

ПАНДЕМИИ ГРИППА И ПОДГОТОВКА ЖИВЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ИХ СДЕРЖИВАНИЯ

Е.М. Дорошенко*, Е.П. Григорьева**,
И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г. Руденко

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Эл. почта: * eldoroshenko@mail.ru, ** epgrigorieva@gmail.ru

Статья поступила в редакцию 14.07.2016; принята к печати 05.09.2016

Дан краткий исторический обзор эпидемиологической ситуации по гриппу в мире и приведены основные данные о биологии вируса гриппа, важные для разработки вакцины. Подробно рассмотрены случаи заболевания и гибели от различных подтипов вируса гриппа птиц [A(H5N1), A(H5N6), A(H7N3), A(H7N7), A(H7N9)] среди людей, стимулировавшие проведение мониторинга, разработку национальных планов подготовки к возможному возникновению пандемий и активное международное сотрудничество в подготовке вакцины для профилактики гриппа. Обеспечение населения России живыми гриппозными вакцинами против потенциально опасных вирусов гриппа птиц, а также штаммов A(H1N1)pdm и A(H2N2) имеет важное стратегическое значение. В отделе вирусологии Института экспериментальной медицины создана коллекция потенциально пандемических штаммов вируса и проведено их всестороннее доклиническое и клиническое изучение. Доклинические исследования вакцин, разработанных на основе этих штаммов, на лабораторных животных продемонстрировали безвредность, иммуногенность и протективную активность. Кандидаты для пандемических и предпандемических живых гриппозных вакцин изучены в клинических испытаниях на взрослых волонтерах. Было показано, что вакцины ареактогенны и безвредны и что передача вируса от привитых волонтерам в контрольную группу отсутствовала. Эти исследования значительно расширили набор методов оценки иммуногенности ЖГВ, включая оценку секреторных антител и клеточный иммунный ответ. Учитывая стимуляцию перекрестно-реагирующих антител, живые гриппозные вакцины могут быть использованы как первичная мера борьбы с новыми пандемиями даже в случае, если пандемический штамм будет иметь антигенные отличия.

Ключевые слова: птичий грипп, живая гриппозная аттенуированная вакцина, пандемии, вакцинные штаммы.

INFLUENZA PANDEMICS AND THE DEVELOPMENT OF LIVE VACCINES FOR THEIR CONTROL

Ye.M. Doroshenko*, Ye.P. Grigoryeva**, I.N. Isakova-Sivak, L.G. Rudenko

Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

E-mail: * eldoroshenko@mail.ru, ** epgrigorieva@gmail.ru

A short historical overview on the epidemiological aspects of influenza worldwide is given, the main biological characteristics of flu viruses most important for developing flu vaccine are outlined, and a more detailed discussion of human infection and death caused by avian flu viruses [A(H5N1), A(H5N6), A(H7N3), A(H7N7), A(H7N9)] are discussed as a background for reviewing measures against possible flu pandemics, including international collaboration in this field. In Russia, the provision of its population with vaccines against potentially hazardous avian flu viruses and the strains A(H1N1)pdm and A(H2N2) is rated as a strategic priority. A collection of potentially pandemic flu viruses is established at Research Institute of Experimental Medicine (Saint Petersburg), and vaccines based on it are currently passing preclinical and clinical trials. Preclinical trials have proved that the vaccine preparations are safe, immunogenic and protective. In Phase I trials on adult human volunteers, the vaccines proved to produce no adverse effects, including the transmission of viruses from vaccinated to control subjects. Because of their ability to evoke cross-reactive immune responses, the vaccines may be used as first-line measures against newly emerged pandemics even if the pandemic strains have unique antigenic features.

Keywords: avian flu, live attenuated vaccine, pandemic, vaccine strains.

Введение

Глобальные изменения под влиянием антропогенных факторов включают рост населения, особенно в мегаполисах, и числа и скорости транспортных перемещений людей, освоение ими новых территорий, создание все более мощных индустриальных предприятий птицеводства и животноводства. Все это способствует усилению контактов людей с носителями инфекций, включая домашних и диких животных, в том числе птиц.

Среди инфекционных заболеваний, поражающих людей, самыми распространенными (до 90%) являются острые респираторные вирусные инфекции, в

структуре которых ведущая роль в настоящее время принадлежит гриппу. Ежегодно во всех странах гриппозные эпидемии наносят значительный социально-экономический ущерб. Это объясняет пристальное внимание к этой инфекции и связанный с этим быстрый прогресс в области молекулярно-генетических знаний о структуре и изменчивости вируса, механизмах противогриппозного иммунитета, а также методах диагностики, вакцинопрофилактики и лечения гриппа.

Чаще всего у людей эпидемии вызывают вирусы гриппа типа А. Все известные подтипы вирусов гриппа типа А выделены от птиц (домашних и ди-

ких) и млекопитающих (свиней, лошадей и др.). Общеизвестно, что главным природным резервуаром вирусов гриппа А являются водоплавающие птицы.

Наличие опасной эпизоотической ситуации, связанной с распространением среди диких птиц высокопатогенных вирусов гриппа птиц, и их потенциальная угроза для людей, а также пандемическая циркуляция штамма H1N1 и вероятность возврата в циркуляцию вируса гриппа А(H2N2) требует создания резервного банка вакцин, на основе которых будет возможно быстро подготовить необходимое количество доз.

Современный уровень знаний позволяет сказать, что пандемии гриппа возможны, однако сложно предсказать, когда и какие вирусы могут их вызвать. Возможно, это будет старый знакомый – вирус подтипа А (H2N2), с которым люди не встречались с 1968 г. [26, 27]. Но большинство ученых считают, что возбудителем будущей пандемии может стать один из высокопатогенных вирусов гриппа птиц.

Новые вирусы гриппа часто возникают в Юго-Восточной Азии в местах основных путей миграции диких перелетных птиц, где на небольших фермах в тесном контакте находятся домашние птицы, свиньи и люди. Живущие здесь в условиях перенаселения люди не всегда достаточно получают белковой пищи, что ослабляет иммунитет и повышает восприимчивость к гриппу [4, 28]. В последние годы было получено множество доказательств наличия постоянного обмена вирусами гриппа А (H5N1), А(H7N9), А(H7N3), А(H7N7), А(H7N2), А(H5N6) между людьми, птицами и животными¹ [24, 41]. Большое значение для возникновения новых вирусов гриппа А имеют сезонные миграции миллионов диких птиц, которые являются резервуарами гриппозных вирусов различной степени патогенности. Вирусами гриппа А заражены многие водоемы в местах перелетов и гнездовий диких птиц. Так как вирусы гриппа в фекалиях птиц могут сохраняться в воде, здоровые птицы заражаются, пролетая через эти «опасные зоны» [4].

Особую опасность, возможно, представляют не только природно-социальные факторы, но и возросшая скорость изменения генетических свойств вирусов гриппа А, поскольку выделенные в последние годы эпидемические штаммы генетически существенно отличаются от штаммов, выделенных в период отсутствия эпидемической ситуации.

