

УДК 571.27

Разработка рекомбинантной вакцины против гриппа А(Н1N1) 2009 на основе вирусоподобных наночастиц – носителей внеклеточного домена М2 белка

Р. Ю. Котляров¹, В. В. Куприянов¹, А. И. Мигунов², Л. А. Степанова², Л. М. Цыбалова²,
О. И. Киселев², Н. В. Равин^{1*}, К. Г. Скрябин¹

¹ Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

² ГУ НИИ гриппа СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17

* E-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 23.04.2010 г.

РЕФЕРАТ Используемые в настоящее время противогриппозные вакцины основаны на получаемом в куриных эмбрионах вирусе гриппа или его компонентах. Изменчивость высокоиммуногенных поверхностных белков вируса гриппа – гемагглютинина и нейраминидазы – требует создания вакцин, соответствующих новым штаммам вируса. Альтернативой традиционным вакцинам являются рекомбинантные вакцины, основанные на отдельных белках вируса гриппа, которые могут быть получены в стандартных организмах-продуцентах. Мы сконструировали рекомбинантные наноразмерные вирусоподобные частицы на основе ядерного антигена вируса гепатита В, несущие на своей поверхности полипептид внеклеточного домена М2 белка вируса нового высокопатогенного штамма «свиного» гриппа А(Н1N1) 2009. Разработаны методы получения этих вирусоподобных частиц в клетках *Escherichia coli*, их выделения и очистки. В результате испытаний полученных препаратов на животных показано, что М2sНВс частицы являются высокоиммуногенными и обеспечивают защиту иммунизированных мышей от летальной инфекции вирусом «свиного» гриппа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА грипп, вакцина, М2 белок, наночастица, НВс антиген.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ М2е – внеклеточный домен М2 белка вируса гриппа, НВс – ядерный антиген вируса гепатита В, М2sНВс – гибридный белок, включающий М2е вируса «свиного» гриппа и НВс, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ИФА – иммуноферментный анализ, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка, ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, LD₅₀ – доза, соответствующая 50 %-ной летальности.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп является одним из наиболее распространенных вирусных заболеваний человека и животных. Вирусы гриппа типа А различаются по степени патогенности в отношении человека и животных. В последние годы высокопатогенные штаммы Н5N1 вызывали локальные вспышки с высокой смертностью в регионах Юго-Восточной Азии. Вирус Н1N1 свиного происхождения вызвал пандемию гриппа 2009–2010 гг. с неожиданно высоким уровнем смертности среди людей среднего возраста и групп риска. По многим фенотипическим свойствам и филогенетическому происхождению пандемический вирус Н1N1v близок к вирусу, вызвавшему «испанку» в 1918–1920 гг., что подтверждает возможность возврата в циркуляцию среди людей вирусов с высоким потенциалом патогенности. Используемые в настоящее время противогриппозные вакцины основаны на получаемом в куриных эмбрионах вирусе гриппа или его компонентах [1]. Высокая изменчивость поверхностных белков вируса, гемагглютинина и нейраминидазы приводит к возникно-

ванию нового эпидемического штамма каждые 1–2 года [2], с такой же частотой требуется изготовление стандартных штамм-специфических вакцин.

Одним из потенциальных источников антигенной изменчивости вируса гриппа человека является его рекомбинация (реассортация) с вирусами гриппа животных, которая может привести к возникновению нового высокопатогенного рекомбинантного вируса, неизвестного иммунной системе человека и потому способного вызвать пандемию. В то же время создание традиционной вакцины от нового штамма требует длительного времени (от 6 до 9 мес.), в течение которого появление нового пандемического штамма гриппа может привести к гибели миллионов людей. Как уже указывалось, таким новым высокопатогенным штаммом является вызвавший пандемию 2009 г. вирус так называемого «свиного» гриппа, относящийся, по последовательностям его гемагглютинина и нейраминидазы, к типу Н1N1.

