



# Сравнительное изучение биологических свойств мутантов вируса гриппа А, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза, и варианта живой гриппозной реассортантной вакцины

Черепович Б.С.<sup>1</sup>, Ртищев А.А.<sup>1</sup>, Акопова И.И.<sup>1</sup>, Борисова О.В.<sup>1</sup>, Кост В.Ю.<sup>2</sup>,  
Кутузова Н.М.<sup>3</sup>, Маркушин С.Г.<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

## Аннотация

**Цель** исследования — сравнительное изучение биологических свойств сайт-специфических мутантов вируса гриппа А и гриппозной реассортантной вакцины.

**Материалы и методы.** Для изучения генетической стабильности сайт-специфических мутантов штамма A/WSN/33 вируса гриппа А была использована методика температурного стресс-теста, который проводили в культуре клеток Madin–Darby Canine Kidney (MDCK). Иммуногенность изучали путём интраназальной иммунизации мышей исследуемыми вирусами. Титр антител определяли с помощью реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментного анализа. Способность вирусов индуцировать интерферон 1-го типа в клетках A549 выявляли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты.** Исследована генетическая стабильность сайт-специфических мутантов штамма A/WSN/33 (H1N1) с разным количеством чувствительных к температуре (temperature-sensitive — ts) мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, при помощи стресс-теста в культуре клеток MDCK. Показано, что мутанты U2 и M26, имеющие, соответственно, 3 и 5 ts-мутаций в генах, кодирующих полимеразные белки, обладают высокой генетической стабильностью. Проведено сравнительное изучение способности мутантов U2 и M26, а также холодоадаптированного (ха) реассортанта индуцировать гуморальный иммунитет при интраназальной иммунизации мышей. Обнаружено, что мутанты способствуют более высокой выработке сывороточных антител, чем ха-реассортант. Изучена способность мутантов U2 и M26, а также ха-реассортанта индуцировать экспрессию интерферонов 1-го типа ( $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -4 и интерферон- $\beta$ ) в культуре клеток A549. Показано, что мутанты в большей степени повышают уровень интерферонов 1-го типа по сравнению с ха-реассортантом.

**Заключение.** Сайт-специфические мутанты вируса гриппа А, имеющие в полимеразных генах 3 и 5 ts-мутаций, показывают высокий уровень генетической стабильности. Они обладают высокой иммуногенностью и индуцируют более высокий уровень интерферона 1-го типа по сравнению с ха-реассортантом. Это позволяет рассматривать сайт-специфические мутанты U2 и M26 в качестве кандидатов в живые гриппозные вакцины.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, сайт-специфические мутанты, генетическая стабильность, иммуногенность, интерферогенность, живые гриппозные вакцины

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 02.04.2018).

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке НИИВС им. И.И. Мечникова.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Черепович Б.С., Ртищев А.А., Акопова И.И., Борисова О.В., Кост В.Ю., Кутузова Н.М., Маркушин С.Г. Сравнительное изучение биологических свойств мутантов вируса гриппа А, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза, и варианта живой гриппозной реассортантной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):557–564.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-239>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-239>

# Comparative study of the biological properties of influenza A virus mutants obtained by site-specific mutagenesis and the live influenza reassortant vaccine variant

Bogdan S. Cherepovich<sup>1</sup>, Artem A. Rtishchev<sup>1</sup>, Irina I. Akopova<sup>1</sup>, Olga V. Borisova<sup>1</sup>, Vladimir Y. Kost<sup>2</sup>, Nina M. Kutuzova<sup>3</sup>, Stanislav G. Markushin<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup>I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia

## Abstract

The **aim** of study was to carry out comparative investigation of biological properties of site-specific mutants of Influenza A virus and variant of live cold-adapted (CA) influenza reassortant vaccine.

**Materials and methods.** The genetic stability of site-specific mutants (SSM) of the A/WSN/33 (H1N1) strain with ts (temperature sensitive)-mutations in polymerase genes was studied using a stress-test in Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) culture. A comparative study of immunogenicity of U2 and M26 mutants with the high genetic stability and the CA-reassortant with similar surface proteins was carried out. The increase in the antibody titer was investigated using enzyme-linked immunosorbent assay and the reaction of delayed hemagglutination. Ability of the studied viruses to induce type 1 interferon in A549 cells was determined using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

**Results.** It was shown that U2 and M26 mutants, which have 3 ts-mutations or more in polymerase genes have high genetic stability. It was found that U2 and M26 mutants induced a higher antibody titers than the CA reassortant in mice following the intranasal immunization. The ability of site-specific mutants and CA reassortant to induce type 1 interferon was also investigated. Mutants U2 and M26 increased the level of interferon to a greater extent than the CA-reassortant.