Иммунитет, формирующийся в организме после заболевания людей, защищает только от конкретного вируса гриппа, которым человек переболел, но не от новых измененных вирусов, появляющихся почти каждый год. Измененный вирус гриппа может преодолеть иммунный барьер и вызвать новое заболевание [21].

Вирусы гриппа типа А делят на подтипы, которые отличаются по строению поверхностных белков: гемагглютинина (его обозначают латинской буквой Н) и нейраминидазы (N). В соответствии с их антигенной специфичностью в настоящее время выделяют 18 подтипов гемагглютинина и 11 подтипов нейраминидазы [50]. Многие годы от больных гриппом людей выделяли только три подтипа вируса А: А(H1N1), А(H2N2) и А(H3N2) [21].

При воспроизведении фрагментированной РНК вирусов гриппа в зараженном организме (человека, птиц или животных) легко возникают «ошибки», которые и приводят к мутациям и рекомбинациям. Незначительные изменения (точечные мутации в гене), которые называют «антигенный дрейф», происходят у вируса гриппа постоянно. Они меняют его так, что у некоторых людей иммунная система не справляется с новым вариантом вируса. Тогда в холодное время возникают обычные сезонные эпидемии, когда болеют дети и те взрослые, которые раньше не встречались с похожим вирусом.

Если же в одной из зараженных клеток встретятся два разных подтипа вируса гриппа А, возможна полная смена гемагглютинина и/или нейраминидазы и появление вируса, который будет иметь смесь разных родительских генов, что приводит к его резкому изменению, антигенному шифту (сдвигу).

Считается, что чаще всего гриппозный антигенный шифт происходит в организме свиней, которые могут заразиться человеческим и птичьим гриппом одновременно, в результате чего возникают новые опасные вирусы гриппа. Входящие в их состав гены вируса гриппа человека передают новому варианту вируса (реассортанту) способность заражать людей, а в случае попадания в вирусное потомство генов птичьего или свиного гриппа этот реассортант приобретает способность вызывать у людей тяжелые формы заболевания с быстрым поражением не только верхних, но и нижних дыхательных путей. Отсутствие у людей иммунитета к таким вирусам гриппа приводит к быстрому распространению инфекции [24, 47–49].

Пандемии гриппа

Первые значительные эпидемии с признаками гриппозной инфекции документально фиксировались начиная с XII в. Иногда вспышки охватывали несколько городов. В иных случаях грипп поражал несколько стран и даже континентов. В те времена причину распространения гриппа объясняли самыми разными влияниями, но только не передачей инфекции, отсюда и прежнее название гриппа «инфлюэнца»².

В результате исследования уровня антител в сыворотках крови людей разного возраста, проведенных уже после открытия в 1933 г. вируса гриппа, было установлено, какие подтипы вируса гриппа типа А вызывали пандемии прежде: в 1889–1891 гг. это был вирус А(H2N2); в 1900 г. – А(H3N2); в 1918–1920 гг. – А(H1N1).

Пандемия, которая началась в 1918 г., была катастрофической не только потому, что начал циркулировать новый вирус гриппа подтипа А(H1N1), высококонтагиозный и вызывающий тяжелые заболевания, но и потому, что в эти годы шла Первая мировая война. Огромные массы людей перемещались по Европе, многие попадали в плохие бытовые условия и не имели возможности для лечения и изоляции. Первые сообщения о тяжелых заболеваниях гриппом по-

² От редакции. Термин инфлюэнца (influenza) по-прежнему является основным в англоязычных странах, где в быту он редуцирован до «flu». Его этимология восходит к итальянскому слову, которое можно перевести как «влияние», поскольку эпидемии гриппа сначала связывали с влиянием неблагоприятных астрологических обстоятельств, а потом с «влиянием холода» (*influenza del freddo*) (<https://en.wikipedia.org/wiki/Influenza>). Русское слово «грипп» происходит от французского *grippe* или немецкого *grippen* – хватать, держать. В обоих языках эти слова по-прежнему используются наряду с *influenza* для обозначения инфекции. В английском слово *grip* означает то же самое, но по отношению к болезни не используется.

¹ Птичий грипп: оценка угрозы пандемии. ВОЗ, 2005. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68985/2/WHO_CDS_2005_29_rus.pdf.

явились из Испании, поэтому он был назван «испанским». За два года пандемия охватила все страны и континенты. Клиническая картина у больных характеризовалась внезапным началом, бурным течением и частыми летальными исходами. Возраст людей, погибших от «испанки», был совершенно необычен для гриппозных эпидемий прошлого: молодые люди умирали через несколько дней после начала заболевания или в результате осложнений чаще, чем пожилые. «Испанкой» переболел каждый пятый житель планеты, погибло более 40 миллионов человек (свыше 1% населения планеты).

В XX в. пандемии вызывали и другие вирусы гриппа типа А. Так в 1957 г. пандемия, которая унесла почти 4 миллиона человеческих жизней, была вызвана вирусом А(Н2N2), названным по месту выделения первого возбудителя «Сингапур», или азиатский грипп. В Москве за один «день максимума» заболели более 100 тысяч человек. По сравнению с «испанкой», относительно «невысокая» смертность в это время была связана с широким применением сульфаниламидных препаратов и антибиотиков, которые начали использовать для лечения бактериальных осложнений гриппа, и началом применения противогриппозных вакцин. Через несколько лет после этого вирус гриппа подтипа А(Н2N2) перестал циркулировать и с 1968 г. не выделяется от людей.

В 1968–1969 гг. во всем мире бушевала пандемия гриппа А(Н3N2) «Гонконг». Количество умерших за время этой пандемии достигло 1 млн человек [21, 40]³.

После этого несколько десятилетий одновременно циркулировали три разных вируса гриппа: А(Н1N1), А(Н3N2) и В. В результате того, что за эти годы все больше людей с ними уже встречались, в эпидемический сезон заболевали не более 10–15% взрослого населения; только дети болели несколько чаще [3].

В марте 2009 г. сначала в Мексике, а вскоре и в других странах были отмечены массовые случаи тяжелой гриппозной инфекции. Очень быстро частота заболеваний достигла пандемического уровня. Пандемия вызвал вирус гриппа, который первое время называли «свиным» (он оказался тройным реассортантом, имеющим сегменты РНК, происходящие от штаммов гриппа свиньи, человека и птицы), а затем этот вирус получил официальное название пандемического А(Н1N1)pdm09. За полтора года он стал причиной тяжелых гриппозных эпидемий, которые были зарегистрированы в 214 странах. По опубликованным данным, число летальных случаев лабораторно подтвержденного гриппа А(Н1N1)pdm09 в мире составило более 18,4 тысячи. За год с апреля 2009 г. пандемическим гриппом только в США заболели более 60 миллионов человек; из них были госпитализированы более 274 тысяч и погибли более 12 тысяч человек [39]. Наиболее тяжелое течение заболевания и высокий риск возникновения осложнений был отмечен в 3 группах населения: среди беременных женщин (особенно в последние месяцы беременности), детей до 2 лет и пациентов, имеющих хронические заболевания дыхательной системы. В качестве особенностей пандемии гриппа А(Н1N1)pdm09 обращала на себя внимание низкая заболеваемость лиц старше 65 лет (даже по сравнению с заболеваемостью их в обычные сезонные эпидемии гриппа) [5, 13, 46].

