

# Влияние конформационной стабильности гемагглютинаина вируса гриппа на качество инактивированных вакцин H5N1

М.В. Сергеева<sup>1\*#</sup>, А. Крохин<sup>2\*</sup>, М. Матросович<sup>3</sup>, Т. Матросович<sup>3</sup>, М. Волшек<sup>2\*</sup>, О.И. Киселев<sup>1</sup> и Ю.Р. Романова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup> Green Hills Biotechnology AG, Вена, Австрия

<sup>3</sup> Институт Вирусологии, Марбург, Германия

\* Авторы внесли одинаковый вклад

# Для корреспонденции: Сергеева Мария, 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова 15/17, ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, E-mail: maria\_ms2@mail.ru

DOI: 10.18527/2500-2236-2014-1-1-1-11

Ключевые слова: гемагглютинин, вирус гриппа, вакцины, стабильность вируса

## АННОТАЦИЯ

Начиная с 1997 года, в популяции диких и домашних птиц наблюдается постоянная циркуляция высокопатогенных вирусов гриппа подтипа H5N1. Периодически эти вирусы инфицируют людей, что создает угрозу возникновения новой пандемии. При производстве инактивированных вакцин из вирусов H5N1 замечено, что содержание главного компонента – антигена гемагглютинаина (НА) – гораздо ниже, чем в аналогичных препаратах сезонных вирусов гриппа. Мы предположили, что урожайность НА определяется его стабильностью. Белки НА, входящие в состав вирионов высокопатогенных вирусов гриппа птиц, отличаются от НА человеческих изолятов вируса гриппа высоким порогом рН-слияния, или рН-активации (5.6–6.0 vs 5.0–5.4), – значение рН, при котором НА изменяет конформацию, переходя в форму, необходимую для проникновения вируса в клетку. Нами получен мутантный вариант НА вируса A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) с единственной заменой 58Lys→Ile, находящейся в HA2 субъединице белка. По сравнению с НА дикого типа у мутантного варианта порог рН-активации снижен, а стабильность увеличена как в кислой среде, так и при повышенной температуре. Кроме того, вирионы, содержащие мутантный НА, оказались более устойчивы к расщеплению трипсином и при их замораживании/размораживании нативная структура шипов НА сохранялась лучше, чем в родительском вирусе. Повышенная стабильность мутантного НА коррелировала с увеличением его продукции как антигена в вакцинном препарате. Таким образом, высокое значение рН-активации НА высокопатогенных штаммов вируса гриппа H5N1 определяет низкую конформационную стабильность НА и, как следствие, низкую стабильность вирионов, что влияет на качество получаемых из них вакцинных препаратов.

## H5N1 influenza vaccine quality is affected by hemagglutinin conformational stability

Mariia Sergeeva<sup>1\*#</sup>, Artem Krokhin<sup>2\*</sup>, Mikhail Matrosovich<sup>3</sup>, Tatyana Matrosovich<sup>3</sup>, Markus Wolschek<sup>2\*</sup>, Oleg Kiselev<sup>1</sup>, and Julia Romanova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Green Hills Biotechnology AG, Vienna, Austria

<sup>3</sup> Institute of Virology, Philipps-University of Marburg, Marburg, Germany

\* These authors contributed equally to this work

# Corresponding author: Mariia Sergeeva, Russian Federation 197376, Saint Petersburg, Prof. Popova str., 15/17, E-mail: mari.v.sergeeva@gmail.com

DOI: 10.18527/2500-2236-2014-1-1-12-26

Keywords: hemagglutinin; influenza virus; vaccines; virus stability

## ABSTRACT

Since 1997, highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses have circulated in wild and domestic birds and sporadically have infected humans. Conventional inactivated vaccines made from these viruses were shown to have decreased HA content and immunogenicity compared to seasonal preparations. We assumed that the high pH threshold (5.6–6.0) known for the HA conformational change (pH of fusion or activation) of avian highly pathogenic influenza viruses resulted in the low stability of native HA conformation and affected the vaccine quality. The 58Lys→Ile mutation introduced into the HA2 subunit of the HA of A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) virus decreased the pH threshold of the HA activation. The mutant virus demonstrated increased HA stability toward acidic pH and elevated temperature, decreased binding efficiency to the monoclonal antibody IIF4 that recognizes the HA low pH form, and increased HA resistance to trypsin digestion. Virus with modified HA was less susceptible to freezing stress and showed an increased content of immunocompetent HA in inactivated vaccine preparation compared to the analogous virus with original HA. Therefore, we have shown a way to increase the quality of inactivated vaccines made from highly pathogenic avian influenza viruses.

## ВВЕДЕНИЕ

Постоянная циркуляция высокопатогенных штаммов вируса гриппа А подтипа H5N1 среди птиц с периодическим инфицированием людей создает угрозу возникновения новой пандемии. Вакцинация считается лучшим способом предотвращения распространения инфекции. С целью защиты населения на случай пандемии был подготовлен резерв противогриппозных вакцин из вирусов гриппа H5N1 подтипа. При этом компании-производители отмечали сниженное содержание антигена гемагглютинаина (НА) по сравнению с вакцинами, получаемыми из сезонных штаммов вируса гриппа. Кроме того, в ходе клинических испытаний различных типов полученных вакцин была выявлена их низкая иммуногенность. Только двукратное введение инактивированной сплит-вакцины, содержащей от 7.5 до 30 мкг НА, удовлетворяло критериям иммуногенности Европейского Комитета Патентованных Лекарственных средств для межпандемических вакцин, но при этом процент сероконверсий у вакцинируемых оставался низким даже при наличии в вакцине адьюванта – гидроксида алюминия [1]. Субвирионная инактивированная вакцина H5N1 вызывала сероконверсию антител не менее, чем у 50% вакцинированных только после введения двух доз по 45–90 мкг – по данным реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и микронейтрализации [2]. Несколько лучшие результаты были получены для цельновирионной вакцины, хотя уровень антител оставался низким, причем антитела чаще выявляли в реакции микронейтрализации, но не РТГА [3]. Причины столь низкой иммуногенности H5N1 вакцин не известны до сих пор.

Ранее нами показано, что мутации в НА сезонных штаммов вируса гриппа человека, возникающие при адаптации вирусов, приводят к повышению значения порога рН-активации НА, а это снижает стабильность вируса и тем самым обуславливает низкое содержание НА-антигена в инактивированных вирусных препаратах [4]. На основании этих данных мы предположили, что высокий порог рН-активации НА (5.6–6.0), характерный для высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1 [5,6], и есть причина низкой стабильности нативного НА и качества получаемых вакцин. Целью данного исследования стало изучение влияния конформационной стабильности НА высокопатогенных вирусов H5N1 на свойства вирионов и содержание антигена НА в полученных из них цельновирионных инактивированных вакцинах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клеточные культуры и вирусы

Клеточная культура Vero была получена из Европейской коллекции клеточных культур и адаптирована к росту в бессывороточной среде OptiPRO (“Invitrogen”) с добавлением 4 мМ L-глутамин (“Invitrogen”) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клеточную культуру Madin-Darby canine kidney (MDCK) получили из Американской коллекции

клеточных культур (ATCC CCL-34). Клетки культивировали в среде DMEM (“Invitrogen”) с добавлением 4 мМ L-глутамин и 2% эмбриональной телячьей сыворотки (“Invitrogen”) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Дифференцированную культуру трахеобронхиальных эпителиальных клеток готовили, как описано ранее [7,8]. Для этого первичные клетки человека (“Lonza”, Швейцария) культивировали на 12-мм мембранной подложке Transwell-Clear (“Corning Inc.”). Далее клетки культивировали в бессывороточной среде с добавлением гормонов и ростовых факторов [7]. Через 5–7 недель культивирования клетки использовали в эксперименте.

