

Оригинальное исследование  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-669>



# Стабильность вакцинных штаммов сезонной живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK

Матюшенко В.А.<sup>✉</sup>, Костромитина А.Д., Степанова Е.А., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

## Аннотация

**Введение.** Подавляющее большинство гриппозных вакцин в мире производится с использованием развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) в качестве субстрата, однако активно обсуждается вопрос о переводе производства вакцин на перевиваемые клеточные линии, что обеспечит бесперебойность в условиях пандемии птичьего гриппа, а также позволит применять вакцину у лиц с аллергией на куриный белок. При накоплении вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины (ЖГВ) в клетках млекопитающих могут возникнуть адаптационные мутации, влияющие на антигенные и иммуногенные свойства вакцины.

**Цель работы** — изучить биологические свойства вакцинных штаммов ЖГВ подтипов А/Н1N1 и А/Н3N2, полученных классическим способом в РКЭ, при их адаптации к культуре клеток почки собаки Мадина–Дарби (MDCK).

**Материалы и методы.** В работе были использованы штаммы для аттенуированной ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (Н1N1pdm09) и А/17/Техас/12/30 (Н3N2). Мы провели серийное пассирование этих вирусов на MDCK и проанализировали ростовые свойства изолированных методом бляшек клонов *in vitro* и *in vivo*, их иммуногенность, перекрёстную реактивность и защитную эффективность на модели мышей, а также с использованием гипериммунных крысиных сывороток. Экспериментальные серии вакцинных штаммов ЖГВ А/17/Боливия/2013/6585 (Н1N1), А/17/Швейцария/2013/1 (Н3N2) и В/60/Пхукет/2013/26 были наработаны на культуре MDCK в ГНЦ ВБ «Вектор». Мы провели секвенирование генов поверхностных белков клеточных моновакцин и сравнили мутации, обнаруженные в гемагглютинине и нейраминидазе при адаптации к культуре клеток MDCK в лабораторных и производственных условиях.

**Результаты.** Секвенирование поверхностных антигенов MDCK-адаптированных вариантов вируса А/Н1N1 обнаружило адаптационные мутации в молекуле гемагглютинина — N156D (субъединица HA1) и A44V (субъединица HA2), одновременное присутствие которых усиливало репликативные свойства вакцинного штамма ЖГВ Н1N1 в культуре клеток MDCK. Изучение данного адаптированного к культуре клеток MDCK варианта в эксперименте на мышах не выявило влияния обнаруженных мутаций на иммуногенные и протективные свойства вакцины. Адаптация вакцинного штамма ЖГВ Н3N2 к культуре клеток MDCK привела к появлению существенно большего количества замен в молекуле HA, по сравнению с вирусом Н1N1. Мутации Y85E и N154K в HA2 являются критическими для размножения вируса в культуре клеток, а набор мутаций P215T в HA1 и W92G, D160H в HA2 дали вакцинному штамму существенное преимущество для размножения в культуре клеток MDCK, что может быть эффективно использовано в производстве культуральной ЖГВ.

**Обсуждение.** Изучение производственных серий культуральных ЖГВ показало наличие адаптационных мутаций в молекуле гемагглютинина штаммов Н1N1 (K116E в субъединице HA2) и Н3N2 (S219Y и N246K в субъединице HA1). Все изученные адаптационные мутации не влияли на антигенность вакцинных штаммов.

**Заключение.** Полученные в ходе исследования данные указывают на перспективность производства культуральной ЖГВ из реассортантных штаммов, подготовленных стандартным путём в РКЭ.

**Ключевые слова:** живая гриппозная вакцина, культура клеток MDCK, адаптационные мутации, гемагглютинин, антигенность, иммуногенность

**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 Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотруднице ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Е.А. Нечаевой за предоставление экспериментальных серий моновалентных ЖГВ, наработанных на MDCK в условиях промышленного производства.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FGWG–2025–0015).

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

**Для цитирования:** Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Степанова Е.А., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Стабильность вакцинных штаммов сезонной живой гриппозной вакцины при их адаптации к культуре клеток MDCK. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(3):296–309.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-669>

EDN: <https://www.elibrary.ru/PCCKFR>

# Stability of vaccine strains of seasonal live attenuated influenza vaccines when adapted to MDCK cell culture

Victoria A. Matyushenko<sup>✉</sup>, Arina D. Kostromitina, Ekaterina A. Stepanova,  
Larisa G. Rudenko, Irina N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

## Abstract

**Introduction.** Currently, the vast majority of influenza vaccines in the world are produced using developing chicken embryos as substrate, but there is an urgent necessity for transferring vaccine production to continuous cell lines, which would ensure uninterrupted production during an avian influenza pandemic and also allow the vaccine to be administered to individuals with chicken protein allergies. When vaccine strains of live attenuated influenza vaccine (LAIV) grow in mammalian cells, adaptation mutations can occur that may affect the antigenic and immunogenic properties of the vaccine.

**The aim** of the study is to investigate the biological properties of vaccine strains of LAIV subtypes A/H1N1 and A/H3N2, produced by the classical reassortment in eggs, when adapted to Madin–Darby canine kidney (MDCK) cell culture.

**Materials and methods.** In current study, LAIV strains A/17/California/2009/38 (H1N1pdm09) and A/17/Texas/12/30 (H3N2) were used. These viruses were passaged on MDCK 5 times and the growth properties of the isolated clones by the plaque assay were analyzed *in vitro* and *in vivo*, also immunogenicity, cross-reactivity and protective efficacy were estimated on a mouse model, as well as using hyperimmune rat sera. Experimental series of LAIV strains A/17/Bolivia/2013/6585 (H1N1), A/17/Switzerland/2013/1 (H3N2) and B/60/Phuket/2013/26 were produced on MDCK cells at the Vector State Research Center of Virology and Biotechnology. The surface protein genes of monovalent vaccines were sequenced, and the mutations in HA and NA were identified and compared between adaptation to MDCK culture in laboratory and industrial conditions.

**Results.** Sequencing of surface antigens of MDCK-adapted variants of the A/H1N1 virus revealed adaptation mutations in the hemagglutinin molecule *N156D* (HA1 subunit) and *A44V* (HA2 subunit), which enhanced the replicative properties of the H1N1 vaccine strain in MDCK cells. The study of this MDCK-adapted variant in a mouse experiment showed no effect of the detected mutations on the immunogenic and protective properties of the vaccine. Adaptation of the H3N2 vaccine strain to MDCK cells resulted in a significantly higher number of substitutions in the HA molecule compared to the H1N1 virus, and it was shown that the *Y85E* and *N154K* mutations in HA2 are critical for virus multiplication in cell culture, and the set of mutations *P215T* in HA1 and *W92G*, *D160H* in HA2 gave the vaccine strain a significant advantage for growth in MDCK cells, which can be effectively used in the production of cell-based LAIVs.

**Discussion.** The study of the MDCK cell-produced series of LAIVs showed the presence of adaptation mutations in the hemagglutinin molecule of the H1N1 (*K116E* in the HA2 subunit) and H3N2 (*S219Y* and *N246K* in the HA1 subunit) strains. It is important to note that all the adaptation mutations studied did not affect the antigenicity of the vaccine strains.

**Conclusion.** In general, the data obtained in the course of the study indicate the feasibility of producing a culture-based live attenuated influenza vaccine from vaccine strains prepared by classical reassortment in eggs.

**Keywords:** *live attenuated influenza vaccine, MDCK cell line, adaptation mutations, hemagglutinin, antigenicity, immunogenicity*

**Ethics approval.** The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the "Consensus Author Guidelines for Animal Use" (IAVES, 23.07.2010). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (protocol No. 1/20 dated 27.02.2020).

**Acknowledgment.** The authors express their gratitude towards E.A. Nechaeva, an employee of the Federal State Budgetary Scientific Institution of Science, State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, for providing experimental series of monovalent LAIV produced on MDCK under industrial production conditions.

**Funding source.** The study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FGWG–2025–0015).

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

**For citation:** Matyushenko V.A., Kostromitina A.D., Stepanova E.A., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Stability of vaccine strains of seasonal live attenuated influenza vaccines when adapted to MDCK cell culture. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(3):296–309.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-669>

EDN: <https://www.elibrary.ru/PCCKFR>

## Введение

Профилактика гриппа в виде ежегодной вакцинации представляет собой наиболее эффективный способ борьбы с этой инфекцией [1]. На протяжении более 70 лет аллантоисная жидкость развивающегося куриного эмбриона (РКЭ) признавалась наиболее оптимальным субстратом для накопления большого объема вирусосодержащего материала, что позволяло производить достаточное количество доз вакцин для сезонной вакцинопрофилактики [2, 3]. Однако вспышка высокопатогенного птичьего гриппа H5N1 в Гонконге в 1997 г., а с 2003 г. — широкомасштабное распространение данной инфекции по всему миру заставили научное сообщество задуматься о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, поскольку такое производство не будет зависеть от своевременной поставки РКЭ в условиях циркуляции птичьего гриппа [4]. Кроме того, наработка вакцинных вирусов в клеточной культуре позволяет избежать появления яично-адаптационных мутаций в вакцинных штаммах, которые оказывают негативное влияние на антигенность и иммуногенность вакцины и, как следствие, снижают её профилактическую эффективность [5, 6]. Самой распространённой перевиваемой линией для производства гриппозных вакцин является культура клеток почки собаки Мадина–Дарби (MDCK), на которой в настоящее время производится культуральная инактивированная гриппозная вакцина FluCellVax [7]. Также важным преимуществом культуральной гриппозной вакцины является возможность её применения у лиц, страдающих аллергией на куриный белок.

