

ЖИВАЯ ГРИППОЗНАЯ ВАКЦИНА: ИТОГИ РАЗРАБОТОК И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

РУДЕНКО Л. Г., ЛАРИОНОВА Н. В., КИСЕЛЕВА И. В., ИСАКОВА-СИВАК И. Н.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»,
Санкт-Петербург

Руденко Л. Г., Ларионова Н. В., Киселева И. В., Исакова-Сивак И. Н. Живая гриппозная вакцина: итоги разработок и перспективы применения // Мед. акад. журн. 2010. Т.10. № 4. С. 235–239. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Массовый характер эпидемий гриппа, резкое повышение смертности (особенно среди детей и стариков), тяжелые осложнения – все эти причины определяют социально-экономическое значение эпидемий и пандемий гриппа и актуальность разработки средств и методов противогриппозной защиты. Вакцинопрофилактика и по сей день остается основным средством борьбы с гриппом. В настоящей статье обобщаются данные по разработке и внедрению живой холодоадаптированной реассортантной сезонной и пандемической гриппозной вакцины в России, обращая особое внимание на ее преимущества, а также на дальнейшие пути ее усовершенствования.

Ключевые слова: вирус гриппа, эпидемии, пандемии, живая гриппозная вакцина.

Rudenko L. G., Larionova N. V., Kiseleva I. V., and Isakova-Sivak I. N. Live influenza vaccine, development and further perspectives // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 4. P. 235–239. Research Institute of Experimental Medicine of RAMS, St. Petersburg, 197376, Russia.

Substantial health and economic burden from annual influenza epidemics makes it of high priority to develop the means to fight this infection. Vaccines are the cornerstone of public health intervention to mitigate influenza epidemics and pandemics. This paper presents a summary of the development and utilization of live cold-adapted influenza reassortant vaccine, both seasonal and pandemic, in Russia with special attention to its advantages as well as further research plans.

Key words: influenza virus, epidemics, pandemics, live influenza vaccine.

Для корреспонденции: Ларионова Наталья Валентиновна, Отдел вирусологии НИИ ЭМ СЗО РАМН, тел. раб. (812) 234–4292, E-mail: nvlarionova@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – острая вирусная инфекция с воздушно-капельным путем передачи, характеризующаяся острым началом, лихорадкой, общей интоксикацией и поражением респираторного тракта. Эпидемии гриппа происходят ежегодно, поражая до 15% населения Земного шара.

Кроме ежегодных эпидемий вирус гриппа А может вызывать и пандемии. Пандемии всегда являлись событиями мирового значения. Они возникли в результате появления высоко контагиозного вируса гриппа, к которому большая часть населения не имела иммунитета и, как следствие, практически глобальной восприимчивости людей к инфекции. Характерными особенностями пандемий являлись быстрота распространения гриппа по всем частям света, как правило, менее чем за год, и подверженность заболеванию более четверти всего населения. Помимо высокой смертности пандемии всегда отличались внезапностью возникновения вспышки заболевания, не позволяющей адекватно подготовиться к борьбе с инфекцией. В прошлом столетии отмечено три пандемии гриппа: «испанский грипп» А(Н1N1) 1918 г., «азиатский грипп» А(Н2N2) 1957 г. и «гон-

конгский грипп» А(Н3N2) 1968 г. «Испанка», которая считается самой крупной пандемией за всю историю человечества, унесла от 40 до 50 млн человек во всем мире.

В настоящее время активно дискутируется вопрос о возможности распространения новой пандемии гриппа. Опасность представляет не только широкое распространение подтипа H5N1 в популяции птиц, но и высокая летальность данного вируса для человека: из 498 зарегистрированных случаев заболевания людей гриппом H5N1 59% (294 случая) закончились летальным исходом [19].

13 апреля 2009 г. в Мексике был подтвержден первый случай заражения новым видом вируса, который назвали «свиным гриппом». Позже, когда был идентифицирован штамм возбудителя (А/Калифорния/07/2009), болезнь получила название «грипп H1N1». Появление и циркуляция данного вируса гриппа H1N1 в популяции людей привела к объявлению 11 июня 2009 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) шестой фазы предупреждения о пандемии [21]. Объявление этой фазы указывает на то, что началась глобальная пандемия. По данным ВОЗ на 23 мая 2010 г., лабораторно подтвержден-

ные случаи заражения вирусом гриппа H1N1 были зафиксированы в 214 странах. Количество случаев со смертельным исходом составило 18114 [20].