Все рекомбинантные вирусы гриппа подтипа H5N1, исследованные в работе, получены методом обратной генетики путем котрансфекции клеток Vero соответствующими плазмидами, как описано ранее [9].

Нуклеотидные последовательности НА и нейраминидазы (NA) высокопатогенных вирусов гриппа птиц получены прямым секвенированием (A/chicken/Kurgan/5/05, GenBank DQ449632, DQ449639) или взяты из базы данных GenBank: A/Vietnam/1203/04 (VN1203), A/Hong Kong/156/97 (HK156), A/Indonesia/5/05 (IND05), A/Anhui/1/05 (ANH01), A/turkey/Turkey/1/05 (tkTK01) – и клонированы в плазмиду рНВ2006 – аналог плазмиды рНВ2000 [10]. Полиосновный сайт расщепления НА заменяли последовательностью TETR/GLF, описанной ранее для низкопатогенных вирусов [11]. Мутацию 58Lys→Ile в субъединицу НА2 вируса A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) вводили с помощью набора для сайт-направленного мутагенеза (“Stratagene”, Германия). Реассортанты, содержащие модифицированный НА и NA вируса A/chicken/Kurgan/5/05 и остальные гены вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8), отличались только целевой мутацией, 58Lys→Ile, и были названы, соответственно, KG05 и KG05-58. Реассортанты вирусов VN1203, HK156, IND05, ANH01 и tkTK01 содержали гены, кодирующие соответствующие им поверхностные белки НА и NA и гены, кодирующие внутренние белки вируса IVR-116 – вакцинного штамма для инактивированной вакцины. (Для справки: IVR-116 содержит гены НА и NA вируса A/New Caledonia/20/99 (H1N1), ген PB1 вируса A/Texas/1/77 (H3N2). Все остальные гены принадлежат вирусу PR8). Вирусы A/Brisbane/59/07 (BR59) (H1N1) и A/Brisbane/10/07 (BR10) (H3N2) – получены из Национального института биологических стандартов и контролей (NIBSC: National Institute of Biological Standards and Controls, Великобритания).

Первичный изолят H3N2 вируса гриппа A/Vienna/25/07 (VI25) (подобный вирусу A/Wisconsin/67/05) получен из Института вирусологии (Вена, Австрия). Изолят пандемического вируса гриппа подтипа H1N1 (H1N1pdm) A/St.Petersburg/14/10 (SP14) и низкопатогенный H5N3 вирус гриппа птиц A/duck/Singapore/3/97 (dkSG03) получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (Россия).

### Культивирование и титрование вирусов

Вирусы накапливали в аллантоисной полости 10–12-суточных куриных эмбрионов. Аллантоисную

жидкость собирали через 48 ч после инфицирования. При культивировании вирусов в культуре Vero в бессывороточной среде OptiPRO с 4-мМ L-глутамином добавляли 250 нг/мл Амфотерицина Б (“Bristol Myers Squibb”, Австрия) и 5 мкг/мл трипсина (“Sigma-Aldrich”, Австрия). Культивирование вирусов в клетках MDCK проводили в бессывороточной среде OptiPRO с добавлением 5 мкг/мл трипсина. Зараженные вирусами клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Инфекционный титр вируса определяли титрованием в куриных эмбрионах и выражали как величину 50%-ой эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД<sub>50</sub>/мл), значение которой рассчитывали методом Рида и Мюнха (Reed & Muench [12]).

### Гемолиз тест

В микропробирки с 50 мкл вируса с титром 128 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) вносили по 150 мкл 1%-ой суспензии эритроцитов человека и инкубировали 1 ч на льду. Пробирки центрифугировали при 400 g, супернатант удаляли, а к полученным осадкам добавляли 250 мкл 0.15-М цитратного буфера с pH от 5.1 до 7.0 и инкубировали при 37°C 1 ч, после чего центрифугировали при 400 g. Из каждой пробирки отбирали 200 мкл супернатанта, вносили в лунку 96-луночного планшета и определяли содержание гемоглобина, высвободившегося в результате гемолиза эритроцитов, измеряя оптическую плотность при длине волны 415 нм (OD<sub>415</sub>). Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов.

### Температурная стабильность вирусов

Вирусы инкубировали при 58°C в течение различных интервалов времени – от 0 до 60 мин. Контрольные пробы параллельно инкубировали на льду 60 мин, после чего для всех образцов определяли титр гемагглютинации с 0.5%-ой суспензией куриных эритроцитов.

### Связывание вирусов с моноклональными анти-НА-антителами IIF4

Подробный протокол метода приведен в статье Варечковой (Vareckova) и соавт. [13]. Кратко, 96-луночные панели (“Nunc”, Дания) покрывали вирусом с титром 40 ГАЕ, разведенным в фосфатно-солевом буфере (PBS), выдерживали в течение ночи при 4°C, затем вносили 300 мкл MES-буфера с pH от 4.6 до 7.5 и инкубировали при 37°C 15 мин, после чего лунки промывали PBS и блокировали раствором 0.5%-ого I-BLOCK (“Invitrogen”) с 0.5% Tween 20 в PBS. В каждую лунку вносили 100 нг моноклональных антител IIF4 (любезно предоставлены Е. Варечковой, Академия наук Словакии: Dr. E. Vareckova, Slovak Academy of Sciences) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. В отмытые лунки вносили анти-мышинные антитела IgG(γ), меченые пероксидазой хрена (“KPL”, США), инкубировали и добавляли субстрат ТМВ (“KPL”). Реакцию останавливали раствором 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли значения OD<sub>450</sub>. Результаты представлены как среднее четырех измерений при указанном значении pH.

### Инфекционность вирусов при различных значениях pH

Клетки Vero инфицировали вирусом (множественность инфекции, MOI, 2), разведенным в MES-буфере с pH 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0 или 7.5 с добавлением амфотерицина Б (250 нг/мл). Через 30 мин инкубации при 37°C инокулят удаляли, а клетки продолжали инкубировать в среде OptiPRO с добавлением 4 мМ L-глутамина при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 ч, после чего их фиксировали 4%-ным параформальдегидом (“Sigma-Aldrich”, Австрия), обрабатывали 1%-ным Triton X-100 (“Merck”, Германия) и блокировали в течение ночи 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (“Sigma-Aldrich”) в PBS. Далее клетки окрашивали моноклональными антителами к вирусному белку NP (“Millipore”, США) с последующим выявлением флуоресцентно-мечеными анти-мышинными антителами Alexa Fluor 488 (“Invitrogen”) методом флуоресцентной микроскопии.