Альтернативой традиционным вакцинам являются рекомбинантные вакцины, основанные на отдельных бел-

Таблица 1. Сравнение аминокислотных последовательностей внеклеточных доменов М2 белков различных штаммов вируса гриппа человека и животных. Отличия от консенсусной последовательности М2е «человеческого» вируса гриппа типа А подчеркнуты

Хозяин	Штамм	Последовательность М2е пептида
Свинья/ человек	A/California/04/2009	SLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD
Человек	Консенсусная последовательность	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
>>	A/PR/8/34	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
Птица	A/Chicken/Kurgan/05/2005	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD
>>	A/Duck/ Potsdam1402-6/1986	SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD

ках вируса гриппа, которые могут быть получены в стандартных организмах-продуцентах, например бактериях или дрожжах. Использование рекомбинантных вакцин не только снимает зависимость производства от куриных эмбрионов и решает проблемы безопасности, общие для вакцин, основанных на цельном патогене [3], но и открывает возможности создания универсальных вакцин при использовании консервативных белков вируса. Более того, такой подход позволяет, с одной стороны, подготовить вакцину очень быстро или создавать вакцины, которые перекрывают антигенные свойства большинства пандемических вирусов.

В работах группы W. Fiers (University of Ghent) исследовалась возможность создания универсальной противогриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка вируса гриппа [4, 5]. М2 является небольшим трансмембранным белком (97 а.о.), он в небольших количествах представлен в составе вириона, но эффективно экспрессируется в инфицированных клетках [6, 7]. Важной особенностью М2 является его консервативность, последовательность его внеклеточного домена М2е (23 а.о.) практически неизменна у всех вирусов гриппа типа А, выделенных у человека начиная с 1933 г. [4, 8, 9]. Однако М2 обладает низкой иммуногенностью, и при инфекции иммунный ответ против него практически не активируется [10].

Решением проблемы низкой иммуногенности М2 белка является присоединение его к наноразмерной частице-носителю. Такая нановакцина, имитируя патоген, обладает высокой иммуногенностью и эффективно распознается иммунной системой человека. В работах группы W. Fiers в качестве носителя М2е пептида использовали вирусоподобные частицы, образуемые НВс антигеном вируса гепатита В [4, 11]. Иммунизация мышей рекомбинантными М2еНВс частицами, полученными в *E. coli*, обеспечивала 100 %-ную защиту от летальной гриппозной инфекции [4]. Помимо НВс в качестве частиц-носителей М2е могут быть использованы вирусоподобные частицы на основе папилломавируса человека [12], бактериофага Qβ [13], вируса мозаики папайи [14] и вируса мозаики коровьего гороха [15].

Как отмечалось выше, последовательность М2е высококонсервативна у всех штаммов вируса гриппа типа А человека, однако у штаммов животного происхождения она существенно отличается [16, 17]. Так, М2е вируса «свиного» гриппа А/California/04/2009(Н1N1), вызвавшего панде-

мию 2009 г., по 4 из 23 аминокислотных остатков отличается от консенсусной последовательности М2е штаммов человека (табл. 1). Такие различия могут определять специфичность вакцин на основе М2е. В этой работе мы сконструировали рекомбинантные частицы (М2сНВс-частицы), представляющие на своей поверхности М2е пептид вируса «свиного» гриппа А/California/04/2009(Н1N1), и показали, что иммунизация этими наночастицами обеспечивает 100 %-ную защиту иммунизированных мышей от летальной инфекции вирусом «свиного» гриппа А/California/04/2009(Н1N1). В то же время защита от заражения птичьим штаммом А/Duck/Potsdam1402-6/1986 или «человеческим» штаммом А/PR/8/34 оказалась лишь частичной, что свидетельствует о необходимости учета различий последовательностей М2е штаммов гриппа различного происхождения при разработке универсальных противогриппозных вакцин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование экспрессионного вектора рQE-М2сНВс и создание штамма-продуцента *E. coli*

