ts-мутациями, обладали более выраженным ts- и att-фенотипом, чем вирусы-трансфектанты с единичными мутациями в *PB2*-гене, а ts-фенотип двух из трех трансфектантов с *PB2*-геном, несущим две мутации, был стабилен даже после продолжительной репликации в верхнем респираторном тракте мышей с нарушениями иммунной системы. Трансфектанты с тремя мутациями в *PB2*-гене обладали более выраженным ts- и att-фенотипом, чем трансфектанты с двумя мутациями в том же гене. Последовательное введение дополнительных ts-мутаций в *PB2*-ген приводило к появлению сайт-специфических мутантов, которые характеризовались ступенчатым повышением ts- и att-фенотипа по сравнению с предшествующими мутантами. На модели хомяков авторами было продемонстрировано, что ts-фенотип трансфектантов коррелировал с уровнем аттенуации этих вирусов. Оказалось, что трансфектанты с тремя мутациями в *PB2*-гене при заражении хомяков характеризовались выраженным att-фенотипом. Тем не менее, интраназальная иммунизация хомяков этими

вирусами индуцировала значительный подъем сывороточных гемагглютинин-ингибирующих антител, и хомяки были резистентны к последующему заражению вирулентным вирусом. Эти эксперименты авторов дали основание предполагать возможность использования обратной генетики для получения нового донора аттенуации путем включения в один ген нескольких аттенуирующих мутаций. Авторы уверены, что вакцинные реассортанты, полученные с помощью такой технологии будут обладать необходимым уровнем аттенуации, генетической стабильности, иммуногенности и защитной эффективности. Разработанный метод включения аттенуирующих мутаций в отдельные гены вируса гриппа позволяет очень точно добиваться желаемого уровня аттенуации у вакцинных вариантов. По мнению авторов, включение в геном вирулентного штамма одного гена, несущего несколько *ts*-мутаций, значительно проще включения нескольких генов, несущих по одной *ts*-мутации, поскольку последний подход резко ограничивается конstellацией генов. Учитывая более длительное размножение вакцинного гриппозного варианта в верхнем респираторном тракте человека, можно ожидать при вакцинации сайт-специфическими мутантами более значительного мукозального ответа. Большой проблемой в данном вопросе представляется генетическая стабильность включенных мутаций. В проведенной работе было показано, что два из трех трансфектантов с двумя мутациями в *PB2*-гене обнаруживали полную стабильность *ts*-фенотипа даже после продолжительной репликации в животных с поврежденной иммунной системой. Третий трансфектант обнаружил высокую, но не полную стабильность. Полученные данные свидетельствовали о том, что *ts*-фенотип вируса, имеющего единичный ген с двумя мутациями, более стабилен, чем *ts*-фенотип вируса с единичными мутациями в двух различных РНК-сегментах. Технология получения живых гриппозных вакцин путем включения сайт-специфических мутаций в геном эпидемических вариантов вируса гриппа была успешно продемонстрирована в другой работе (Zhou et al., 2012). В качестве источника *ts*-мутаций был использован все тот же ХА штамм А/Энн Арбор/6/60, а в качестве штамма-реципиента был выбран пандемический штамм гА/Нью Йорк/1682/2009(Н1Н1) (гNY1682-WT). В геном пандемического штамма в первую очередь были включены хорошо охарактеризованные мутации из *PB1*-гена А/Энн Арбор/6/60 (K391E, D581G, A661T) и одна мутация из *PB2*-гена того же штамма (N265S). Геном пандемического штамма уже содержал мутацию

D34G в *NP*-гене, которая играла определенную роль в формировании *ts*-фенотипа штамма А/Энн Арбор/6/60. Для усиления аттенуации и безопасности вакцинного прототипа авторы ввели в его геном еще три дополнительные мутации, локализованные в *PB2*-гене А/Энн Арбор/6/60 (P112S, N556D, Y658H). Включение дополнительных мутаций привело к получению варианта гNY1682-TS2, который реплицировался активно при пониженной температуре, но резко снижал репликацию при повышенной температуре. *In vivo* гNY1582-TS2 и коммерческая вакцина FluMist-H1N1pdm имели сходные уровни аттенуации, тем не менее гNY1682-TS2 обеспечивал лучшую защиту от вирусной инфекции, когда мыши были инфицированы либо вирулентным гомологичным вариантом NY1682(H1N1pdm) или гетерологичным вирусом гNY1682(HA/NA). В противоположность вакцине FluMist-H1N1pdm, в которой все шесть внутренних генов были унаследованы от ХА штамма А/Энн Арбор/6/60(H2N2), вариант гNY1682-TS2 содержал шесть внутренних генов от пандемического штамма H1N1 и поэтому мог индуцировать более эффективный Т-клеточный ответ к вирулентному вирусу. Предварительно было показано (Jin et al., 2004), что пяти *ts*-мутаций из генома А/Энн Арбор/6/60 было достаточно, чтобы создать эффективный *ts*-фенотип у штамма А/PR/8/34. Однако данные, полученные этими исследователями, показали, что эта группа критических мутаций в геноме сезонного штамма H1N1 полностью ограничивает его репликацию *in vitro*, однако только частично ограничивает репликацию пандемического вируса гNY1682-TS1 *in vitro* и совсем не ограничивает *in vivo*. Эти результаты совпадают с недавними исследованиями, свидетельствующими, что введение критических мутаций из генома ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 в геном Северо-Американского тройного реассортанта свиного вируса (H3N2) только частично аттенуирует вирус (Solorzano et al., 2010).