Подготовка вакцинных штаммов для отечественной лицензированной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) в настоящее время возможна только методами классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах, в которых получение вакцинной формулы 6 : 2 происходит по отработанному протоколу и обычно позволяет получить производства ЖГВ с РКЭ на культуре клеток MDCK ранее были проведены исследования по получению вакцинных штаммов в культуре клеток MDCK, в ходе которых было показано, что при реассортации в данной клеточной линии эпидемического вируса и донора аттенуации практически не происходило формирования вакцинного штамма с необходимой формулой генома 6 : 2 [9]. С 2019 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в рекомендациях актуальных штаммов вирусов гриппа для сезонных гриппозных вакцин разделила штаммы для культуральных и «яичных» гриппозных вакцин, поскольку множество исследований показали, что для производства вакцин следует использовать штаммы, выделенные на том же субстрате, во избежание по-

явления адаптационных мутаций [10]. Решить вопрос получения вакцинных штаммов ЖГВ в культуре клеток MDCK можно с использованием методов обратной генетики для сборки вирусов гриппа с заданным набором генов, однако наличие патента у компании «MedImmune» на данную технологию исключает возможность её использования для коммерческого производства [11].

В связи с вышеизложенным одним из вариантов получения культуральной ЖГВ является использование вакцинных штаммов, полученных классической реассортацией в РКЭ, для их накопления на перевиваемой клеточной линии. Поскольку меняется субстрат для накопления вакцинных вирусов, необходимо изучить стабильность основных биологических свойств вакцинных штаммов ЖГВ при их адаптации к клеточной линии.

**Целью** настоящей работы явилось выявление возможных адаптационных мутаций в вакцинных штаммах ЖГВ A/H1N1 и A/H3N2, полученных методом классической реассортации в РКЭ, при их адаптации к культуре клеток MDCK, с последующей оценкой влияния обнаруженных мутаций на ростовые характеристики вирусов, их иммуногенность, кросс-реактивность и протективную активность в эксперименте. Кроме того, в рамках работы была проанализирована экспериментальная серия культуральной ЖГВ, произведённая ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» на культуре клеток MDCK с использованием промышленных биореакторов [12].

## Материалы и методы

### Вирусы

В работе были использованы штаммы для аттенуированной ЖГВ A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) (Калиф17) [13] и A/17/Техас/12/30 (H3N2) (Тех17) [14], поверхностные гены которых соответствовали эпидемическим штаммам A/Калифорния/07/2009 (H1N1pdm09) (номер в базе данных NCBI: NC\_026433 (HA) и NC\_026434 (NA)) и A/Техас/50/2012 (H3N2) (номер в базе данных NCBI: KC892248 (HA) и KC892237 (NA)) соответственно. Для экспериментального заражения мышей использовали адаптированный к данному животным вирус гриппа A/Калифорния/07/09 (H1N1), полученный из Коллекции вирусов гриппа и ОРВИ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева [15]. Экспериментальные серии вакцинных штаммов ЖГВ A/17/Боливия/2013/6585 (H1N1), A/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26 были наработаны на культуре клеток MDCK в ГНЦ ВБ «Вектор» с использованием биореакторов с объёмом культурального сосуда 2 л («Multigen») и 10 л («Biostat») [12].

### *Накопление вирусов в РКЭ и культуре клеток MDCK и определение инфекционного титра*

Для накопления вирусов гриппа в куриных эмбрионах 10–11-дневные РКЭ заражали вирусосодержащим материалом в объёме 0,2 мл, после чего эмбрионы инкубировали в течение 48 ч при 33°C. Накопление вирусов в культуре клеток MDCK проводилось на суточном монослое с конfluence 90–95%, выращенном в среде DMEM с добавлением 1×антибиотика-антимикотика (АА) («Gibco») и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) («Биолот») при 37°C в термостате с содержанием 5% CO<sub>2</sub>. Для заражения культуры клеток MDCK готовый монослой дважды отмывали теплым раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ), после чего добавляли вирусную суспензию в объёме 1, 2, 4 мл во флаконы Т-25, Т-75 и Т-175 соответственно. После контакта в течение 1 ч при 33°C и 5% CO<sub>2</sub> инокулят удаляли и добавляли среду DMEM с 1×АА и 1 мкг/мл трипсина ТРСК («Sigma-Aldrich»). Через 72 ч инкубации при 33°C визуально оценивали цитопатическое действие вируса и определяли его титр в реакции гемагглютинации по стандартной методике.

Инфекционные титры вирусов в обеих системах культивирования определяли методом предельных разведений. РКЭ заражали последовательными разведениями вирусов на ФСБ в объёме 200 мкл и инкубировали при 33°C в течение 48 ч, после чего определяли наличие вируса в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. Определение титра в культуре клеток MDCK проводили на 96-луночных планшетах с суточным монослоем, при этом серийные 10-кратные разведения готовили на среде DMEM с 1×АА и 1 мкг/мл ТРСК-трипсина. После адсорбции инокулят удаляли, клетки промывали и далее инкубировали в поддерживающей среде в течение 3 сут при 33°C и 5% CO<sub>2</sub>. Наличие вирусов в лунках определяли в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. Титры вирусов в РКЭ и культуре клеток MDCK рассчитывали по методу Рида и Менча [16] и выражали в 50% инфекционных дозах (lgЭИД<sub>50</sub>/мл и lgТЦИД<sub>50</sub>/мл).

### *Адаптация вирусов к культуре клеток MDCK*

Адаптацию вирусов гриппа к культуре клеток MDCK проводили в течение 5 последовательных пассажей вируса при оптимальной множественности заражения (0,001–0,010), за которыми следовало клонирование вируса методом бляшек. Для этого на 6-луночные планшеты, засеянные накануне клетками MDCK, наносили 10-кратные разведения вирусов в 2 повторях. После часового контакта с регулярным покачиванием инокулят удаляли и в лунки вносили по 3 мл агарового покрытия, полученного смешиванием равных объёмов двукратной среды DMEM (в присутствии 2×АА и 2 мкг/мл

ТРСК-трипсина) и 1,6% легкоплавкой агарозы («Lonza»). На 3–5-й день инкубации визуально определяли наличие вирусных бляшек, выделяли 20–30 хорошо отделяемых друг от друга бляшек на предельных разведениях, из каждой выделенной бляшки изолировали отдельный клон вируса, который затем накапливали на культуре клеток MDCK. Накопленный вирус далее подвергали полногеномному секвенированию методом Сэнгера с помощью набора «BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1» («Thermo»). В первую очередь проверяли сохранность аттенуирующих мутаций, свойственных штаммам ЖГВ, поскольку именно их наличие определяет безвредность ЖГВ и возможности ее применения [17], а затем проводили поиск мутаций в генах поверхностных белков: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА).

### *Работа с лабораторными животными*

В экспериментах с животными использовали мышей линии СВА (Столбовая, Россия). Исследование было одобрено Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020). Для оценки иммуногенности и защитной эффективности вакцинных штаммов H1N1 были использованы самки мышей линии СВА, которых иммунизировали интраназально в дозе 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> в объёме 50 мкл, двукратно с разницей в 3 нед, после чего еще через 21 день отбирали сыворотку крови для исследования уровней антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментном анализе (ИФА) по стандартной методике<sup>1</sup>. Для исследования защитной эффективности проводили эксперимент на мышах, иммунизированных по описанной выше схеме, с последующим заражением летальным вариантом штамма А/Калифорния/07/09 (H1N1), адаптированного к мышам, в дозе 5,0 lg ЭИД<sub>50</sub> с ежедневным мониторингом выживаемости в течение 14 сут.