**Conclusion.** The data obtained indicate that SSM U2 and M26 with 3 ts-mutations or more in the genome have a significant level of genetic stability. Mutants U2 and M26 have a higher immunogenicity and a higher ability to induce interferon in comparison with the CA reassortant. These facts allow us to conclude that SSM of the influenza virus with a set of mutations in polymerase genes can be considered as promising candidates for live influenza vaccines.

**Keywords:** *site-specific mutants, influenza virus, genetic stability, immunogenicity, CA-reassortant, interferonogenicity, live influenza vaccines*

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (protocol No. 6, 4 April, 2018).

## Acknowledgement.

**Funding source.** The study was carried out with the financial support of the I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Cherepovich B.S., Rtishchev A.A., Akopova I.I., Borisova O.V., Kost V.Y., Kutuzova N.M., Markushin S.G. Comparative study of the biological properties of influenza A virus mutants obtained by site-specific mutagenesis and the live influenza reassortant vaccine variant. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):557–564.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-239>

## Введение

Накопленный к настоящему времени опыт применения холодоадаптированной (ха) живой гриппозной вакцины в России и США продемонстрировал высокую эффективность этого препарата при массовой вакцинации против гриппа, особенно детей. В отличие от инактивированных гриппозных вакцин, живая вакцина способна защитить от инфек-

ции дрейфовыми вариантами вируса гриппа. Классические живые гриппозные вакцины представляют собой reassortants, имеющие гены, кодирующие «внутренние» белки от ха-штаммов — доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), А/Энн Арбор/6/60 (H2N2), А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), и гены, кодирующие поверхностные гликопротеины от антигенно-актуальных эпидемических штаммов

вируса гриппа. В последнее время значительный интерес среди исследователей вызывает генно-инженерный подход к получению живых гриппозных вакцин, предполагающий прямое включение заранее известных и охарактеризованных чувствительных к температуре (*temperature-sensitive* — *ts*) мутаций, присутствующих в геноме штаммов-доноров аттенуации, которые в дальнейшем клонируются в геном вирулентного штамма вируса гриппа. Данные литературы свидетельствуют о том, что использование технологии сайт-специфического мутагенеза может значительно продвинуть разработку живых гриппозных вакцин как в медицине, так и в ветеринарии [1–12]. В НИИВС им. И.И. Мечникова была получена большая панель сайт-специфических мутантов (ССМ) вируса гриппа серотипа H1N1 с использованием мультиплазмидной системы на базе плазмид pHW2000, содержащих гены штамма A/WSN/33 (H1N1). Исследование *ts*- и *att* (*attenuated*)-фенотипа полученных мутантов показало их высокий аттенуационный потенциал.

**Цель работы** — сравнительное изучение свойств двух ССМ — U2 и M26, имеющих *ts*-мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, и ха-реассортанта, полученного по классической технологии и имеющего 6 генов, кодирующих «внутренние» белки от ха-донора аттенуации A/Краснодар/101/35/59 (H2N2), и 2 гена, кодирующих поверхностные белки HA и NA от вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1).

## Материалы и методы

### Вирусы

Вирулентный штамм A/WSN/33 (H1N1) получен из Государственной коллекции вирусов при НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского. При изучении генетической стабильности использовали группу ССМ, полученных с помощью мультиплазмидной системы на базе плазмид pHW2000, содержащих гены штамма A/WSN/33(H1N1), предоставленной доктором Р. Вебстером (Мемфис, США). Для исследований использовали ССМ U2 и M26, а также ха-реассортант между штаммами A/WSN/33 (H1N1) и A/Краснодар/101/35/59 (H2N2). ССМ U2 имел 3 *ts*-мутации в гене *PB2*, полученные из генома ха-штаммов-доноров A/Энн Арбор/6/60, A/Ленинград/134/17/57 и A/Краснодар/101/35/59. ССМ M26 имел 3 *ts*-мутации в гене *PB1*, полученные от штамма A/Энн Арбор/6/60, 1 *ts*-мутацию в гене *PB2* от штамма A/Краснодар/101/35/59 и 1 *ts*-мутацию в гене *PA* (аминокислотные замены и их позиции указаны в табл. 1).