³ Influenza Report 2006. Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla: Flying Publisher; 2006. <http://www.influenzareport.com/>.

Активные действия ученых и срочное выделение многими государствами средств на борьбу с этой пандемией позволили в кратчайшие сроки (в течение нескольких недель) получить, проверить в клинических испытаниях и внедрить в производство живые и инактивированные моновалентные вакцины для защиты от этого вируса [13, 25, 30, 36, 42]. Через полтора года этот же вирус вызывал обычную по частоте и тяжести заболеваемость и продолжает циркулировать в настоящее время [2].

Птичий грипп

Раньше считалось, что вирусы гриппа птиц не передаются непосредственно от птиц человеку и не циркулируют среди людей. В 1997 г. в Гонконге было доказано, что именно от домашних птиц гриппом А(Н5N1) заразились 18 человек, из которых 6 человек погибли. Считают, что этот вирус возник от случайного скрещивания трех вирусов гриппа типа А (гусиного, утиного и перепелиного). Для предотвращения распространения инфекции в этой провинции было уничтожено все поголовье домашних птиц (более 1,4 миллиона), что предотвратило заболевания не только домашних пернатых, но и людей [7].

Только через 5 лет после первой вспышки (в феврале 2003 г.) в Китае и Вьетнаме вновь появились тяжелобольные люди, от которых удалось выделить вирус А(Н5N1). Было доказано, что они заразились при тесном контакте с инфицированными курами. В 2004 г. во Вьетнаме заболели 51 человек, из которых умерло 33. Инфекция поразила и Таиланд, где заболело 17 человек (умерли 12). При обычном эпидемическом гриппе такого критического уровня смертности никогда не отмечалось. В 2005 г. список стран, где люди заболели тем же птичьим гриппом, дополнили Индонезия и Камбоджа [8]. При выяснении источника заражения можно было проследить тесные контакты с инфицированными курами. В ряде случаев заражение происходило при употреблении сырой птичьей крови. Но, к счастью, вирус не передавался от заболевших людей к окружающим контактным лицам.

Значительная вспышка произошла в Азербайджане весной 2006 г. Заболели 8 человек, из них 5 спасти не удалось. Все заболевшие (подростки и женщины) жили в одной деревне. Было доказано, что они заразились от погибших лебедей, когда ошипывали их и собирали пух. Вместе с частицами пуха вирус проник в нижние дыхательные пути и вызвал тяжелые заболевания.

Затем заболевания людей были зарегистрированы в Египте, Ираке, Джибути, Лаосе, Нигерии, Индонезии и Вьетнаме. Только в 2015 г. в Египте заразились 136 человек, из которых не удалось спасти 39. Всего в период с 2003 по 2016 г. в 16 странах птичьим гриппом А(Н5N1) заболели 850 человек, 449 из них погибли⁴.

Хотя вирусом гриппа А(Н5N1) уже были инфицированы более 800 человек, передача вируса от человека к человеку происходит крайне редко. Это связано с тем, что имеются анатомические различия в преимущественном расположении рецепторов, связывающих птичьих и человеческих вирусы гриппа. Репродукция вирусов сезонного гриппа начинается

⁴ Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO 2016. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20160509cumulativenumberH5N1cases.pdf?ua=1

у людей сразу после попадания возбудителя на клетки слизистой носовой полости, где расположены рецепторы $\alpha 2,6$. Вирусы, циркулирующие среди птиц, связываются с рецепторами $\alpha 2,3$, которые у человека в основном располагаются на поверхности клеток нижних дыхательных путей, где и происходит репликация птичьих вирусов. Возможно, что именно с этим и связана сложность передачи вирусов птиц от человека к человеку. Однако в случае возможных изменений структуры гемагглютинина птичьих гриппозных вирусов вполне вероятно опасность их беспрепятственной передачи между людьми [38].

Кроме вируса А(Н5N1) от заболевших гриппом людей выделяли и другие подтипы вируса гриппа птиц.

В 1998–1999 гг. в Китае и Гонконге был выделен вирус гриппа А(Н9N2) от пяти заболевших детей. Позднее грипп птиц А(Н9N2) у людей вызывал только респираторные заболевания средней тяжести⁵.

В Нидерландах в 2003 г. была вспышка гриппа среди домашних птиц и свиней, от которых респираторными заболеваниями и конъюнктивитом заразились 89 человек, из них умерла одна женщина – ветеринар. Тогда от людей и животных был выделен вирус гриппа А(Н7N7) [11].

В 2004 г. в Канаде у людей была отмечена вспышка конъюнктивитов, вызванная вирусом гриппа А(Н7N3) [45].

В 2014 г. впервые от больного человека выделили грипп А(Н5N6). До лета 2016 г. таких случаев было уже 14, из них 6 больных погибли⁴.

Для людей крайне опасен грипп птиц с антигенной формулой А(Н7N9). Впервые выделенный в 2013 г. от больных в Китае, он всего за 3 года уже вызвал тяжелые заболевания у 791 человека, из которых 306 спасти не удалось⁶.

Хотя люди заражаются птичьим гриппом только от больных птиц и в настоящее время не доказана передача этих вирусов от человека к человеку, в любой момент возможно нарушение этого хрупкого равновесия.

Сообщения о появлении случаев заболевания людей и их гибели от различных подтипов гриппа птиц стимулировали проведение мониторинга, подготовку национальных планов подготовки к возможному возникновению эпидемий и активное международное сотрудничество в этой области.

В 2006 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) совместно с представителями общественного здравоохранения, научными экспертами, производителями вакцин и финансирующими организациями многих стран был разработан глобальный план действий по подготовке к пандемии гриппа (Global Action Plan for Influenza Vaccines. GAP). В нем была сформирована стратегия, направленная на уменьшение существующей нехватки вакцин для профилактики сезонного и пандемического гриппа в мире путем применения трех основных подходов:

- 1) расширение применения сезонных вакцин;
- 2) увеличение потенциальных возможностей для производства вакцин;
- 3) научные исследования по разработке новых пандемических вакцин.

⁵ Influenza at the human-animal interface Summary and assessment, 5 April to 9 May 2016 2016. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_05_09_2016.pdf?ua=1.

⁶ H7N9 situation update 19 May 2016, 17:00 hours; Rome 2016. http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/H7N9/situation_update.html

Благодаря усилиям ВОЗ достигнуты значительные успехи на пути обеспечения готовности к возможным пандемиям гриппа; созданы новые предприятия по производству вакцин в развитых и в развивающихся странах; увеличен объем производства; наблюдается прогресс в области новых технологий.