Трахеобронхиальные эпителиальные клетки человека заражали вирусом (MOI 1) в MES-буфере с pH 5.6, 5.8 или 7.5 и инкубировали 1 ч при 35°C. После удаления инокулята клетки трижды промывали PBS и продолжали инкубирование еще 8 ч, затем клетки фиксировали и красили с помощью меченых пероксидазой хрена моноклональных анти-NP-антител, как описано выше, с последующим добавлением субстрата DAB.

Клетки MDCK инфицировали вирусами (MOI 2) в MES-буфере при указанных значениях pH. Через 5 ч после инфицирования клетки снимали с пластика с помощью 0.2% раствора трипсин-EDTA (“Cellgro”), фиксировали буфером Fix/Perm (BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit), блокировали 1%-ным раствором фетальной телячьей сыворотки в PBS в течение ночи, пермебилизировали и окрашивали FITC-мечеными анти-NP-антителами (“Imagen”, Великобритания). Процентное содержание инфицированных клеток измеряли методом проточной цитометрии с использованием программы EXPO 32 (“Coulter Immunotech”).

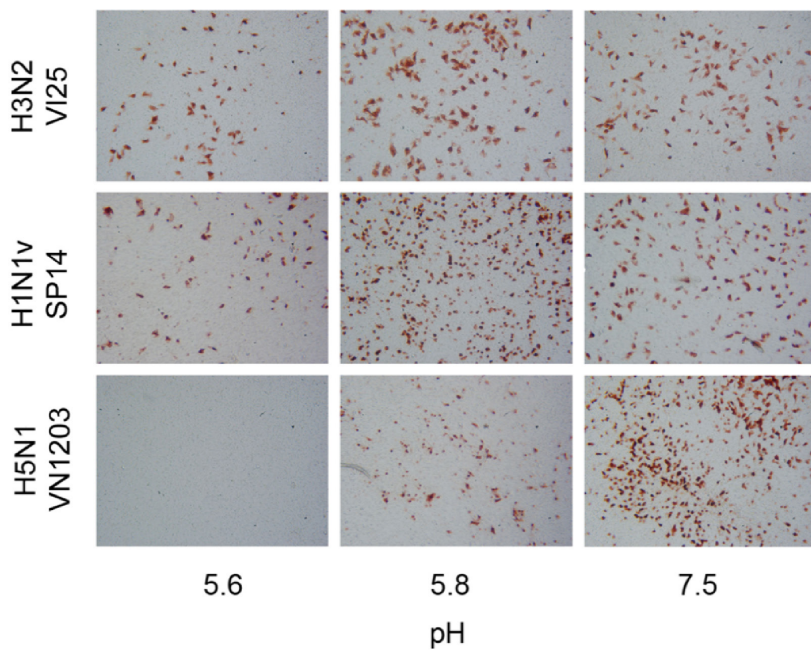
### Получение инактивированных вирусных препаратов

Вирусы накапливали в куриных эмбрионах, клетках Vero или MDCK, как описано выше, инактивировали формалином с конечной концентрацией 0.015% в течение 24.5 ч при 32°C, осветляли и концентрировали ультрацентрифугированием при 60 000 g в роторе 45Ti (“Beckman Coulter”). Полученный осадок ресуспендировали в PBS и очищали ультрацентрифугированием в 20–60% градиенте концентраций сахаразы при 110 000 g в роторе SW40 (“Beckman Coulter”). Очищенный вирус ресуспендировали в PBS.

### Определение содержания НА в вирусных препаратах

Содержание НА в вакцинных препаратах определяли методом одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД) по методу Вуда (Wood) и др. [14].





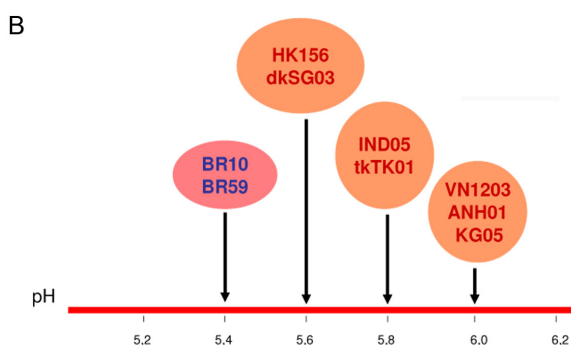
**Рис. 1.** Инфекционность вирусов в трахеобронхиальных клетках человека при различных значениях pH.

Дифференциальную культуру трахеобронхиальных эпителиальных клеток человека инфицировали эпидемическими штаммами вирусов гриппа: VI25 (H3N2), SP14 (H1N1pdm) и VN1203 (H5N1) – при различных значениях pH. Инфицированные клетки выявляли по окрашиванию вирусного белка NP.



**Рис. 2.** Инфекционность вирусов в клетках MDCK при различных значениях pH.

(А) Клетки MDCK заражали вирусом, разведенным MES-буфером с указанным значением pH. Зараженные клетки выявляли по окрашиванию с анти-NP-антителами и подсчитывали методом проточной цитометрии. Указан процент инфицированных клеток. (Б) Сравнение стабильности вирусов при кислых значениях pH. За порог стабильности принимали значение pH, при котором инфицировано  $\geq 50\%$  клеток.



## Обработка трипсином

Очищенные концентрированные препараты вирусов KG05 и KG05-58 разводили в PBS (pH 7.4) до концентрации 15 мкг/мл (по суммарному белку) и инкубировали с ТРСК-обработанным трипсином (100 мкг/мл; “Sigma”) в течение 2 ч при 37°C. Затем пробы прогревали 5 мин при 95°C в буфере для проб и анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Содержание белка в пробах определяли методом Quant-iT Protein Assay (“Invitrogen”).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### При кислых значениях pH вирусы гриппа птиц H5N1 менее стабильны, чем сезонные штаммы

С целью сравнения стабильности вирусов гриппа H5N1 с сезонными изолятами вирусов гриппа А при кислых значениях pH мы оценили их инфекционность в культуре дифференцированных трахеобронхиальных клеток при пониженных (5.6 и 5.8) и нейтральном (7.5) значениях pH. Первичные изоляты VI25, SP14 и реассортант VN1203 (H5N1) с одинаковым значением MOI разводили буфером с соответствующим pH и наносили на клетки; через 1 ч буфер заменяли на нейтральную среду и продолжали инкубацию еще 8 ч. Эффективность инфекции оценивали по содержанию белка NP (Рис. 1). Мы обнаружили, что оба вируса гриппа человека инфицировали клетки при pH 5.6 и 5.8, тогда как вирус VN1203 эффективно заражал клетки при pH 7.5 и 5.8, но терял инфекционность при pH 5.6. С целью выяснить, присуще ли это свойство другим высокопатогенным птичьим вирусам гриппа