Для оценки кросс-реактивности антител, вырабатываемых к вакцинным штаммам ЖГВ H3N2, были получены гипериммунные крысиные сыворотки. Для этого крыс линии Вистар (Рапполово, Россия) иммунизировали 5-кратно с интервалом 5–7 дней. Первую, 3-ю и 5-ю иммунизации проводили внутрибрюшинно в объёме 5 мл/животное, 2-ю и 4-ю — с использованием полного адьюванта Фрейнда подкожно в холку в объёме 1 мл/крысу, соотношение вируса и адьюванта 1 : 1. Через неделю после последней иммунизации проводили тотальный забор крови у всех иммунизированных животных. После центрифугирования крови в течение

<sup>1</sup> WHO. WHO Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. 2002. URL: [http://www.wpro.who.int/emerging\\_diseases/documents/docs/manualonanimalaidiagnosisandsurveillance.pdf](http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/documents/docs/manualonanimalaidiagnosisandsurveillance.pdf)

15 мин при 3000g аккуратно отбирали сыворотку и хранили аликвоты при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Иммунологические методы

Исследование сывороток крови животных в РТГА проводили по стандартному протоколу ВОЗ с куриными эритроцитами и обработкой сывороток рецептор-разрушающим ферментом («Denka»). За титр сыворотки в РТГА принимали последнее разведение, при котором наблюдалось полное торможение агглютинации эритроцитов.

Постановку ИФА с образцами мышинных сывороток осуществляли с использованием в качестве антигена очищенных на градиенте плотности сахарозы соответствующих диких вирусов гриппа. Антиген вносили в 96-луночные планшеты с высокой сорбцией («Corning») в количестве 16 агглютинирующих единиц в 50 мкл и инкубировали в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . Планшеты промывали 3 раза отмывочным буфером (ФСБ + 0,05% Твин-20 («Биолот»)), проводили блокировку несвязанных сайтов с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина. Двукратные разведения сывороток готовили в отдельных круглодонных планшетах, которые затем переносили в лунки отмывочного от блокировочного раствора планшета. После инкубации в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$  планшеты промывали 3 раза отмывочным буфером, подсушивали и вносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, анти-IgG мыши (1 : 10 000). Инкубировали 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 раз промывали планшет отмывочным буфером, подсушивали и добавляли 50 мкл/лунку субстрата ТМВ («Thermo»), который инкубировали в темноте до 20 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Первичные результаты ИФА учитывали на спектрофотометре («Bio-Rad») при длине волны 450 нм. Рассчитывали параметр «площадь под кривой» оптической плотности с помощью программного пакета «GraphPad Prizm v. 7».

### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения «GraphPad Prizm v. 7». Для попарного сравнения титров вирусов использовали непараметрический U-тест Манна–Уитни; уровни антител между группами иммунизированных мышей сравнивали в непараметрическом однофакторном ANOVA с по-

правкой Краскела–Уоллиса. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

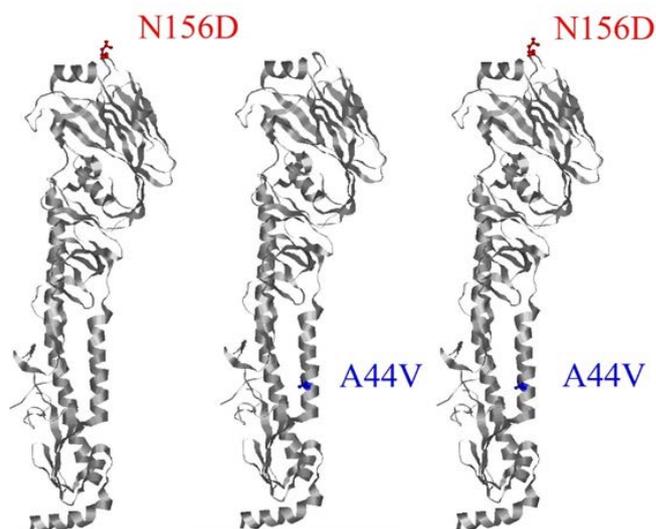
## Результаты

### Адаптация вакцинного штамма H1N1 к культуре клеток MDCK в лабораторных условиях

В результате серийного пассирования вакцинного штамма Калиф17 в культуре клеток MDCK с последующим клонированием методом бляшек получен 21 вариант вируса. Секвенирование показало сохранность всех аттенуирующих мутаций в генах внутренних и неструктурных белков. При этом лишь 2 из 21 исследованных вариантов не имели аминокислотных замен в молекуле HA, а в остальных изолятах были обнаружены мутации либо N156D в HA1, либо A44V в HA2, либо обе одновременно (табл. 1).

Расположение аминокислотных замен в молекуле HA клеточных клонов Калиф-17 представлено на рис. 1.

У 3 адаптированных к культуре клеток MDCK вариантов (Калиф17-1, Калиф17-4 и Калиф17-8) с различным набором обнаруженных мутаций были изучены ростовые характеристики в РКЭ и культуре клеток MDCK в сравнении с исходным

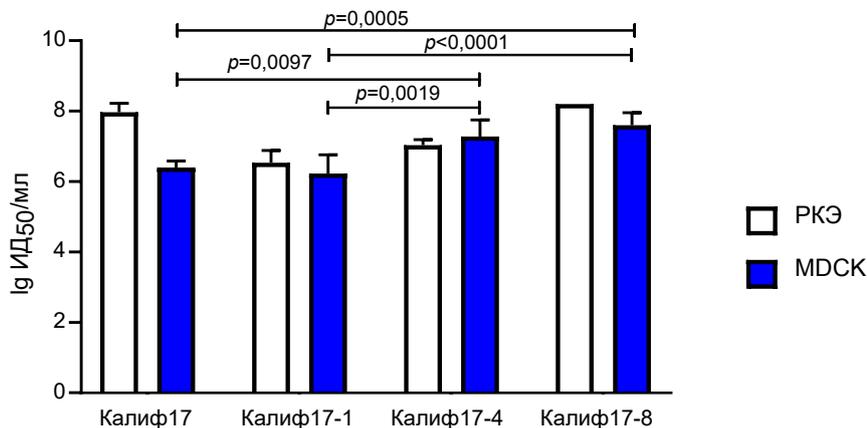


**Рис. 1.** Картирование адаптационных аминокислотных замен в молекуле HA вакцинного штамма Калиф17.

Расположение аминокислот показано на мономере HA A/California/04/2009 (H1N1) (PDBID: 3UYX). Иллюстрации получены с использованием программы «RasMol v. 2.7.5».

**Таблица 1.** Мутации, обнаруженные в молекуле HA MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Калиф17

Субъединица HA	Аминокислотная позиция	Исходный вирус Калиф17	Клоны, адаптированные к MDCK		
			Калиф17-1 (9 клонов)	Калиф17-4 (7 клонов)	Калиф17-8 (3 клон)
HA1	156	Asn	Asp	Asn	Asp
HA2	44	Ala	Ala	Val	Val



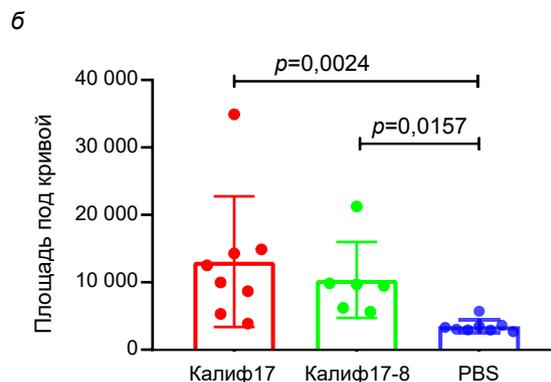
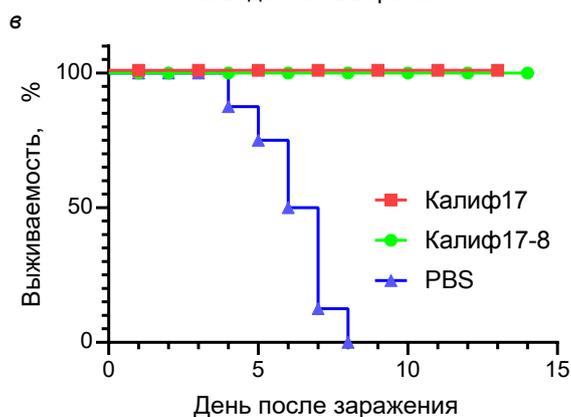
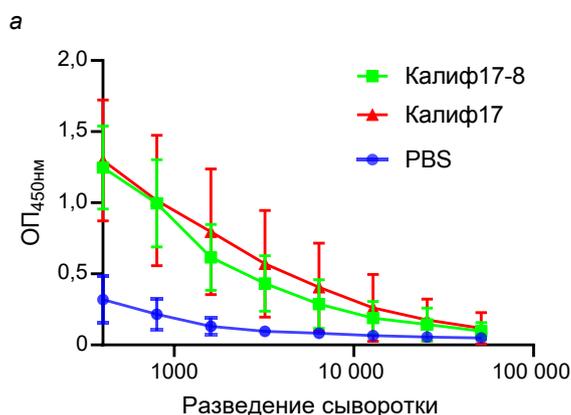
**Рис. 2.** Инфекционная активность вакцинного штамма ЖГВ A/17//Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) и его MDCK-адаптированных вариантов в РКЭ и культуре MDCK.