Подготовка к пандемиям в России

В России применяют два типа гриппозных вакцин: инактивированные (ИГВ) и живая (ЖГВ) для интраназального введения, которая была разработана в отделе вирусологии Института экспериментальной медицины (ИЭМ, Санкт-Петербург). Государственные испытания препарата проводились под руководством Министерства здравоохранения в различных городах страны. Всего под наблюдением находилось более 120 тысяч детей и 500 тысяч взрослых и лиц пожилого возраста. На основании результатов проведенных испытаний, показавших безвредность, высокую защитную эффективность и преимущества живой гриппозной вакцины по сравнению с инактивированными, в 1987 г ЖГВ была внедрена в практику здравоохранения для профилактики гриппа у детей с 3 лет, взрослых и лиц пожилого возраста, в том числе страдающих различными хроническими заболеваниями. За этот период было произведено более 100 миллионов доз этого препарата. По данным Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, за весь период применения ЖГВ не было зарегистрировано каких-либо тяжелых или неблагоприятных последствий применения этой вакцины. Проводимый в эти годы специалистами НИИ гриппа МЗ РФ мониторинг гриппозных вирусов, циркулирующих на территории РФ, не выявил в составе выделенных от людей вирусов гриппа каких-либо мутаций, связанных с применением ЖГВ [1, 37].

Вакцина является приоритетом российской науки, аналогичная живая интраназальная вакцина зарегистрирована в США только в 2003 г. Живая вакцина имеет следующие преимущества перед инактивированными вакцинами:

- 1) ЖГВ вводится интраназально с помощью индивидуальных распылителей, а не путем инъекций, как инактивированные вакцины;
- 2) из одного куриного эмбриона, которые используются для производства всех гриппозных вакцин, можно получить 10–15 доз ЖГВ и только 2–3 дозы инактивированной вакцины, поэтому производство ЖГВ экономически выгоднее, чем инактивированных вакцин;
- 3) в случае пандемии, вызванной «птичьим» гриппом, ограниченное количество сырья (куриных эмбрионов) не позволит произвести в короткие сроки достаточное количество инактивированных вакцин.

В период пандемической ситуации 2009 г. (свиного гриппа) и в России, и в США первыми вакцинами, подготовленными для иммунизации населения, были живые гриппозные вакцины.

Наличие опасной эпизоотической ситуации, связанной с распространением среди диких птиц высокопатогенных вирусов гриппа птиц, и их потенциальная угроза для людей, а также пандемическая циркуляция штамма H1N1 и вероятность возврата в циркуляцию вируса гриппа А(Н2N2) потребовала

создания резервного банка вакцин (как инактивированных, так и живых интраназальных).

В мире ведутся активные разработки живых гриппозных вакцин для защиты людей от вирусов гриппа птиц. В США фирма MedImmune подготовила серию живых вакцин путем реассортации птичьих вирусов H5 [20], H7 [43], H6 [44] и H9 [19] с американским холодоадаптированным донором аттенуации, которые были исследованы в доклинических и в клинических испытаниях на волонтерах.

Обеспечение населения страны российскими живыми гриппозными вакцинами против потенциально опасных вирусов гриппа птиц, а также штаммов A(H1N1)pdm и A(H2N2) имеет важное стратегическое значение. Поэтому в отделе вирусологии Института экспериментальной медицины в последние 10 лет была создана коллекция вакцин на основе этих штаммов и проведено их всестороннее изучение. В случае возникновения пандемической ситуации они могут быть в кратчайшие сроки использованы для производства ЖГВ.

Эти исследования были поддержаны международными фондами (Program for Appropriate Technology in Health, PATH) и ВОЗ. При финансовой поддержке ВОЗ и BARDA (Biomedical Advanced Research and Development Authority, США) в ИЭМ был построен современный высокотехнологичный комплекс (BSL2 и BSL3) для работы с высокопатогенными штаммами вируса гриппа.

Штаммы для живых вакцин подтипов H1N1, H5N2, H5N1, H7N3, H7N9, H2N2 были подготовлены методом классической реассортации эпидемически опасных вирусов и российского холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Все штаммы были исследованы на экспериментальных моделях животных в сотрудничестве с нидерландским Центром контроля инфекционных заболеваний (Centre for Infectious Disease Control), Университетом Питтсбурга (США), Северо-восточной исследовательской лабораторией птицеводства (Southeast Poultry Research Laboratory, США), Центрами контроля заболеваний (CDC, США) и компанией ViroClinics Biosciences (Нидерланды).

Доклинические исследования вакцинных штаммов

При изучении на животных шести указанных выше штаммов была показана их безвредность для мышей, морских свинок и хорьков. Все штаммы, введенные животным интраназально, имели профиль репродукции, характерный для аттенуированных холодоадаптированных штаммов, не имели признаков нейроринвазивности и обладали протективной активностью при последующем заражении животных «диким» вирулентным (соответствующими «родительскому» штамму) вирусом.

В табл. 1 представлены результаты доклинических исследований. Основные эксперименты были проведены на хорьках, при заражении которых гриппом удается воспроизвести симптомы, характерные для классической картины гриппа у человека.

На основе штамма А/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm, вызвавшего в 2009 г. пандемию вируса гриппа, был подготовлен вакцинный штамм А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1). Однократная иммунизация этим штаммом хорьков индуцировала высокий уро-

вень сывороточных антител. Интратрахеальное заражение вакцинированных животных не вызвало у них клинических симптомов либо патоморфологических признаков заболеваний. В то же время заражение животных группы плацебо вызвало у них развитие тяжелой гриппозной инфекции. В отличие от неиммунизированных животных, у вакцинированных интраназально хорьков после заражения диким штаммом не выявлено симптомов и патоморфологических признаков заболевания.

Двукратное интраназальное введение хорькам вакцины А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) вызвало у животных формирование иммунного ответа широкого спектра действия, достаточного для их защиты от последующего заражения дикими вирусами не только соответствующего типу и клайду «родительского» вируса (на основе которого была получена вакцина), но и от заражения вирусами генетически отличных двух других клайдов.

Двукратная иммунизация штаммом А/17/Вьетнам/1203/04 (H5N1) индуцировала у хорьков образование высокого уровня сывороточных антител и полностью защищала животных от заражения летальными дозами гомологичного и гетерологичного вирусов (клайды 1 и 2.2).

Вакцинный вирус А/17/mallard/Нидерланды/00/95 (H7N3) был подготовлен с использованием вируса низкопатогенного для птиц, но вызвавшего в 2004 г. вспышку конъюнктивитов у людей в Канаде [45]. Его репликация в тканях респираторного тракта зараженных мышей и хорьков была незначительной, но хорьки были защищены от заражения летальными дозами штаммов, не только гомологичных вакцинному вирусу, но и гетерологичного вируса H7N9.

