

УДК 571.27;578.74

Гриппозные рекомбинантные вакцины

Е. С. Седова^{1*}, Д. Н. Щербинин¹, А. И. Мигунов², Ю. А. Смирнов^{1,3}, Д. Ю. Логунов¹,
М. М. Шмаров¹, Л. М. Цыбалова², Б. С. Народицкий¹, О. И. Киселев², А. Л. Гинцбург¹

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Минздравсоцразвития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Научно-исследовательский институт гриппа Минздравсоцразвития Российской Федерации,
197022, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17

³Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского
Минздравсоцразвития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

*E-mail: sedova-es@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.07.2012

РЕФЕРАТ Обзор посвящен проблеме конструирования и получения новых гриппозных вакцин при помощи рекомбинантных технологий. Новые подходы к созданию гриппозных вакцин включают возможности обратной генетики, получение вирусоподобных частиц в различных экспрессионных системах и рекомбинантные технологии, позволяющие конструировать генетические вакцины. Большой интерес представляют такие подходы, как генетическая иммунизация, позволяющие сохранить нативную структуру антигенов вируса гриппа. Среди векторов, используемых для создания генетических вакцин, особое место занимают аденовирусные. Они легко взаимодействуют и проникают в клетки слизистой оболочки дыхательного тракта, что позволяет проводить мукозальную иммунизацию, обеспечивая длительную персистенцию антигена в организме и активизацию врожденного иммунитета. Обсуждается возможность использования панели аденовирусных векторов, несущих гены гемагглютинаина различных вирусов гриппа А, для создания вакцины, обеспечивающей защиту от большинства эпидемических вариантов вируса гриппа А.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА грипп, иммунизация, рекомбинантные вакцины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; РНК – рибонуклеиновая кислота; Ad – аденовирус; HA – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; NP – нуклеопротеин.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – самое массовое инфекционное заболевание. По данным ВОЗ, ежегодно во всем мире гриппом заболевают 20–30% детей и от 5 до 10% взрослых, а от тяжелых осложнений, вызванных гриппозной инфекцией, умирают от 250 до 500 тыс. человек. Экономический ущерб от эпидемий гриппа составляет 1–6 млн долларов на 100 тыс. населения [1]. При пандемиях масштабы ущерба и смертность значительно возрастают. Например, от пандемии гриппа в 1918–1919 годах умерли, по разным данным, от 50 до 100 млн человек [2].

Важнейшей мерой защиты от гриппозной инфекции и ограничения ее распространения является вакцинопрофилактика [3]. Современные гриппозные вакцины индуцируют, как правило, образование антител к поверхностным антигенам вируса гриппа – гемагглютинину (HA) и нейраминидазе (NA). К таким вакцинам относятся как живые, так и инактивированные (цельновирсионные, расщепленные, субъединичные) вакцины. Эффективность сезонных вакцин прямо зависит от степени соответствия антигенной структуры

штаммов вируса гриппа, входящих в состав вакцины, и штаммов, циркулирующих среди населения в текущий эпидемический сезон. Поверхностные белки вируса гриппа подвергаются постоянной антигенной вариации (антигенный дрейф), что требует ежегодного обновления штаммового состава вакцин [4].

Разработка высокоиммуногенных и безопасных вакцин, индуцирующих иммунный ответ широкого спектра действия, является на сегодняшний день одной из основных проблем эффективной профилактики гриппа. Пандемия 2009–2010 годов, вызванная вирусом гриппа А (H1N1)pdm09, и существующая пандемическая угроза, вызванная «птичьими» вирусами гриппа А (H5N1), поддерживают интерес к созданию новых вакцин, способных индуцировать широкий защитный иммунитет [5].

Применение методов обратной генетики для создания гриппозных вакцин

Существующие гриппозные вакцины можно разделить на два вида: аттенуированные (живые) и инактивированные, включая субъединичные. Все они

Конструирование вируса гриппа с помощью обратной генетики

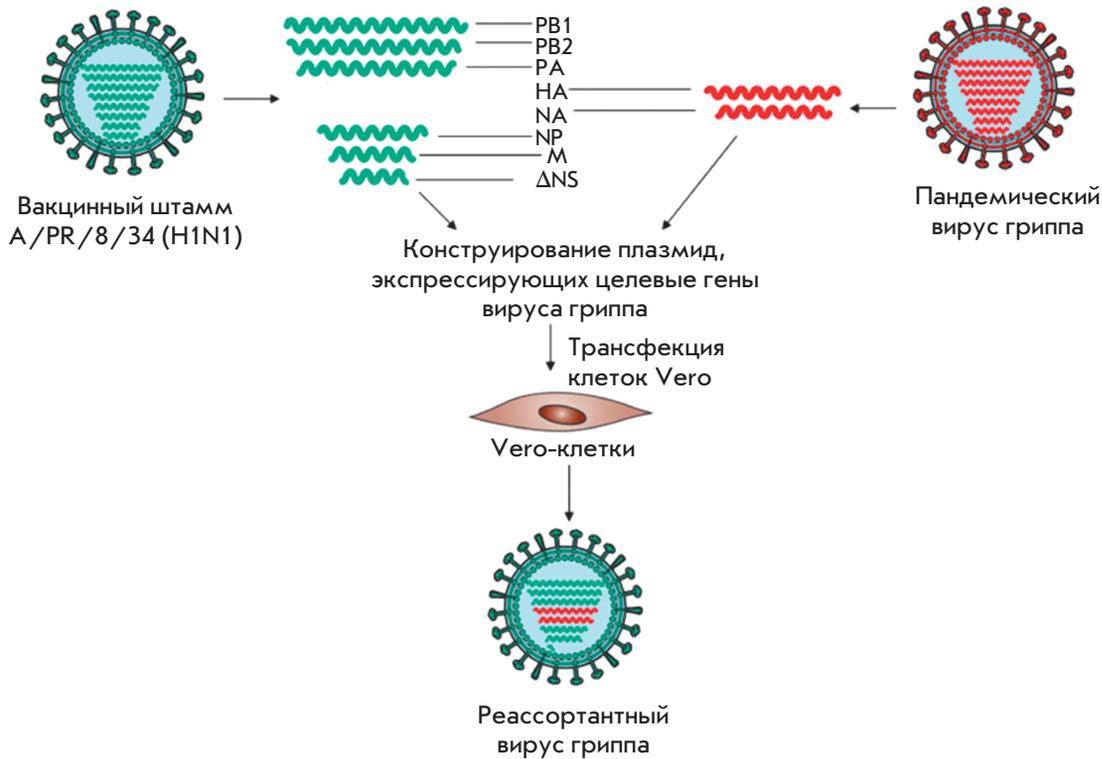


Рис. 1. Получение реассортантного штамма вируса гриппа с помощью обратной генетики

достаточно широко применяются при вакцинации населения и хорошо зарекомендовали себя. Атенуированные вакцины представляют собой вирусы гриппа с ослабленной вирулентностью [6]. При приготовлении инактивированных субъединичных вакцин также используются эпидемически актуальные штаммы вируса, хотя применение высокопатогенных штаммов ограничено высокими требованиями к биологической безопасности производства [7].