Ген, кодирующий гибридный белок М2сНВс, синтезировали с помощью трехстадийной ПЦР. На первом этапе часть последовательности М2сНВс была получена в результате ПЦР с использованием праймеров М2F3 (С GAA TGG GAA TGC CGT TGC AGC GAT AGC AGC GAT GAC CCT) и НВс-R2 (А GGA TCC TCA GCA AAC AAC AGT AGT CTC CGG AAG) и ДНК копии генома вируса гепатита В в качестве матрицы. На втором этапе полученный фрагмент использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами М2сF1 (GAA ACC CCG ACC CGT AGC GAA TGG GAA TGC CGT TGC AGC) и НВс-R2. На третьем этапе полноразмерный ген М2сНВс получали в результате ПЦР-амплификации с праймерами М2сF2 (СТС АТГ АГС СТГ СТГ АСС GAA GTG GAA АСС ССГ АСС СГТ АГС) и НВс-R2. Полученный фрагмент длиной 525 нт обрабатывали рестриктазами PаgI и VаmНI, сайты узнавания которых были введены в последовательности праймеров М2сF2 и НВс-R2 соответственно, и клонировали в экспрессионном векторе рQE60 (Qiagen) по сайтам NcoI и VаmНI. Полученный экспрессионный вектор рQE-М2сНВс использовали в дальнейшей работе. Отсутствие обусловленных ПЦР мутаций в синтезированном гене было подтверждено с помощью секвенирования.

Таблица 2. Схема опыта по изучению иммуногенности и протективного действия кандидатной вакцины на основе M2e пептида вируса «свиного» гриппа

Группа мышей	Кол-во мышей	1-я иммунизация	2-я иммунизация	3-я иммунизация	Заражение вирусом гриппа		
					A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2)	A/California/04/2009 (H1N1)	A/PR/8/34
Опытная (M2sHBc)	60	60 мышей с адъювантом TiterMax Gold Adjuvant 50 мкг/мышь п/к*	60 мышей с неполным адъювантом Фрейнда 50 мкг/мышь п/к	60 мышей с неполным адъювантом Фрейнда 50 мкг/мышь п/к	20 мышей дозой 5 LD ₅₀	20 мышей дозой 5 LD ₅₀	10 мышей дозой 5 LD ₅₀
Контрольная (нативные мыши)	40	Физ. раствор	Физ. раствор	Физ. раствор	15 мышей дозой 5 LD ₅₀	15 мышей дозой 5 LD ₅₀	10 мышей дозой 5 LD ₅₀

* п/к – подкожное введение.

Для получения штамма-продуцента рекомбинантного белка M2sHBc плазмиду pQE-M2sHBc вводили в клетки *E. coli* штамма DLT1270 с помощью трансформации. Штамм DLT1270, являющийся производным штамма DH10B [18], содержит ген репрессора лактозного оперона *lacI*, интегрированный в хромосому.

Выделение и очистка M2sHBc частиц

Штамм DLT1270/pQE-M2sHBc выращивали в LB-бульоне до середины логарифмической фазы роста (OD₆₀₀ = 0.5) при 37 °C, добавляли IPTG до 1 mM и продолжали культивировать в течение 16 ч при 30 °C. Клетки штамма-продуцента после индукции осаждали центрифугированием 3000 об/мин в течение 30 мин и ресуспендировали в 50 mM Tris-HCl-буфере pH 8.0, содержащем 0.5 M NaCl, 15 mM ЭДТА и 20 % сахарозы из расчета 1 мл буфера на 50 мл культуральной жидкости. Клеточную суспензию обрабатывали лизоцимом (1 мг/мл) в течение 15 мин при 4 °C, затем клетки разрушали ультразвуком. К полученному лизату добавляли 1/20 объема раствора полиэтиленгликоля (50 % вес/объем) и инкубировали 30 мин при 4 °C. Затем проводили центрифугирование в течение 10 мин при 13 000 об/мин. К супернатанту добавляли 1/5 объема насыщенного раствора сульфата аммония, перемешивали и оставляли на 30 мин при 4 °C. Образовавшийся после центрифугирования осадок белков растворяли в 1 мл того же буфера и повторно осаждали сульфатом аммония в тех же условиях. Полученный осадок растворяли в 1 мл 50 mM Tris-HCl-буфера с pH 8.0, содержащего 0.5 M NaCl, 15 mM ЭДТА и 20 % сахарозы. Полученный препарат M2sHBc частиц содержал, по данным SDS-PAGE, около 90 % белка M2sHBc в концентрации ~ 0.5 мг/мл.