H5N1, мы получили аналогичные реассортанты, содержащие поверхностные антигены HA и NA вирусов этого подтипа из различных клайдов, а именно: НК156, (клайд 1), IND05 (клайд 2.1), ANH01 (клайд 2.2), tkTK01 (клайд 2.2), KG05 (клайд 2.2) – и сравнили их инфекционность в диапазоне pH 5.2–6.0 на клетках MDCK, измеряя число инфицированных клеток методом проточной цитометрии (Рис. 2А). Оказалось, что только вирусы гриппа человека BR59 и BR10 заражали клетки при pH 5.4 (62% и 68% соответственно). Низкопатогенный вирус гриппа птиц dkSG03 (H5N3) и высокопатогенный вирус НК156 (H5N1) инфицировали клетки при pH 5.6 (74% и 76% соответственно), тогда как все остальные вирусы гриппа птиц были инфекционны только при pH ≥ 5.8. На основе полученных результатов построена диаграмма стабильности вирусов (Рис. 2Б).

### Стабильность вирусов KG05 и KG05-58 при кислых значениях pH и повышенной температуре

Ранее нами показано, что введение мутации 58Lys→Ile в HA2 субъединицу H5 HA приводит к снижению порога pH-активации и повышению стабильности вируса при кислом значении pH и повышенной температуре. Эти результаты согласуются с многочисленными данными других авторов [15-18]. С целью выяснить, влияет ли стабильность вирусов на качество инактивированных вакцинных препаратов, мы ввели замену Lys58Ile в HA низкостабильного вируса KG05 (Рис. 3) и получили два реассортанта, различающихся только по этой позиции. Оба вируса, KG05 и KG05-58, содержали трипсинозависимый модифицированный сайт расщепления HA, хорошо размножались в куриных эмбрионах, достигая гемагглютинирующего титра 512 и инфекционного титра 9.0 lgЭИД<sub>50</sub>/мл (Рис. 4). Пороги

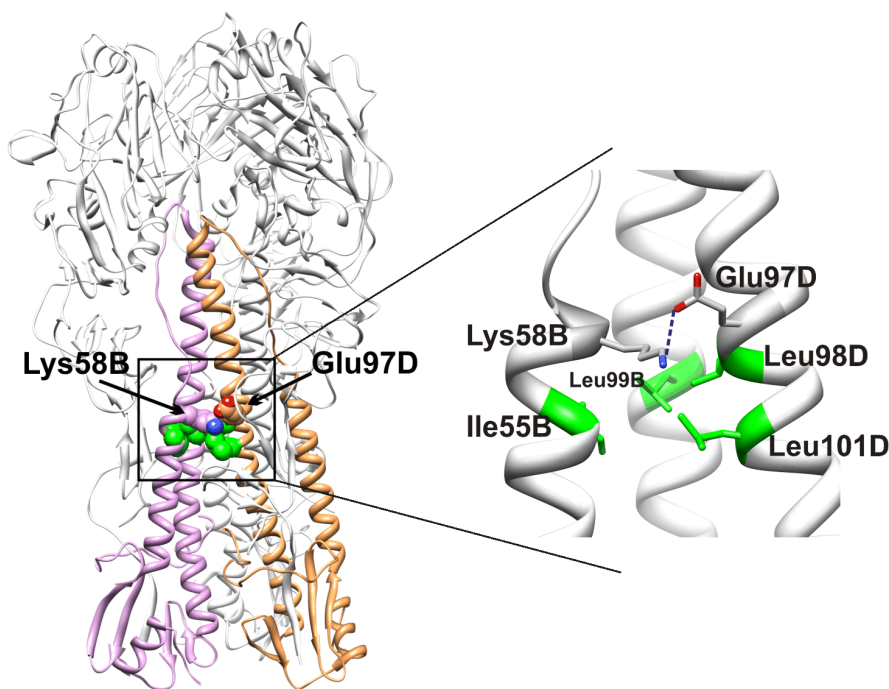
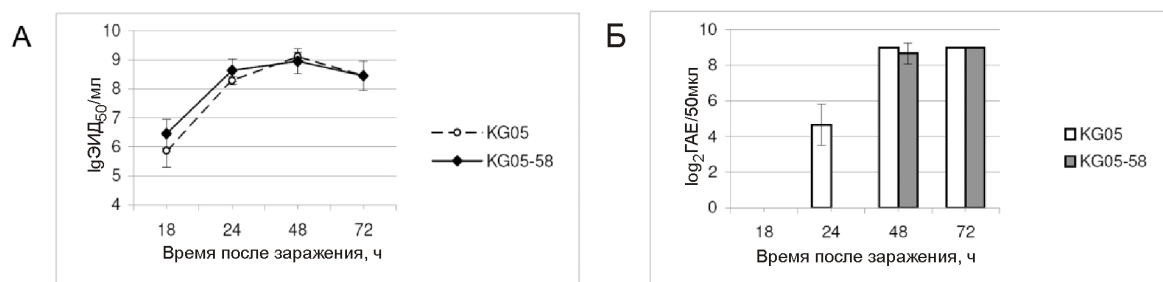


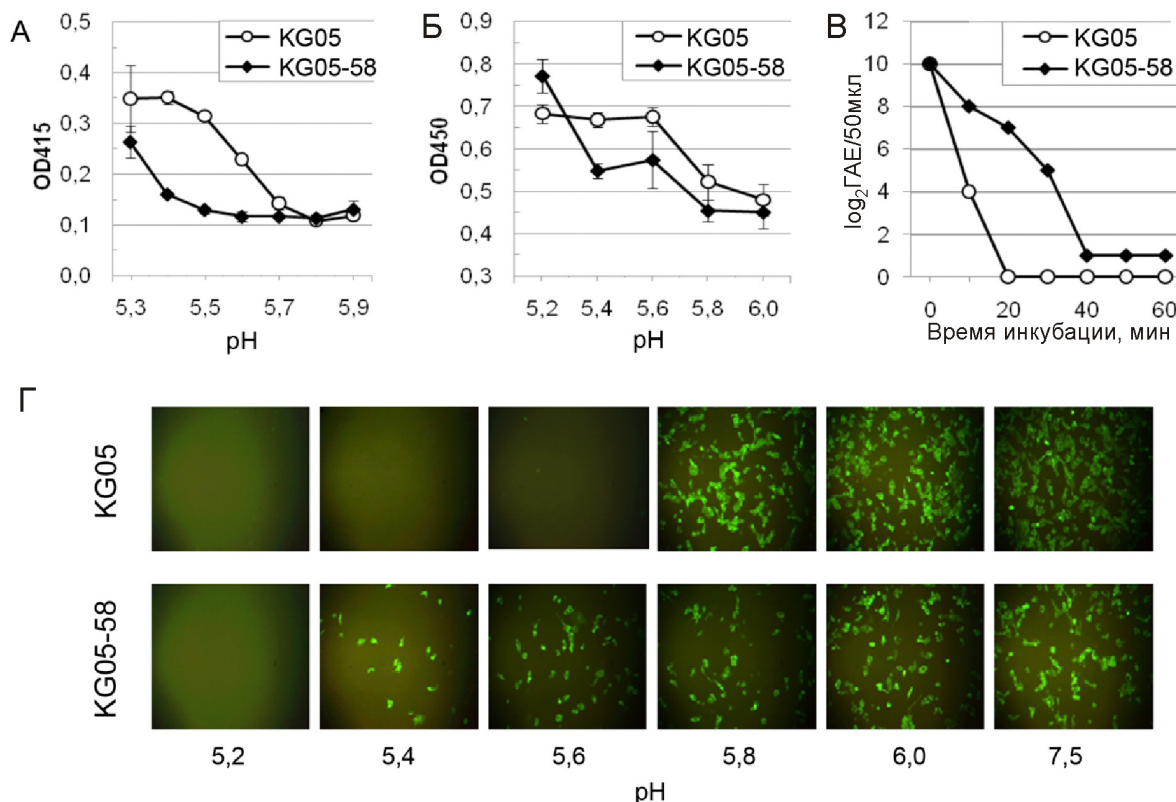
Рис. 3. Трехмерная структура молекулы HA (вид сбоку).