Результаты опытов с гNY1682-TS1 говорят о том, что мутация N265S не имеет такого влияния на птичью линию *PB2*-гена, какое имеет на человеческую линию *PB2*-гена. Принимая во внимание сильное ограничение репликации варианта H1N1pdm-TS2 и сезонного вируса H1N1-TS2 при повышенной температуре, авторы предполагают, что включение восьми *ts*-мутаций в гены *PB1*, *PB2* и *NP* в достаточной степени, возможно, аттенуируют большинство штаммов вируса гриппа А.

Главной проблемой данного генетического подхода является генетическая стабильность аттенуационного фенотипа. Проведенное исследе-

дование гNY1682-TS2 варианта, выделенного из мышинных легких и назальных смывов через четыре дня после инфекции, свидетельствует о том, что вариант сохраняет ts-фенотип. Однако требуется интенсивное исследование генетической стабильности варианта гNY1682-TS2 для того, чтобы показать, что мутации в геноме этого варианта такие же стабильные, как и мутации в ХА штамме А/Энн Арбор/6/60. Принимая во внимание, что ХА штамм имеет много точковых мутаций, которые аттенуируют вирус и повышают безопасность, включение дополнительных мутаций в геном сайт-специфических вариантов типа NY1682(H1N1pdm) может быть рекомендовано для большего увеличения их стабильности. Однако практическая вакцинология рекомендует разумный баланс между аттенуацией и иммуногенностью.

По мнению некоторых авторов (Parkin et al., 1997), ts-мутации должны быть включены в домены вирус-специфических белков вирулентного вируса, которые взаимодействуют с функционально важными факторами клетки-хозяина, поскольку такие мутации будут меньше подвергаться влиянию супрессорных мутаций. Исходя из этого предположения, мутации были включены в *PB2*-ген вирулентного штамма А/Лос Анжелес/2/87(H3N2), кодирующий белок, обладающий кэп-связывающей функцией. Наибольшим эффектом характеризовалось включение комбинаций, состоящих из пяти ts-мутаций, из трех ts-мутаций и трех не ts-мутаций. Последовательно включая мутации в *PB2*-ген, авторы получили два аттенуированных ts-варианта, которые не размножались при 38 °С в клетках MDCK (madin darby canine kidney) и обладали низкой реактогенностью для хорьков. Иммунизация мышей и хорьков этими вариантами обеспечивали защиту против интраназального заражения гомологичным вирусом дикого типа. Генетическая стабильность двух вариантов была исследована различными методами, и было установлено, что вариант, снизивший способность связывать кэп-структуру клеточных мРНК, был более стабильным, чем второй вариант.

Возможность генетической модификации высокорепродуктивного штамма А/PR/8/34 с целью его использования в качестве донора аттенуации для живых гриппозных вакцин была исследована сотрудниками фирмы MedImmune Vaccines, Inc. (Jin et al., 2004). Четыре ts-локуса, идентифицированных в *PB1*- и *PB2*-генах ХА штамма А/Энн Арбор/6/60(H2N2) были введены в геном штамма А/PR/8/34. Включение сайт-специфических мутаций в геном вируса привело к появлению ts- и att-фенотипа у штамма А/PR/8/34. При инфици-

ровании хорьков модифицированным вариантом А/PR/8/34, размножение вируса в легких хорьков не обнаруживалось, однако наблюдалась индукция антител, достаточная, чтобы обеспечить защиту от инфицирования вирулентным вирусом.

На модели живой гриппозной вакцины на базе штамма А/PR/8/34, адаптированного к мышам и содержавшего в геноме четыре ts-мутации (*PB2* – N265S; *PB1* – K391E, D581G, A661T), была сделана попытка создания более аттенуированного варианта путем включения в *PB1*-ген дополнительной мутации L319Q (Cox, Dewhurst, 2015). Включение этой мутации сопровождалось резким повышением аттенуации модифицированного варианта с одновременным умеренным снижением его иммуногенности. Интересно отметить, что действие данной мутации проявлялось только в контексте остальных ts-мутаций, присутствующих в *PB1*-гене, и отсутствовало у исходного дикого штамма А/PR/8/34. Фенотипическое проявление мутации L319Q проявлялось в резком снижении полимеразной активности при температуре 37 °С и ниже. Включение данной мутации не влияло на генетическую стабильность аттенуированного варианта А/PR/8/34. Введение максимальной нелетальной дозы ($10^{6.0}$ бляшкообразующих единиц) модифицированного варианта повышало в четыре раза титры антигемагглютинирующих антител в сравнении с введением максимальной нелетальной дозы исходного штамма ($10^{4.0}$ бляшкообразующих единиц).