Иммунизация мышей

Для изучения иммуногенности и протективного действия кандидатной вакцины была использована схема иммунизации с применением для первого введения вакцины адъюванта TiterMax Gold Adjuvant (Sigma) и последующих иммунизаций — неполного адъюванта Фрейнда (Sigma) в соответствии с их инструкцией по применению. Вторая иммунизация была проведена через три недели после первой, третья — через неделю после второй. Схема иммунизации приведена в табл. 2.

Сыворотки собирали через 2 недели после 3-й иммунизации, титры антител определяли в пуле сывороток мышей каждой группы (3–5 мышей). В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированных мышей, а как положительный контроль — моноклональные антитела к M2e пептиду штамма A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2), которые были предоставлены П.Г. Свешниковым (ОАО «ВНЦМДЛ»).

Синтетические пептиды

В качестве стандартов для определения антител против M2e были использованы синтетические пептиды G-11-1 (SLLTEVETPTRNEWECRCS DSSD, соответствует M2e штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005), G-19 (SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD, соответствует M2e штамма A/Duck/Potsdam1402-6/1986), G-26 (SLLTEVETPTRSEWECRCS DSSD, соответствует M2e штамма A/California/04/2009) и G18 (SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD, соответствует M2e штамма A/PR/8/34).

ИФА для определения титра специфических антител

Для проведения ИФА 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) покрывали синтетическими пептидами G-11-1, G19, G26 и G18 в концентрации 5 мкг/мл (в карбонатном буфере, pH 9.5–9.6), выдерживали ночь при 4 °C. Планшеты обрабатывали блокирующим буфером (0.01 M ФСБ pH 7.–7.4) с 5 %-ной ЭТС в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывали 3 раза ФСБ с твином. Пул сывороток мышей каждой группы исследовали в дубликатах. В лунки планшета добавляли 100 мкл 2-кратных разведений сывороток (начиная с 1:400) в блокирующем буфере, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. В качестве конъюгата использовали кроличьи поликлональные антимышьиные IgG (Abscam, Великобритания) в разведении 1:8000, меченные пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали ТМБ. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором оптическое поглощение по крайней мере в 2 раза больше, чем оптическое поглощение сыворотки неиммунизированных мышей в том же разведении.