### Клеточные культуры

В работе использовали перевиваемую культуру эпителиальных клеток почки собаки Madin–Dar-

by Canine Kidney (MDCK) и культуру клеток аденокарциномы лёгкого человека A549. Все использованные в работе вирусы и ССМ поддерживали путём пассажей в 9–11-дневных куриных эмбрионах («СГЦ Загорское ЭПХ»).

### Изучение генетической стабильности ССМ штамма A/WSN/33

Клеточную культуру MDCK инфицировали исследуемыми вирусами с расчётом коэффициента множественности заражения, равном 0,01 средней эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД<sub>50</sub>) на 0,2 мл на одну клетку тканевой культуры, и инкубировали в диапазоне температур 34–39°C. Через 72 ч супернатанты отбирали из культуры клеток, где наблюдалось цитопатическое действие вируса. У вирусов, присутствующих в этих супернатантах, было исследовано изменение *ts*-фенотипа методом заражения куриных 10-дневных эмбрионов при разных температурах. Поскольку способность к генетическим изменениям, которые вызывали изменение *ts*-фенотипа, могла быть достаточно низкой, а также могла варьировать, эксперименты проводили несколько раз для каждого мутанта. Мутант считался генетически стабильным, если соотношение титров при пороговых значениях температур 38°C/34°C было не ниже 1 : 500 [1].

**Таблица 1.** ССМ штамма A/WSN/33 (H1N1)

**Table 1.** Site-specific mutants of the A/WSN/33 (H1N1)

Номер трансфектанта Number of transfectant	Ген Gene	Штамм-донор (H2N2) Donor strain (H2N2)	Аминокислотные замены Amino acid replacement
3	<i>PB1</i>	A/Krasnodar/101/35/59	I147T
4	<i>PB2</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Krasnodar/101/35/59	N265S M290L
21	<i>PB1</i> <i>PA</i>	A/Krasnodar/101/35/59 A/WSN/33 (H1N1)	I147T F658A
13 LAK-2	<i>PB2</i>	A/Krasnodar/101/35/59 A/Leningrad/134/17/57	V290L V478L
14 AAK -2	<i>PB2</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Krasnodar/101/35/59	N265S V290L
15 LAK-2	<i>PB2</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Leningrad/134/17/57	N265S V478L
16 U2	<i>PB2</i>	A/Ann Arbor/6/60 A/Krasnodar/101/35/59, A/Leningrad/134/17/57	N265S V290L V478L
17 M26	<i>PB1</i>  <i>PB2</i>  <i>PA</i>	A/Ann Arbor/6/60  A/Krasnodar/101/35/59  A/WSN/33 (H1N1)	K391E E581G E457D  V290L  F658A

### Иммунизация мышей

Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986. На проведение исследования получено разрешение этического комитета НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 02.04.2018). Беспородные мыши-самки массой 10–12 г получены из питомника РАН «Андреевка». Иммунизацию проводили интраназально под лёгким эфирным наркозом вирусами в инфекционном титре  $10^{5.0}$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл в дозе 50 мкл на мышью, вторая иммунизация была через 21 день после первой. Забор крови у мышей производили через 21 день после 1-й иммунизации и через 10 дней после 2-й иммунизации. В эксперименте было 4 группы животных по 12 особей. Первую группу иммунизировали мутантом U2, 2-ю — мутантом M26, 3-ю — ха-реассортантом, 4-ю (контрольную) — физиологическим раствором.