Был подготовлен вакцинный штамм А/17/Ануи/2013/61 (H7N9) с использованием вируса, выделенного в 2013 г. в Китае от заболевшего человека. У хорьков даже после однократной интраназальной вакцинации этим штаммом отмечался прирост сывороточных антител, предотвращающий репликацию в тканях их респираторного тракта вируса (H7N9) дикого типа и защищающий животных от бронхопневмонии.

Эксперименты на лабораторных животных продемонстрировали безвредность, иммуногенность и протективную активность ЖГВ H2N2 для мышей, хорьков и морских свинок. Вакцинация вызвала у хорьков формирование иммунного ответа широкого спектра действия и защищала их от поврежденных эпителиальных тканей верхних дыхательных путей при последующем заражении как гомологичным А/Калифорния/1/66 (H2N2), так и гетерологичным вирусом А/Токио/3/67 (H2N2).

Клинические исследования на волонтерах

Все упомянутые выше кандидаты для пандемических и предпандемических вакцин прошли фазу I клинических испытаний на взрослых волонтерах в сотрудничестве с PATH, НИИ гриппа МЗ РФ и НПО «Микроген». Клинические испытания проводились по схеме рандомизированных, двойных слепых исследований на здоровых взрослых волонтерах и контролировались независимыми международными наблюдателями. Вакцины и препарат плацебо вводили интраназально, двукратно с интервалом 21 день, в

Доклинические исследования пандемических живых гриппозных вакцин в моделях на животных

Потенциально пандемические кандидаты для ЖГВ	Животные	Основные результаты	Ссылки
A/17/Калифорния/2009/38 H1N1) pdm09	Хорьки	Однократная вакцинация индуцировала высокий уровень сывороточных антител (РТГА)*. Вакцинированные хорьки были защищены от и/т* заражения пандемическим вирусом H1N1 (репликация вируса в ВДП* была ниже, чем у контрольных животных, не выявлено симптомов и патоморфологических признаков заболевания)	[42]
A/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2), клайд 2.2	Хорьки	Двукратная вакцинация вызывала образование высоких уровней гомологичных и гетерологичных (к вирусам птиц H5N1 клайдов 1 и 2.1) титров антител. Все вакцинированные животные были полностью защищены против летального заражения гомологичным вирусом: вирус не определялся в ВДП, а в НДП* его титры были значительно снижены	[23]
A/17/Вьетнам/1203/04 (H5N1) RG, клайд 1	Мыши, хорьки	Двукратная вакцинация вызывала образование высоких уровней гетерологичных (к клайду 2.2) титров антител; животные были полностью защищены против заражения летальными дозами гомологичного и гетерологичного ВПВП*. При заражении хорьков продемонстрировано преимущество ЖГВ перед ИГВ по способности вызывать перекрестную защиту	[14,15]
A/17/mallard/ Нидерланды/00/95 (H7N3)	Мыши	Двойная иммунизация высокой дозой вакцины вызывала умеренные титры антигемагглютинирующих антител. Отмечена слабая способность вакцинного вируса реплицироваться в верхних и нижних дыхательных путях мышей	[29]
	Хорьки	Репликация вакцинного вируса не определялась в тканях респираторного тракта; однако у вакцинированных животных выявлен высокий уровень перекрестно-реагирующих антител к гетерологичному вирусу H7N9; отмечено снижение репликации диких вирусов H7N3 и H7N9 в верхних и нижних дыхательных путях вакцинированных животных по сравнению с контрольной группой. Пассивно иммунизированные хорьки были защищены против летальной дозы вируса H7N9: уменьшилась потеря веса и титр вируса в ВДП	[6, 29]
A/17/ Калифорния/66/395 (H2N2)	Хорьки	Однократная иммунизация индуцировала очень высокие титры гомологичных и гетерологичных антител в РТГА, РМН* и РИНА*; защищала животных против заражения гомологичным и гетерологичным вирусами путем уменьшения репликации вирусов в ВДП и НДП и ослабления гистопатологических изменений в тканях носовых ходов	[16]
A/17/Ануи/2013/61 (H7N9)	Хорьки	Однократная и двукратная иммунизации вызвали прирост антител, предотвращали репликацию вируса H7N9 дикого типа в тканях респираторного тракта, защищали животных от тяжелой бронхопневмонии	[9]

* Сокращения: РТГА – реакция торможения геагглютинации; и/т – интратрахеальное заражение; ВДП – верхние дыхательные пути; НДП – нижние дыхательные пути; ВПВП – высокопатогенный вирус гриппа птиц; РМН – реакция микронеutralизация; РИНА – реакция ингибции нейраминидазной активности.

дозе 0,5 мл (по 0,25 мл в каждый носовой ход). В течение первых 7 дней после каждой из двух вакцинаций добровольцы наблюдались в условиях стационара.

Исследования показали хорошую переносимость изученных вакцин, серьезные нежелательные явления зарегистрированы не были. Отмечены только единичные случаи слабых кратковременных температурных реакций (37,1–37,5 °С); заложенность носа, ринит, гиперемия зева, боль в горле.

Присутствие вакцинного вируса в мазках из полости носа определяли в полимеразной цепной реакции

(ПЦР) и/или выделением в культуре клеток MDCK и на куриных эмбрионах. Все вирусы, изолированные от привитых волонтеров, сохранили состав генома введенного вакцинного штамма и аттенуирующие мутации. Это доказывает высокий уровень генетической стабильности данных реассортантных вирусов после репликации их в организме человека.

Так как вакцинные вирусы реплицируются в верхних дыхательных путях, всегда существуют опасения их возможной передачи (трансмиссии) невакцинированным контактным людям и возможной реассорта-

ции между вакцинными штаммами и циркулирующими в человеческой популяции вирусами гриппа. Все клинические испытания пандемических ЖГВ продемонстрировали отсутствие трансмиссии вируса от вакцинированных лиц волонтерам, получившим плацебо, несмотря на их тесный контакт [17, 31].

Согласно существующим нормативным требованиям единственным критерием для оценки иммуногенности вакцины против пандемического гриппа является защитная индукция сывороточных антител (которую определяют в реакции торможения гемагглютинации, РТГА). Это требование основано на данных о противогриппозном иммунитете после введения ИГВ, полученных еще в середине прошлого века. Эволюция и совершенствование новых методов изучения иммунитета в течение последних десятилетий привела к возможности использования для оценки эффективности ЖГВ таких факторов иммунитета, как цитотоксические Т-клетки, субпопуляции Т-хелперов, местные секреторные антитела и клетки памяти. В опубликованных в последние годы работах большое внимание уделяется оценке вирусоспецифических В- и Т-клеток памяти, которые обеспечивают длительный противовирусный иммунитет после вакцинации. Общепризнано, что существующие требования для оценки иммуногенности сезонных вакцин могут не подходить для вакцин пандемических, так как иммунная система у людей, как правило, характеризуется наивностью к вирусам птичьего гриппа, число В-клеток памяти невысокое, поэтому уровень выработки антител после вакцинации, как правило, низкий. Рекомендации ВОЗ по проведению клинических испытаний и оценке иммуногенности ЖГВ предполагают использование дополнительных (помимо РТГА) тестов: реакции микронейтрализации, определение титра секреторных антител в верхних дыхательных путях, клеточный иммунный ответ (с особым вниманием к В- и Т-клеткам памяти) [12].