Указаны аминокислотные остатки, которые могут влиять на стабильность HA. Структура получена с помощью программы Chimera v1.5.3 [19], модель 2IBX (Protein Data Bank).



**Рис. 4.** Кинетика роста вирусов KG05 и KG05-58 в куриных эмбрионах.

(А) Инфекционный титр вирусов в куриных эмбрионах. (Б) Гемагглютинирующая активность вирусов. Результаты представлены как среднее трех независимых экспериментов.



**Рис. 5.** Сравнение стабильности вирусов KG05 и KG05-58 при различных значениях pH и повышенной температуре.

(А) pH-зависимость HA-индуцированного слияния вирусов KG05 и KG05-58 с эритроцитами в гемолиз-тесте. (Б) pH-зависимость связывания анти-HA-моноклональных антител ПФ4 с вирусами KG05 и KG05-58. (В) Стабильность вирусов KG05 и KG05-58 при 58°C. (Г) Инфекционность вирусов KG05 и KG05-58 в клетках Vero в зависимости от pH.

pH-активации вирусов сравнивали в тесте гемолиза эритроцитов. Как показано на рисунке 5А, вирус KG05 вызывал слияние мембран при pH 5.6–5.7, тогда как для мутантного вируса эффект наблюдали при pH 5.3–5.4.

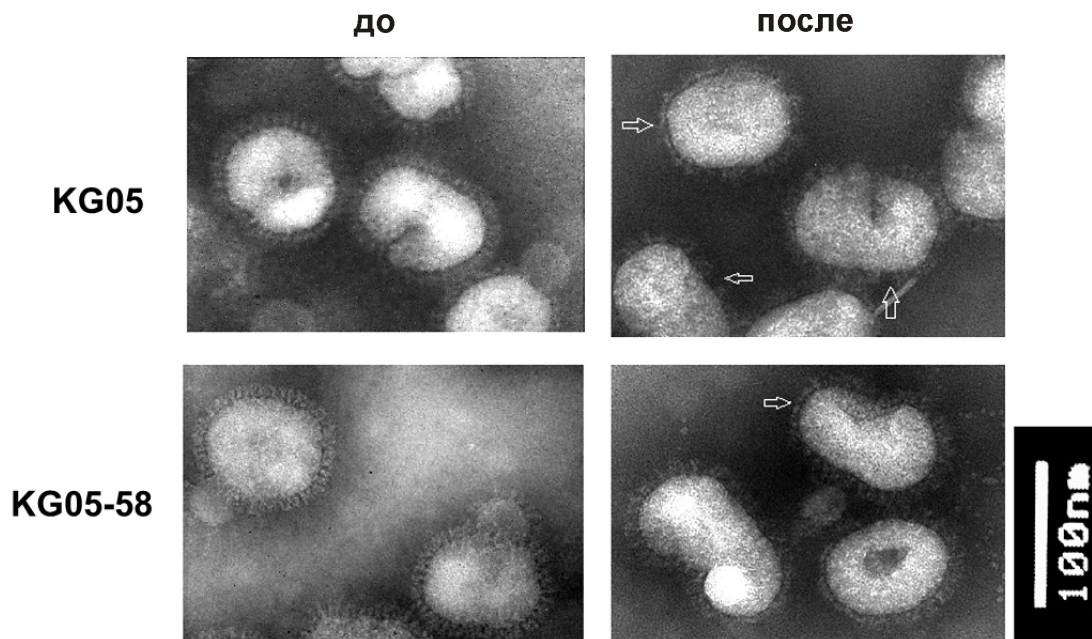
Аналогичный сдвиг в значениях pH регистрировали при взаимодействии исходного вируса и мутантного варианта с моноклональными антителами ПФ4, специфичными к конформации HA, которая реализуется при кислом значении pH (Рис. 5Б). Так, ПФ4 эффективно связывались с вирусом KG05 при pH 5.6, тогда как для вируса KG05-58 такой же уровень достигался только при pH 5.3. Из этого следует, что конформационный переход в «закисленную» форму HA происходит в мутантном штамме при гораздо более низком значении pH, чем в родительском вирусе.

При исследовании инфекционности вирусов на культуре Vero обнаружено, что мутант KG05-58 приобретал устойчивость при низких значениях pH и инфицировал клетки при pH 5.4, тогда как для исходного вируса KG05 порог инфицирования соответствовал pH 5.8 (Рис. 5Г).

При анализе стабильности вирусов при повышенной температуре выявлено, что вирус KG05 полностью терял гемагглютинирующую активность через 20 мин инкубирования при 58°C, тогда как для мутантного варианта KG05-58 этот период составлял 40 мин (Рис. 5В).

Полученные данные подтверждают, что мутация 58LysI→Ile придает повышенную стабильность белку HA вируса гриппа KG05 при низком значении pH и повышенной температуре.





**Рис. 6.** Электронная микроскопия вирусов KG05 и KG05-58.

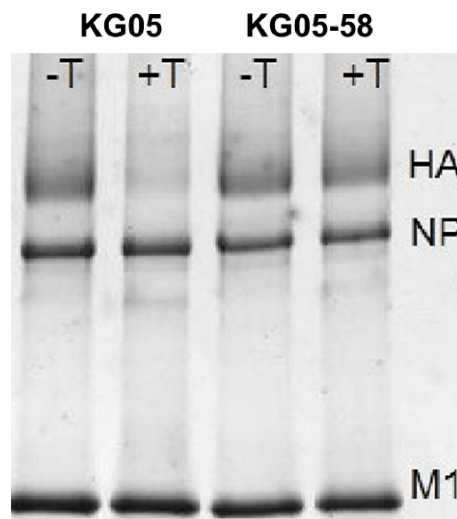
Очищенные инактивированные вирусы в нативном состоянии или после однократного замораживания/размораживания. Стрелками указаны поврежденные шипы НА.