В качестве донора ts-мутаций были использованы и другие ХА штаммы вируса гриппа. Следует отметить, что в России в течение длительного времени успешно использовался в качестве донора аттенуации штамм А/Ленинград/134/17/57(H2N2) (Александрова, Климов, 1994). Также в НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (Москва) был получен ХА штамм А/Краснодар/101/35/59(H2N2), у которого были выявлены мутации в РНК-сегментах генома и определены гены, несущие детерминанты, ответственные за аттенуацию этого штамма: *PB1*-ген и *NS*-ген (Гендон и др., 2013; Терехов и др., 2013). В связи с этим была исследована возможность прямого включения мутации Pe147Thr в *PB1*-гене этого штамма в геном вирулентного штамма А/WSN/33(H1N1) с целью его аттенуации. В отличие от родительского штамма вариант-реципиент W9 резко снизил способность реплицироваться при температуре 39 °С, а также снизил способность к размножению в легких мышей (Маркушин и др., 2014). Включения единственной мутации из генома ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 было достаточно для рез-

кого изменения фенотипических характеристик вирулентного штамма A/WSN/33(H1N1).

ВКЛЮЧЕНИЕ TS- И АТТ-МУТАЦИЙ В ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ПОЛИМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ЖИВОТНЫХ

В последние годы метод сайт-специфического мутагенеза находит широкое применение и в области ветеринарии. Ввиду повторяющихся вспышек низкопатогенного и высокопатогенного птичьего гриппа в птицеводческих хозяйствах возникла необходимость создания вакцин для массовой иммунизации домашней птицы против штаммов вируса птичьего гриппа. С помощью методов обратной генетики было создано новое поколение кандидатов в такие вакцины (Song et al., 2007). Ts-мутации из *PB1*-гена (K391E, E581G, A661T) и *PB2*-гена (N265S) ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 были введены в геном штамма вируса птичьего гриппа A/GuineaFowl/Hong Kong WF10/99(H9N2) (WF10). С целью повышения аттенуации данного вируса была проведена дальнейшая генетическая модификация *PB1*-гена: включение в СООН-конец информации, кодирующей последовательность восьми аминокислот НА-белка вируса гриппа серотипа Н3 (НА-tag), а также включение в геном вирулентного штамма *HA*-гена штамма А/Дикая утка/Альберта/24/01(H7N3), адаптированного к размножению в клетках MDCK. Однократная вакцинация двухнедельных цыплят полученным аттенуированным вариантом (attH7N2) создавала полную защиту от последующего заражения низкопатогенным штаммом вируса птичьего гриппа.

Аналогичная стратегия в дальнейшем была использована при получении кандидата в живую вакцину против высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1. В этом случае был использован аттенуированный вариант, чьи гены, кодирующие поверхностные белки вириона, были получены от азиатского вируса гриппа птиц H5N1. Однократная вакцинация этим аттенуированным вариантом 18-дневных куриных эмбрионов создавала 60%-ную защиту четырехнедельных цыплят и 100%-ную защиту 9–12-недельных цыплят против высокопатогенного вируса H5N1. Повторная вакцинация двухнедельных цыплят имела результатом 100%-ную защиту цыплят четырехнедельного возраста против высокопатогенного вируса. Аттенуированные варианты были способны реплицироваться в верхнем респираторном тракте птиц, вирус не был найден в легких или в клоаке, у контактирующих птиц не наблюдалось серокон-

версии. Одна иммунизация цыплят в дозе $5 \times 10^{3.0}$ ЭИД₅₀ (50%-ная эмбриональная инфекционная доза) обеспечивала защиту против $5 \times 10^{5.0}$ ЭИД₅₀ вирулентного вируса. Полученные результаты доказали, что ts-фенотип и att-фенотип возможно успешно переносить в геном штаммов вируса гриппа птиц с помощью ts-мутаций, взятых из генома аттенуированных штаммов вируса гриппа человека.

На следующей стадии работы была исследована возможность использования полученных аттенуированных вариантов вируса птичьего гриппа для получения живых вакцин, способных защитить млекопитающих от заражения штаммами вируса гриппа, относящихся к различным серотипам (Hickman et al., 2008). Аттенуированный вариант штамма вируса птичьего гриппа A/GuineaFowl/Hong Kong WF10/99(H9N2) (WF10att) обладал широким кругом хозяев и мог служить в качестве основы для создания универсальной вакцины для защиты животных и человека от вируса гриппа птиц. Чтобы лучше оценить аттенуационный потенциал варианта WF10att(H9N2), его защитная эффективность была изучена на модели лабораторных мышей. С этой целью были получены реассортанты, содержащие “внутренние” гены от аттенуированного варианта и гены, кодирующие поверхностные белки серотипов H1, H5, H7. Анализ ростовых характеристик реассортантов при различных температурах (32 °C, 37 °C, 38.5 °C) в клетках MDCK показал, что ts-фенотип реассортантов четко проявлялся вне зависимости от набора генов, кодирующих поверхностные белки. Размножение аттенуированных реассортантов 6 WF10ts:2 H1N1 и 6 WF10att:2 H1N1, несущих гены, кодирующие поверхностные белки серотипа H1N1 в легких мышей было сильно ограничено. Изучение вирулентности аттенуированных реассортантов (для мышей), содержащих шесть “внутренних” модифицированных генов WF10 в контексте серотипов H5N1 и H7N2, показало наличие у них аттенуационного фенотипа: 1 МЛД₅₀ (50%-ная мышьяная летальная доза) реассортанта 6 WF10att:2 H5N1 содержала $10^{6.0}$ ЭИД₅₀ по сравнению с реассортантом 6 WF10:2 H5N1, содержащим $<10^{2.0}$ ЭИД₅₀. Аттенуационный фенотип WF10att обеспечивал защиту иммунизированных мышей против заражения летальными вирусами серотипов H1N1 или H5N1. Интересно отметить, что мыши, иммунизированные одной дозой реассортанта 6 WF10att:2 H7N2, выживали после заражения штаммом A/WSN/33(H1N1) или высокопатогенным штаммом вируса птичьего гриппа H5N1, что свидетельствовало о том, что “внутренние” гены штамма

WF10att могли создавать защиту и против гетерологичных летальных вирусов. Дальнейшие исследования показали, что защита связана с клеточным иммунитетом, который не предотвращает начальную репликацию вирулентных вирусов.