При изучении иммуногенности пандемических живых гриппозных вакцин использовали:

1) определение сывороточных антигемагглютинирующих антител (АТ) в реакции торможения гемагглютинации (РТГА);

2) определение сывороточных АТ в реакции микронейтрализации (РНН);

3) определение сывороточных IgA- и IgG-АТ в иммуноферментном анализе (ИФА);

4) определение вирусоспецифических CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов методом проточной цитометрии;

5) оценку поствакцинальной секреции антител культурой В-лимфоцитов *in vitro*.

Показано, что, хотя после двукратного введения вакцин титры антител в РТГА оставались относительно низкими, суммарный учет данных всех использованных методов свидетельствует о достоверной иммуногенности вакцин у более чем 70% привитых волонтеров. Индуцированные вакцинами антитела имели широкий спектр специфичности к вирусам гриппа [32]. Эти данные значительно расширили набор методов оценки иммуногенности ЖГВ.

Материалы всех доклинических и клинических исследований переданы в ВОЗ и опубликованы (табл. 2).

После клинических испытаний потенциально пандемические и пандемические кандидаты переданы в Государственную коллекцию вирусов НИИ вирусологии им. Ивановского МЗ РФ и в НПО «Микроген» и могут быть немедленно использованы для наработки вакцин в случае чрезвычайных ситуаций.

Согласно договору с ВОЗ, эти вакцинные штаммы были переданы для производства ЖГВ и подготовки к регистрации вакцин в три страны: Таиланд (Government Pharmaceutical Organization, Bangkok), Китай (Changchun Biotechnology Co. Ltd, Changchun, Jilin) и Индию (Serum Institute of India Pvt. Ltd., Pune).

В 2009 г. в Таиланде была произведена пандемическая ЖГВ А/Н1N1pdm, проведены доклинические и клинические испытания и регистрация этой вакцины. Идет подготовка к регистрации предпандемической вакцины подтипа А/Н5N2.

В Китае закончено строительство завода по производству живой гриппозной вакцины и начаты клинические испытания. К 2019 г. в Китае планируют закончить регистрацию ЖГВ и начать ее производство.

В 2010 г. была зарегистрирована индийская моновалентная живая пандемическая вакцина А/Н1N1pdm Nasovac®. Ее эффективность была изучена в г. Пуна,

Табл. 2

Пандемические и потенциально пандемические ЖГВ, на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), подготовленные в ИЭМ и переданные в ВОЗ

Вакцинные штаммы для ЖГВ	«Дикий» вирус	Стадия исследований	Ссылки
А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09	А/Калифорния/07/2009 (H1N1pdm)	Завершены фазы I и II клинических испытаний. Вакцина зарегистрирована в РФ: ЛСР-007988/09	[36]
А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2)	NIBRG-23 (H5N1), clade 2.2	Завершена фаза I клинических испытаний	[23, 35]
А/17/Вьетнам/04/65107 (H5N2)	IDCDC-RG1 (H5N1), clade 1	Завершены доклинические исследования	[23]
А/17/Калифорния/66/395 (H2N2)	А/Калифорния/1/66 (H2N2)	Завершена фаза I клинических испытаний	[16, 18]
А/17/Ануи/2013/61 (H7N9)	А/Ануи/1/2013 (H7N9)	Завершена фаза I клинических испытаний	[9, 33]
А/17/mallard/Нидерланды/00/95 (H7N3)	А/mallard/Нидерланды/12/2000 (H7N3)	Завершена фаза I клинических испытаний	[10, 34]

где отмечался высокий уровень заболеваемости населения пандемическим гриппом. Эффективность оценивали (в исследовании случай-контроль) по снижению числа лабораторно подтвержденных случаев пандемического гриппа H1N1 у иммунизированных и не получивших вакцину пациентов 5 городских больниц. Всего методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) были исследованы мазки из носовой полости 784 пациентов. При этом у 253 больных была установлена этиология пандемического гриппа, а у 531 пациента были диагностированы другие ОРЗ. В данном исследовании эффективность живой аттенуированной моновакцины против гриппа A(H1N1)pdm09 составила 75,5% [22]. В 2014 г. индийские специалисты закончили разработку трехкомпонентной сезонной ЖГВ и зарегистрировали ее. Обе вакцины прошли предварительную квалификацию в ВОЗ. В настоящий момент в Индии трехвалентная ЖГВ используется для вакцинации населения против сезонного гриппа. Также проводятся исследования по усовершенствованию производства вакцины; расширению рекомендованных для вакцинации возрастных групп; планируется производство жидкой формы ЖГВ на культуре клеток.

Заключение

Перспективность борьбы с гриппом с помощью вакцинации признается специалистами всего мира, что отражено в решениях многих совещаний, проведенных ВОЗ, рекомендациях Комитета США по практике иммунизации (ACIP) и официальных документах МЗ России. В последние годы ЖГВ заняла лидирующее место в мире среди профилактических противогриппозных препаратов. По мнению экспертов ВОЗ, именно живая гриппозная вакцина является наиболее эффективным средством защиты населения от вирусов гриппа, вызывающих не только сезонные эпидемии, но и глобальные пандемии. Создание национальной коллекции пандемических штаммов для живых гриппозных вакцин дает возможность производить необходимое количество доз вакцины в случае возникновения пандемической ситуации. Учитывая, что ЖГВ стимулирует выработку перекрестно-реагирующих антител, эти вакцины могут быть использованы в случае новой пандемии, даже если вызвавший их штамм имеет антигенные отличия. Наиболее важным достижением последних лет в развитии пандемических ЖГВ является лицензирование российской технологии для развивающихся стран, которые являются наиболее уязвимыми из-за высокой плотности населения.

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Григорьева ЕП, Дриневский ВП, Дорошенко ЕМ, Дешева ЮА, Ерофеева МК, Макасова ВЛ, Руденко ЛГ. Эффективность живой гриппозной реассортантной вакцины при циркуляции дрейфовых вариантов вируса гриппа. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009;44(1):45-53.
2. Карпова ЛС, Соминина АА, Бурцева ЕИ, Пелих МЮ, Феодоритова ЕЛ, Поповцева НМ, Столярова ТП, Киселев ОИ. Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г. *Вопросы вирусологии*. 2015;60(3):19-24.
3. Маринич ИГ, Карпова ЛС, Сысоева ТИ, Пелих МЮ, Поповцева НМ, Столярова ТП. Ситуация по гриппу в мире и России во втором полугодии 2007 – первом полугодии 2008 года. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009;44(1):8-14.