Традиционные способы получения вакцинных штаммов вируса гриппа А имеют ряд недостатков. Использование как аттенуации, основанной на адаптации вирусов к организму гетерологичного хозяина [8], так и реассортации при коинфекции эпидемическими штаммами и донорами аттенуации [9] не всегда позволяет сохранить баланс между уровнем вирулентности исходного вируса и его иммуногенностью. Чрезмерная аттенуация может привести к получению штаммов, утративших способность репродуцироваться в клетках дыхательных путей человека.

Альтернативным способом получения вакцинных штаммов является использование методов обратной генетики. Обратная генетика позволяет воссоздать биологически активную вирусную частицу путем коинфекции перmissive линий клеток плазмидами, содержащими гены, кодирующие вирусные белки. Внося изменения в эти гены, можно менять

вирулентность и антигенные свойства вируса гриппа [10].

С помощью методов обратной генетики можно получить реассортанты вирусов гриппа. Например, плазмидами, кодирующими сегменты генома пандемического или циркулирующего сезонного штамма и аттенуированного вакцинного штамма вируса гриппа А, трансфицируют перmissive эукариотические клетки. В результате происходит сборка полноценных вирионов вируса, несущих набор белков как вакцинного, так и патогенного штаммов (рис. 1). С помощью данного метода удалось получить и исследовать вирус гриппа А (H1N1), вызвавший в 1918 году пандемию («испанский грипп») [11].

Методы обратной генетики позволяют снижать вирулентность вируса путем введения мутаций в различные вирусные гены. Например, мутации в двух генах, кодирующих полимеразные белки PB1 и PB2 вируса гриппа птиц A/guinea fowl/Hong Kong/WF10199 (H9N2), привели к утрате патогенности вируса для кур [12]. Делеция неструктурного белка NS1 обеспечила аттенуацию вируса гриппа А. Полученная таким способом вакцина успешно прошла первую фазу клинических испытаний [13, 14]. Внесения мутаций в белок M2, необходимый для формирования ионного канала, также приводят к аттенуации вируса [15]. Изменение последовательности аминок-

кислот в сайте нарезания HA высокопатогенного вируса гриппа А H5 при помощи направленного мутагенеза привело к приобретению им характеристик низкопатогенных вирусов [16].

Методы обратной генетики хорошо зарекомендовали себя при получении аттенуированных штаммов вирусов гриппа [17]. Однако использование реассортации в случае вакцинных штаммов поднимает вопрос биобезопасности в связи с возможностью мутаций, восстанавливающих или повышающих вирулентность вируса [18]. Кроме того, широкое применение живых аттенуированных гриппозных вакцин вызывает опасение ввиду возможной реассортации живой вакцины с циркулирующими штаммами вирусов гриппа человека [19, 20]. В препаративных количествах вакцинные штаммы вируса гриппа чаще всего получают в куриных эмбрионах, что делает невозможным вакцинацию лиц с аллергией на куриный белок. Зависимость технологического процесса от продуктивности куриного стада также относится к недостаткам вакцин, получаемых с помощью куриных эмбрионов.

Рекомбинантные субъединичные вакцины

Решить проблемы, связанные с применением куриных эмбрионов и необходимостью аттенуации патогенных штаммов вируса гриппа, можно с использованием рекомбинантных субъединичных вакцин. Одним из новых подходов к получению субъединичных вакцин против вирусов гриппа является применение различных систем экспрессии для быстрой продукции отдельных вирусных белков в препаративных количествах [21].

В одной из популярных систем экспрессии гриппозные антигены продуцируют в клетках насекомых при помощи бакуловирусных векторов, несущих гены целевых антигенов. Наиболее широко используют вирус множественного ядерного полиэдроза калифорнийской совки (AcMNPV). Для работы с AcMNPV обычно используют линии клеток Sf9, полученные из яичника гусениц *Spodoptera frugiperda*. В этой системе можно продуцировать различные антигены вируса гриппа А. Иммунизация мышей рекомбинантным HA вируса гриппа H5N1, полученным в бакуловирусной системе экспрессии, приводила к индукции высокого уровня вируснейтрализующих антител. Однако для достижения значимых уровней антител требовалось либо применение адъюванта, либо прайм-буст-иммунизация с помощью инактивированного вируса гриппа H5N1 или рекомбинантного аденовируса, несущего ген HA вируса гриппа [22].

Одним из наиболее перспективных кандидатов для создания субъединичных вакцин против вируса гриппа считается белок M2, формирующий ионный

канал. M2 – один из трех белков вируса гриппа А, экспрессируемых на поверхности вириона, и, в отличие от HA и NA, высококонсервативный. В вирусах, циркулирующих в человеческой популяции, эктодомен белка M2 (M2e) практически не претерпел изменений с 1933 года [23], поэтому белок M2e рассматривается в качестве кандидата для создания вакцин широкого спектра действия. Так, показана возможность применения вируса мозаики огурца для экспрессии белка M2e вируса гриппа А H5N1 в растениях [24].

Недостатком рекомбинантных субъединичных вакцин, как и традиционных субъединичных вакцин, являются низкая иммуногенность и, как следствие, необходимость многократной вакцинации и применения адъювантов. Один из способов решения этой проблемы состоит во включении в состав субъединичных вакцин молекулярных адъювантов – лигандов различных рецепторов системы врожденного иммунитета. Рекомбинантный белок STF2.4×M2e, продуцируемый в клетках *Escherichia coli* и включающий флагеллин, лиганд для Toll-подобного рецептора 5 (TLR-5), позволял защитить иммунизированных мышей от летальной дозы вируса гриппа [25]. Безопасность и эффективность вакцины на основе полученной конструкции показаны на взрослых добровольцах [26].

Внутримышечная иммунизация мышей полученным в *E. coli* рекомбинантным слитым белком 4×M2e·HSP70с, состоящим из последовательных повторов белков M2e и HSP70 *Mycobacterium tuberculosis*, приводила к значительному снижению падения веса, уменьшению титра вируса в легких и менее выраженному проявлению симптомов заболевания при заражении летальной дозой вирусов гриппа А H1N1, H3N2 или H9N2 [27].

Вирусоподобные частицы

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) представляют собой антигенные детерминанты вирионов без фрагментов геномной РНК. Благодаря отсутствию генетического материала ВПЧ не способны инфицировать клетки человека и животных, что обеспечивает их безопасность [18]. Поверхностные белки гриппозных ВПЧ могут представлять конформационные эпитопы клеткам иммунной системы как нативные вирионы.

В ряде исследований показано, что в формировании гриппозных ВПЧ ключевую роль играет участие внутреннего белка вируса гриппа – M1. Этот белок связывается с липидным участком апикального домена плазматической мембраны, взаимодействует с поверхностными гликопротеинами вируса гриппа и инициирует сборку и почкование ВПЧ, содержащих липидную мембрану клетки-хозяина с инкорпо-

рированными в нее тремя трансмембранными белками вируса гриппа [28].

Гриппозные ВПЧ получены в различных системах экспрессии. Для эффективного освобождения из клеток млекопитающих гриппозных ВПЧ, содержащих НА, необходима либо одновременная экспрессия НА, либо добавление экзогенной НА. Это связано со способностью активной НА расщеплять сиаловые кислоты на поверхности клеточной мембраны [29]. В клетках насекомых гриппозные ВПЧ, содержащие НА, можно получить даже в отсутствие экспрессии НА, так как в этих клетках сиаловые кислоты не связываются с N-гликанами в процессе посттрансляционной модификации [30].