В 2009 г. штамм H1N1pdm09 вируса свиного гриппа стал преобладающим среди штаммов вируса гриппа, циркулирующих в человеческой популяции. Этот штамм преодолел межвидовые барьеры и инфицировал индеек и свиней в отдельных странах. В связи с угрозой пандемии возникла крайняя необходимость в срочном создании вакцины, которая обладала защитным потенциалом против штамма H1N1pdm09. Используя положительный опыт введения ts-мутаций в *PB1*- и *PB2*-гены вируса птичьего гриппа H9N2 в комбинации с включением HA-tag в COOH-конец *PB1*-белка, возникла идея ввести аттенуирующие модификации в изолят штамма А/Индеек/ОН/313053/04(H3N2) (ty/04), который также как и штамм H1N1pdm09, был тройным реассортантом, с целью получения живой вакцины против штамма H1N1pdm09 (Pena et al., 2011). Полученный с помощью обратной генетики модифицированный прототип ty/04att имел ts-фенотип, сниженную полимеразную активность и был высоко аттенуирован для мышей. Однократная иммунизация мышей вариантом ty/04att создавала у мышей полную защиту против штамма H1N1pdm09. Вакцинация свиней вариантом ty/04attH1N1 индуцировала стерильный иммунитет в случае заражения H1N1pdm09. Эти факты свидетельствуют о безопасности полученного с помощью сайт-специфического мутагенеза вакцинного варианта ty/04att и характеризуют его как перспективного донора аттенуации для получения живых аттенуированных вакцин.

О возможности включения ts-мутации, локализованной в *NP*-гене штамма А/Росток/34 вируса чумы птиц (H7N1) в геном штамма А/PR/8/34 вируса гриппа человека (H1N1) сообщила Нотон с соавт. (Noton et al., 2009).

Мутация M239L при непермиссивных условиях вызывала формирование вирионов, характеризующихся резко сниженной инфекционностью и своеобразным полиморфизмом. Дефект наблюдался на поздней стадии вирусного цикла репродукции. Было обнаружено, что включение данной мутации в геном штамма А/Удорн/72(H3N2) вируса гриппа человека было сильно затруднено. Аналогичным образом включение химерического сегмента 7, кодирующего белок M2 от штамма А/WSN/33 и белок M1 от штамма А/Удорн/72(H3N2), в геном штамма А/WSN/33 только в одном случае из шести привело к появлению

трансфектанта. Эти факты дали основание предполагать, что мутация M239L влияет на взаимодействие *NP*-белка с белком M1 на конечных стадиях формирования вириона.

Попытка переноса ts-мутаций из *PA*-гена штамма А/WSN/33(H1N1) в геном пандемического вируса гриппа H1N1pdm09, циркулирующего в настоящий момент в человеческой популяции была предпринята группой Да Коста с сопр. (Da Costa et al., 2015). Мутации D216P и L219P, локализованные в области линкера (aa 197–256) между NH- и COOH-доменами *PA*-белка штамма А/WSN/33, были включены в *PA*-ген пандемического штамма H1N1pdm09. Мутация D216P индуцировала образование ts-фенотипа у штамма H1N1pdm09, сходного с ts-фенотипом мутантного А/WSN/33(H1N1). Трансфектант удалось получить только в случае с мутацией D216P, но не с мутацией L219P. Этот факт свидетельствует о том, что перенос мутаций от одного штамма вируса гриппа А другому штамму того же серотипа не всегда бывает удачным.

ВКЛЮЧЕНИЕ ДЕЛЕЦИОННЫХ МУТАЦИЙ В NS-ГЕН ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

NS1-белок вируса гриппа является многофункциональным белком, обладающим различными регуляторными функциями во время цикла вирусной репродукции. N-домен белка NS1 ответствен за связывание двуспиральной вирус-специфической РНК, что позволяет вирусу маскировать свое размножение и ускользать от действия альфа/бета-интерферона. COOH-домен белка NS1 ингибирует процессинг клеточных мРНК, в том числе и кодирующих интерферон, а также связывается с поли-А-концами мРНК, предотвращая их экспорт из клеточного ядра и сплайсинг. Было показано (Talon et al., 2000), что вариант вируса гриппа А/delNS1 с полной делецией белка NS1 плохо размножался в куриных эмбрионах старше семи дней и обладал сниженной вирулентностью для мышей. Второй вариант А/NS1–99 с частичной делецией белка NS1 демонстрировал умеренные ростовые характеристики в куриных эмбрионах и низкую вирулентность для мышей. Дальнейшие исследования показали, интраназальная иммунизация этими вариантами приводила к появлению полноценного противовирусного иммунитета (Talon et al., 2000). Таким образом, введение мутаций в NS1-белок могло быть использовано как общая стратегия для конструирования живых вирусных вакцин, которые оптимально аттенуированы и иммуногенны.