В плане предупреждения возникшей угрозы здоровью людей вакцинация является основным инструментом в борьбе с инфекцией, и, как показал мировой опыт борьбы с такими заболеваниями, как оспа, полиомиелит, корь, наиболее эффективными являются живые вакцины.

В настоящей статье обобщаются данные по разработке и внедрению живой холодадаптированной реассортантной сезонной и пандемической гриппозной вакцины (ЖГВ) в России, обращая особое внимание на ее преимущества, а также на дальнейшие пути ее усовершенствования.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ДРЕЙФОВЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА

Одним из преимуществ ЖГВ является ее способность вызывать перекрестную защиту против дрейфовых вариантов вируса гриппа. По данным клинических испытаний ЖГВ с учетом снижения числа острых респираторных заболеваний (ОРЗ) у привитых детей и взрослых, проведенных в 1986–2004 гг., эффективность вакцины варьировала в пределах 30–59% и зависела от степени антигенного родства между циркулирующими эпидемическими вирусами гриппа и штаммами, входящими в состав ЖГВ [2].

ДОЛГОВРЕМЕННАЯ ЗАЩИТА

В клинических испытаниях была продемонстрирована способность ЖГВ защищать от гриппоподобных заболеваний в течение длительного промежутка времени (16 мес после вакцинации в сезон 1991–1993 гг.). Было показано, что 40% детей, вакцинированных ЖГВ в предшествующий сезон, были защищены и в следующем эпидемическом сезоне, тогда как при иммунизации инактивированной вакциной (ИГВ) такой защиты не наблюдалось [2, 3].

ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ЖИВУЮ ГРИППОЗНУЮ ВАКЦИНУ

Было показано, что, наряду с выработкой антигемагглютинирующих антител в крови, ЖГВ вызывает продукцию локальных IgA у людей, а также стимулирует Т- и В-клеточный иммунитет [7, 8]. При этом полноценность развития поствакцинального иммунитета определяет именно Т- и В-клеточная иммунологическая память, формирующаяся в ответ на введение вакцинного штамма [7]. В экспериментальных исследованиях показано, что определяющую роль в

защите от гриппа играет локальная В- и Т-клеточная иммунологическая память [14].

НЕАДАПТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Еще одним преимуществом ЖГВ является ее способность защищать привитых вскоре после вакцинации, еще до выработки специфического приобретенного иммунитета. Было продемонстрировано снижение уровня заболеваемости ОРЗ у детей в первую неделю после вакцинации. Такой эффект может быть объяснен тем, что вирусы гриппа эффективно стимулируют продукцию интерферона α/β , а также значительно повышают активность НК-клеток на ранних стадиях вирусной инфекции [1].

КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ЖИВАЯ ГРИППОЗНАЯ ВАКЦИНА

Штаммы ЖГВ эффективно реплицируются как в развивающихся куриных эмбрионах, так и в культуре клеток млекопитающих [12]. В чллендж-экспериментах на модели хорьков был продемонстрирован сопоставимый уровень защитной эффективности для «яичной» и культуральной ЖГВ. Если в группе хорьков, получивших препарат плацебо, «дикий» вирус выделялся из легких в количестве 106–107 геномных копий на 1 мл, то в обеих вакцинных группах вирус в легких полностью отсутствовал [13].

КОЛЛЕКТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ

Способность ЖГВ вызывать защиту у непривитых детей была продемонстрирована при широкомасштабной иммунизации учащихся школ. Уровень такой защиты зависел от степени охвата вакцинацией в каждой школе. Что же касается ИГВ, то, в противоположность ЖГВ, было показано, что иммунизация ИГВ не приводила к формированию коллективного иммунитета [18].