### Иммуноферментный анализ

В работе использовали общелабораторные и химические реагенты: 3,3'-, 5,5'-тетраметилбензидин, компоненты буферных растворов («Sigma», «Fluka», «Хеликон»). Для приготовления растворов брали деионизованную воду («Milli-Q System», «Millipore»). Для иммуноферментного анализа (ИФА) использовали прозрачные полистироловые 96-луночные планшеты («Corning-Costar») с иммобилизованными препаратами вируса гриппа. В лунки планшета вносили по 100 мкл сывороток крови иммунизированных мышей и мышей контрольной группы в разведении от 1 : 400 до 1 : 409 600, выдерживали на шейкере при 37°C, скорости вращения 700 об/мин в течение 60 мин. Каждый образец анализировали в 2 лунках. После отмывки в лунки планшета вносили по 100 мкл антител кролика к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой (А 9044, «Sigma») и повторяли этап инкубации. Затем вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3'-, 5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,5 М серной кислоты, измеряли оптическую плотность в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Результаты выявления антител в ИФА представляли в виде титров, которые определяли как последнее разведение образца, в котором  $OP_{образца} \geq OP_{cp,K} \times 2$ , где  $OP_{cp,K}$  — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для образцов контрольной группы.

### Реакция торможения гемагглютинации

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили согласно Методическому указанию МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28.09.2003). В качестве антигенов в РТГА использовали мутант U2, мутант M26 и ха-реассортант. Для постановки РТГА сыворотки прогревали в течение 30 мин при 56°C для разрушения термолабильных ингибиторов. Результаты выявления антител в РТГА представляли в виде титров, которые определяли как последнее разведение образца сыворотки, при котором отсутствовала агглютинация эритроцитов.

### Сравнительное изучение интерферогенности мутантов U2, M26 и ха-реассортанта

Монослой клеток A549 инфицировали вирусами с расчётом коэффициента множественности заражения, равного 0,01 ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл на одну клетку тканевой культуры, и инкубировали 16 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Далее проводили выделение РНК из клеточной культуры при помощи набора «diaGene» («Диаэм»). Для получения кДНК использовали набор реактивов «MMLV RT kit» («Евроген»). Далее проводили полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием праймеров к последовательностям генов, кодирующих интерфероны 1-го типа. Результаты ПЦР-РВ анализировали с помощью программного обеспечения «Microsoft Office Excel 2013». Уровень экспрессии, показывающий, во сколько раз большую экспрессию имеют исследуемые образцы по сравнению с контрольным, неинфицированным образцом, оценивали по формуле:

$$\text{Нормализованная степень экспрессии} = 2^{-\Delta\Delta CT},$$

где  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{(\text{инфицированный образец})} -$

$\Delta CT_{(\text{неинфицированный образец})}$ ;

$\Delta CT = CT_{(\text{исследуемого гена})} - CT_{(\text{гена } \beta\text{-актин})}$ .

Процесс нормализации экспрессии исследуемого гена с референсным геном компенсирует любые различия в количествах взятых на анализ образцов биологического материала.

### Статистический анализ

Данные, полученные в ИФА и РТГА, анализировали с помощью программного обеспечения «Prism 9» и «GraphPad Software». Результаты для каждой группы экспериментальных животных выражали как среднее арифметическое титра  $\pm$  стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения результатов, полученных для разных условий эксперимента. Величина  $p < 0,05$  рассматривалась как статистически значимая.

## Результаты

### Генетическая стабильность

Генетическая стабильность вакцинных вариантов вируса гриппа является важнейшим условием их безопасного использования для иммунизации людей. В этой связи мы исследовали генетическую стабильность группы полученных нами ССМ штамма А/WSN/33 (H1N1), имеющих различное количество ts-мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, с помощью температурного стресс-теста [1]. Данный тест предварительно был успешно использован для изоляции ts-ревертантов из популяции кандидатов в живые гриппозные вакцины [13, 14]. Данные по генетической стабильности, полученные после заражения клеточной культуры MDCK вакцинными вариантами вируса гриппа, представлены в **табл. 2**. У исследуемых вирусов, имеющих в геноме одиночные или двойные мутации, наблюдалось резкое изменение ts-фенотипа. В частности, после стресс-теста соотношение титров при пороговых значениях температур 38°C/34°C наблюдалось у мутанта ААК-2 не выше 1 : 30, у мутанта ААЛ-2 — не выше 1 : 10, у мутанта ЛАК-2 — не выше 1 : 3. Однако у мутантов U2 и M26, имеющих большее количество ts-мутаций в геноме, не наблюдалось значительных изменений ts-фенотипа. Соотношение титров при shutoff 38°C/34°C сохранялось в пределах 1 : 3000–1 : 4000, что свидетельствует о высокой генетической стабильности этих вариантов.