Разработанный с помощью этой стратегии новый тип живой гриппозной вакцины на основе штамма А/Новая Каледония/20/99(H1N1) с делетированным NS1-белком, не формировал интактных вирусных частиц, а также сохранял в инфицированных клетках высокий уровень интерферона, и, следовательно, индуцировал существенный В- и Т-клеточный иммунитет. После доклинических исследований были проведены клинические испытания вакцины на серонегативных добровольцах (Wacheck et al., 2010). У участников эксперимента наблюдалось трех-четырёхкратное повышение титра гуморальных антител. Важно отметить, что вакцина вызывала образование нейтрализующих антител против гетерологичных дрейфовых вариантов. Образцы сывороток из групп, иммунизированных самыми высокими дозами вакцины, были проанализированы на кросс-нейтрализующую активность на модели реассортантных штаммов, содержащих поверхностные гликопротеины от штаммов А/НК/20/99, А/Соломоновы острова/3/06 или А/Брисбейн/59/07. В то время как 8 из 12 (67%) участников обнаруживали четырехкратное увеличение титров нейтрализующих антител против гомологичного штамма А/НК/20/99, 7 из 12 (58%) обнаруживали четырехкратное увеличение титров нейтрализующих антител против штамма А/Соломоновы острова/3/06 и 6 из 12 (50%) показывали увеличение титров нейтрализующих антител против штамма А/Брисбейн/59/07.

С целью получения живых вакцин против высокопатогенных штаммов птичьего гриппа подтипа H5 была создана и охарактеризована панель из восьми вариантов на базе вирулентного штамма А/Вьетнам/1203/04 (VN/1203), которые включали модификации генов, кодирующих белки NS1, HA, PB2 (Steel et al., 2008).

Большинство полученных вариантов характеризовались протяженными делециями в CO-ОН-концевой области NS1-белка. Каждый NS-ген был скомбинирован с полимеразным геном PB2, который содержал в позиции 627 лизин или глутаминовую кислоту. У HA-гена каждого варианта был удален сайт разрезания, кодирующей несколько положительно заряженных аминокислот. Все восемь вариантов характеризовались att-фенотипом при интраназальном заражении мышей, при этом варианты, содержащие делеции NS1-белка, индуцировали более высокий уровень интерферона в инфицированных клетках и утратили вирулентность для мышей. Все варианты защищали иммунизированных мышей против заражения летальным вирусом птичьего гриппа H5. Важно отметить, что один из вариантов с де-

летируемым NS1-белком полностью защищал цыплят против 100 ПЛД₅₀ (50%-ных птичьих летальных доз) высокопатогенного штамма птичьего гриппа.

Сайт-специфические мутанты вируса гриппа лошадей (H3N8) с делециями NS1-белка были исследованы с целью использования их в качестве кандидатов в живые вакцины против вируса гриппа лошадей (Quinlivan et al., 2005). Интересно отметить, что в отличие от аналогичных сайт-специфических мутантов вируса гриппа человека у этих сайт-специфических мутантов вирулентные свойства не коррелировали с размером делеции в NS-гене. Известно, что сайт-специфический мутант NS1-73 характеризуется наиболее высокой вирулентностью по сравнению с сайт-специфическими мутантами NS1-126 или NS1-99. Есть предположение, что более выраженная аттенуация сайт-специфических мутантов NS1-99 и NS1-126 объясняется тем, что их неструктурные делетированные белки отличаются наименьшей стабильностью.

Сайт-специфические мутанты вируса гриппа свиней с делецией в NS-гене также успешно применяются для получения живых вакцин против вирулентных штаммов вируса гриппа свиней. С помощью обратной генетики был создан рекомбинантный вариант вируса свиного гриппа H3N2 на основе штамма А/SW/TX/4199-2/98 (TX98), геном которого содержал NS-ген, экспрессирующий делетированный NS1-белок протяженностью 126 аминокислот (Solorzano et al., 2005; Richt et al., 2006). Этот рекомбинантный вариант характеризовался высокой аттенуацией для свиней и мог быть использован в качестве живой вакцины для свиней при интратрахеальном введении. Однако интраназальный путь введения вакцины на основе штамма TX98-NS1del126 оказался более эффективным в праймировании мукозального иммунного ответа. Иммунизированные свиньи были затем заражены гомологичным вирулентным штаммом TX(H3N2), дрейфовым вариантом вируса свиного гриппа А/SW/CO/23619/99(H3N2) и гетеросубтипическим штаммом H1N1 А/SW/IA/00239/2004(IA04). При этом интраназально вакцинированные свиньи были полностью защищены против заражения гомологичным вирусом. Также вакцинация свиней вариантом TX98-NS1del126 обеспечивала почти полную защиту от вирулентного дрейфового варианта CO99(H3N2) и частичную защиту от гетеросубтипического штамма IA04 (Vincent et al., 2007). Следует особо отметить, что введение делеционных мутаций в NS-ген широко используется как необходимый этап в процессе получения высокоиммуноген-

ных рекомбинантных штаммов вируса гриппа, экспрессирующих посторонние антигенные последовательности с рамки считывания белка NS1 (Ferko et al., 1998, 2001; Kittel et al., 2004, 2005; Stukova et al., 2006; Sereinig et al., 2006; Tabunov et al., 2014).