Один из подходов к получению гриппозных ВПЧ в клетках насекомых предполагает использование рекомбинантных бакуловирусов (рис. 2) [1]. На животных моделях показано, что поверхностные гриппозные антигены в составе ВПЧ, полученные при помощи рекомбинантных бакуловирусов, индуцировали выработку как антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител, так и эффекторов клеточного иммунного ответа. Кроме того, вакцина на основе гриппозных ВПЧ индуцировала протективный иммунитет против гомологичных и гетерологичных штаммов вируса гриппа А [31].

Вакцина на основе ВПЧ, несущих антигены пандемического вируса гриппа А H1N1(2009), прошла вторую фазу клинических испытаний на 4 563 здоровых взрослых добровольцах и показала безопасность и иммуногенность [32].

Использование рекомбинантных бакуловирусов для экспрессии белков вируса гриппа в клетках насекомых приводит к накоплению в культуральной жидкости не только ВПЧ, но и бакуловирусов. Поскольку эти структуры близки между собой по размерам, возникают проблемы с очисткой ВПЧ от бакуловирусных частиц. Гриппозные ВПЧ могут быть получены в клетках млекопитающих с помощью других ДНК- и вирусных векторов. Например, разработана система продукции гриппозных ВПЧ в клетках Vero при помощи ДНК-векторов, несущих гены НА, NA, белков M1 и M2 вируса гриппа. Описано использование модифицированного вируса осповакцины Анкара для получения ВПЧ, содержащих белки вируса гриппа H5N1 (НА, NA, M1) в клетках млекопитающих. Такие ВПЧ способны формировать протективный иммунный ответ у мышей [33].

Таким образом, получение ВПЧ представляет перспективное направление при разработке гриппозных вакцин нового типа. Для усиления иммуногенности были предприняты попытки ввести в структуру гриппозных ВПЧ компоненты, стимулирующие иммунитет. С этой целью были получены рекомбинант-

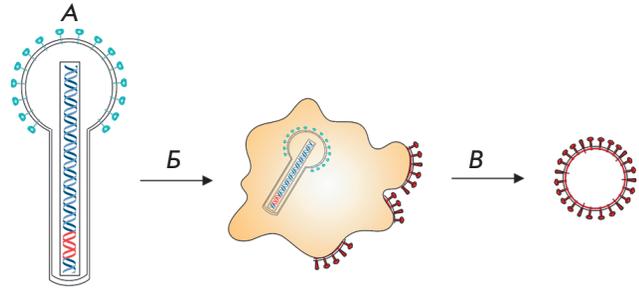


Рис. 2. Получение вирусоподобных частиц при помощи бакуловирусной системы экспрессии. А – Конструирование рекомбинантного бакуловируса, несущего гены белков вируса гриппа, генно-инженерными методами; Б – трансдукция клеток насекомых данным вектором; В – отпочковывание от трансдуцированных клеток вирусоподобных частиц

ные бакуловирусы, несущие ген флагеллина – лиганда TLR-5. Присутствие рекомбинантного флагеллина в составе гриппозных ВПЧ, содержащих НА вируса гриппа А/PR8 (H1N1), существенно усиливало иммуногенность и протективные свойства ВПЧ при заражении иммунизированных мышей гетерологичным штаммом вируса гриппа [34].

Протеосомы

Методами генной инженерии можно получить наноразмерные структуры, в состав которых входит целевой антиген, соединенный с носителем, состоящим из макромолекул биологического происхождения. В результате самосборки таких макромолекул могут быть получены так называемые протеосомы, представляющие собой комплекс белков, диаметром около 30–60 нм, несущий на своей поверхности целевой антиген. Несмотря на то что многие авторы называют такие структуры вирусоподобными частицами, однако, в отличие от ВПЧ, основой для образования протеосом служит белок-носитель.

Наиболее часто в качестве основы для создания протеосом используют белки вирусной оболочки, например пентон аденовируса [35], белок L1 папилломавируса человека [36], НВс-антиген вируса гепатита В [37] (рис. 3).

Получены протеосомы, содержащие белок M1 вируса гриппа А, связанный через WW-домен со структурой, включающей поверхностные белки аденовируса (додекаэдрон). Комплекс додекаэдрона с антигеном способен активировать дендритные клетки человека, которые после активации представляют антиген цитотоксическим Т-лимфоцитам [38]. В качестве носителя белка M2e вируса гриппа

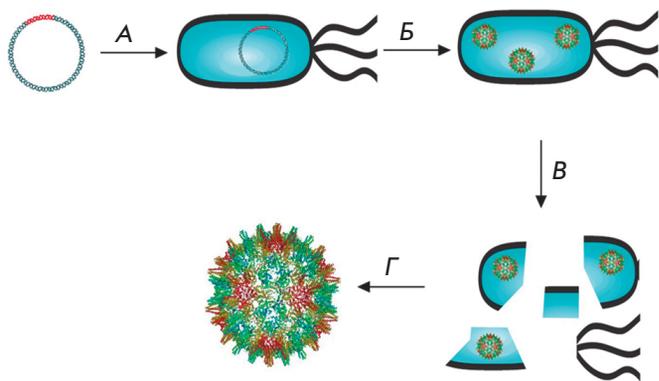


Рис. 3. Получение протеосом. А – Трансформация штамма-продуцента плазмидой с целевым трансгеном и белками протеосомы; Б – сборка протеосом в клетках и их экспрессия; В – выделение протеосом из культуры штамма-продуцента; Г – очистка и получение готовых протеосом

или различных эпитопов белка М2 использовали белок L1 папилломавируса человека [36], а также белок оболочки бактериофага Q β [39], капсидный белок вируса мозаики папайи [40] и антиген вируса гепатита сурков [41].

Наибольший интерес в качестве белка-носителя вызывает НВс-антиген вируса гепатита В, мономер которого способен собираться в наноразмерные частицы. Такие химерные частицы были использованы в качестве белка-носителя белка М2е вируса гриппа. Гибридный белок М2е-НВс получали в клетках *E. coli*. Иммунизация мышей рекомбинантными М2е-НВс-протеосомами обеспечивала защиту от летальной гриппозной инфекции даже в присутствии преysуществующих антител к НВс-антигену [37]. Описана система получения М2е-НВс-протеосом в клетках растений *Nicotiana benthamiana* при помощи рекомбинантного вирусного вектора, основанного на X-вирусе картофеля [42].

Несомненным преимуществом протеосом является их способность нести множество антигенных детерминант на своей поверхности [36]. Однако антигены, представленные таким способом, не всегда обладают достаточной иммуногенностью. К недостаткам протеосом относится также их способность нести пептиды только небольшого размера.

Генетические вакцины

Принцип создания любой генетической вакцины заключается в том, что определенный ген или участок генома патогена встраивается в вектор-носитель, который затем используется для вакцинации. Такие вакцины обеспечивают попадание генетического материала в клетки-хозяина и экспрессию в них ге-

нов белков патогена. В результате экспрессируемые клетками организма антигены патогена распознаются иммунной системой, что приводит к индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Структура целевых антигенов максимально близка к структуре, формируемой при вирусной инфекции. При получении генетических вакцин отпадает необходимость в выделении и очистке антигенов, а значит – в работе непосредственно с патогенами. Кроме того, применение различных векторов на основе рекомбинантных вирусов, благодаря присутствию в них молекулярных патоген-ассоциированных структур, индуцирующих врожденный иммунитет, может оказывать дополнительное иммуностимулирующее действие [43].