\* $p < 0,05$  по сравнению с ТЦИД<sub>50</sub>/мл Калиф17; † $p < 0,05$  по сравнению с ЭИД<sub>50</sub>/мл Калиф17.

вирусом, накопленным в РКЭ (Калиф17). Репродукция исходного вакцинного вируса Калиф17 на различных субстратах отличалась также почти на 2 порядка: титр вируса в РКЭ составлял 8,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, тогда как титр вируса в культуре клеток MDCK — 6,3 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл (**рис. 2**). При исследовании MDCK-адаптированных вариантов вируса Калиф17 обнаружено достоверное увеличение титров вируса на культуре клеток MDCK более чем в 10 раз у 2 штаммов (Калиф17-4 — 7,3 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл и Калиф17-8 — 7,6 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл), оба содержат мутацию A44V в HA2. Вариант Калиф17-8 также со-

хранил высокий уровень репродукции в РКЭ (8,2 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл), при этом штамм Калиф17-1, имеющий только мутацию N156D в HA1, не улучшил репродукцию в культуре клеток и снизил её в РКЭ более чем в 30 раз (6,2 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл и 6,6 log ЭИД<sub>50</sub>/мл). Таким образом, мутация A44V в HA2 положительно влияет на репликацию вакцинного штамма H1N1pdm09 в обеих системах культивирования.

Изолированные после клонирования методом бляшек варианты вируса Калиф17, имеющие одну из двух мутаций, при последующем накоплении в культуре клеток MDCK приобретали обе мута-



**Рис. 3.** Иммуногенность и протективная активность вакцинного штамма H1N1pdm09, полученного в РКЭ, и его аналога, адаптированного к культуре MDCK, в эксперименте на мышах линии СВА.

а — зависимость оптической плотности от разведения сывороток в ИФА; б — расчёт площади под кривой по данным графика а; в — уровень выживаемости иммунизированных и контрольных мышей после экспериментального заражения летальным вирусом A/Калифорния/09/07 МА. Статистическая обработка произведена методом непараметрического однофакторного ANOVA с поправкой Краскела–Уоллиса.

**Таблица 2.** Кросс-реактивность антител, вырабатываемых в ответ на иммунизацию мышей различными вариантами ЖГВ H1N1pdm09

Антигены	Титр антигемагглютинирующих антител в сыворотках крови мышей, привитых вариантом	
	Калиф17	Калиф17-8
Калиф-wt	640	320
Калиф17	640	320
Калиф17-8	320	320

ции — *A44V* в HA2 и *N156D* в HA1, становясь идентичными по аминокислотному составу варианту Калиф17-8. Этот феномен говорит о том, что эти две мутации сильно ассоциированы с адаптацией вируса к клеточной линии млекопитающих, но при этом исходное пятикратное пассирование не полностью заменило соответствующие аминокислоты в гетерогенной популяции вируса. Дополнительное накопление вариантов с одной мутацией на культуре клеток MDCK продолжило процесс адаптации вируса, привнося недостающую мутацию в ген HA. Таким образом, в эксперименте по иммуногенности и протективной активности вирусов на мышях была возможность сравнить только штамм Калиф17-8, несущий обе адаптационные мутации, с исходным вирусом Калиф17, накопленным в РКЭ.

На рис. 3 представлены результаты ИФА сывороток крови иммунизированных мышей, где в качестве антигенной подложки выступал эпидемический штамм А/Калифорния/09/07 (H1N1pdm09), накопленный в РКЭ и очищенный на градиенте плотности сахарозы. Статистическая обработка данных

эксперимента показала, что значимых отличий между уровнями IgG-антител, индуцированных обоими вакцинными штаммами, нет, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния обнаруженных адаптационных мутаций *A44V* в HA2 и *N156D* в HA1 на иммуногенность ЖГВ H1N1pdm09.

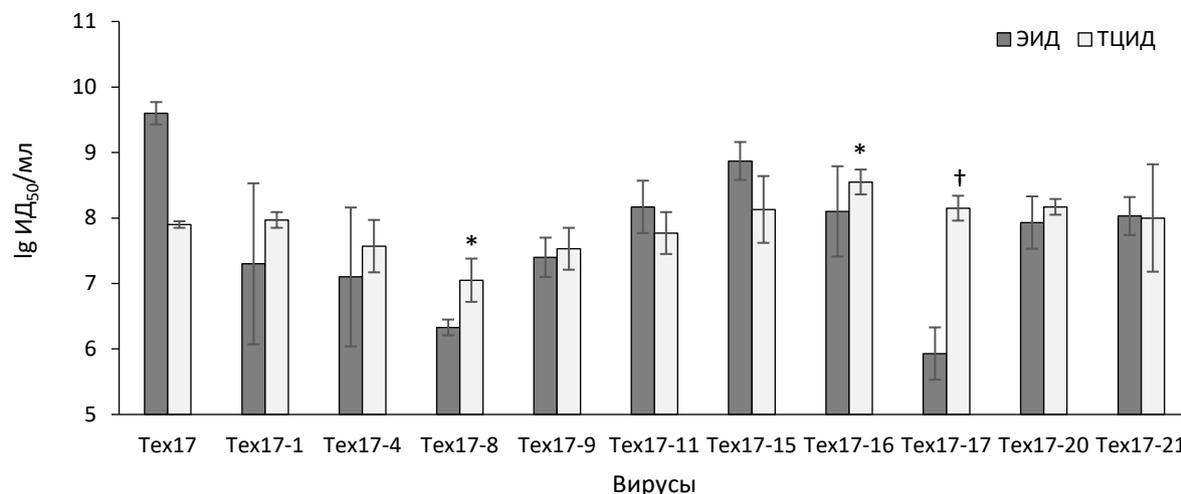
Кросс-реактивность антител, индуцируемых MDCK-адаптированным вариантом Калиф17-8 и вакцинным штаммом Калиф17, оценивали в РТГА по классической методике. Адаптационные мутации не повлияли на способность продуцируемых антител связывать исходный вариант HA штамма А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09) (табл. 2), что полностью согласуется с данными по иммуногенности, представленными выше.

Исследование влияния адаптационных мутаций *N156D* в HA1 и *A44V* в HA2 на защитную эффективность проводили с использованием «дикого» вируса А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm), адаптированного к мышам. В челлендж-эксперименте мышам, иммунизированным вакцинными штаммами Калиф17 и Калиф17-8, а также контрольную группу наивных животных заражали адаптированным к мышам летальным вирусом в дозе  $10^5$  IgЭИД<sub>50</sub>, после чего проводили ежедневный мониторинг выживаемости в течение 14 дней. Защитная эффективность как классического штамма ЖГВ, так и его MDCK-адаптированного варианта составила 100%, тогда как животные контрольной группы погибли полностью и выживаемость в ней составила 0% (рис. 3, в, г). Таким образом, исследуемые MDCK-адаптационные мутации не повлияли на защит-

**Таблица 3.** Мутации, обнаруженные в молекуле HA MDCK-адаптированных вариантов вакцинного штамма Tex17

Субъединица HA	Аминокислотная позиция	Исходный вирус Tex17	Клоны, адаптированные к культуре клеток MDCK									
			Tex17-1	Tex17-4	Tex17-8	Tex17-9	Tex17-11	Tex17-15	Tex17-16	Tex17-17	Tex17-20	Tex17-21
HA1	176	Val	Val	Val	Ile	Ile	Val	Val	Ile	Val	Val	Ile
	215	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Pro	Thr	Pro	Pro
	221	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Ser
	265	Asp	Asp	Asp	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp/Glu	Asp	Asp	Asp
	301	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg
HA2	79	Asp	Asp	Asp	Asp	Gly	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asn
	83	Tyr	His	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
	85	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
	92	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp/Gly	Trp	Trp
	124	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
	154	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Lys	Asn	Asn
	160	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	His	Asp
169	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Lys	Asn	Asn	Asn	

**Примечание.** Выделены адаптационные аминокислотные замены в HA по сравнению с исходным вакцинным штаммом Tex17.



**Рис. 4.** Репродукция вакцинных вирусов гриппа A/17/Техас/12/30 (H3N2).  
 \* $p < 0,05$  по сравнению с ТЦИД<sub>50</sub>/мл Tex17; † $p < 0,05$  по сравнению с ЭИД<sub>50</sub>/мл Tex17-17.

ную эффективность вакцинного штамма ЖГВ Калиф17.

#### Адаптация вакцинного штамма H3N2 к культуре клеток MDCK в лабораторных условиях

В работе был использован вакцинный штамм A/17/Техас/12/30 (H3N2) (Tex17), содержащий HA и NA от эпидемического вируса гриппа A/Техас/50/2012 (H3N2). После адаптации Tex17 к культуре клеток MDCK выделено 20 клонов Tex17, у 10 из которых при секвенировании обнаружены различные аминокислотные отличия в молекуле HA (табл. 3).