ВКЛЮЧЕНИЕ TS- И АГТ-МУТАЦИЙ В NP- И M-ГЕНЫ ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ЧЕЛОВЕКА И ПТИЦ

M1-белок является главным структурным компонентом вириона вируса гриппа. Показано, что ассоциация M1-белка с вирусной РНК и нуклеопротеином NP требуется для формирования рибонуклеопротеина (РНП) и его ядерного экспорта (Comrans, Klenk, 1979; Baudin et al., 2001). РНК-связывающие домены M1-белка находятся в двух независимых локусах: мотиве “цинковых пальцев” в позиции 148–162 и серии положительно заряженных аминокислот RKLKR в позиции 101–105, которая играет роль сигнала ядерной локализации. Было показано на модели штамма A/WSN/33(H1N1), что двойная замена R-S в позициях 101 и 105 M1-белка приводит к появлению ts-фенотипа вируса (Li, Ye, 2004). Мутантный вирус также характеризовался сниженным соотношением M1 и NP, а также более слабым взаимодействием M1-белка и РНП в вирионах. Таким образом, включение сайт-специфических мутаций в аминокислотную последовательность сигнала ядерной локализации M1-белка позволяет менять фенотипические характеристики вирулентного штамма A/WSN/33(H1N1).

Включение ts-мутации M239L из NP-белка штамма А/Цыпленок/Росток/34(H7N1) вируса чумы птиц в геном штамма А/PR/8/34 вируса гриппа человека приводило к появлению ts-фенотипа у штамма-реципиента US3. Этот штамм обладал нормальным уровнем транскрипции, репликации и белкового синтеза, однако его вирионы характеризовались резко сниженной инфекционностью и своеобразным полиморфизмом (Noton et al., 2009). Недавно был разработан еще один метод получения аттенуированных вариантов вируса гриппа, связанный с включением мотивов каспазного воздействия в вирус-специфические белки (Jang et al., 2013). Включение в NP- и NS1-белки штамма А/WSN/33 с помощью сайт-специфического мутагенеза последовательности DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), являющейся сайтом разрезания для каспаз II группы (каспаза-3, каспаза-7), приводило к получению мутантов, снизивших вирулентность для мышей по сравнению с вирусом дикого типа. В процессе инфекции клеток MDCK

полученными мутантами наблюдалось эффективное разрезание NP- и NS1-белков спустя 9 ч. после начала инфекции. Мутанты показывали частичную летальность для мышей только при наивысшей дозе заражения $10^{6.0}$ бляшкообразующих единиц. Однократная вакцинация мышей мутантами, имеющими сайты каспазного воздействия в NP- и NS1-белках, индуцировала высокие титры сывороточных гемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител. Была отмечена высокая защитная эффективность этих мутантов при заражении иммунизированных мышей вирулентным вирусом через 4 нед. после вакцинации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные литературы за последний период свидетельствуют о том, что использование технологии сайт-специфических мутаций значительно продвинуло разработку живых гриппозных вакцин как в медицине, так и в ветеринарии. Вместе с тем прогресс в этой области обозначил наличие серьезных нерешенных проблем. Согласно данным, основным источником сайт-специфических ts-мутаций является ХА штамм А/Энн Арбор/6/60, полученный д-ром Маассабоом более полувека назад. Три мутации из *PB1*-гена данного штамма (K391E, E581G, A661T), одна мутация из *PB2*-гена (N265S) и одна из *NP*-гена (D34G) составляет “джентльменский набор” для модификации генома подавляющего количества вирулентных штаммов вируса гриппа человека и животных. Однако использование этого набора мутаций не позволяет полностью аттенуировать не только пандемический штамм, но также и некоторые особо вирулентные сезонные варианты вируса гриппа человека. Для полной аттенуации пандемического штамма требуется 7–8 мутаций, если использовать мутации из генома штамма А/Энн Арбор/6/60 (Zhou et al., 2012). Данная проблема впервые ставит вопрос о “качестве” мутаций. Как видно из данных литературы, включение сайт-специфических мутаций даже в геном серологически близкородственного вируса бывает не всегда удачным. В этой связи вполне целесообразно провести сравнительное исследование ts-мутаций, взятых из генома других ХА штаммов вируса гриппа человека. В России в течение многих лет в качестве донора аттенуации для живых гриппозных вакцин используется ХА штамм А/Ленинград/134/17/57(H2N2) (Александрова, Климов, 1994). Генетические детерминанты, ответственные за аттенуацию этого штамма сосредоточены в *PB1*-гене (K265N, V591I) и *PB2*-гене (V478L). В другом недавно полученном ХА

штамме А/Краснодар/101/35/59(H2N2) ts-мутация, ответственная за ts-фенотип этого штамма, локализована в *PB1*-гене (I147T) (Гендон и др., 2013). Потенциал этих ts-мутаций, а также ts-мутаций в *PA*- и *NP*-генах этих штаммов в плане модификации фенотипических характеристик вирулентных штаммов вируса гриппа почти не изучен. Решение этой проблемы дало бы возможность сравнить эффективность этих мутаций, а также расширить арсенал сайт-специфических мутаций, что весьма полезно для дальнейшего конструирования живых гриппозных вакцин.