#### Анализ вирусов KG05 and KG05-58 методом электронной микроскопии

Структуру и морфологию очищенных инактивированных вирусных частиц исходного, KG05, и мутантного, KG05-58, вариантов анализировали методом электронной микроскопии. Как показано на рисунке 6, оба вируса содержали шипы правильной формы и одинаковой длины. Интересно, что после одного цикла замораживания/размораживания шипы вируса KG05 частично деформировались, тогда как у вируса KG05-58 их морфология не изменилась. Таким образом, вирионы KG05-58 оказались более устойчивы к процедуре замораживания/размораживания по сравнению с вирусом KG05.

#### Чувствительность НА вирусов KG05 и KG05-58 к обработке трипсином

Белок НА, как известно, в нативной форме резистентен к действию трипсина и других протеаз. Происходящее при кислом значении pH изменение конформации НА влечет за собой повышение чувствительности молекулы к расщеплению протеазами [20]. Для сравнения чувствительности вирусов KG05 и KG05-58 к расщеплению трипсином концентрированные очищенные препараты (с одинаковой концентрацией общего белка) обрабатывали трипсином и оценивали целостность НА методом электрофореза в ПААГ. Как показано на рисунке 7, в исходных образцах вирусов KG05 и KG05-58 содержание НА было сравнимым, а после обработки трипсином в препарате KG05 исследуемый белок полностью исчезал, тогда как на мутированный вариант НА в составе вируса KG05-58 трипсин практически не действовал. Это наблюдение подтверждает, что значительная часть НА



**Рис. 7.** Чувствительность вирусов KG05 и KG05-58 к действию трипсина.

Очищенные вирусы KG05 и KG05-58 обрабатывали 100 мкг/мл трипсина в течение 2 ч при 37°C. Вирусные белки разделяли методом электрофореза в ПААГ в невосстанавливающих условиях.

в препарате вируса KG05 находится в чувствительной к расщеплению конформации, характерной для кислого pH, в отличие от KG05-58.

#### Урожайность вирусов KG05 и KG05-58 по НА (метод ОРИД)

Основным методом для оценки количества антигена в препаратах инактивированных противогриппозных вакцин служит метод ОРИД, позволяющий измерить содержание НА в препарате по взаимодействию с анти-НА-антителами стандартной антисыворотки.

Мы провели сравнительный анализ содержания НА в инактивированных очищенных препаратах вирусов KG05 и KG05-58 и, кроме того, проверили, влияет ли субстрат (куриные эмбрионы, клетки Vero или клетки MDCK), в котором культивируют вирус, на выход этого антигена.

Содержащие вирус аллантаисные и культуральные жидкости инактивировали, вирусы очищали центрифугированием в градиенте концентраций сахарозы и полученные концентраты выравняли по содержанию общего белка (100 мкг/мл). В таблице представлены основные характеристики полученных препаратов. Оказалось, что препарат вируса KG05, выращенного в культуре клеток MDCK, содержал в 1.8 раз меньше НА, чем аналогичный препарат вируса KG05-58 (Рис. 8). В образцах, полученных в культуре Vero, содержание НА было близким: в вирусе KG05 в 1.14 раз меньше, чем в KG05-58. Не выявлено достоверных различий для препаратов вирусов, накопленных в куриных эмбрионах. Интересно отметить, что препараты мутантного варианта – вируса KG05-58, выращенного в культуре клеток MDCK и Vero, содержали соответственно в 1.9 и 1.5 раз больше общего белка, чем аналогичные препараты вируса KG05 (Табл.).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании изучено влияние конформационной стабильности НА высокопатогенных вирусов гриппа птиц подтипа H5N1 на свойства полученных из них препаратов инактивированных вакцин. Сравнивая вирусы этого подтипа, которые в соответствии с их антигенными характеристиками относятся к разным клейдам, а именно: HK156, VN1203 (клейд 1), IND05 (клейд 2.1.3), KG05, tkTk01 (клейд 2.2.1), ANH01 (клейд 2.3.4), а также низкопатогенный H5N3 вирус гриппа птиц dkSG03 с сезонными вирусами гриппа человека BR59 (H1N1) и BN10 (H3N2), мы обнаружили, что все исследованные вирусы гриппа птиц более чувствительны к кислым значениям pH, чем сезонные штаммы вирусов человека. На модели вируса KG05 было показано, что стабильность НА при кислом pH и повышенной температуре можно повысить путем введения единичной замены 58Lys→Ile в субъединицу НА2. Позиция 58 расположена в стебле НА и может стабилизировать структуру

белка в составе тримера (шпильки НА на поверхности вируса сформированы гомотримерами НА) за счет дополнительных гидрофобных взаимодействий между НА2 разных субъединиц НА (Рис. 3Б) [21].

Вирус KG05-58, содержащий модифицированный НА, вызывал слияние с мембраной эритроцитов при значениях pH 5.3–5.4, близких к показателям первичных изолятов вируса гриппа человека (pH 5.0–5.4) [22].

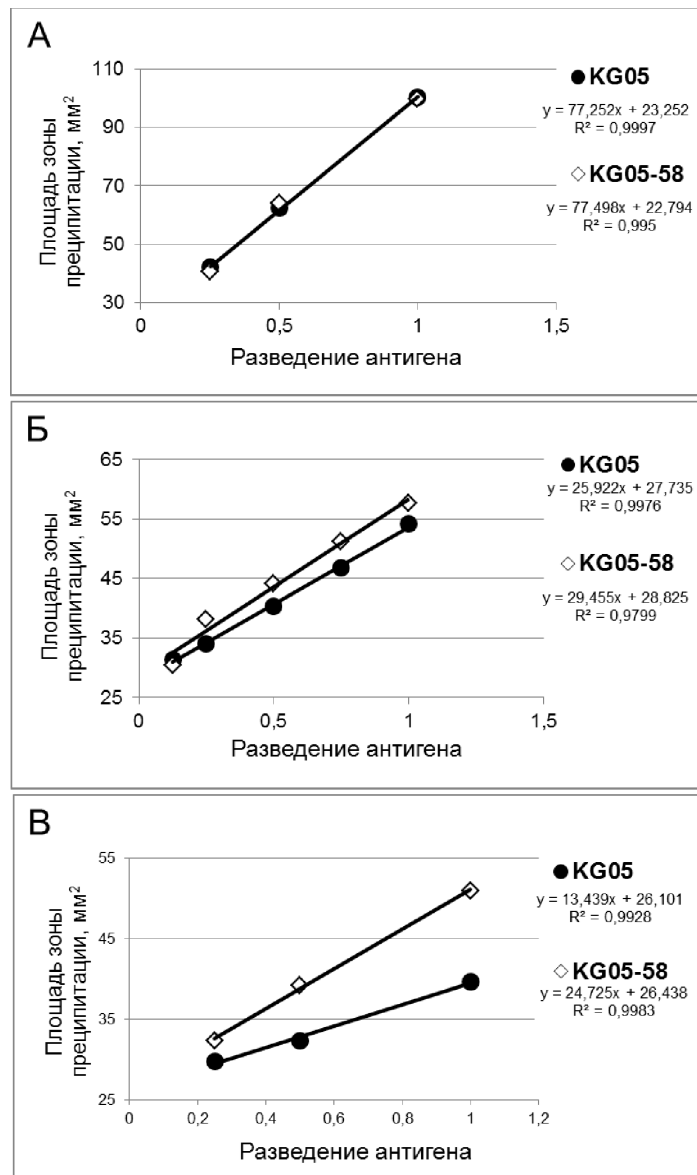
Сравнивая аффинность связывания исходного и мутантного вирусов с моноклональными антителами IF4, распознающими «закисленную» конформацию НА, мы показали, что у мутантного варианта порог связывания с IF4 сдвинут в кислую область pH по сравнению с исходным вирусом. Мутантный вирус оказался более устойчив к процедуре замораживания/размораживания, когда в результате кристаллизации изменяются локальные концентрации солей буфера, что может вызвать резкое изменение значений pH и тем самым индуцировать конформационные изменения НА [23]. Кроме того, белок НА в составе вируса KG05-58 был резистентен к обработке трипсином в тех же условиях, когда НА вируса KG05 полностью гидролизован.