Из разнообразия генетических вакцин можно выделить три основные группы: ДНК-вакцины, векторные бактериальные вакцины и векторные вирусные вакцины.

ДНК-вакцины

ДНК-вакцины – это бактериальные плазмиды, в которые включен целевой ген и регуляторные элементы, обеспечивающие его экспрессию после введения такой конструкции в организм [44].

Уровень клеточного и гуморального ответа, индуцированного введением ДНК-вакцины, часто бывает недостаточным для формирования иммунитета против патогена. Поэтому при использовании ДНК-вакцин, как правило, требуется применение адъювантов для повышения иммуногенности, а также таких процедур, как электропорация и *gen-gun* (или введение с помощью «генной пушки», аппарата, выстреливающего микроскопическими частицами, покрытыми ДНК), для лучшего проникновения генетического материала в клетки [10].

Первая фаза клинических испытаний ДНК-вакцины, экспрессирующей НА вируса гриппа птиц А/Vietnam/1203/04 (H5N1) с применением адъюванта, выявила образование гемагглютиницидирующих антител у 47–67% и индукцию Т-клеточного ответа у 75–100% иммунизированных добровольцев. Трехвалентная вакцина, содержащая плазмиды, экспрессирующие NP, М2 и НА этого же вируса гриппа, индуцировала Т-клеточный ответ у 72% иммунизированных [45]. Достаточно перспективным может быть и использование ДНК-вакцин для праймирования иммунной системы в комбинации с вакцинами различного типа (ВПЧ [46], аттенуированная вакцина [47], рекомбинантный аденовирус [48]).

Вакцины на основе рекомбинантных бактериальных векторов

В качестве бактериальных векторов для создания

генетических вакцин используются аттенуированные штаммы таких бактерий, как BCG, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri* и др. Особенностью бактериальных векторов является их способность доставлять антиген в антигенпредставляющие клетки, а также возможность создания на их основе вакцин для введения через слизистые оболочки. При использовании бактериальных векторов происходит активация врожденного иммунитета в результате взаимодействия бактериальных компонентов с рецепторами системы врожденного иммунитета [49].

Иммунизация мышей бактериальными векторами на основе *L. monocytogenes*, несущими ген NP вируса гриппа А, снижала титр вируса гриппа в легких зараженных мышей [50]. Безопасность и иммуногенность такой вакцины показаны на добровольцах [51]. Применение вакцинного вектора BPZE1 на основе *Bordetella pertussis*, несущего ген белка M2e вируса гриппа А, индуцировало у мышей образование антител к M2e и уменьшало титры вируса гриппа в легких после заражения А/PR8 (H1N1). Однако такая вакцина не могла полностью защитить животных при заражении летальной дозой вируса [52].

При использовании бактериальных векторов формируемый иммунный ответ не всегда достаточен для защиты, поэтому необходимо применять дополнительные средства повышения иммуногенности вакцин. Серьезной проблемой в случае бактериальных векторов может быть вероятность передачи плазмиды, несущей трансген, другим бактериям. Кроме того, существует возможность инсерционного мутагенеза [53].

Вакцины на основе рекомбинантных вирусных векторов

Вирусные векторы представляют собой рекомбинантные вирусы, в геном которых встроены целевые гены с набором регуляторных элементов. Среди существующих систем доставки антигенов вирусные векторы занимают особое место, поскольку обладают следующими свойствами: имеют природный механизм взаимодействия с клеткой и проникновения в нее; переносят чужеродный генетический материал в ядро клетки; способны обеспечивать длительную экспрессию антигена; вирусная оболочка защищает генетический материал, кодирующий антиген [54].

Вакцины на основе вирусных векторов эффективно активируют цитотоксические Т-лимфоциты, что особенно важно при вакцинации против внутриклеточных патогенов. Такие вакцины могут реализовать широкий спектр действия за счет индукции Т-клеточного ответа на консервативные эпитопы, потенциально способные обеспечить защиту от различ-

ных штаммов патогенов (в том числе вируса гриппа) [55].

Вирусные векторы обладают способностью активировать врожденный иммунитет путем связывания генетического материала или белков их оболочки с паттерн-распознающими рецепторами (TLR, RIG-1 и др.) [56]. Вирусные векторы распознаются такими TLR, как TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9. При взаимодействии этих рецепторов с лигандами активируются различные факторы транскрипции, что приводит к формированию очага воспаления и быстрой активации защитных реакций организма [57].

При выборе вирусного вектора для генетической иммунизации необходимо руководствоваться следующими критериями: такая вакцина не должна вызывать симптомов заболевания, она должна быть безопасной для людей с ослабленным иммунитетом, пожилых и детей; собственные белки рекомбинантного вируса не должны вызывать сильного иммунного ответа; вирусный вектор должен быть простым для генетических манипуляций и позволять включать большие фрагменты чужеродной ДНК; полученные препараты должны иметь высокий титр и обеспечивать высокий уровень экспрессии целевых антигенов; при иммунизации ДНК вирусного вектора не должна интегрироваться в геном клетки-хозяина, и сам вектор должен полностью выводиться из организма после индукции иммунного ответа. Кроме того, нежелательно наличие предсуществующего иммунного ответа к белкам вирусного вектора у иммунизируемых индивидов, так как он может существенно снизить уровень иммунного ответа на целевой антиген [58].

Не все вирусы обладают свойствами, необходимыми для создания эффективных векторов. Для создания гриппозных вакцин на основе вирусных векторов в настоящее время наиболее широко используются поксвирусы [59], вирус болезни Ньюкасла [60] и аденовирусы [61].

Рекомбинантные поксвирусы. Поксвирусы (Poxviridae) – это ДНК-содержащие вирусы с большим геномом. Среди поксвирусов, используемых в качестве вирусного вектора, наиболее популярен вирус осповакцины, к преимуществам которого относятся простота и дешевизна получения, а также высокая пакующая емкость (до 25 т.п.н.) [59]. Для получения вакцин используют аттенуированные вирусы осповакцины, такие, как модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) и аттенуированный штамм NYVAC, полученный на основе штамма Копенгаген. Аттенуирование MVA было достигнуто путем многократного пассирования в фибробластах куриных

эмбрионов, что привело к потере ряда генов, не существенных для репликации в клетках птиц, и снижению репродукции в клетках человека. Атенуация штамма NYVAC была достигнута путем делеции 18 генов, в результате чего вирус стал репликативно-дефектным для клеток человека [62].

Показано, что иммунизация мышей MVA, экспрессирующим гены HA высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1, обеспечила защиту мышей как от гомологичного, так и от гетерологичных штаммов вируса гриппа H5N1, а также индукцию вируснейтрализующих антител и HA-специфичных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток [63]. Вакцина на основе MVA, экспрессирующая ген HA вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1), была эффективной при двукратной иммунизации мышей, макак и хорьков [64]. Эффективность вакцины на основе штамма NYVAC, экспрессирующего ген HA вируса гриппа А птиц H5N1, показана на свиньях [65].