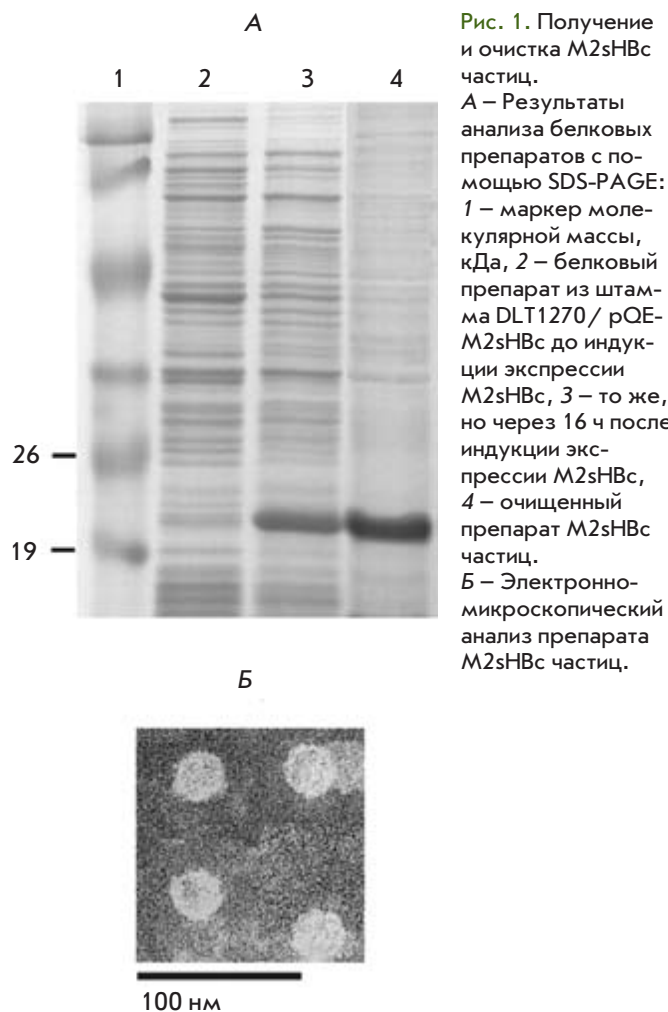


Рис. 1. Получение и очистка M2sHBc частиц. **А** – Результаты анализа белковых препаратов с помощью SDS-PAGE: 1 – маркер молекулярной массы, кДа, 2 – белковый препарат из штамма DLT1270/ pQE-M2sHBc до индукции экспрессии M2sHBc, 3 – то же, но через 16 ч после индукции экспрессии M2sHBc, 4 – очищенный препарат M2sHBc частиц. **Б** – Электронно-микроскопический анализ препарата M2sHBc частиц.

Вирусы и заражение мышей

Для заражения животных, иммунизированных кандидатными вакцинами, были использованы следующие вирусы гриппа, адаптированные к мышам: A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2), A/California/04/2009 (H1N1) и A/PR/8/34 (H1N1). Вирусы вводили интраназально в дозе 5 LD₅₀ по 50 мкл/мышь под легким эфирным наркозом. После заражения ежедневно наблюдали за животными. Протективное действие кандидатной вакцины оценивали с помощью двух параметров: определения динамики падения массы тела и выживаемости мышей после заражения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн и получение M2sHBc наночастиц

Ядерный антиген вируса гепатита В является одним из наиболее эффективных носителей антигенных детерминант. Мономеры этого белка, состоящие из 183 а.о., собираются в икосаэдрические частицы диаметром 34 нм, состоящие из 240 субъединиц, организованных в димерные блоки [19]. Два района HBc антигена могут быть использованы

для презентации чужеродных пептидов на поверхности HBc частиц – N-конец белка и иммунодоминантная петля, расположенная между 75-м и 85-м аминокислотными остатками белка [20 – 22]. Согласно нашему опыту, введение чужеродных последовательностей в иммунодоминантную петлю в большинстве случаев нарушает сборку и/или растворимость частиц, поэтому для конструирования гибридного белка M2sHBc в качестве места вставки M2e пептида был использован N-конец HBc. Последовательность HBc содержит аргинин-богатый C-концевой домен, связывающий вирусную ДНК при сборке вириона, при экспрессии в *E. coli* этот домен связывает бактериальную РНК [23], наличие которой в препарате нежелательно. Поскольку C-концевой домен (150–183 а.о.) не требуется для сборки частиц [24], он был удален и заменен остатком цистеина, введение которого повышает стабильность HBc частиц [16]. Таким образом, сконструированный нами гибридный белок M2sHBc включал, начиная с N-конца, последовательность M2e вируса «свиного» гриппа A/California/04/2009 (H1N1), последовательность HBc антигена от 4-й до 149-й аминокислоты и C-концевой цистеин.

Ген, кодирующий гибридный белок M2sHBc, был синтезирован с помощью трехстадийной ПЦР с использованием последовательности HBc в качестве матрицы. На каждой стадии к 5'-концу синтетического гена добавлялись последовательности, кодирующие участки M2e. Полученный синтетический ген клонировали в экспрессионном векторе pQE60 (Qiagen) под контролем промотора, индуцируемого IPTG. Гибридный белок хорошо экспрессируется в *E. coli* (рис. 1А) и в основном содержится в растворимой фракции. Сборка M2sHBc в вирусоподобные наночастицы была подтверждена электронно-микроскопическим анализом очищенного препарата (рис. 1Б).