Анализ литературы показывает, что вопрос об оптимальной стратегии включения мутаций в геном вирулентного штамма остается открытым. Возможно включение нескольких мутаций в единичный ген штамма-реципиента, однако в этом случае есть риск, что несбалансированное количество включенных мутаций может привести к гиператтенуации или полной потере жизнеспособности вируса. При включении единичных мутаций в группу генов серьезным препятствием будет являться констелляция генов. Можно предположить, что общее решение для этой проблемы отсутствует, и использование той или иной стратегии будет оптимальным в зависимости от биологических особенностей эпидемического штамма. Биологические особенности эпидемических и пандемических штаммов вируса гриппа, которые в обозримом будущем будут циркулировать в человеческой популяции, можно рассматривать как непредсказуемые. В этой связи существенное значение приобретает изучение зависимости эффекта включенной в геном вирулентного штамма мутации от нового фенотипического окружения. Это направление исследований из-за его сложности потребует дополнительных знаний о структуре и функциях белков вируса гриппа человека и животных.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 15-04-05044.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова Г. И., Климов А. И. Живая вакцина против гриппа. СПб: Наука, 1994. 234 с.
- Гендон Ю. З., Маркушин С. Г., Цфасман Т. М. и др. Новые холодоадаптированные штаммы – доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа // *Вопр. вирусол.* 2013. Т. 58. С. 11–17.
- Маркушин С. Г., Кост В. Ю., Аконова И. И. и др. Исследование возможности использования сайт-специфического мутагенеза в конструировании живых гриппозных вакцин // *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2014. № 6. С. 100–103.
- Терехов А. В., Цфасман Т. М., Маркушин С. Г. и др. Генетические основы аттенуации холодоадаптированного штамма А(H2N2)/Краснодар/101/35/59 – донора для живых гриппозных вакцин // *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2013. № 3. С. 70–77.
- Bhat N., Wright J., Broder K. et al. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003–2004 // *N. Engl. J. Med.* 2005. V. 353. P. 2559–2567.
- Baudin F., Petit I., Weissenhorn W., Ruigrok R. In vitro dissection of the membrane binding and RNP binding activities of influenza virus M1 protein // *Virology.* 2001. V. 281. P. 102–108.
- Belshe R., Mendelman P., Treanor J. et al. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 338. P. 1405–1412.
- Compans R., Klenk H. Viral membranes // *Comprehensive Virology / Eds H. Fraenkel-Conrat, R. Wagner.* N.-Y.: Plenum Press, 1979. V. 13. P. 293–407.
- Cox A., Dewhurst S. A single mutation at PB1 residue 319 dramatically increases the safety of PR8 live attenuated influenza vaccine in a murine model without compromising vaccine efficacy // *J. Virol.* 2015. V. 90(5). P. 2702–2705.
- Da Costa B., Sausset A., Munier S. et al. Temperature-sensitive mutants in the influenza A virus RNA polymerase: alterations in the PA linker reduce nuclear targeting of the PB1-PA dimer and result in viral attenuation // *J. Virol.* 2015. V. 89(12). P. 6376–6390.
- Enami M., Luytjes W., Krystal M., Palese P. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus // *PNAS.* 1990. V. 87 (10). P. 3802–3805.
- Ferko B., Katinger D., Grassauer A. et al. Chimeric influenza virus replicating predominantly in the murine upper respiratory tract induces local immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in genital tract // *J. Infect. Dis.* 1998. V. 178. P. 1359–1368.
- Ferko B., Stasakova J., Sereinig S. et al. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice // *J. Virol.* 2001. V. 75. P. 8899–8908.
- Fodor E., Devenish L., Engelhardt O. G. et al. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 9679–9682.
- Hickman D., Hossain J., Song H. et al. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines // *J. Gen. Virol.* 2008. V. 89. P. 2682–2690.
- Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y. et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids // *PNAS.* 2000a. V. 97(11). P. 6108–6113.