Серьезный недостаток векторов на основе вируса осповакцины – предсуществующий иммунитет к этому вирусу, который сформировался в человеческой популяции в результате иммунизации против оспы. Поэтому целесообразно использовать векторы на основе таких поксвирусов, как вирус оспы канарейки (Canarypox) и вирус оспы домашней птицы (Flowpox), к которым в человеческой популяции отсутствуют предсуществующие антитела. Иммунизация кур и уток рекомбинантным Flowpox-вирусом, в геном которого введен ген HA вируса гриппа А птиц, защищала птиц от заражения летальными дозами гомологичных вирусов гриппа [66]. Высокая пакующая емкость поксвирусов позволяет вводить в геном сразу несколько трансгенов, например гены HA и NP вируса гриппа А [66]. Однако Canarypox и Flowpox индуцируют более слабый иммунный ответ на целевые антигены, чем вирус осповакцины, и требуют многократного введения или использования адъювантов [66].

Рекомбинантный вирус болезни Ньюкасла. Вирус болезни Ньюкасла (NDV) относится к семейству Paramyxoviridae. Это вирус с несегментированным одноцепочечным РНК-геном, который содержит шесть генов, кодирующих семь белков: NP, Р- и V-белки, М-белок, белок слияния, или F-белок, HA-NA и большой полимеразный белок L. Так как уровень экспрессии каждого вирусного белка снижается в направлении от 3'- до 5'-конца генома, при использовании NDV в качестве вектора уровень экспрессии чужеродного гена можно контролировать по его положению в вирусном геноме. Уровень вирулентности и тропизм NDV зависят от сайта нарезания протеазами F-белка, необходимого для сли-

яния вирусной оболочки и клеточной мембраны. Таким образом, вирулентность вируса можно изменить при помощи аминокислотных замен в F-белке, что позволяет считать этот вирус удобной основой для создания вакцинных векторов [60].

NDV, экспрессирующий ген HA вируса гриппа A/WSN/3 (H1N1), получен методом обратной генетики. При помощи этой конструкции мышей удалось защитить от заражения вирусом гриппа A/WSN/3 (H1N1) [60]. NDV, экспрессирующий гены HA высокопатогенных вирусов гриппа А птиц H5 и H7, защищал иммунизированных птиц от заражения летальными дозами гомологичных вирусов гриппа А. Эффективность иммунизации рекомбинантным NDV, экспрессирующим ген HA высокопатогенного вируса гриппа птиц А H5, показана на мышах [67].

NDV в природе инфицирует только птиц, поэтому антитела к этому вирусу у человека отсутствуют. Следовательно, проблема предсуществующего иммунного ответа для этого вирусного вектора не стоит. Однако существенным недостатком вакцинного вектора NDV является то, что последствия введения рекомбинантных NDV недостаточно изучены, и не ясно, безопасны ли гриппозные вакцины на основе NDV для человека. Кроме того, NDV характеризуется низкой пакующей емкостью и сложностью получения векторов, несущих несколько целевых антигенов. Препаративные количества NDV получают в куриных эмбрионах, что, как отмечено выше, имеет ряд недостатков [68].

Рекомбинантные аденовирусы. Рекомбинантные аденовирусы (Adenoviridae) – наиболее хорошо изученные и наиболее часто используемые рекомбинантные вирусные векторы. Вирионы аденовирусов состоят из молекулы двухцепочечной ДНК, окруженной белковым капсидом.

Многие типы аденовирусов подробно охарактеризованы, в том числе и на генетическом уровне. Нуклеотидная последовательность геномов большинства из них полностью расшифрована. Подробные данные о структуре, физико-химических и биологических свойствах аденовирусов позволяют использовать их для создания рекомбинантных вакцин и генно-терапевтических препаратов [61]. Среди генетических вакцин, проходящих клинические испытания, на долю вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов приходится около 24% (clinicaltrials.gov) (рис. 4).

Аденовирусы обладают такими важными для вакцинных векторов свойствами, как способность обеспечивать высокий уровень экспрессии целевого трансгена в клетке-мишени и трансдуцировать как делящиеся, так и постмитотические клетки.

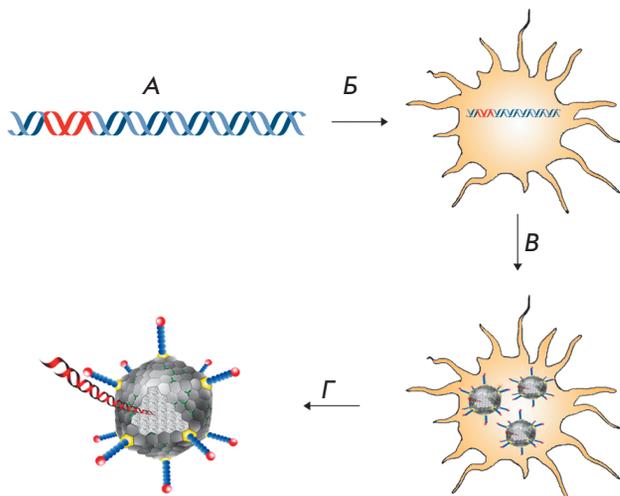


Рис. 4. Схема получения рекомбинантных аденовирусов. А – Получение геномной ДНК рекомбинантного аденовируса человека, несущей гены вируса гриппа, с помощью генно-инженерных методов; Б – трансфекция пермиссивной линии клеток ДНК рекомбинантного вируса; В – экспрессия вирусных генов в клетках и сборка рекомбинантных аденовирусных частиц; Г – очистка аденовирусных вирионов из суспензии клеток

При этом ДНК аденовируса остается во внехромосомной форме. Аденовирусы способны накапливаться в культуре клеток в высоких титрах. Процесс получения нового рекомбинантного аденовируса занимает несколько недель, что может позволить реагировать на меняющуюся эпидемиологическую обстановку в максимально сжатые сроки [61].

В настоящее время на основе рекомбинантных аденовирусов ведется разработка вакцин против многих патогенов, вызывающих такие заболевания, как малярия, туберкулез, бруцеллез и др. [69, 70], и различных вирусов (вирус гриппа А, вирус иммунодефицита человека, папилломавирус человека, вирус бешенства, вирус Эбола и др.) [71–74].

Наиболее изученный представитель аденовирусов – аденовирус человека пятого серотипа (Ad5), является самым популярным среди аденовирусов объектом для создания рекомбинантных вирусных векторов [75, 76].

Для получения вакцин и генно-терапевтических препаратов используют дефектные по репликации Ad5. У таких Ad5 делетированы различные области генома (E1, E2, E3, E4), необходимые для репликации вируса. Для получения и накопления таких вирусов созданы клеточные линии, комплементирующие функции удаленных областей *in trans*. Эти векторы позволяют встраивать до 10000 п.н. [77].

При введении в организм аденовирусы способны активировать рецепторы TLR-9 и RIG-1. Одновременно активация врожденного иммунитета происходит и в результате проникновения аденовирусов в антигенпредставляющие клетки [78].

Трансдуцированные аденовирусом дендритные клетки, экспрессирующие целевой антиген, или активированные дендритные клетки, захватившие антиген, продуцируемый эпителиальными клетками, служат связующим звеном между системами врожденного и адаптивного иммунитета. При мукозальной иммунизации праймирование дендритных клеток происходит в мукозных тканях, поэтому активированные Т- и В-лимфоциты, как и образующиеся из них клетки памяти, приобретают способность экспрессировать $\alpha 4\beta 7$ -интегрин. Эта молекула позволяет Т- и В-лимфоцитам мигрировать через слой эндотелия в подслизистую, к месту возможного контакта с патогеном [79].