Иммуногенность M2sHBc частиц

Для характеристики иммуногенности и протективного действия был проведен эксперимент по иммунизации мышей очищенным препаратом M2sHBc частиц. Опытную группу из 60 животных иммунизировали подкожно с применением для первого введения вакцины адьюванта TiterMax Gold Adjuvant (Sigma), а для двух последующих иммунизаций – неполного адьюванта Фрейнда (Sigma). Для определения иммуногенности кандидатной вакцины были исследованы сыворотки мышей через 2 недели после 1-й и после 3-й иммунизации, титры антител определяли в пуле сывороток мышей каждой группы (3–5 мышей). Для проведения ИФА использовали четыре синтетических пептида, последовательности которых соответствовали M2e вируса «свиного» гриппа A/California/04/2009, двум штаммам птичьего гриппа и штамму A/PR/8/34 человека. Полученные результаты (табл. 3) показывают, что после 3-кратной иммунизации в высоких титрах образуются сывороточные антитела изотипа IgG, связывающиеся как с синтетическим пептидом G-26 «свиного» гриппа A/California/7/2009, последовательность которого соответствовала использованному для иммунизации M2sHBc, так и с синтетическими пептидами, последовательности которых соответствуют M2e гетерологичных штаммов «птичьего» и «человеческого» гриппа.

Таблица 3. Титры IgG антител к синтетическим пептидам M2e

Образцы сыворотки	Титры антител к синтетическим пептидам M2e			
	G-26	G-19	G-11-1	G-18
Мыши после 1-й иммунизации	1600	1600	800	800
Мыши после 3-й иммунизации	51 200	51 200	51 200	6400
Положительный контроль (моноклональные антитела к пептиду G19 – клон D2)	>51 200	>51 200	>51 200	1600
Отрицательный контроль (сыворотка неиммунизированных мышей)	<400	<400	<400	<400

Протективное действие кандидатной вакцины

Для оценки протективного действия вакцины мышам опытной и контрольной групп заражали тремя штаммами вируса гриппа, адаптированными к мышам: A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 (H5N2), A/California/04/2009 (H1N1) и A/PR/8/34 (H1N1). Вирусы вводили интраназально в дозе 5 LD₅₀.

На рис. 2 показана динамика падения массы тела животных после заражения 5 LD₅₀ вируса «свиного» гриппа A/California/4/2009, что может являться показателем тяжести протекания заболевания. После инфицирования масса иммунизированных животных снижалась (до 90 % от начальной), но в значительно меньшей степени, чем у мышам контрольной группы (до 70 % от начального веса). Эти результаты показывают, что иммунизация кандидатной вакциной не предотвращает гриппозную инфекцию, но облегчает ее протекание.

Динамика гибели мышам после заражения различными штаммами вируса гриппа представлена на рис. 3. Полученные данные свидетельствуют о 100 %-ном протективном действии M2sHBc после трехкратной иммунизации. За весь период наблюдения все животные в этой группе остались

живы. В контрольной группе мышам при этих условиях заражения выжило лишь 12 % животных. Частичная защита от инфекции наблюдалась и в отношении штаммов гриппа, у которых аминокислотная последовательность M2e пептида отличается от таковой в использованном для иммунизации препарате. Так, при инфицировании мышам вирусом «птичьего» штамма A/Duck/Potsdam/1402-6/1986 наблюдали 60 %-ную выживаемость иммунизированных животных против 13 % в контрольной группе (статистическая значимость P < 0.006, тест Фишера). При инфицировании «человеческим» гриппом A/PR/8/34 выживаемость животных составила 40 % в опытной группе и 20 % – в контрольной.

Перспективы создания универсальных противогриппозных вакцин на основе M2e

Консервативность аминокислотной последовательности M2 белка стала основой разработки противогриппозных вакцин универсального действия на его основе. Поскольку практически все выделенные из человеческой популяции вирусы гриппа типа А имеют одинаковую последовательность M2e, перспектива создания такой вакцины является реальной [5]. Однако появившиеся в последние годы штаммы животного происхождения, в частности вирус «свиного» гриппа, имеют отличия в последовательности M2e пептида, и, как показывают полученные нами результаты, эффективность M2e вакцин в отношении гетерологичных штаммов гриппа является более низкой. Одним из путей создания M2e вакцин, эффективных в отношении широкого спектра штаммов гриппа, как человека, так и животных, может стать включение в состав M2sHBc частиц нескольких копий M2e пептида, последовательности которых соответствуют различным типам M2e.