В молекуле HA MDCK-адаптированных клонов вакцинного штамма Tex17 не найдено общих мутаций, но были отмечены часто встречающиеся аминокислотные замены: *V176I*, *P215T*, *P221S* и *D265E* в HA1. Также были выявлены одиночные мутации: *R301K* в HA1, *D79N*, *D79G*, *Y83H*, *E85D*, *W92G*, *K124E*, *N154K*, *D160H* и *N169K* — в HA2 (табл. 3). Локализация часто встречающихся и одиночных мутаций различная: первые располагаются в глобулярной части HA вблизи рецептор-связывающего сайта, вторые — в ножке молекулы HA.

Исследование репродуктивной активности исследуемых вариантов показало, что исходный вакцинный штамм Tex17 в 50 раз лучше размножается в системе куриных эмбрионов, чем в культуре клеток MDCK. Интересно, что один из MDCK-адаптированных вариантов — штамм Tex17-16 — показал наиболее значимое увеличение инфекционного титра в культуре клеток MDCK по сравнению с исходным вакцинным штаммом Tex17 (рис. 4). Таким образом, набор мутаций *V176I*, *P221S*, *D265E* в HA1 и *N154K* в HA2 ассоциируется с повышением репродуктивной активности вакцинного штамма в культуре клеток MDCK.

Кроме этого, выявлен вариант Tex17-8, который имел значительно меньший титр в культуре клеток MDCK по сравнению с контрольным штаммом Tex17, на что повлияли аминокислотные замены *P221S*, *D265E* в HA1 и *Y85E* в HA2. Из вышесказанного следует, что мутации *N154K* и *Y85E* в HA2 являются критическими для размножения вируса в культуре клеток и требуют дальнейшего исследования. Также оказался интересен штамм Tex17-17, который в 200 раз лучше размножался в культуре клеток MDCK, чем в системе РКЭ. То есть адаптационные мутации *P215T* в HA1 и *W92G*, *D160H* в HA2 дали вакцинному штамму существенное преимущество для размножения в культуре клеток MDCK, что может быть эффективно использовано в производстве культуральной ЖГВ. Однако набор указанных мутаций значительно снизил репродукцию вирусов в РКЭ, и, если обратить внимание на вирусы Tex17-11 и Tex17-15, то можно заметить, что эти варианты отличаются только мутациями в субъединице HA2 молекулы HA, и именно аминокислотные различия в ножке HA являются ключевыми в адаптации вакцинных штаммов H3N2 к культуре клеток MDCK.

На рис. 5 представлены трёхмерные структуры молекул HA вакцинных штаммов Tex17-8 и Tex17-16, на которых отмечены обнаруженные адаптационные мутации. Видно, что мутации, критическим образом повлиявшие на уровень репродукции вакцинных вирусов в культуре клеток MDCK, находятся в ножке молекулы HA. Также представляет интерес исследование иммуногенности и антигенности данных вирусов, однако современные вирусы гриппа подтипа H3N2 не способны эффективно инфицировать мышей, поэтому в рамках данной работы исследование иммуногенности вирусов H3N2 в эксперименте на мышах не проводилось. Для оценки антигенности наиболее ин-

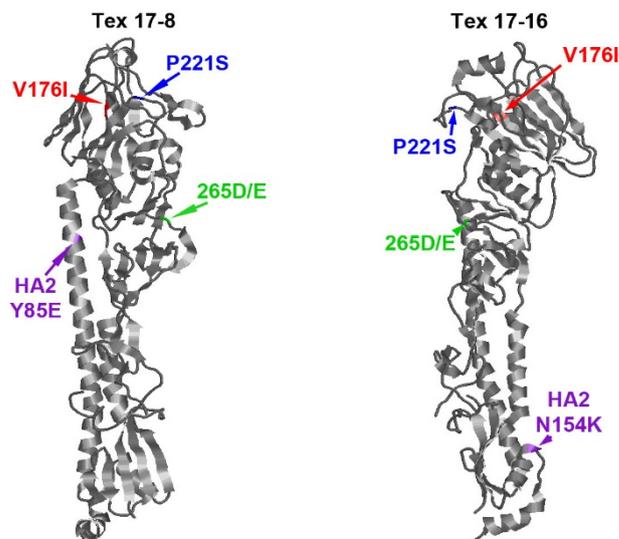
тересных MDCK-адаптированных вариантов были получены гипериммунные крысиные сыворотки.

Кросс-реактивность антител, индуцируемых клеточными клонами Tex17-8, Tex17-16 и Tex17-17, оценивали в РТГА по классической методике. Показано, что адаптационные мутации не влияли на способность продуцируемых антител связывать исходный вариант НА штамма А/Техас/50/2012 (H3N2) (табл. 4).

#### Адаптация вакцинных штаммов трёхвалентной ЖГВ к культуре клеток MDCK в условиях промышленного производства

В России культуральная ЖГВ разрабатывается в ГНЦ ВБ «Вектор», при этом в качестве исходного сырья используются реассортантные вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные классическим методом реассортации в РКЭ. Компания зарегистрировала систему для производства ЖГВ на культуре клеток млекопитающих и успешно произвела экспериментальную серию клеточных моновакцин против сезонных вирусов гриппа в 2015 г. [12], а затем провела клинические испытания фазы I [18]. Однако оставалось неизвестным, как повлиял процесс производства на свойства штаммов ЖГВ.

Секвенирование генов поверхностных белков НА и NA клеточных моновакцин показало, что адаптационные мутации появились только в молекулах НА вирусов гриппа А, тогда как в штамме В/60/Пхукет/2013/26 аминокислотных замен не



**Рис. 5.** Картирование адаптационных аминокислотных замен в молекуле НА вакцинного штамма Tex17.

Расположение аминокислот показано на мономере НА A/Pennsylvania/14/2010 (H3N2) (PDBID: 6MZK). Иллюстрации получены с использованием программы «RasMol v. 2.7.5».

обнаружено (табл. 5). Так, в вакцинном штамме А/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm09) была идентифицирована мутация *K116E* в субъединице НА2, а в штамме А/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) — мутации *S219Y* и *N246K* в субъединице НА1.

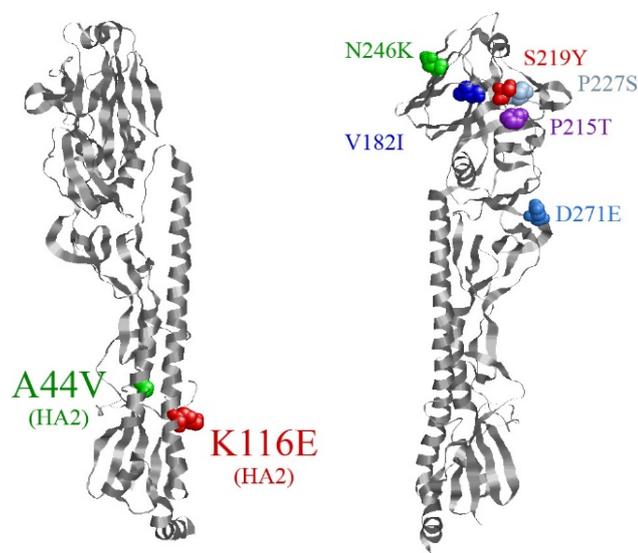
На рис. 6 на мономерах соответствующих молекул НА выделены позиции, в которых были

**Таблица 4.** Кросс-реактивность антител в гипериммунных сыворотках крыс, полученных к различным вариантам вакцинного штамма ЖГВ H3N2

Антигены	Титр антигемагглютинирующих антител в гипериммунных сыворотках крыс, полученных к указанным вариантам вакцинного вируса			
	Tex17	Tex17-8	Tex17-16	Tex17-17
Tex-wt	1280	320	640	640
Tex17	1280	320	320	1280
Tex17-8	2560	320	320	1280
Tex17-16	640	640	640	640
Tex17-17	1280	320	640	640

**Таблица 5.** Аминокислотные замены в поверхностных антигенах экспериментальных клеточных моновалентных ЖГВ

Вакцина	Ген	Белок	Аминокислота	Исходный вакцинный штамм	Вакцинный штамм после производственных пассажей
А/17/Боливия/2013/6585 (H1N1pdm)	НА	НА2	116	Lys	Glu
	НА	НА		Мутаций не обнаружено	
А/17/Швейцария/2013/1 (H3N2)	НА	НА1	219	Ser	Tyr
			246	Asn	Lys
	НА	НА		Мутаций не обнаружено	
В/60/Пхукет/2013/26	НА	НА		Мутаций не обнаружено	
	НА	НА		Мутаций не обнаружено	



**Рис. 6.** Картирование адапционных аминокислотных замен в молекуле HA вакцинных штаммов Калифория17 и Боливия17 (а), Тех17 и Швейцария17 (б).