В опытах на лабораторных животных показано, что при мукозальной иммунизации вакцинами различных типов развивается перекрестный иммунитет [80]. Основной компонент адаптивного иммунитета слизистых оболочек – антитела, относящиеся, главным образом, к секреторному иммуноглобулину А (sIgA), в меньшей степени, к секреторному иммуноглобулину М (sIgM), а также к IgG как плазменного, так и местного происхождения. Экспрессия sIgA, возможно, определяет перекрестную протективность вакцины [81]. К другим преимуществам мукозальных вакцин перед инъекционными относятся отсутствие повреждения кожных покровов во время иммунизации, а также более низкая реактогенность [82].

Благодаря активации врожденного иммунного ответа интраназальное введение мышам рекомбинантного Ad5, не несущего трансгена, также способно защищать от вируса гриппа А, так как индуцирует продукцию широкого спектра противовоспалительных цитокинов и хемокинов, включая интерфероны типа I, а также оксида азота, активирует натуральные киллерные клетки (НК). Протективные эффекты, вызванные введением Ad5, не несущего трансген, сохраняются как минимум в течение 3 нед. после однократной интраназальной иммунизации. Введение рекомбинантного аденовируса обеспечивает неспецифическую защиту от невысоких доз вируса гриппа в течение времени, необходимого для формирования адаптивного иммунного ответа на целевые антигены. Таким образом, протективное действие вакцин на основе Ad5 начинается практически с первых дней после иммунизации [83], а его длительность, уже за счет специфического иммунного ответа на трансген, составляет более 6 мес.

В настоящее время в различных странах ведутся разработки вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов против различных серотипов вируса гриппа А. Одна из таких вакцин успешно прошла первую стадию клинических испытаний в США, оказалась безопасной для человека и высокоиммуногенной по отношению к вирусу гриппа А H5N2 [84].

Проблема создания гриппозных вакцин, формирующих гетеросубтипический иммунитет, способный защитить от различных вариантов вируса гриппа, актуальна, и в последние годы появились новые подходы для ее разрешения. Выявлены консервативные для различных субтипов вируса гриппа А конформационные эпитопы HA, на которые могут вырабатываться антитела широкого спектра действия как после перенесенной инфекции, так и при иммунизации живыми вакцинами [85]. Иммунизация рекомбинантными аденовирусными векторами имитирует заражение клеток слизистой оболочки верхних дыхательных путей, обеспечивая экспрессию антигенов с нативной третичной структурой, что позволяет индуцировать образование таких перекрестных антител. Рекомбинантные аденовирусные вакцины также способны формировать сильный Т-клеточный иммунный ответ, который характеризуется более широким, чем гуморальный, спектром действия.

В лаборатории молекулярной биотехнологии НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи изучена возможность индукции рекомбинантным Ad5 гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа А. Показано, что двукратная интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным аденовирусом, несущим ген HA вируса гриппа А H5N2, обеспечивает высокий уровень индукции специфических антител к этому вирусу и полную защиту мышей от заражения летальной дозой вируса H5N2 (50 ЛД₅₀) [86]. Мыши, иммунизированные таким рекомбинантным аденовирусом, были защищены и от заражения вирусами гриппа H1N1 и H2N3, которые относятся к группе H1 (H1, H2, H5, H6, H11, H13 и H16), но не были защищены от заражения вирусом гриппа H3N2, принадлежащим к группе H3 (H3, H14 и H4) [87, 80].

Полученные данные позволяют предположить, что, используя панель аденовирусных векторов, несущих гены HA вирусов гриппа А из различных групп, можно создать вакцину, обеспечивающую защиту от большинства эпидемических вариантов вируса гриппа А.

Применение Ad5 как вектора для создания вакцин имеет серьезный недостаток – наличие антител к Ad5 у большей части населения. Присутствие таких антител может существенно снизить эффективность иммунизации. Однако ряд исследований показывает, что при интраназальной иммунизации (в отли-

чие от парентерального введения) вакцины на основе Ad5 могут избегать воздействия предсуществующего иммунного ответа [88–90]. Интраназальное введение Ad5 приводит к эффективной доставке трансгена через мукозальный барьер. Даже однократное интраназальное введение вакцин на основе Ad5 приводит к пролонгированной *ex vivo*-экспрессии трансгена, несмотря на предсуществующий иммунитет как у лабораторных животных, так и у приматов [89]. Однократная интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным аденовирусным вектором, несущим ген HA вируса гриппа А птиц H5N2, обеспечивала защиту иммунизированных животных от заражения вирусом гриппа А птиц H5N2. При этом не наблюдалось различий в уровне защиты мышей, в крови которых присутствовали вируснейтрализующие антитела к Ad5, и наивных по отношению к Ad5 мышей [80].

Интраназальная иммунизация мышей с предсуществующим иммунным ответом на Ad4, рекомбинантным Ad4, несущим ген HA вируса гриппа, приводила к более низкому уровню продукции антител к вирусу гриппа, чем у непраймированных мышей и снижению клеточного иммунного ответа в 2 и более раз (в зависимости от дозы рекомбинантного Ad4). Однако независимо от предсуществующего иммунитета животные были полностью защищены от заражения летальной дозой вируса гриппа [74]. Аналогичные данные получены для Ad5, несущего гены HA и NP вируса гриппа. Повышение дозы рекомбинантного аденовируса нивелировало снижение иммунного ответа [90].

Включение в состав вектора элементов, позволяющих оптимизировать уровень экспрессии трансгена, и подбор оптимальной дозы Ad5 позволяли добиться значимого уровня трансгенспецифических CD8⁺-клеток у иммунизированных животных даже при высоких уровнях Ad5-нейтрализующих предсуществующих антител [91].

Таким образом, рекомбинантные Ad5, несущие гены различных антигенов вируса гриппа А, весьма перспективны в качестве потенциальных противогриппозных вакцин. Они безопасны, эффективны и могут служить основой для создания универсальной интраназальной вакцины против гриппа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре данные свидетельствуют о широкомасштабных работах, направленных на конструирование гриппозных вакцин при помощи новых подходов, использующих возможности обратной генетики и рекомбинантные технологии, а также о получении ВПЧ, протеосом и субъединичных вакцин в различных системах экспрессии.