ВЫВОДЫ

Целью данной работы являлась разработка рекомбинантной кандидатной вакцины против нового высокопатогенного штамма вируса гриппа типа А, «свиного» гриппа H1N1. Использованный нами подход предполагал конструирование нановакцины, в которой внеклеточный домен M2 белка вируса был представлен на поверхности вирусоподобных частиц, образованных ядерным антигеном вируса гепатита В. Полученные нами данные показывают, что гибридный белок M2sHBc эффективно экспрессируется в E. coli и собирается в наноразмерные вирусоподобные частицы. Иммунизация мышам препаратом M2sHBc частиц вызывает

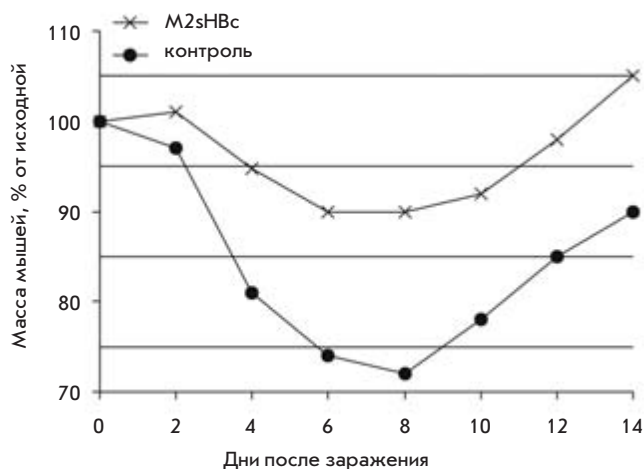


Рис. 2. Динамика изменения массы мышам после заражения вирусом гриппа A/California/04/2009. Данные в контроле приведены для выживших мышам.

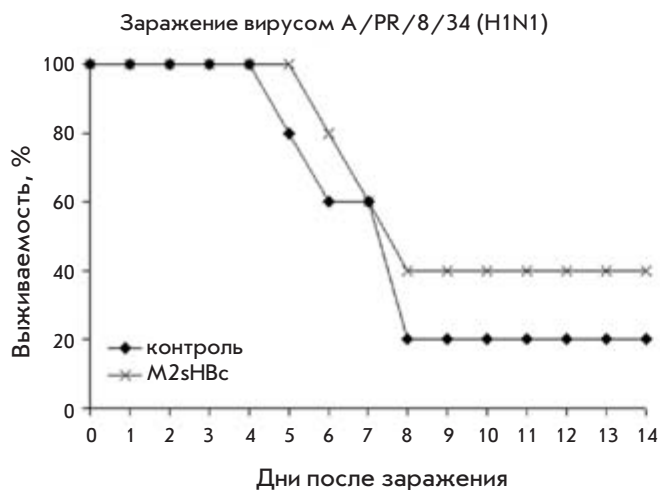
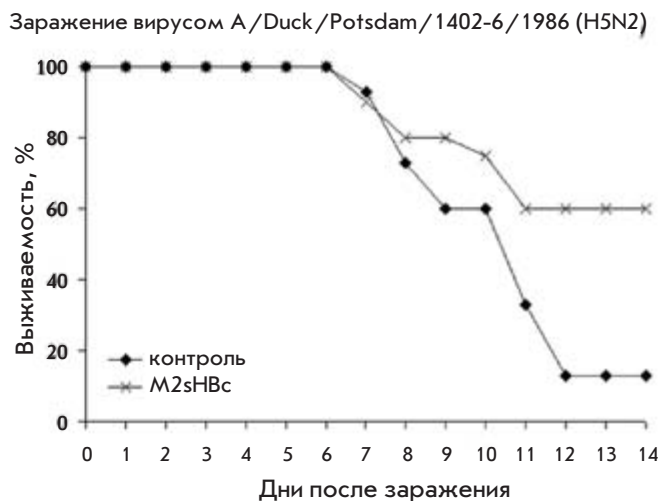
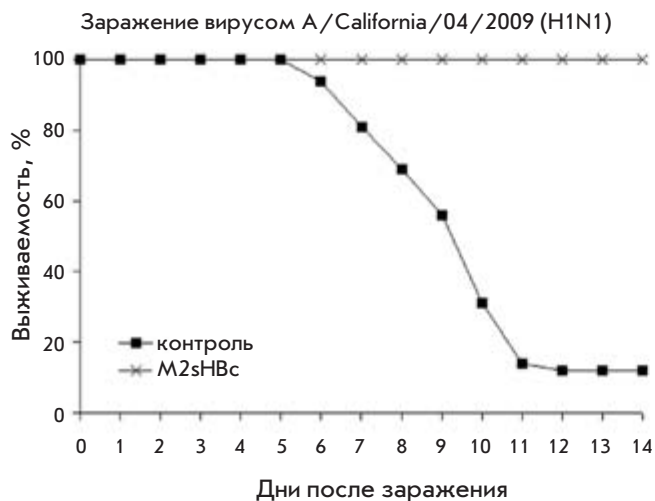