Общий список литературы/Reference List

1. Grigoryeva YeP, Drinevsky VP, Doroshenko YeM, Desheva YuA, Erofeeva MK, Maksakova VL, Rudenko LG. [Efficacy of live attenuated influenza vaccine during the period of circulation of drift variants of flu virus]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2009;44(1):45-53. (In Russ.)
2. Karpova LS, Somnina AA, Burtseva YeI, Pelikh MYu, Feodoritova YeL, Popovtseva NM, Stolyarova TP, Kiselev OI. [Comparison of influenza epidemics in Russia caused by the pandemic

virus A(H1N1)pdm09 in 2009- 2013]. *Voprosy Virusologii*. 2015;60(3):19-24. (In Russ.)

3. Marinich IG, Karpova LS, Sysoyeva TI, Pelikh MYu, Popovtseva NM, Stolyarova TP. [Flu activity worldwide and in Russia in the second half of 2007 through the first half of 2008]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2009;44(1):8-14. (In Russ)
4. Bahl J, Pham TT, Hill NJ, Hussein IT, Ma EJ, Easterday BC, Halpin RA, Stockwell TB, Wentworth DE, Kayali G, Krauss S, Schultz-Cherry S, Webster RG, Webby RJ, Swartz MD, Smith GJ, Runstadler JA. Ecosystem Interactions Underlie the Spread of Avian Influenza A Viruses with Pandemic Potential. *PLoS Pathogens*. 2016;12(5):e1005620.
5. Briand S, Mounts A, Chamberland M. Challenges of global surveillance during an influenza pandemic. *Public Health*. 2011;125(5):247-56.
6. Carter DM, Bloom CE, Kirchenbaum GA, Tsvetnitsky V, Isakova-Sivak I, Rudenko L, Ross TM. Cross-protection against H7N9 influenza strains using a live-attenuated H7N3 virus vaccine. *Vaccine*. 2015;33(1):108-16.
7. Chan PKS. Outbreak of Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Diseases*. 2002;34(Suppl. 2):S58-S64.
8. Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated

in Vietnam and Thailand in 2004. *J Virology*. 2005;79:10821-5.

9. de Jonge J, Isakova-Sivak I, van Dijken H, Spijkers S, Mouthaan J, de Jong R, Smolonogina T, Roholl P, Rudenko L. H7N9 live attenuated influenza vaccine is highly immunogenic, prevents virus replication, and protects against severe bronchopneumonia in ferrets. *J Am Soc Gene Therap*. 2016;24(5):991-1002.

10. Desheva JA, Rudenko LG, Rekstin AR, Swayne D, Cox NJ, Klimov AI, eds. Development of Candidate H7N3 Live Attenuated Cold-adapted Influenza Vaccine. International Conference on Options for the Control of Influenza VI 2007, June 17–23; Toronto, Ontario, Canada. Atlanta, London: International Medical Press; 2007.

11. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(5):1356-61.

12. Girard MP, Katz J, Pervikov Y, Palkonyay L, Kieny MP. Report of the 6th meeting on the evaluation of pandemic influenza vaccines in clinical trials World Health Organization, Geneva, Switzerland, 17-18 February 2010. *Vaccine*. 2010;28(42):6811-20.

13. Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*. 2010;28(31):4895-902.

14. Gustin KM, Maines TR, Belser JA, van Hoeven N, Lu X, Dong L, Isakova-Sivak I, Chen LM, Voeten JT, Heldens JG, van den Bosch H, Cox NJ, Tumpey TM, Klimov AI, Rudenko L, Donis RO, Katz JM. Comparative immunogenicity and cross-clade protective efficacy of mammalian cell-grown inactivated and live attenuated H5N1 reassortant vaccines in ferrets. *J Infect Diseases*. 2011;204(10):1491-9.

15. Isakova-Sivak I, Chen LM, Matsuoka Y, Voeten JT, Kiseleva I, Heldens JG, den Bosch H, Klimov A, Rudenko L, Cox NJ, Donis RO. 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.

16. Isakova-Sivak I, de Jonge J, Smolonogina T, Rekstin A, van Amerongen G, van Dijken H, Mouthaan J, Roholl P, Kuznetsova V, Doroshenko E, Tsvetnitsky V, Rudenko L. Development and pre-clinical evaluation of two LAIV strains against potentially pandemic H2N2 influenza virus. *PLoS One*. 2014;9(7):e102339.

17. Isakova-Sivak I, Rudenko L. Safety, immunogenicity and infectivity of new live attenuated influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(10):1313-29.

18. Isakova-Sivak I, Stukova M, Erofeeva M, Naykhin A, Donina S, Petukhova G, Kuznetsova V, Kiseleva I, Smolonogina T, Dubrovina I, Pisareva M, Nikiforova A, Power M, Flores J, Rudenko L. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and

immunogenic for healthy adult volunteers. *Human Vaccines Immunotherapeutics*. 2015;11(4):970-82.

19. Karron RA, Callahan K, Luke C, Thumar B, McAuliffe J, Schappell E, Joseph T, Coelingh K, Jin H, Kemble G, Murphy BR, Subbarao K. A live attenuated H9N2 influenza vaccine is well tolerated and immunogenic in healthy adults. *J Infect Diseases*. 2009;199(5):711-6.

20. Karron RA, Talaat K, Luke C, Callahan K, Thumar B, Dilorenzo S, McAuliffe J, Schappell E, Suguitan A, Mills K, Chen G, Lamirande E, Coelingh K, Jin H, Murphy BR, Kemble G, Subbarao K. Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults. *Vaccine*. 2009;27(36):4953-60.

21. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infect Diseases*. 2006;12(1):9-14.

22. Kulkarni PS, Agarkhedkar S, Lalwani S, Bavdekar AR, Jog S, Raut SK, Parulekar V, Agarkhedkar SS, Palkar S, Mangrulkar S. Effectiveness of an Indian-made attenuated influenza A(H1N1)pdm2009 vaccine: a case control study. *Human Vaccines Immunotherapeutics*. 2014;10(3):566-71.

23. Larionova N, Kiseleva I, Isakova-Sivak I, Rekstin A, Dubrovina I, Bazhenova E, Ross TM, Swayne D, Gubareva L, Tsvetnitsky V, Fedorova E, Doroshenko E, Rudenko L. Live Attenuated Influenza Vaccines against Highly Pathogenic H5N1 avian Influenza: Development and Preclinical Characterization. *Vaccines Vaccination*. 2013;4(8):208.

24. Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster RG. Influenza: emergence and control. *J Virol*. 2004;78(17):8951-9.

25. Mallory RM, Malkin E, Ambrose CS, Bellamy T, Shi L, Yi T, Jones T, Kemble G, Dubovsky F. Safety and immunogenicity following administration of a live, attenuated monovalent 2009 H1N1 influenza vaccine to children and adults in two randomized controlled trials. *PLoS One*. 2010;5(10):e13755.

26. Nabel GJ, Wei CJ, Ledgerwood JE. Vaccinate for the next H2N2 pandemic now. *Nature*. 2011;471:157-8.

27. Pappas C, Viswanathan K, Chandrasekaran A, Raman R, Katz JM, Sasisekharan R, Tumpey TM. Receptor specificity and transmission of H2N2 subtype viruses isolated from the pandemic of 1957. *PLoS One*. 2010;5(6):e11158.