Новые подходы позволили существенно продвинуться в создании гриппозных вакцин нового типа. Некоторые из этих вакцин в настоящее время проходят либо доклинические исследования, либо клинические испытания. Среди векторов, используемых для создания генетических вакцин, особое место занимают аденовирусные векторы. Они эффективно проникают в клетки слизистой оболочки дыхательных путей, что позволяет проводить мукозальную иммунизацию, обеспечивая длительную персистенцию антигена в организме и активацию врожденного иммунитета. Рекомбинантные аденовирусы человека пятого серотипа, несущие гены различных антигенов вируса гриппа А, перспективны в качестве противогриппозных вакцин. Они безопасны, эффективны

и могут служить основой для создания универсальной интраназальной вакцины против гриппа. Рекомбинантный аденовирус при иммунизации действует как адъювант, он способен бустировать иммунитет в отношении трансгена. Процесс получения такой вакцины занимает несколько недель, что позволяет быстро реагировать на меняющуюся эпидемиологическую обстановку. Рекомбинантные аденовирусные векторы, несущие гены НА вирусов гриппа А различных подтипов, можно использовать для формирования гетеросубтипического иммунного ответа против большинства эпидемических вариантов вируса гриппа А. Таким образом, аденовирусы могут стать основой для создания универсальной гриппозной рекомбинантной вакцины. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Girard M., Cherian T., Pervikov Y., Kieny M. // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 50. P. 5708–5724.
- Taubenberger J., Morens D. // *Emerg. Infect. Dis.* 2006. V. 12. № 1. P. 15–22.
- Гендон Ю.З. // *Вопр. вирусол.* 2007. Т. 52. № 1. С. 4–10.
- Киселев О.И. // *Биотехнология*. 2010. № 2. С. 1–18.
- Bodewes R., Osterhaus A., Rimmelzwaan G. // *Viruses*. 2010. V. 2. P. 166–188.
- Nichol K. // *Vaccine*. 2001. V. 19. № 31. P. 4373–4377.
- Swayne D. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1081. P. 226–227.
- Mahmud M., Maassab H., Jennings R., Potter C. // *Arch. Virol.* 1979. V. 61. № 3. P. 207–216.
- Snyder M., Clements M., Betts R., Dolin R., Buckler-White A., Tierney E., Murphy B. // *J. Clin. Microbiol.* 1986. V. 23. № 5. P. 852–857.
- Plotkin S. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. V. 16. № 12. P. 1709–1719.
- Tumpey T., Basler C., Aguilar P., Zeng H., Solórzano A., Swayne D., Cox N., Katz J., Taubenberger J., Palese P., et al. // *Science*. 2005. V. 310. № 5745. P. 77–80.
- Song H., Nieto G., Perez D. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 17. P. 9238–9248.
- Li Z., Jiang Y., Jiao P., Wang A., Zhao F., Tian G., Wang X., Yu K., Bu Z., Chen H. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 22. P. 11115–11123.
- Wacheck V., Egorov A., Groiss F., Pfeiffer A., Fuehrer T., Hoeflmayer D., Kundi M., Popow-Kraupp T., Redlberger-Fritz M., Mueller C., et al. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 3. P. 354–362.
- Watanabe T., Watanabe S., Kim J., Hatta M., Kawaoka Y. // *J. Virol.* 2007. V. 82. № 5. P. 2486–2492.
- Middleton D., Bingham J., Selleck P., Lowther S., Gleeson L., Lehrbach P., Robinson S., Rodenberg J., Kumar M., Andrew M. // *Virology*. 2007. V. 359. № 1. P. 66–71.
- Harvey R., Wheeler J., Wallis C., Robertson J., Engelhardt O. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 51. P. 6550–6554.
- Васильев Ю. // *Вопр. вирусол.* 2008. Т. 6. № 1. С. 4–15.
- Киселев О., Цыбалова Л.М., Покровский В. // *Журн. микробиол.* 2006. Т. 5. С. 28–38.
- Wang C., Luo Y., Chen Y., Li S., Lin C., Hsieh Y., Liu H. // *J. Virol. Methods*. 2007. V. 146. № 1–2. P. 293–297.
- Deroo T., Jou W., Fiers W. // *Vaccine*. 1996. V. 14. № 6. P. 561–569.
- Lin S., Huang M., Tsou P., Huang L., Chong P., Wu S. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 5. e20052.
- Цыбалова Л.М., Киселев О.И. // *Вопр. вирусол.* 2012. Т. 57. № 1. С. 9–14.
- Nemchinov L., Natilla A. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 56. P. 153–159.
- Huleatt J., Nakaar V., Desai P., Huang Y., Hewitt D., Jacobs A., Tang J., McDonald W., Song L., Evans R., et al. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 2. P. 201–214.
- Turley C., Rupp R., Johnson C., Taylor D., Wolfson J., Tussey L., Kavita U., Stanberry L., Shaw A. // *Vaccine*. 2011. V. 29. № 32. P. 5145–5152.
- Ebrahimi S., Dabaghian M., Tebianian M., Zabeh Jazi M. // *Virology*. 2012. V. 430. № 1. P. 63–72.
- Latha T., Galarza J. // *J. Virol.* 2001. V. 75. № 13. P. 6154–6165.
- Chen B., Leser G., Morita E., Lamb R. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 13. P. 7111–7123.
- Galarza J., Latham T., Cupo A. // *Viral. Immunol.* 2005. V. 18. № 2. P. 365–367.
- Bright R., Carter D., Daniluk S., Toapanta F., Ahmad A., Gavrilov V., Massare M., Pushko P., Mytle N., Rowe T., et al. // *Vaccine*. 2007. V. 25. № 19. P. 3871–3878.
- López-Macías C. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012. V. 8. № 3. P. 411–414.
- Tang X., Lu H., Ross T. // *Viral. Immunol.* 2011. V. 24. № 4. P. 311–319.
- Wang B., Quan F., Kang S., Bozja J., Skountzou I., Compans R. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 23. P. 11813–11823.
- Fender P., Ruigrok R., Gout E., Buffet S., Chroboczek J. // *Nat. Biotechnol.* 1997. V. 15. № 1. P. 52–56.
- Matic S., Rinaldi R., Masenga V., Noris E. // *BMC Biotechnol.* 2011. V. 11. № 1. P. 106.
- De Filette M., Martens W., Smet A., Schotsaert M., Birkett A., Londoño-Arcila P., Fiers W., Saelens X. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 51. P. 6503–6507.
- Naskalska A., Szolajska E., Chaperot L., Angel J., Plumas J., Chroboczek J. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 52. P. 7385–7393.
- Bessa J., Schmitz N., Hinton H., Schwarz K., Jegerlehner A., Bachmann M. // *Eur. J. Immunol.* 2008. V. 38. № 1. P. 114–126.
- Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., Hamelin M., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard C., Pare C., Lopez Macias C., et al. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 27–28. P. 3395–3403.
- Ameiss K., Ashraf S., Kong W., Pekosz A., Wu W.H., Milich