Рис. 3. Динамика гибели мышей, иммунизированных M2sHBc частицами, после заражения различными штаммами вируса гриппа.

эффективный иммунный ответ против M2e и обеспечивает формирование протективного иммунитета в отношении штамма вируса гриппа, имеющего идентичную последовательность M2e пептида. Таким образом, полученные

M2sHBc частицы могут являться основой создания рекомбинантной вакцины против современного пандемического «свиного» гриппа H1N1 и других вирусов, циркуляция которых ожидается в ближайшие годы. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nicholson K., Webster R., Hay A. Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell Science, 1998.
- Webster R., Bean W., Gorman O., Chambers T., Kawaoka Y. // Microbiol. Rev. 1992. V. 56(1). P. 152–179.
- Webby R., Perez D., Coleman J., et al. // Lancet. 2004. V. 363. P. 1099–1103.
- Neiryck S., Deroo T., Saelens X., et al. // Nat. Med. 1999. V. 5. P. 1157–1163.
- Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. // Expert Rev Vaccines. 2009. V. 8(4). P. 499–508.
- Lamb R., Zebedee S., Richardson C. // Cell. 1985. V. 40. P. 627–633.
- Pinto H., Holsinger J., Lamb A. // Cell. 1992. V. 69. P. 517–528.
- Fiers W., De Filette M., Birkett A., Neiryck S., Min Jou W. // Virus Res. 2004. V. 103. P. 173–176.
- Ito T., Gorman O., Kawaoka Y., Bean W., Webster R. // J. Virol. 1991. V. 65. P. 5491–5498.
- Feng J., Zhang M., Mozdhanowska K., et al. // Virol. J. 2006. V. 3. P. 102.
- De Filette M., Min Jou W., Birkett A., et al. // Virology. 2005. V. 337 (1). P. 149–161.
- Ionescu R., Przysiecki C., Liang X., et al. // J. Pharm. Sci. 2006. V. 95 (1). P. 70–79.
- Bessa J., Schmitz N., Hinton H., et al. // Eur. J. Immunol. 2008. V. 38 (1). P. 114–126.
- Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., et al. // Vaccine. 2008. V. 26 (2728) P. 3395–3403.
- Мещерякова Ю.А., Эльдаров М.А., Мигунов А.И. и др. // Мол. биол. 2009. Т. 43. С. 741–750.
- De Filette M., Fiers W., Martens W., et al. // Vaccine. 2006. V. 24 (4446) P. 6597–6601.
- Tompkins S., Zhao Z., Lo C., et al. // Emerg. Infect. Dis. 2007. V. 13 (3). P. 426–435.
- Grant S., Jessee J., Bloom F., Hanahan D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4645–4649.
- Wynne S., Crowther R., Leslie A. // Mol. Cell. 1999. V. 3. P. 771–780.
- Kratz P., Bottcher B., Nassal M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 1915–1920.
- Murray K., Shiau A.L. // Biol. Chem. 1999. V. 380. P. 277–283.
- Pumpens P., Grens E. // Intervirology. 2001. V. 44. P. 98–114.
- Wingfield P., Stahl S., Williams R., Steven A. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 4919–4932.
- Zheng J., Schodel F., Peterson D. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 9422–9429.