Расположение аминокислот показано на мономере HA A/California/04/2009 (H1N1) и A/Singapore/H2011.447/2011 (H3N2) (PDBID: 3UYX и 4WEA соответственно). Иллюстрации получены с использованием программы «RasMol v. 2.7.5».

обнаружены аминокислотные замены при адаптации вакцинных штаммов к культуре клеток в лабораторном масштабе (*A44V* в HA2 подтипа H1N1, *V176I*, *P215T*, *P221S* и *D265E* в HA1 подтипа H3N2) и в процессе производства серий культуральной ЖГВ (*K116E* в HA2 подтипа H1N1, *S219Y* и *N246K* в HA1 подтипа H3N2). Нужно отметить, что несмотря на то, что выявленные мутации не идентичны в различных вирусах, можно наблюдать их общую локализацию у каждого подтипа. Так, позиции 44 и 116 в HA2 подтипа H1N1 находятся в непосредственной близости друг от друга, позиции 176, 215, 219, 221 в HA1 подтипа H3N2 локализируются в районе рецептор-связывающего сайта.

### Обсуждение

Адаптация вируса к новому кругу хозяев неизбежно влечёт за собой появление адапционных мутаций, которые могут приводить к изменению свойств исходного вируса. При этом адапционные мутации могут носить драматический характер, как, например, произошло при адаптации вируса гриппа от клеток птичьего происхождения к клеткам млекопитающих, что привело к пандемиям гриппа H2N2 в 1957 г. и H3N2 в 1968 г. [19–22]. Субстрат для наработки биомассы для получения гриппозной вакцины — как живой, так и инактивированной, также может оказывать влияние на её свойства. Как уже упоминалось выше, подготовка штаммов для отечественной ЖГВ возможна только в РКЭ, при этом известны случаи появления яично-адапционных мутаций, которые повлияли на

антигенность вакцинного штамма, что приводило к снижению эффективности вакцины при её массовом применении [21, 23–25].

Поскольку штаммы A/H3N2 являются наиболее изменчивыми и больше остальных подвержены антигенному дрейфу, это обстоятельство необходимо учитывать при наработке вакцинных вирусов в различных субстратах культивирования [21]. Так, с 2013 по 2018 г. обнаружен ряд мутаций, критически повлиявших на антигенность циркулирующих вирусов: замены *F159Y* и *K160T* в антигенном сайте В вместе с остатком N в сайте 158 способствуют приобретению дополнительного сайта гликозилирования, что активно помогало вирусу ускользать от иммунного ответа [26–28]. Затем в процессе эволюции произошла характерная аминокислотная замена *N171K*, расположенная на антигенном сайте D молекулы HA, а также замены *D122N* и *T135K* в антигенном сайте А, каждая из которых вызывает потерю N-связанных сайтов гликозилирования [29]. Следующий сезон выявил наличие замены *S144K* в молекуле HA1, которая находится в антигенном сайте, фланкирующем рецептор-связывающий сайт. Два кластера вируса гриппа H3N2 показали, что антигенно важны и замены *I58V* и *S219Y*, а также замены *I22D* и *S262N*, которые приводят к потере сайта гликозилирования [21]. В настоящем исследовании при адаптации к культуре клеток MDCK были обнаружены мутации, тоже, вероятно, находящиеся в антигенных сайтах: *V176I*, *P215T*, *P221S* и *S219Y*, однако было показано, что они не влияют на антигенность вакцинного штамма, но влияют на его способность к росту в клетках млекопитающих.

В исследованиях инфекционной активности и стабильности высокоурожайных штаммов вируса гриппа для инактивированной гриппозной вакцины продемонстрировано, что культивирование вирусов гриппа H1N1 и H3N2 в культуре клеток Vero или MDCK в подкисленных условиях сохраняет стабильность вируса, что успешно использовалось при производстве инактивированной гриппозной вакцины против птичьего гриппа H5N1. Пассивирование вирусов без дополнительных условий способствовало появлению в молекуле HA2 адапционных мутаций *N50K* (H1N1) и *D160E* (H3N2), которые улучшали рост вируса в культуре клеток, но при этом отрицательно сказывались на стабильности антигена [30]. Вирусы H3N2, накопленные в РКЭ, запускают конформационные изменения в молекуле HA в менее кислых условиях, чем их антигенно схожие первичные изоляты, и этот фенотип связывали с наличием аминокислотных замен *A138S*, *L194P* в HA1 и *D160N* в HA2, пониженной устойчивостью к кислым условиям и повышенной температуре [30]. Вероятно, отличие уровней pH при размножении в куриных эмбрионах и культуре клеток обусловило появление мутаций в районе пептида слияния

в HA2 у MDCK-адаптированных вариантов вакцинных штаммов H3N2 Tex17-8, Tex17-16, Tex17-17 и H1N1 Калиф17-8.

Интересно, что 5 мутаций в молекуле HA обнаружили только в молекуле HA1, в частности, 4 из них (*A138S*, *G218R*, *P221L* и *V223I*) находятся вблизи рецептор-связывающего сайта [31]. Мутация *N165K* локализовалась в антигенном сайте HA [31]. Замена *A138S* может возникать *in vivo* у пациентов с ослабленным иммунитетом, а также *in vitro* в культуре клеток MDCK, и было обнаружено, что она вызывает полную потерю связывания  $\alpha$ 2,3-типа рецептора [32]. Мутация в позиции 218 в молекуле HA1, которая находится вблизи рецептор-связывающего сайта, была также ассоциирована со снижением аффинности к человеческому рецептору и с повышенной патогенностью на модели мышей [33, 34]. Аминокислотная замена *L194P* в HA1, превалирующая в яично-адаптированных (пассированных в куриных эмбрионах 4–5 раз) вариантах вирусов H3N2, на 3 порядка снижает связывание и нейтрализацию антителами широкого спектра действия, распознающими рецептор-связывающий сайт, а также значительно меняет антигенность молекулы HA [35]. Несмотря на то что часть обнаруженных в нашем исследовании адаптационных мутаций находится в значимых местах молекулы HA, таких как рецептор-связывающий сайт или антигенные сайты, описанные мутации не влияют на ключевые для вакцинного штамма ЖГВ показатели — не меняется антигенность MDCK-адаптированного штамма, его иммуногенность, но при этом увеличивается репликативная активность вакцинного вируса в культуре клеток, т. е. приобретает полезное свойство в контексте производства культуральной ЖГВ. При этом можно наблюдать снижение инфекционных титров MDCK-адаптированных штаммов ЖГВ в РКЭ, что является допустимым явлением при смене субстрата для культивирования вирусов. Для производства культуральной ЖГВ наиболее важна высокая репликационная активность в культуре клеток MDCK, но не в РКЭ.

Штамм вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1pdm) генетически очень похож на штамм А/Калифорния/4/2009 (H1N1pdm), но был выделен в системе РКЭ и при пассировании получил адаптационную мутацию *Q226R*, а после адаптации к мышам добавились мутации *N159D* и *K212M*. При этом вирус с мутацией *Q226R* в HA1 потерял сродство к рецепторам человеческого типа и приобрел сродство к птичьим рецепторам [36]. В обоих вирусах мутации, находящиеся непосредственно в рецептор-связывающем сайте, ожидаемо повлияли на рецепторную специфичность вируса, нарушив при этом баланс HA–NA, что повлекло снижение репродуктивной активности вируса в культуре клеток MDCK-SIAT-1. Появившиеся еще через не-

сколько пассажей в мышях мутации в молекуле HA стали компенсаторными по поверхностному заряду молекулы и при этом внесли существенный вклад в усиление патогенности исследуемых вирусов. Интересно, что данные по вкладу мутаций *D225E* и *Q226R* в HA в вирулентность пандемического вируса гриппа H1N1 на мышах были также получены корейскими учеными [37]. В других исследованиях мутацию *N159D* ассоциируют с escape-мутациями, которые позволяют вирусу ускользнуть от иммунного ответа [38].

При подготовке вакцинного штамма X-181 H1N1pdm09 в куриных эмбрионах были обнаружены мутации *N133D*, *K212T* и *Q226R* в молекуле HA1, которые привели к сильному изменению кросс-реактивности вакцинного штамма, в результате чего антитела, индуцированные вакцинным штаммом, связывались с диким типом вируса, но не нейтрализовали его [39]. Эволюционные исследования молекулы H1 показали важное значение аминокислот в позициях 156, 190 и 225 для адаптации к человеческим рецепторам и антигенному дрейфу циркулирующих вирусов H1N1 [40].