Таким образом, нами показано, что в составе вириона вируса гриппа птиц подтипа H5N1 белок НА достаточно легко переходит в конформацию, характерную для кислой среды. Эти изменения приводят к значительному снижению уровня иммунокомпетентного НА – как это показано методом ОРИД. Для препаратов вирусов KG05 и KG05-58 наибольшие потери выявлены для KG05, накопленного в клетках MDCK; в случае использования культуры Vero разница менее выражена, а для вирусов, полученных в куриных эмбрионах статистически достоверных различий не выявлено вообще. Поскольку в сравниваемых препаратах KG05 и KG05-58 содержание общего белка было одинаковым, сниженный уровень НА в вирусе KG05 в культурах клеток млекопитающих может быть результатом «повреждения» этого белка в процессе концентрации и очистки. Наименьшие потери выявлены при продуцировании вирусов в куриных эмбрионах, что можно объяснить более высоким значением pH (8.0 - 8.3) аллантаисной жидкости по сравнению с pH клеточной среды (7.4) и стабилизирующим действием аллантаисных белков [24].

**Таблица.** Характеристика препаратов вирусов KG05 и KG05-58

Субстрат	Вирус	Урожайность		Очищенные инактивированные препараты		
		Объем, мл	Титр, ГАЕ	Объем, мл	Титр, ГАЕ	Общий белок, мг/мл
КЭ	KG05	100	128	0.50	12800	1.78
	KG05-58	100	128	0.50	12800	1.92
Vero	KG05	100	16	0.40	400	0.40
	KG05-58	100	16	0.40	800	0.61
MDCK	KG05	100	16-32	0.25	320	0.30
	KG05-58	100	16	0.25	640	0.59





**Рис. 8.** Содержание НА в препаратах вирусов KG05 и KG05-58.

Относительное содержание НА в очищенных препаратах вирусов, выращенных в куриных эмбрионах (А), клетках Vero (Б) и MDCK (В), измеряли методом ОРИД. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов.

Харви (Harvey) с соавт. показали, что содержание НА в вакцинных препаратах, произведенных из вирусов серотипа H5N1, составляло примерно 78% от количества, получаемого из вируса гриппа человека A/PR/8/34 (H1N1) [25]. Авторы предположили, что это связано с более низким относительным содержанием НА в частицах вирусов H5N1. На основании полученных нами результатов можно предположить, что данный эффект скорее связан с низкой конформационной стабильностью НА вирусов H5N1, приводящей к его быстрой деградации.

Нативная структура НА представляет собой метастабильное состояние, которое при кислом значении рН преодолевает кинетический барьер и переходит в термодинамически более стабильную форму. В результате этой перестройки нейтрализующие антигенные детерминанты НА – в нативном вирионе они расположены на поверхности глобулярной части НА1 и именно на них вырабатываются нейтрализующие

вирус антитела – маскируются, а обычно скрытые эпитопы субъединицы НА2 экспонируются. Такое изменение конформации может быть вызвано не только изменением рН, но и повышением температуры или денатурирующими агентами [26]. Это позволяет предположить, что в процессе производства вакцины из вирусов гриппа H5N1, под действием различных дестабилизирующих факторов, НА может легко терять нативную конформацию переходя в более стабильную «закисленную» форму. При испытании H5N1-вакцин, действительно, отмечается повышенная выработка антител на антигенные детерминанты НА2, что приводит к измененному (по сравнению с обычно наблюдаемым) спектру антител и, как следствие, низкой иммуногенности этих вакцин. Данная гипотеза согласуется с данными Курана (Khurana) и соавт. [27], которые показали, что антитела в сыворотках вакцинируемых субъединичной вакциной H5N1 имели низкую аффинность к пептидам

субъединицы HA1 (участок 28–319), и обладали высокой аффинностью к эпитопам субъединицы HA2. Содержание нейтрализующих антител в вакцине повышалось в присутствии адъюванта MF59, возможно, за счет его стабилизирующего действия.

Таким образом, низкая конформационная стабильность HA имеет негативные последствия для качества вакцин, снижая количество образующихся нейтрализующих антител и протективную эффективность препаратов [28,29]. Следует заметить, что низкая конформационная стабильность HA вирусов H5N1 также способствует их высокой склонности к агрегации [30]. В образовании агрегатов задействованы гидрофобные участки HA2. Наличие в вакцине агрегатов крайне нежелательно еще и потому, что они вызывают дополнительные побочные эффекты у вакцинируемых [31].

Ранее нами показано, что интраназальная вакцинация живым вирусом также зависит от конформационной стабильности HA, которая определяет эффективное проникновение вируса в эпителиальные клетки верхнего респираторного тракта и обеспечивает более высокий уровень иммуногенности [15,32]. В полном соответствии с этими результатами

и данные, полученные Имай (Imai) и др. [33]. Авторы выявили, что низкая стабильность высокопатогенных штаммов вируса гриппа – одна из причин их низкой трансмиссивности у млекопитающих.