### Иммуногенность

Проведено сравнительное изучение способности ССМ U2 и M26, а также ха-реассортанта индуцировать гуморальный иммунитет путём интраназальной иммунизации мышей исследуемыми вирусами.

На **рис. 1** и **рис. 2** представлены результаты, полученные в РТГА и ИФА. Результаты свидетельствуют о том, что как после 1-й, так и после 2-й иммунизации ССМ способствовали более высокой выработке сывороточных антител, чем ха-реассортант. Наиболее отчётливо эта разница проявилась в результатах ИФА. По сравнению с ха-реассортантом мутант M26 показал в 4 и 8 раз больший титр после 1-й и 2-й иммунизаций соответственно; для мутанта U2 наблюдалась разница в 2 и 4 раза ( $p < 0,01$ ).

### Сравнительное изучение интерферогенности

Исследована способность ССМ U2 и M26, а также ха-реассортанта индуцировать интерфероны 1-го типа, а именно:  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -4 и  $\beta$  в клеточной культуре A549. ССМ способствовали повышению интерферона 1-го типа в большей степени, чем ха-реассортант (**рис. 3**). Мутанты U2 и M26 индуцировали  $\alpha$ -1 в 2,2 и 3,6 раза соответственно больше по сравнению с контролем. В свою очередь экспрессия интерферона- $\beta$  показала превышение в 11,3 и 15,4 раза над контролем для мутантов U2 и M26 соответственно, что является наибольшим значением для группы исследуемых интерферонов.

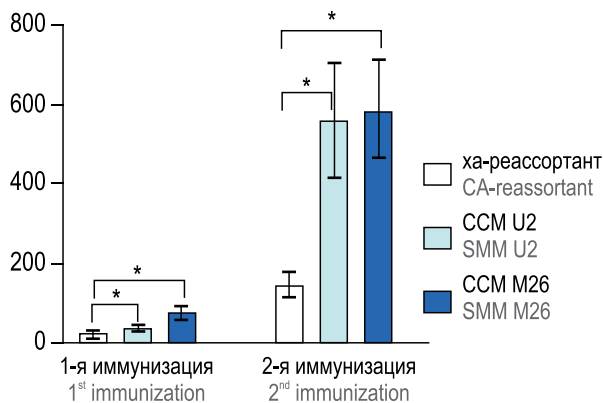
## Обсуждение

Генетическая стабильность вакцинных вариантов вируса гриппа является важнейшим условием их безопасного использования для иммунизации населения. У мутантов U2 и M26 после проведения температурного стресс-теста не наблюдалось изменения ts-фенотипа. Соотношение титров при пороговых значениях температур 38°C/34°C у данных мутантов свидетельствует об их высокой генетической стабильности. Как показали результаты срав-

**Таблица 2.** Изучение генетической стабильности ССМ штамма А/WSN/33, имеющих ts-мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса

**Table 2.** Study of the genetic stability of site-specific mutants of strain A/WSN/33 with ts-mutations in the genes encoding proteins of the polymerase complex

Исследуемые вирусы Researched viruses	ts-Фенотип мутантов до проведения стресс-теста, lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл ts-Phenotype of mutants before the stress test, lg EID <sub>50</sub> /0,2 ml			ts-Фенотип после проведения стресс-теста, lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл ts-Phenotype after stress test, lg EID <sub>50</sub> /0,2 ml		
	34°C	38°C	39°C	34°C	38°C	39°C
Исходный штамм Original strain A/WSN/33 (H1N1)	6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,2	6,2 ± 0,4	6,5 ± 0,4	6,5 ± 0,8	6,2 ± 0,4
AAL-2	6,5 ± 0,4	3,5 ± 0,5	< 1,0	4,5 ± 0,8	3,5 ± 0,7	1,5 ± 0,5
AAK-2	5,5 ± 0,5	3,5 ± 0,4	< 1,0	5,0 ± 0,5	3,5 ± 0,4	2,0 ± 0,4
ЛАК-2	6,5 ± 0,5	3,0 ± 0,3	< 1,0	5,5 ± 0,2	5,0 ± 0,5	2,5 ± 0,2
U-2	6,5 ± 0,3	2,0 ± 0,4	< 1,0	4,5 ± 0,5	1,0 ± 0,5	< 1,0
M26	6,0 ± 0,5	2,0 ± 0,4	< 1,0	6,0 ± 0,4	2,0 ± 0,3	< 1,0
Трансфектант № 3   Transfectant No. 3	6,5 ± 0,3	3,0 ± 0,3	< 1,0	6,0 ± 0,5	5,5 ± 0,4	2,0 ± 0,4
Трансфектант № 4   Transfectant No. 4	5,5 ± 0,6	3,0 ± 0,5	< 1,0	5,5 ± 0,5	3,5 ± 0,4	1,0 ± 0,5