Сравнение штаммов H1N1pdm А/Калифорния/9/2007 и А/Брисбен/10/2010 показало наличие мутации *E47K* в молекуле HA2, которая влияла на стабильность тримера HA, снижала пороговое значение рН слияния мембран с 5,4 до 5,0. Установлено также, что это происходит из-за наличия межмономерного солевого мостика между аминокислотами K47 в HA2 и E21 в HA1 [41]. Кроме этого, замена *E47K* повысила термостабильность вируса и его вирулентность у хорьков, что указывает на преимущество вируса с K47 в HA2 при адаптации к эволюционным изменениям у людей [42]. Мутация *V66H* в HA2 в месте контакта двух субъединиц молекулы HA вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) влияет на сдвиг максимума рН слияния мембран в сторону более низких значений (с 5,6 до 5,1). При этом снижалась способность к репликации вируса в культуре клеток MDCK, что сопровождалось более долгим клиренсом вируса в мышах [43]. Можно заметить, что адаптационные мутации *A44V* в Калиф17-8 и *K116E* в Боливия17-М, обнаруженные в настоящем исследовании, имеют сходную локализацию с уже описанным мутациям *K47* в HA2 и *E21* в HA1. Вероятно, они могут оказывать влияние на пороговое значение рН при слиянии мембран, что является ожидаемым результатом адаптации вирусов к новому субстрату.

Исходя из полученных данных, адаптация вакцинного вируса гриппа А(H3N2) к культуре клеток MDCK привела к возникновению множественных аминокислотных замен в HA. Было показано, что мутации *N154K* и *Y85E*, обнаруженные в субъединице HA2 молекулы HA вакцинного штамма, являются критическими для размножения вируса в культуре.

Кроме этого, адаптационные мутации *W92G*, *D160H* в HA2 дают существенное преимущество репликации вакцинного вируса в культуре клеток MDCK над его репликацией в РКЭ.

Сравнение стерического расположения адаптационных мутаций между штаммами, адаптированными к клеткам MDCK в лабораторных и производственных условиях, выявило схожесть этих позиций. Так, в штамме H1N1 аминокислотные замены *A44V* (Калиф17-4) и *K116E* (Боливия17) находятся в непосредственной близости друг от друга в субъединице HA2 в ножке HA, а большинство обнаруженных адаптационных замен у штаммов H3N2 — в глобулярном домене молекулы HA1 (рис. 6). Таким образом, адаптация вакцинных штаммов ЖГВ к культуре клеток MDCK в условиях лаборатории и в производственном масштабе приводит к появлению схожих адаптационных замен у штаммов одного подтипа, при этом вирусы гриппа типа В являются максимально стабильными, а вирусы А/H1N1 приобретают адаптационные замены, необходимые для усиленной репликации вируса в данном субстрате. Штаммы А/H3N2 являются наименее стабильными, а адаптационные мутации могут захватывать и рецептор-связывающие области, что указывает на необходимость тщательного отслеживания антигенных свойств штаммов данного подтипа при их производстве на клеточном субстрате.

### Заключение

В результате адаптации вакцинного штамма А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1pdm09) к культуре клеток MDCK были обнаружены мутации *N156D* в HA1 и *A44V* в HA2. Исследование их влияния на репликативную активность *in vitro* показало, что наличие обеих мутаций увеличивает титр вакцинного штамма в культуре клеток MDCK на порядок, что даёт преимущества данному варианту при его наработке в производственных масштабах. Обнаруженные мутации сохранили иммуногенность, кросс-реактивность и защитную эффективность MDCK-адаптированного штамма Калиф17-8 на уровне исходного вакцинного штамма Калиф17. Таким образом, проведённые исследования показывают, что вакцинный штамм ЖГВ подтипа H1N1pdm09, полученный методом классической реассортации в РКЭ, может быть использован для производства ЖКВ на культуре клеток MDCK.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Tian Y., Ma Y., Ran J., et al. Protective impact of influenza vaccination on healthcare workers. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(11):1237. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines12111237>
2. Bouvier N.M. The future of influenza vaccines: a historical and clinical perspective. *Vaccines (Basel)*. 2018;6(3):58. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines6030058>
3. Krietsch Boerner L. The flu shot and the egg. *ACS Cent. Sci.* 2020; 6(2):89–92. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00107>
4. Charostad J., Rezaei Zadeh Rukerd M., Mahmoudavian S., et al. A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: An imminent threat at doorstep. *Travel Med. Infect. Dis.* 2023;55:102638. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2023.102638>
5. Rajaram S., Boikos C., Gelone D.K., Gandhi A. Influenza vaccines: the potential benefits of cell-culture isolation and manufacturing. *Ther. Adv. Vaccines Immunother.* 2020;8:2515135520908121. DOI: <https://doi.org/10.1177/2515135520908121>
6. McGovern I., Taylor A., Sardesai A., et al. Influenza burden averted with a cell-based quadrivalent seasonal influenza vaccine compared with egg-based quadrivalent seasonal influenza vaccine. *Expert Rev. Vaccines*. 2024;23(1):371–9. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2024.2330643>
7. Manini I., Domnich A., Amicizia D., et al. Flucelvax (Optafu) for seasonal influenza. *Expert Rev. Vaccines*. 2015;14(6):789–804. DOI: <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1039520>
8. Shcherbik S., Pearce N., Kiseleva I., et al. Implementation of new approaches for generating conventional reassortants for live attenuated influenza vaccine based on Russian master donor viruses. *J. Virol. Methods*. 2016;227:33–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.10.009>
9. Киселева И.В., Исакова И.Н., Ларионова Н.В. и др. Эффективность получения реассортантов между эпидемическими и холодоадаптированными вирусами гриппа в развивающихся куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007;84(6):40–5. Kiseleva I.V., Isakova I.N., Larionova N.V., et al. Efficacy of production of reassortants between epidemic and cold-adapted influenza viruses in growing chicken embryos and in MDCK cell culture. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;84(6):40–5. EDN: <https://elibrary.ru/iisqbx>
10. Rockman S., Laurie K., Ong C., et al. Cell-based manufacturing technology increases antigenic match of influenza vaccine and results in improved effectiveness. *Vaccines (Basel)*. 2022;11(1):52. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11010052>
11. Trager G., Kembler G., Schwartz R., et al. Methods of producing influenza vaccine compositions. Patent US No. 20060153872A1;2005.
12. Нечаева Е.А., Сенькина Т.Ю., Радаева И.Ф. и др. Разработка технологии производства живой культуральной тривалентной вакцины против сезонного гриппа. *Приоритетные направления развития науки и образования*. 2016;(1):85–91. Nechaeva E.A., Sen'kina T.Yu., Radaeva I.F., et al. Development of technology for the production of a live culture trivalent vaccine against seasonal influenza. *Priority Areas for the Development of Science and Education*. 2016;(1):85–91. EDN: <https://elibrary.ru/vkwmwr>
13. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Вакцинный штамм вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) для производства живой трипозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей. Патент РФ № 2413765 C1;2011. Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G., Aleksandrova G.I. Vaccine strain of influenza virus A/17/California/2009/38 (H1N1) for the production of live influenza intranasal vaccine for adults and children. Patent RF № 2413765 C1;2011.
14. Дубровина И.А., Ларионова Н.В., Киселева И.В. и др. Штамм вируса гриппа А/17/Техас/2012/30 (H3N2) для производства живой трипозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей. Патент РФ № 2563352 C2;2015. Dubrovina I.A., Larionova N.V., Kiseleva I.V., et al. Influenza virus strain A/17/Texas/2012/30 (H3N2) for the production of live influenza intranasal vaccine for adults and children. Patent RF No. 2563352 C2;2015.