- D., Billaud J., Curtiss R. 3rd. // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 41. P. 6704–6713.
42. Ravin N.V., Kotlyarov R.Y., Mardanov E.S., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Skryabin K.G. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2012. V. 77. № 1. P. 33–40.
43. Bessis N., GarciaCozar F., Boissier M. // *Gene Ther.* 2004. V. 11. Suppl 1. S. 10–17.
44. Abdulhaqq S., Weiner D. // *Immunol. Res.* 2008. V. 42. P. 219–232.
45. Smith L., Wloch M., Ye M., Reyes L., Boutsaboualoy S., Dunne C., Chaplin J., Rusalov D., Rolland A., Fisher C., et al. // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 13. P. 2565–2572.
46. Ding H., Tsai C., Gutiérrez R.A., Zhou F., Buchy P., Deubel V., Zhou P. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. e16563.
47. Suguitan A.L. Jr., Cheng X., Wang W., Wang S., Jin H., Lu S. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. e21942.
48. Guo J., Yao L., Chen A., Liu X., Fu J., Xu P., Zhang Z. // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2011. V. 27. № 6. P. 876–883.
49. Stoeker L., Nordone S., Gunderson S., Zhang L., Kajikawa A., LaVoy A., Miller M., Klaenhammer T., Dean G. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2011. V. 18. № 11. P. 1834–1844.
50. Ikonomidis G., Portnoy D.A., Gerhard W., Paterson Y. // *Vaccine*. 1997. V. 15. № 4. P. 433–440.
51. Johnson P., Blair B., Zeller S., Kotton C., Hohmann E. // *Microbiol. Immunol.* 2011. V. 55. № 5. P. 304–317.
52. Li R., Lim A., Ow S., Phoon M., Loch C., Chow V., Alonso S. // *Vaccine*. 2011. V. 29. № 33. P. 5502–5511.
53. Hense M., Domann E., Krusch S., Wachholz P., Dittmar K., Rohde M., Wehland J., Chakraborty T., Weiss S. // *Cell Microbiol.* 2001. V. 3. № 9. P. 599–609.
54. Draper S., Heeney J. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. P. 62–73.
55. Wei C., Boyington J., McTamney P., Kong W., Pearce M., Xu L., Andersen H., Rao S., Tumpey T., Yang Z., et al. // *Science*. 2010. V. 329. P. 1060–1064.
56. Тухватулин А.И., Щербинин Д.Н., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Народицкий Б.С. // *Вест. ПАН. 2011. № 10. С. 47–54.*
57. Tutykhina I.L., Logunov D.Y., Shcherbinin D.N., Shmarov M.M., Tuxhvatulina A.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *J. Mol. Med. (Berl.)*. 2011. V. 89. № 4. P. 331–341.
58. Kopecky-Bromberg S., Palese P. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009. V. 333. P. 243–267.
59. Gherardi M., Esteban M. // *J. Gen. Virol.* 2005. V. 86. № 11. P. 2925–2936.
60. Nakaya T., Cros J., Park M., Nakaya Y., Zheng H., Sagrera A., Villar E., Garcia-Sastre A., Palese P. // *J. Virol.* 2001. V. 75. № 23. P. 11868–11873.
61. Карпов А., Тутыхина И., Логунов Д., Верховская Л., Шмаров М., Валихов А.Ф., Шульпин М.И., Дрыгин В.В., Народицкий Б.С. // *Биотехнология*. 2007. Т. 5. С. 38–44.
62. Pantaleo G., Esteban M., Jacobs V., Tartaglia J. // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2010. V. 5. № 5. P. 391–396.
63. Hessel A., Schwendinger M., Holzer G., Orlinger K., Coulibaly S., Savidis-Dacho H., Zips M., Crowe B., Kreil T., Ehrlich H., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. e16247.
64. Kreijtz J., Süzer Y., Bodewes R., Schwantes A., van Amerongen G., Verburgh R., de Mutsert G., van den Brand J., van Trierum S., Kuiken T., et al. // *J. Gen. Virol.* 2010. V. 91. Pt 11. P. 2745–2752.
65. Kyriakis C., De Vleeschauwer A., Barbé F., Bublout M., van Reeth K. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 16. P. 2258–2264.
66. Webster R., Kawaoka Y., Taylor J., Weinberg R., Paoletti E. // *Vaccine*. 1991. V. 9. № 5. P. 303–308.
67. Ge J., Deng G., Wen Z., Tian G., Wang Y., Shi J., Wang X., Li Y., Hu S., Jiang Y., et al. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 1. P. 150–158.
68. Xie Y., Sun H., Li D. // *Chem. Biodivers.* 2010. V. 7. № 3. P. 677–689.
69. Radosevic K., Rodriguez A., Lemckert A., van der Meer M., Gillissen G., Warnar C., von Eyben R., Pau M., Goudsmit J. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2010. V. 17. № 11. P. 16876–16894.
70. Ronan E., Lee L., Beverley P., Tchilian E. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 12. e8235.
71. Vemula S., Mittal S. // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2010. V. 10. № 10. P. 1469–1487.
72. Paris R., Kim J., Robb M., Michael N. // *Expert. Rev. Vaccines*. 2010. V. 9. № 9. P. 1055–1069.
73. Knowles M., Roberts D., Craig S., Sheen M., Nadin-Davis S., Wandeler A. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 20. P. 2662–2668.
74. Alexander J., Ward S., Mendy J., Manayani D., Farness P., Avanzini J., Guenther B., Garduno F., Jow L., Snarsky V., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 2. e31177.
75. Рогожин В.Н., Белоусова Р.В., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Лунин В.Г., Народицкий Б.С. // *Ветеринарная медицина*. 2011. № 2. С. 10–13.
76. Грибова И.Ю., Тиллиб С.В., Тутыхина И.Л., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Верховская Л.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3. № 3 (10). С. 66–72.
77. Gao G., Yang Y., Wilson J. // *J. Virol.* 1996. V. 70. № 12. P. 8934–8943.
78. Тутыхина И.Л., Щербинин Д.Н., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С. // *Вест. ПАН. 2011. № 10. С. 37–49.*
79. Tamura S., Asanuma H., Ito Y., Hirabayashi Y., Suzuki Y., Nagamine T., Aizawa C., Kurata T., Oya A. // *Eur. J. Immunol.* 1992. V. 22. № 2. P. 477–481.
80. Шмаров М.М., Седова Е.С., Верховская Л.В., Богачева Е.А., Барыкова Ю.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Тутыхина И.Л., Неугодова Г.Л., Логунов Д.Ю. и др. // *Биопрепараты*. 2011. № 1. С. 31–35.
81. Roy C., Ault A., Sivasubramani S., Gorres J., Wei C., Andersen H., Gall J., Roederer M., Rao S. // *Respir. Res.* 2011. V. 12. P. 153.
82. Ugwoke M., Agu R., Verbeke N., Kinget R. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 57. № 11. P. 1640–1665.
83. Zhang J., Tarbet E., Toro H., Tang D.C. // *Expert. Rev. Vaccines*. 2011. V. 10. № 11. P. 1539–1552.
84. van Kampen K., Shi Z., Gao P., Zhang J., Foster K., Chen D., Marks D., Elmetts C., Tang D.C. // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 8. P. 1029–1036.
85. Sahini L., Tempczyk-Russell A., Agarwal R. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 2. e9268.
86. Седова Е.С., Шмаров М.М., Тутыхина И.Л., Барыков Ю.А., Верховская Л.В., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // *Журн. микробиол.* 2010. № 3. С. 44–48.
87. Шмаров М.М., Седова Е.С., Верховская Л.В., Руднева И.А., Богачева Е.А., Барыкова Ю.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Тутыхина И.Л., Логунов Д.Ю. и др. // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 1 (4). С. 119–126.
88. Croyle M., Patel A., Tran K., Gray M., Zhang Y., Strong J., Feldmann H., Kobinger G. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 10. e3548.
89. Zabner J., Petersen D., Puga A., Graham S.M., Couture L., Keyes L., Lukason M., St. George J., Gregory R., Smith A. // *Nat. Genet.* 1994. V. 6. № 1. P. 75–83.
90. Pandey A., Singh N., Vemula S., Couët L., Katz J., Donis R., Sambhara S., Mittal S. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e33428.
91. Steffensen M., Jensen B., Holst P., Bassi M., Christensen J., Thomsen A. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 4. e34884.