Таким образом, нами показано, что низкая конформационная стабильность HA высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц определяет низкий выход иммунокомпетентного HA в вакцинных препаратах этих вирусов и, возможно, их низкую иммуногенность. Однако для подтверждения последнего требуются дальнейшие исследования.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-31397), Центра исследований инфекционных заболеваний Министерства образования и научных исследований (Германия), и гранта SP5B-CT-2007-044512 Европейской комиссии.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bresson JL, Perronne C, Launay O, Gerdil C, Saville M, Wood J, Hoschler K, Zambon MC. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial. *Lancet* 2006; 367,1657-64.
2. Treanor JJ, Campbell JD, Zangwill KM, Rowe T, Wolff M. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N Engl J Med* 2006; 354,1343-51.
3. Ehrlich HJ, Muller M, Oh HM, Tambyah PA, Joukhadar C, Montomoli E, Fisher D, Berezuk G, Fritsch S, Low-Baselli A, Vartian N, Bobrovsky R, Pavlova BG, Pollabauer EM, Kistner O, Barrett PN. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N Engl J Med* 2008; 358, 2573-84.
4. Nakowitsch S, Waltenberger AM, Wressnigg N, Ferstl N, Triendl A, Kiefmann B, Montomoli E, Lapini G, Sergeeva M, Muster T, Romanova JR. Egg- or cell culture-derived hemagglutinin mutations impair virus stability and antigen content of inactivated influenza vaccines. *Biotechnol J* 2014; 9 (3), 405-14.
5. Maeda T, Ohnishi S. Activation of influenza virus by acidic media causes hemolysis and fusion of erythrocytes. *FEBS Lett* 1980; 122, 283-7.
6. Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. *Vaccine* 1985; 3, 215-8.
7. Gray TE, Guzman K, Davis CW, Abdullah LH, Nettesheim P. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14, 104-12.
8. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101, 4620-4.
9. Romanova J, Krenn BM, Wolschek M, Ferko B, Romanovskaja-Romanko E, Morokutti A, Shurygina AP, Nakowitsch S, Ruthsatz T, Kiefmann B, Konig U, Bergmann M, Sachet M, Balasingam S, Mann A, Oxford J, Slais M, Kiselev O, Muster T, Egorov A. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. *PLoS One* 2009; 4, e5984.
10. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97, 6108-13.
11. Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Tagawa-Sakai Y, Yamada S, Ito H, Ito T, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kawaoka Y. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine* 2006; 24, 3669-76.
12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 1938; 27, 493-7.
13. Vareckova E, Wharton SA, Mucha V, Gocnik M, Kostolansky F. A monoclonal antibody specific to the HA2 glycoprotein of influenza A virus hemagglutinin that inhibits its fusion activity reduces replication of the virus. *Acta virologica* 2003; 47, 229-36.
14. Wood JM, Schild GC, Newman RW, Seagroatt V. An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. *Journal of biological standardization* 1977; 5, 237-47.
15. Krenn BM, Egorov A, Romanovskaya-Romanko E, Wolschek M, Nakowitsch S, Ruthsatz T, Kiefmann B, Morokutti A,

- Humer J, Geiler J, Cinatl J, Michaelis M, Wressnigg N, Sturlan S, Ferko B, Batishchev OV, Indenbom AV, Zhu R, Kastner M, Hinterdorfer P, Kiselev O, Muster T, Romanova J. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS ONE* 2011; 6, e18577.
16. Reed ML, Bridges OA, Seiler P, Kim JK, Yen HL, Salomon R, Govorkova EA, Webster RG, Russell CJ. The pH of activation of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity and transmissibility in ducks. *J Virol* 2009; 84, 1527-35.
  17. Smeenk CA, Wright KE, Burns BF, Thaker AJ, Brown EG. Mutations in the hemagglutinin and matrix genes of a virulent influenza virus variant, A/FM/1/47-MA, control different stages in pathogenesis. *Virus Res* 1996; 44, 79-95.
  18. Daniels RS, Downie JC, Hay AJ, Knossow M, Skehel JJ, Wang ML, Wiley DC. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* 1985; 40, 431-9.
  19. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004; 25, 1605-12.
  20. Skehel JJ, Bayley PM, Brown EB, Martin SR, Waterfield MD, White JM, Wilson IA, Wiley DC. Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79, 968-72.
  21. Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, Skehel JJ. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105, 17736-41.
  22. Nakowitsch S, Waltenberger AM, Wressnigg N, Ferstl N, Triendl A, Kiefmann B, Montomoli E, Lapini G, Sergeeva M, Muster T, Romanova JR. Egg- or cell culture-derived hemagglutinin mutations impair virus stability and antigen content of inactivated influenza vaccines. *Biotechnol J* 2014; 9, 405-14.
  23. Amorij JP, Meulenaar J, Hinrichs WL, Stegmann T, Huckriede A, Coenen F, Frijlink HW. Rational design of an influenza subunit vaccine powder with sugar glass technology: preventing conformational changes of haemagglutinin during freezing and freeze-drying. *Vaccine* 2007; 25, 6447-57.
  24. Eichelberger SL, Sultana I, Gao J, Getie-Kehtie M, Alterman M, Eichelberger MC. Potency under pressure: the impact of hydrostatic pressure on antigenic properties of influenza virus hemagglutinin. *Influenza Other Respir Viruses* 2013; 7, 961-8.
  25. Harvey R, Nicolson C, Johnson RE, Guilfoyle KA, Major DL, Robertson JS, Engelhardt OG. Improved haemagglutinin antigen content in H5N1 candidate vaccine viruses with chimeric haemagglutinin molecules. *Vaccine* 2010; 28, 8008-14.
  26. Carr CM, Chaudhry C, Kim PS. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94, 14306-13.
  27. Khurana S, Chearwae W, Castellino F, Manischewitz J, King LR, Honorkiewicz A, Rock MT, Edwards KM, Del Giudice G, Rappuoli R, Golding H. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Sci Transl Med* 2010; 2, 15ra5.
  28. Budimir N, Huckriede A, Meijerhof T, Boon L, Gostick E, Price DA, Wilschut J, de Haan A. Induction of heterosubtypic cross-protection against influenza by a whole inactivated virus vaccine: the role of viral membrane fusion activity. *PLoS ONE* 2012; 7, e30898.
  29. Wei CJ, Xu L, Kong WP, Shi W, Canis K, Stevens J, Yang ZY, Dell A, Haslam SM, Wilson IA, Nabel GJ. Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus. *J Virol* 2008; 82, 6200-8.
  30. Sato SB, Kawasaki K, Ohnishi S. Hemolytic activity of influenza virus hemagglutinin glycoproteins activated in mildly acidic environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80, 3153-7.
  31. Babiuk S, Skowronski DM, De Serres G, HayGlass K, Brunham RC, Babiuk L. Aggregate content influences the Th1/Th2 immune response to influenza vaccine: evidence from a mouse model. *J Med Virol* 2004; 72, 138-42.
  32. Nakowitsch S, Wolschek M, Morokutti A, Ruthsatz T, Krenn BM, Ferko B, Ferstl N, Triendl A, Muster T, Egorov A, Romanova J. Mutations affecting the stability of the haemagglutinin molecule impair the immunogenicity of live attenuated H3N2 intranasal influenza vaccine candidates lacking NS1. *Vaccine* 2011; 29, 3517-24.
  33. Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, Li C, Kawakami E, Yamada S, Kiso M, Suzuki Y, Maher EA, Neumann G, Kawakami Y. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 2012; 486, 420-8.