ЖИВАЯ ГРИППОЗНАЯ ВАКЦИНА ПРИ АСТМЕ

В настоящее время широко обсуждается проблема безопасности применения ЖГВ у больных астмой. В нашем отделе была разработана «мышинная модель» аллергической бронхиальной астмы и было показано, что, в отличие от инфекции «дикими» вирусами гриппа, иммунизация мышей живой гриппозной вакциной в стадии ремиссии заболевания не приводила к образованию аллергических реакций и воспалительным изменениям в легких животных [9]. В дальнейшем планируется изучение безопасности использования ЖГВ у людей, страдающих аллергией и иммунодефицитами.

ПАНДЕМИЧЕСКИЕ ЖИВЫЕ ГРИППОЗНЫЕ ВАКЦИНЫ

Первым H5N1 кандидатом в пандемические вакцины явилась ЖГВ на основе реассортанта A/17/H5, полученного методом классической реассортации в куриных эмбрионах холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) с апатогенным вирусом гриппа А/утка/Потсдам/86/92 (H5N2).

Доклинические исследования штамма А/17/H5 на мышцах, хорьках и обезьянах продемонстрировали аттенуирующий фенотип и защиту не только от гомологичного вируса, но и от высокопатогенных гетерологичных штаммов А(H5N1) [10, 17].

Клинические испытания на волонтерах подтвердили безвредность и генетическую стабильность вакцины из штамма А/17/H5. Вакцина стимулировала образование антигемагглютинирующих, нейтрализующих и секреторных антител, а также продукцию клеточных факторов (CD4⁺, CD8⁺) [14].

Вакцина из штамма А/17/H5 была зарегистрирована в России как потенциальный кандидат для защиты населения в случае наступления пандемии птичьего гриппа.

В 2009 г., в связи с возникновением пандемической ситуации в мире, вызванной вирусами, подобными А/Калифорния/7/2009 (H1N1), в отделе вирусологии на основе метода классической реассортации в куриных эмбрионах был подготовлен вакцинный штамм А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) [6].

Аттенуирующий фенотип и протективная активность вакцинного штамма были подтверждены в исследованиях на хорьках, проведенных в Роттердамском университете (ViroClinics, Роттердам, Нидерланды) по программе, организованной ВОЗ.

Результаты клинических исследований на взрослых, пожилых и детях показали, что результаты безвредности пандемической вакцины А(H1N1) были сопоставимы с аналогичными показателями сезонной ЖГВ. Были обоснованы критерии оценки иммуногенности, включающие показатели антигемагглютинирующих антител, IgG, секреторных IgA и цитокинов.

В настоящее время в отделе проводятся исследования холодоадаптированных и «диких» вирусов гриппа, включая вирусы гриппа птиц, что представляет собой один из главных вопросов безопасности применения ЖГВ в предпандемической и пандемической ситуациях. Предварительные данные показывают, что одновременное введение мышам СВА [15] или морским свинкам [4] холодоадаптированного и «дикого» вирусов не приводит к повышению уровня патогенности по сравнению с инфекцией одним «диким» штаммом. Фенотипический и генотипический анализ клонов показал, что все изоляты обладали

ts-фенотипом [4, 15], и при этом не образовывались реассортанты между холодоадаптированным и «диким» вирусами [15].

РАЗРАБОТКА ОБРАТНОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДОНОРА АТТЕНУАЦИИ А/ЛЕНИНГРАД/134/17/57 (H2N2)

Чтобы иметь возможность конструировать вакцинные штаммы ЖГВ генно-инженерными методами, нам необходимо было разработать обратногогенетическую систему для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Для этого все гены вируса были клонированы в векторы для обратной генетики, что позволило получить его генно-инженерную копию, неотличимую по нуклеотидным последовательностям от своего природного аналога. Кроме того, с помощью целенаправленного точечного мутагенеза нам удалось получить генно-инженерную копию «дикого» предшественника донора аттенуации А/Ленинград/134/57 (H2N2). Фенотип вирусов, полученных генно-инженерным путем, не отличался от фенотипа исходных вирусов. Таким образом, с разработкой обратногогенетической системы для отечественного донора аттенуации стало возможным получать любые генно-инженерные конструкции на его основе, в том числе и вакцинные штаммы против высокопатогенных вирусов гриппа [11].