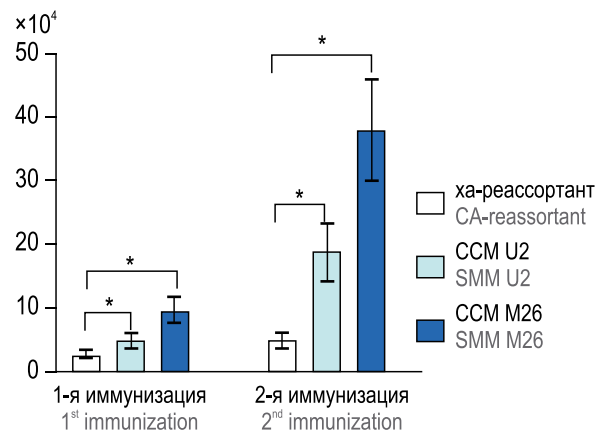


**Рис. 1.** Титры антител ССМ и ха-реассортанта в РТГА после интраназальной иммунизации.

\* $p < 0,01$ .

**Fig. 1.** Antibody titers induced by site-specific mutants (SSM) and CA reassortant in the hemagglutination inhibition assay after intranasal immunization.

\* $p < 0.01$ .

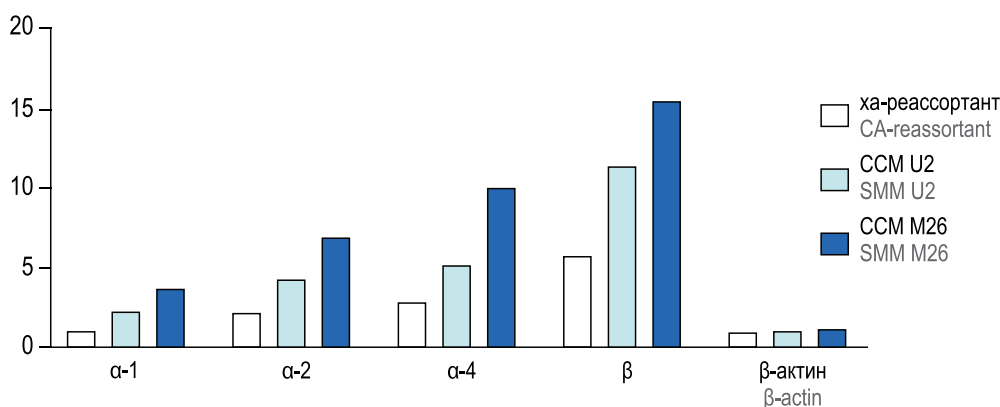


**Рис. 2.** Титры антител ССМ и ха-реассортанта в ИФА после интраназальной иммунизации.

\* $p < 0,01$ .

**Fig. 2.** Antibody titers induced by site-specific mutants (SSM) and CA reassortant in enzyme immunoassay after intranasal immunization.

\* $p < 0.01$ .



**Рис. 3.** Влияние ССМ и ха-реассортанта на способность индуцировать интерферон  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -4 и  $\beta$  клетками карциномы лёгочной ткани человека A549.

**Fig. 3.** Effect of site-specific mutants (SSM) and CA reassortant on the ability to induce interferon  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -4 and  $\beta$  by A549 human lung tissue carcinoma cells.