28. Qi L, Pujanauski LM, Davis AS, Schwartzman LM, Chertow DS, Baxter D, Scherler K, Hartshorn KL, Slemons RD, Walters KA, Kash JC, Taubenberger JK. Contemporary avian influenza A virus subtype H1, H6, H7, H10, and H15 hemagglutinin genes encode a mammalian virulence factor similar to the 1918 pandemic virus H1 hemagglutinin. *mBio*. 2014;5(6):e02116-14.

29. Rekstin A, Desheva Y, Kiseleva I, Ross T, Swayne D, Rudenko L. Live Attenuated Influenza H7N3 Vaccine is Safe, Immunogenic and Confers Protection in Animal Models. *Open Microbiol J*. 2014;8:154-62.

30. Robertson JS, Nicolson C, Harvey R, Johnson R, Major D, Guilfoyle K, Roseby S, Newman R, Collin R, Wallis C, Engelhardt OG, Wood JM, Le J, Manojkumar R, Pokorny BA, Silverman J, Devis R, Bucher D, Verity E, Agius C, Camuglia S, Ong C, Rockman S, Curtis A, Schoofs P, Zoueva O, Xie H, Li X, Lin Z, Ye Z, Chen LM, O'Neill E, Balish A, Lipatov AS, Guo Z, Isakova I, Davis CT, Rivaviller P, Gustin KM, Belser JA, Maines TR, Tumpey TM, Xu X, Katz JM, Klimov A, Cox NJ, Donis RO. The development of vaccine viruses against pandemic A(H1N1) influenza. *Vaccine*. 2011;29(9):1836-43.
31. Rudenko L, Isakova-Sivak I. Pandemic preparedness with live attenuated influenza vaccines based on A/Leningrad/134/17/57 master donor virus. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(3):395-412.
32. Rudenko L, Isakova-Sivak I, Donina S. H7N3 live attenuated influenza vaccine has a potential to protect against new H7N9 avian influenza virus. *Vaccine*. 2013;31(42):4702-5.
33. Rudenko L, Isakova-Sivak I, Naykhin A, Kiseleva I, Stukova M, Erofeeva M, Korenkov D, Matyushenko V, Sparrow E, Kieny MP. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I trial. *Lancet Infect Diseases*. 2016;16(3):303-10.
34. Rudenko L, Kiseleva I, Naykhin AN, Erofeeva M, Stukova M, Donina S, Petukhova G, Pisareva M, Krivitskaya V, Grudin M, Buzitskay Z, Isakova-Sivak I, Kuznetsova S, Larionova N, Desheva J, Dubrovina I, Nikiforova A, Victor JC, Neuzil K, Flores J, Tsvetnitsky V, Kiselev O. Assessment of human immune responses to H7 avian influenza virus of pandemic potential: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study of live attenuated H7N3 influenza vaccine. *PLoS One*. 2014;9(2):e87962.
35. Rudenko L, Kiseleva I, Stukova M, Erofeeva M, Naykhin A, Donina S, Larionova N, Pisareva M, Krivitskaya V, Flores J. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study. *Vaccine*. 2015;33(39):5110-7.
36. Rudenko L, van den Bosch H, Kiseleva I, Mironov A, Naikhin A, Larionova N, Bushmenkov D. Live attenuated pandemic influenza vaccine: clinical studies on A/17/California/2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries. *Vaccine*. 2011;29(Suppl 1):A40-4.
37. Rudenko LG, Slepshkin AN, Mono AS, Kendal AP, Grigorieva EP, Burtseva EP, Rekestin AR, Beljaev AL, Bragina VE, Cox N et al. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia. *J Infect Dis*. 1993;168(4):881-7.
38. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006;440:435-6.
39. Shrestha SS, Swerdlow DL, Borse RH, Prabhu VS, Finelli L, Atkins CY, Owusu-Edusei K, Bell B, Mead PS, Biggerstaff M, Brammer L, Davidson H, Jernigan D, Jhung MA, Kamimoto LA, Merlin TL, Nowell M, Reed SC, Reed C, Schuchat A, Meltzer MI. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009-April 2010). *Clin Infect Diseases*. 2011;52(Suppl 1):S75-S82.
40. Song L. It is unlikely that influenza viruses will cause a pandemic again like what happened in 1918 and 1919. *Frontiers Public Health*. 2014;2:39.
41. Sorrell EM, Ramirez-Nieto GC, Gomez-Osorio IG, Perez DR. Genesis of pandemic influenza. *Cytogenetic Genome Res*. 2007;117:394-402.
42. Stittelaar KJ, Veldhuis Kroeze EJ, Rudenko L, Dhare R, Thirapakpoomanunt S, Kieny MP, Osterhaus AD. Efficacy of live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 influenza in ferrets. *Vaccine*. 2011;29(49):9265-70.
43. Talaat KR, Karron RA, Callahan KA, Luke CJ, DiLorenzo SC, Chen GL, Lamirande EW, Jin H, Coelingh KL, Murphy BR, Kemble G, Subbarao K. A live attenuated H7N3 influenza virus vaccine is well tolerated and immunogenic in a Phase I trial in healthy adults. *Vaccine*. 2009;27(28):3744-53.
44. Talaat KR, Karron RA, Luke CJ, Thumar B, McMahon BA, Chen GL, Lamirande EW, Jin H, Coelingh KL, Kemble G, Subbarao K. An open label Phase I trial of a live attenuated H6N1 influenza virus vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2011;29(17):3144-8.
45. Tweed SA, Skowronski DM, David ST, Larder A, Petric M, Lees W, Li Y, Katz J, Kraiden M, Tellier R, Halpert C, Hirst M, Astell C, Lawrence D, Mak A. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerging Infect Diseases*. 2004;10(12):2196-9.
46. Van Kerkhove MD, Vandemaële KA, Shinde V, Jaramillo-Gutierrez G, Koukounari A, Donnelly CA, Carlino LO, Owen R, Paterson B, Pelletier L, Vachon J, Gonzalez C, Hongjie Y, Zijian F, Chuang SK, Au A, Buda S, Krause G, Haas W, Bonmarin I, Taniguchi K, Nakajima K, Shobayashi T, Takayama Y, Sunagawa T, Heraud JM, Orelle A, Palacios E, van der Sande MA, Welders CC, Hunt D, Cutter J, Lee VJ, Thomas J, Santa-Olalla P, Sierra-Moros MJ, Hanshaoworakul W, Ungchusak K, Pebody R, Jain S, Mounts AW. Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: a global pooled analysis. *PLoS Med*. 2011;8(7):e1001053.
47. Webster RG. Influenza: an emerging disease. *Emerging Infect Diseases*. 1998;4(3):436-41.
48. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Reviews*. 1992;56(1):152-79.
49. Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerging Infect Diseases*. 2006;12(1):3-8.
50. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*. 2014;22(4):183-91.