ВАКЦИННЫЕ ШТАММЫ H5N1, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ

На основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) и А/Египет/321/2007 (H5N1) были сконструированы два вакцинных штамма – А/17/Вьетнам (H5N1) и А/17/Египет (H5N1). Эти штаммы были полностью апатогенны для кур, а их фенотипические свойства не отличались от свойств донора аттенуации. Если «дикие» вирусы эффективно размножались в широком диапазоне высоких температур и ограничено при низких, то вакцинные штаммы, так же как и донор, хорошо размножались при пониженных температурах, тогда как их репродукция при высоких температурах была резко снижена.

Сравнение уровня репликации во внутренних органах мышей исходного донора аттенуации и его генно-инженерной копии показало, что оба вируса вели себя идентично, не размножаясь в тканях мозга и слабо размножаясь в легких, тогда как в носовых ходах мышей вирусы активно реплицировались. Вакцинные штаммы А/17/Вьетнам и А/17/Египет

по репродукции в органах мышей были сопоставимы с донором аттенуации, тогда как их «дикие» предшественники поражали легкие и могли успешно преодолевать гематоэнцефалический барьер, что и объясняет их высокую патогенность.

Для изучения защитной эффективности вакцинных штаммов H5N1 была проведена двукратная иммунизация мышей Balb/c. После одной дозы сывороточные антитела вырабатывались у мышей слабо, и их среднегеометрические титры не достигали значения 20. Однако вторая доза вируса приводила к существенному увеличению титров антител в крови мышей, поэтому именно схема двукратной иммунизации была применена далее для изучения защитной эффективности вакцины. В качестве челлендж-вируса были использованы «дикие», высокопатогенные вирусы гриппа птиц А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) и А/Египет/321/2007 (H5N1). Было показано, что не только при гомологичном челлендже, но и в случае, когда челлендж-вирус отличался по антигенной структуре от вакцинного штамма, защита была 100%-й. При этом у не вакцинированных мышей, как и ожидалось, вирус выделялся в высоких титрах из всех органов, а смертность составила 100%. Интересно, что мыши, двукратно вакцинированные донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), несмотря на отсутствие специфических сывороточных антител против вирусов H5N1, были защищены от летальной инфекции в 80–100% случаев. При этом «дикий» вирус H5N1 выделялся в легких мышей в высоких титрах. Это говорит о том, что иммунизация ЖГВ может обеспечивать неспецифическую защиту привитых от гетерологичного «дикого» вируса гриппа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетний опыт изучения и активного применения ЖГВ в России доказал безопасность вакцины и ее эффективность даже в отношении дрейфовых вариантов вируса [1, 2]. Не обнаружено обратных реверсий мутаций, отвечающих за аттенуацию вакцинного штамма ЖГВ [5]. Иммунизация ЖГВ вызывала достаточно высокий уровень немедленной (первые 7 дней) защиты и стимулировала выработку локального иммунитета и уровней функциональных антител [1]. Вакцинация учащихся школ живой гриппозной вакциной обеспечивала население коллективным иммунитетом [18]. Иммунизация ЖГВ не вызывала аллергических реакций у детей и взрослых. У детей, вакцинированных ЖГВ, наблюдалось снижение уровня заболеваемости пневмонией и отитом на 40–50% [16]. Вакцинные штаммы, подготовленные в куриных эмбрионах и культуре клеток млекопитающих, продемонстрировали сопоставимые уровни защиты в экспериментах на хорьках [13]. Холодоадаптированный реассортантный штамм Лен17/Н5 был

аттенуирован для мышей, обезьян, кур и человека. В доклинических и клинических испытаниях была показана безопасность и ареактогенность вакцинного штамма Лен17/Н5. Мыши и обезьяны, привитые Лен17/Н5, были в значительной степени защищены от инфекции высокопатогенными вирусами А/Гонконг/483/97 (H5N1), А/Гонконг/213/2003 (H5N1), А/курица/Курган/02/2005 (H5N1) [10, 17].

Опыт работы с пандемической вакциной А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) показал возможность быстрой подготовки и апробации ЖГВ в экстренной ситуации, что многократно подчеркивалось в документах ВОЗ. ЖГВ была первой вакциной, готовой для применения в практике здравоохранения. Разработка обратногогенетической системы для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и успешное получение вакцинных штаммов H5N1 методом обратной генетики [11] являются весьма своевременными и обеспечивают подготовку ЖГВ при появлении высокопатогенных вариантов вируса гриппа.