нительного изучения иммуногенности ССМ U2, M26 и ха-реассортанта, ССМ способствовали более высокой выработке сывороточных антител, чем ха-реассортант. Интересно отметить способность мутанта M26 индуцировать более высокие титры сывороточных антител по сравнению с мутантом U2 в ИФА, в то же время в РТГА наблюдались одинаковые титры сывороточных антител для ССМ после 2-й иммунизации. Можно предположить, что мутант M26 в результате иммунизации приводит к синтезу большого количества дефектного белка. Антитела, образуемые в ответ на синтез дефектного белка, теряют способность к нейтрализации в РТГА, однако в ИФА продолжают детектироваться.

Сравнительное изучение интерферогенности исследуемых вирусов показало, что ССМ U2 и M26 способствуют повышению уровня интерферонов 1-го типа в клетках A549 в большей степени,

чем ха-реассортант, что свидетельствует о более активной стимуляции мутантами клеточного иммунитета. Ранее мы показали высокую защитную эффективность данных ССМ вируса гриппа при гомологичном и гетерологичном контрольном заражении [11]. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что ССМ вируса гриппа типа А серотипа H1N1, обладающие соответствующим набором ts-мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, можно рассматривать как кандидаты в живые гриппозные вакцины.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Parkin N.T., Chiu P., Coelingh K. Genetically engineered live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *J. Virol.* 1997; 71(4): 2772–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2772-2778.1997>
2. Subbarao E.K., Park E.J., Lawson C.M., Chen A.Y., Murphy B.R., et al. Sequential addition of 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 a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virol.* 1995; 69(10): 5969–77. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.5969-5977.1995>
3. Broadbent A.J., Santos C.P., Godbout R.A., Subbarao K. The temperature-sensitive and attenuation phenotypes conferred by mutations in the influenza virus PB2, PB1 and NP genes are influenced by the species of origin of the PB2 gene in reassortant viruses derived from Influenza A/California/07/2009 and A/WSN/33 viruses. *J. Virol.* 2014; 88(21): 12339–47. <https://doi.org/10.1128/jvi.02142-14>
4. Song H., Nieto G.R., Perez D.R. A new generation of modified live attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol.* 2007; 81(17): 9238–48. <https://doi.org/10.1128/jvi.00893-07>
5. Hickman D., Hossain M.J., Song H., Araya Y., Solórzano A., Perez D.R. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 11): 2682–90. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004143-0>
6. Solórzano A., Ye J., Pérez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol.* 2010; 84(9): 4587–96. <https://doi.org/10.1128/jvi.00101-10>
7. Pena L., Vincent A.L., Ye J., Ciacci-Zanella J.R., Angel M., Lorusso A., 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; 85(1): 456–69. <https://doi.org/10.1128/jvi.01503-10>
8. Pena L., Sutton T., Chockolingam M., Kumar S., Angel M., Shao H., et al. Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated vaccines. *J. Virol.* 2013; 87(9): 5118–27. <https://doi.org/10.1128/jvi.02490-12>
9. Zhou B., Li Y., Speer S.D., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine.* 2012; 30(24): 3691–792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.025>
10. Kost V., Tsfasman T., Terekhov A., Koptiaeva I.B., Lisovskaya K.V., Markushin S. Attenuation of the cold-adapted (CA) A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) influenza strain. Role of the 147Thr mutation in the PB1 gene. *Int. J. Sci. Res. Methodol.* 2017; 6(2): 96–114.
11. Tsfasman T., Kost V.Y., Markushin S., Koptyaeva I.B., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., et al. Investigation of efficiency of site-specific mutants of the influenza virus in homological and heterologous control infection. *EC Microbiology.* 2017; 12(5): 232–42.
12. Markushin S.G., Rtishchev A.A. Creation of live influenza vaccines with the use of site -specific mutagenesis. *Biol. Bull. Rev.* 2017; 7(4): 323–32.
13. Murphy B.R., Tolpin M.D., Massicot J.G., Kim H.Y., Parrott R.H., Chanock R.M. Escape of a mutant from its temperature sensitive phenotype by extragenic suppression and other types of mutation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1980; 354: 172–82. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27966.x>
- 71(4): 2772–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2772-2778.1997>
2. Subbarao E.K., Park E.J., Lawson C.M., Chen A.Y., Murphy B.R., et al. Sequential addition of 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 a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virol.* 1995; 69(10): 5969–77. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.5969-5977.1995>
3. Broadbent A.J., Santos C.P., Godbout R.A., Subbarao K. The temperature-sensitive and attenuation phenotypes conferred by mutations in the influenza virus PB2, PB1 and NP genes are influenced by the species of origin of the PB2 gene in reassortant viruses derived from Influenza A/California/07/2009 and A/WSN/33 viruses. *J. Virol.* 2014; 88(21): 12339–47. <https://doi.org/10.1128/jvi.02142-14>
4. Song H., Nieto G.R., Perez D.R. A new generation of modified live attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol.* 2007; 81(17): 9238–48. <https://doi.org/10.1128/jvi.00893-07>
5. Hickman D., Hossain M.J., Song H., Araya Y., Solórzano A., Perez D.R. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 11): 2682–90. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004143-0>
6. Solórzano A., Ye J., Pérez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol.* 2010; 84(9): 4587–96. <https://doi.org/10.1128/jvi.00101-10>
7. Pena L., Vincent A.L., Ye J., Ciacci-Zanella J.R., Angel M., Lorusso A., 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; 85(1): 456–69. <https://doi.org/10.1128/jvi.01503-10>
8. Pena L., Sutton T., Chockolingam M., Kumar S., Angel M., Shao H., et al. Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated vaccines. *J. Virol.* 2013; 87(9): 5118–27. <https://doi.org/10.1128/jvi.02490-12>
9. Zhou B., Li Y., Speer S.D., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine.* 2012; 30(24): 3691–792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.025>
10. Kost V., Tsfasman T., Terekhov A., Koptiaeva I.B., Lisovskaya K.V., Markushin S. Attenuation of the cold-adapted (CA) A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) influenza strain. Role of the 147Thr mutation in the PB1 gene. *Int. J. Sci. Res. Methodol.* 2017; 6(2): 96–114.
11. Tsfasman T., Kost V.Y., Markushin S., Koptyaeva I.B., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., et al. Investigation of efficiency of site-specific mutants of the influenza virus in homological and heterologous control infection. *EC Microbiology.* 2017; 12(5): 232–42.
12. Markushin S.G., Rtishchev A.A. Creation of live influenza vaccines with the use of site -specific mutagenesis. *Biol. Bull. Rev.* 2017; 7(4): 323–32.
13. Murphy B.R., Tolpin M.D., Massicot J.G., Kim H.Y., Parrott R.H., Chanock R.M. Escape of a mutant from its temperature sensitive phenotype by extragenic suppression and other types of mutation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1980; 354: 172–82. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27966.x>