- Hoffmann E., Neumann G., Hobom G. et al.* Ambisense approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template // *Virology*. 2000b. V. 267(2). P. 310–317.
- Jang Y., Byun Y., Lee K. et al.* Host defense mechanism-based rational design of live vaccine // *PLoS One*. 2013. V. 8(10). P. e75043–75054.
- Jin H., Lu B., Zhou H.* Multiple amino acid residues confer temperature sensitive to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 // *Virology*. 2003. V. 306. P. 18–24.
- Jin H., Zhou H., Lu B. et al.* Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 // *J. Virol.* 2004. V. 78(2). P. 995–998.
- Kim H. W., Arrobio J. O., Brandt C. D. et al.* Temperature-sensitive mutants A virus: response of children to the influenza A/Hong Kong/68-ts-1(E)(H3N2) and influenza A/ Udorn/72-ts-1(E)(H3N2) candidate vaccine viruses and significance of immunity to neuraminidase antigen // *Pediatr. Res.* 1976. V. 10. P. 238–242.
- Kittel C., Sereinig S., Ferko B. et al.* Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame // *Virology*. 2004. V. 324. P. 67–73.
- Kittel C., Ferko B., Kurz M. et al.* Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 10672–10677.
- Lamb R. A., Zebedee L. S., Richardson C. D.* Influenza virus protein in an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface // *Cell*. 1989. V. 40. P. 627–633.
- Li T., Ye Z.* Introduction of a temperature-sensitive phenotype into influenza A/WSN/33 virus by altering the basic amino acid domain of influenza virus matrix protein // *J. Virol.* 2004. V. 78(18). P. 9585–9591.
- Luytjens W., Krystal M., Enami M. et al.* Amplification, expression and packaging of a foreign gene by influenza virus // *Cell*. 1989. V. 59. P. 1107–1113.
- Maassab H.* Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C // *Nature*. 1967. V. 213. P. 612–614.
- Maassab H. F., Bryant M. I.* The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans // *Rev. Med. Virol.* 1999. V. 9(4). P. 237–244.
- Molinari N., Ortega-Sanchez I., Messonnier M.* The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs // *Vaccine*. 2007. V. 25. P. 5086–5096.
- Murphy B., Coelingh K.* Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines // *Viral. Immunol.* 2002. V. 15. P. 295–323.
- Neumann G., Zobel A., Hobom G.* RNA polymerase I-mediate expression of influenza viral RNA molecules // *Virology*. 1994. V. 202. P. 477–479.
- Neumann G., Watanabe T., Ito H. et al.* Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs // *PNAS*. 1999. V. 96(16). P. 9345–9350.
- Noton S., Simpson-Holley M., Medealf E. et al.* Studies of an influenza A virus temperature-sensitive mutant identify a late role for NP in the formation of infectious virions // *J. Virol.* 2009. V. 83(2). P. 562–571.
- Palese P., Zheng H., Engelhardt O. et al.* Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications // *PNAS*. 1996. V. 93(21). P. 11354–11358.
- Parkin N., Chiu P., Coelingh K.* Genetically engineering live attenuated influenza A virus vaccine candidates // *J. Virol.* 1997. V. 71(4). P. 2772–2778.
- Pena L., Vincent A., Ye J. et al.* Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses // *J. Virol.* 2011. V. 85(1). P. 456–469.
- Porter A. G., Smith J. C., Emtage J. S.* The sequence of influenza virus RNA segment 8 indicates that the coding regions for the NS1 and NS2 protein overlap // *PNAS*. 1980. V. 77. P. 5074–5078.
- Quinlivan M., Zamarin D., Garcia-Sastre A. et al.* Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein // *J. Virol.* 2005. V. 79(13). P. 8431–8439.
- Richt J., Lekcharoensuk P., Lager K. et al.* Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 11009–11018.
- Shah N., Greenberg J., McNulty M. et al.* Severe influenza in 33 US hospitals, 2013–2014: Complications and risk factors for death in 507 patients // *Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.* 2015. V. 36. P. 1251–1260.
- Sereinig S., Stukova M., Zabolotnyh N. et al.* Influenza virus NS vectors expressing the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein induce CD4+Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge // *Clin. Vaccine Immunol.* 2006. V. 13. P. 898–904.
- Solorzano A., Webby R., Lager K. et al.* Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 7535–7543.
- Solorzano A., Ye J., Perez D. R.* Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modification in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu // *J. Virol.* 2010. V. 84(9). P. 4587–4596.
- Song H., Nieto G., Perez D.* A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates // *J. Virol.* 2007. V. 81(17). P. 9238–9248.

- Steel J., Loven A., Pena L.* Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza // *J. Virol.* 2008. V. 83(10). P. 1742–1753.
- Stukova M., Sereinig S., Zabolotnyh N. et al.* Vaccine potential of influenza vectors expressing *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein // *Tuberculosis.* 2006. V. 86. P. 236–246.
- Subbarao E. K., Kawaoka Y., Murphy B. R.* Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature-sensitive and attenuating mutation // *J. Virol.* 1993. V. 67(12). P. 7223–7227.
- Subbarao K., Park E., Lawson C. et al.* Sequential addition temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine // *J. Virol.* 1995. V. 69(10). P. 5969–5977.
- Tabynov K., Sansyzbay A., Kydyrbayev Z. et al.* Influenza viral vectors expressing the Brucella OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against *B. abortus* infection // *J. Virol.* 2014. V. 11. P. 69.
- Talon J., Salvatore M., O'Neill R. et al.* Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: a vaccine approach // *PNAS.* 2000. V. 97. P. 4309–4314.
- Tolpin M. D., Massicot J. G., Mullinix M. G. et al.* Genetic factors associated with loss of the temperature-sensitive phenotype of the influenza A/Alaska/77-ts-1 A2 recombinant during growth *in vivo* // *Virology.* 1981. V. 112. P. 505–512.
- Vincent A., Ma W., Lager K. et al.* Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine // *Vaccine.* 2007. V. 25. P. 7990–8009.
- Wacheck V., Egorov A., Groiss F. et al.* A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1 // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. P. 354–362.
- Zhou B., Li Yo., Speer S. et al.* Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses // *Vaccine.* 2012. V. 30(24). P. 3691–3702.

Development of Live Influenza Vaccines Using Technology of Site-Specific Mutagenesis

S.G. Markushin, A.A. Rtishchev

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
E-mail: s.g.markushin@rambler.ru

The introduction of genetic and engineering approaches to the practice of developing live influenza vaccines can significantly optimize individual stages of this process. In the last period, a method including a direct incorporation of the well-known and carefully characterized mutations into the genome of epidemic variants of influenza virus is of great interest among researchers. This genome, which acquires a ts- and att-phenotype, may be used as a candidate for live influenza vaccines. The review considers the possibilities of this methodological approach and problems associated with its use in medical and veterinary practice.