15. Stepanova E., Krutikova E., Wong P.F., et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of a chimeric A/B Live attenuated influenza vaccine in a mouse model. *Microorganisms*. 2021;9(2):259.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020259>
16. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938;27(3):493–7.
17. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). *Virology*. 2011;412(2):297–305.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.004>  
EDN: <https://elibrary.ru/oiazrz>
18. Nechaeva E.A., Bogryantseva M.P., Ryzhikov A.B., et al. Phase I clinical trials of safety and immunogenicity of live cultural influenza vaccine vector-flu. *BMC Proc.* 2015;9(Suppl. 9):P73. DOI: <https://doi.org/10.1186/1753-6561-9-S9-P73>
19. Pappas C., Viswanathan K., Chandrasekaran A., et al. Receptor specificity and transmission of H2N2 subtype viruses isolated from the pandemic of 1957. *PLoS One*. 2010;5(6):e11158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011158>
20. Thompson A.J., Wu N.C., Canales A., et al. Evolution of human H3N2 influenza virus receptor specificity has substantially expanded the receptor-binding domain site. *Cell Host Microbe*. 2024;32(2):261–75.e4.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.01.003>
21. Allen J.D., Ross T.M. H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018;14(8):1840–7.  
DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1462639>
22. Liu M., Bakker A.S., Narimatsu Y., et al. H3N2 influenza A virus gradually adapts to human-type receptor binding and entry specificity after the start of the 1968 pandemic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2023;120(31):e2304992120.  
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2304992120>
23. Martin E.T., Cheng C., Petrie J.G., et al. Low influenza vaccine effectiveness against A(H3N2)-associated hospitalizations in 2016–2017 and 2017–2018 of the Hospitalized Adult Influenza Vaccine Effectiveness Network (HAIVEN). *J. Infect. Dis.* 2021;223(12):2062–71.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa685>
24. Rondy M., Gherasim A., Casado I., et al. Low 2016/17 season vaccine effectiveness against hospitalised influenza A(H3N2) among elderly: awareness warranted for 2017/18 season. *Euro Surveill.* 2017;22(41):17-00645.  
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2017.22.41.17-00645>
25. Kissling E., Pozo F., Buda S., et al. Low 2018/19 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) among 15–64-year-olds in Europe: exploration by birth cohort. *Euro Surveill.* 2019;24(48):1900604.  
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.48.1900604>
26. Skowronski D.M., Sabaiduc S., Chambers C., et al. Mutations acquired during cell culture isolation may affect antigenic characterisation of influenza A(H3N2) clade 3C.2a viruses. *Euro Surveill.* 2016;21(3):30112.  
DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.3.30112>
27. Chambers B.S., Parkhouse K., Ross T.M., et al. Identification of Hemagglutinin Residues Responsible for H3N2 Antigenic Drift during the 2014–2015 Influenza Season. *Cell Rep.* 2015;12(1):1–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.005>
28. Lee H.K., Tang J.W., Kong D.H., et al. Comparison of mutation patterns in full-genome A/H3N2 influenza sequences obtained directly from clinical samples and the same samples after a single MDCK passage. *PLoS One*. 2013;8(11):e79252.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079252>
29. Melidou A., Gioula G., Exindari M., et al. Influenza A(H3N2) genetic variants in vaccinated patients in northern Greece. *J. Clin. Virol.* 2017;94:29–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.003>
30. Nakowitsch S., Waltenberger A.M., Wressnigg N., et al. Egg- or cell culture-derived hemagglutinin mutations impair virus stability and antigen content of inactivated influenza vaccines. *Biotechnol. J.* 2014;9(3):405–14.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201300225>
31. Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:531–69.  
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>
32. Kumari K., Gulati S., Smith D.F., et al. Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses. *Virology*. 2007;4:42. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422x-4-42>
33. Daniels P.S., Jeffries S., Yates P., et al. The receptor-binding and membrane-fusion properties of influenza virus variants selected using anti-haemagglutinin monoclonal antibodies. *The EMBO J.* 1987;6(5):1459–65.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02387.x>
34. Narasaraju T., Sim M.K., Ng H.H., et al. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. *Microbes Infect.* 2009;11(1):2–11.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.09.013>
35. Wu N.C., Zost S.J., Thompson A.J., et al. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine. *PLoS Pathog.* 2017;13(10):e1006682.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006682>
36. Гамбарян А.С., Ломакина Н.Ф., Боравлева Е.Ю. и др. Изменение вирулентности пандемического вируса гриппа А(H1N1), обусловленное мутациями гемагглютинина и полимеразы. *Молекулярная биология*. 2018;52(4):644–58.  
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026898418040055>  
EDN: <https://elibrary.ru/oxkwrn>
37. Gambaryan A.S., Lomakina N.F., Boravleva E.Y., et al. Mutations in hemagglutinin and polymerase alter the virulence of pandemic A(H1N1) influenza virus. *Molecular Biology*. 2018;52(4):644–58.  
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893318040052>  
EDN: <https://elibrary.ru/ybidnj>
38. Kim J.I., Lee I., Park S., et al. Effects of a hemagglutinin D222G substitution on the pathogenicity of 2009 influenza A (H1N1) virus in mice. *Arch Virol.* 2014;159(10):2559–65.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2104-5>
39. Rudneva I., Ignatieva A., Timofeeva T., et al. Escape mutants of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus: variations in antigenic specificity and receptor affinity of the hemagglutinin. *Virus Res.* 2012;166(1-2):61–7.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.03.003>
40. Raymond D.D., Stewart S.M., Lee J., et al. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat. Med.* 2016;22(12):1465–9.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4223>
41. Shen J., Ma J., Wang Q. Evolutionary trends of A(H1N1) influenza virus hemagglutinin since 1918. *PLoS One*. 2009;4(11):e7789.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007789>
42. Cotter C.R., Jin H., Chen Z. A single amino acid in the stalk region of the H1N1pdm influenza virus HA protein affects viral fusion, stability and infectivity. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003831.  
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003831>
43. Yang H., Chang J.C., Guo Z., et al. Structural stability of influenza A(H1N1)pdm09 virus hemagglutinins. *J. Virol.* 2014;88(9):4828–38. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02278-13>
44. Jakubcová L., Vozárová M., Hollý J., et al. Biological properties of influenza A virus mutants with amino acid substitutions in the HA2 glycoprotein of the HA1/HA2 interaction region. *J. Gen. Virol.* 2019;100(9):1282–92.  
DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001305>

### Информация об авторах

**Матюшенко Виктория Аркадьевна**<sup>✉</sup> — н. с. лаб. иммунологии и вакцинопрофилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, [matyshenko@iemspb.ru](mailto:matyshenko@iemspb.ru), <https://orcid.org/0000-0002-4698-6085>

**Костромитина Арина Дмитриевна** — м. н. с. лаб. клеточной иммунологии отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, [arina8goshina@gmail.com](mailto:arina8goshina@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-5432-0171>

**Степанова Екатерина Алексеевна** — канд. биол. наук., в. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, [fedorova.iem@gmail.com](mailto:fedorova.iem@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-8670-8645>

**Руденко Лариса Георгиевна** — д-р мед. наук, профессор, г. н. с. лаб. иммунологии и вакцинопрофилактики вирусных инфекций, рук. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, [vaccine@mail.ru](mailto:vaccine@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-0107-9959>

**Исакова-Сивак Ирина Николаевна** — д-р биол. наук, член-корр. РАН, зам. директора Института экспериментальной медицины по науке, Санкт-Петербург, Россия, [isakova.sivak@iemspb.ru](mailto:isakova.sivak@iemspb.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>

**Участие авторов:** **Матюшенко В.А.** — идея и разработка концепции статьи, подготовка и проведение вирусологических и иммунологических исследований, экспериментов с животными, анализ данных мировой литературы, подготовка текста статьи; **Костромитина А.Д.** — подготовка и проведение иммунологических исследований, проведение экспериментов с животными; **Степанова Е.А.** — анализ данных мировой литературы, работа с базами данных, визуализация молекулярных структур; **Руденко Л.Г.** — идея и разработка концепции статьи, написание текста статьи, окончательное утверждение версии для публикации; **Исакова-Сивак И.Н.** — идея и разработка концепции статьи, общее руководство проектом, написание статьи, редактирование и рецензирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.03.2025;  
принята к публикации 28.05.2025;  
опубликована 28.06.2025

### Information about the authors

**Victoria A. Matyushenko**<sup>✉</sup> — researcher, Laboratory of immunology and vaccine prevention of viral infections, Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, [matyshenko@iemspb.ru](mailto:matyshenko@iemspb.ru), <https://orcid.org/0000-0002-4698-6085>

**Arina D. Kostromitina** — junior researcher, Laboratory of cellular immunology, Department of immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, [arina8goshina@gmail.com](mailto:arina8goshina@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-5432-0171>

**Ekaterina A. Stepanova** — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, [fedorova.iem@gmail.com](mailto:fedorova.iem@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-8670-8645>

**Larisa G. Rudenko** — Dr. Sci. (Med.), Professor, main researcher, Laboratory of immunology and vaccine prevention of viral infections, Head, Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, [vaccine@mail.ru](mailto:vaccine@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-0107-9959>

**Irina N. Isakova-Sivak** — Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Deputy director for science, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, [isakova.sivak@iemspb.ru](mailto:isakova.sivak@iemspb.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>

**Authors' contribution:** **Matyushenko V.A.** — the idea and development of the concept of the article, preparation and conduction of virological and immunological studies, experiments with animals, analysis of world literature data, preparation of the text of the article; **Kostromitina A.D.** — preparation and conduction of immunological studies, experiments with animals; **Stepanova E.A.** — analysis of world literature data, work with databases, visualization of molecular structures; **Rudenko L.G.** — the idea and development of the concept of the article, writing the text of the article, final approval of the version for publication; **Isakova-Sivak I.N.** — the idea and development of the concept of the article, the general management of the project, writing the article, editing and reviewing the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 20.03.2025;  
accepted for publication 28.05.2025;  
published 28.06.2025