## REFERENCES

**Информация об авторах**

*Черепович Богдан Сергеевич* — м.н.с. лаб. РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>

*Ртищев Артём Андреевич* — м.н.с. лаб. РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

*Акопова Ирина Ивановна* — в.н.с. лаб. РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1795-4356>

*Борисова Ольга Васильевна* — к.х.н., зав. лаб. медицинской биотехнологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

*Кост Владимир Юрьевич* — н.с. лаб. молекулярной токсикологии ИБХ РАН им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

*Кутузова Нина Михайловна* — д.б.н., профессор, зав. каф. биохимии, молекулярной биологии и генетики МПГУ, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5963-9525>

*Маркушин Станислав Георгиевич*<sup>✉</sup> — д.м.н., зав. лаб. генетики РНК-содержащих вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, [s.g.markushin@rambler.ru](mailto:s.g.markushin@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 13.06.2022;  
принята к публикации 12.08.2022;  
опубликована 30.10.2022

**Information about the authors**

*Bogdan S. Cherepovich* — junior researcher, Laboratory of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>

*Artem A. Rtishchev* — junior researcher, Laboratory of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

*Irina I. Akopova* — leading researcher, Laboratory of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1795-4356>

*Olga V. Borisova* — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of medical biotechnology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7664-2945>

*Vladimir Y. Kost* — researcher, Laboratory of molecular toxicology, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

*Nina M. Kutuzova* — D. Sci. (Biol.), Professor, Head, Department of biochemistry, molecular biology and genetics, Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5963-9525>

*Stanislav G. Markushin*<sup>✉</sup> — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of genetics of RNA-containing viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, [s.g.markushin@rambler.ru](mailto:s.g.markushin@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 13.06.2022;  
accepted for publication 12.08.2022;  
published 30.10.2022