Литература

1. Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г. Вакцинопрофилактика гриппа с помощью живой гриппозной вакцины // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2005. № 4. С. 13–16.
2. Григорьева Е.П., Дринецкий В.П., Дорошенко Е.М. и др. Эффективность живой гриппозной реассортантной вакцины при циркуляции дрейфовых вариантов вирусов гриппа // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. № 1. С. 45–53.
3. Дринецкий В.П., Дорошенко Е.М., Гаврилов А.А. и др. Профилактика гриппа живой гриппозной вакциной у детей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2005. № 5. С. 35–37.
4. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Баженова Е.А. и др. Трансмиссивность вируса гриппа (экспериментальные данные) // Мед. акад. журн. 2010. В печати.
5. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Исакова И.Н., Руденко Л.Г. Генетическая стабильность холодоадаптированных вирусов гриппа // Вопр. вирусол. 2006. № 4. С. 13–16.
6. 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 гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и детей // Заявка на патент РФ. Регистрационный № 2009134769. Дата приоритета 18.09.2009.
7. Найхин А.Н., Кореньков Д.А., Петухова Г.Д. и др. Оценка Т-клеточной иммунологической памяти по экспрессии молекул CD45 у людей, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной // Мед. иммунол. 2008. Т. 10. № 6. С. 535–542.

8. Найхин А.Н., Рекстин А.Р., Баранцева И.Б. и др. Иммуный ответ на живую гриппозную вакцину // Вестн. РАМН. 2002. № 12. С. 24–28.
9. Chirkova T., Petukhova G., Korenkov D. et al. Immunization with live influenza viruses in an experimental model of allergic bronchial asthma: infection and vaccination // *Influenza and other Respiratory viruses*. 2008. № 2. P. 165–174.
10. Desheva J.A., Lu X., Rekstin A.R. et al. Characterization of an influenza A H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic H5N1 viruses with pandemic potential // *Vaccine*. 2006. Vol. 24. № 47–48. P. 6855–6866.
11. Isakova-Sivak I., Chen L.-M., Matsuoka Y. et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus for live attenuated influenza A vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) // *Virology*. 2010. Article in press.
12. Kiseleva I., Su Q., Toner T.J. et al. Cell-based assay for the determination of temperature sensitive and cold-adapted phenotypes of influenza viruses // *J. Virol. Meth.* 2004. Vol. 116. P. 71–78.
13. Palker T., Kiseleva I., Johnston K. et al. Protective efficacy of intranasal cold-adapted influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) vaccines comprised of egg- or cell culture-derived reassortants // *Virus Res.* 2004. Vol. 105. № 2. P. 183–194.
14. Petukhova G., Chirkova T., Donina S. et al. Comparative studies of local antibody and cellular immune response to influenza infection and vaccination with live attenuated reassortant influenza vaccine (LAIV) // *Vaccine*. 2009. Vol. 27. P. 2580–2587.
15. Rekstin A.R., Desheva J.A., Rudenko L.G. Interference-dominance properties of cold-adapted influenza viruses // *Proceedings of «Options for the control of influenza VI»*. Toronto, Ontario, Canada, June 17–23, 2007. International Medical Press Ltd. Elsevier. 2008. P. 522–524.
16. Rudenko L.G. Live attenuated vaccine in Russia: Advantages, further research and development // *Proceedings of «Options for the control of influenza VI»*. Toronto, Ontario, Canada, June 17–23, 2007. International Medical Press Ltd. Elsevier. 2008. P. 122–124.
17. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S. et al. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I–II clinical trials) // *IRV*. 2008. № 2. P. 203–209.
18. Rudenko L.G., Slepushkin A.N., Monto A.S. et al. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia // *J. Infect. Dis.* 1993. Vol. 168. P. 881–887.
19. WHO. Global alert and response (GAR). Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. May 6, 2010 // Available from http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_05_06.
20. WHO. Global alert and response (GAR). Pandemic (H1N1) 2009 – update 102. May 28, 2010 // Available from http://www.who.int/csr/don/2010_05_28.
21. World Health Organization. Statement by WHO Director-General, Dr Margaret Chan 11 June 2009. World now at the start of 2009 influenza pandemic. Available from http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html.