

М.В. Сергеева, Ю.Р. Романова

Вакцины против высокопатогенных вирусов гриппа птичьего происхождения

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург

Появление высокопатогенных вирусов гриппа подтипов H5 и H7, способных инфицировать людей без предварительной адаптации, и их беспрецедентное распространение по всему земному шару создают постоянную угрозу пандемии. Эффективность предотвращения пандемии находится в прямой зависимости от качества применяемых противогриппозных вакцин. Из-за высокой патогенности антигенно-актуальных штаммов данных подтипов производство вакцин классическими методами проблематично. Поэтому возникает необходимость разработки новых концепций конструирования вакцинных штаммов и производства вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа птичьего происхождения.

Ключевые слова: высокопатогенный вирус гриппа птиц; разработка вакцин.

Vaccines against Highly Pathogenic Influenza Viruses of the Avian Origin

M. V. Sergeeva J. R. Romanova

Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, 197376, St. Petersburg, Russia

Worldwide spreading of H5 and H7 highly pathogenic influenza viruses of the avian origin, which periodically infect and kill humans without prior adaptation, poses a constant threat of the new pandemic. The effectiveness of the pandemic prevention completely depends on the quality of the existing influenza vaccines. Typical methods of the vaccine production from the antigenically relevant strains are problematic in case of high virulent H5 and H7 viruses. Therefore, new approaches to the construction of the vaccine strains and production technologies are required in order to protect the population.

Key words: avian highly pathogenic influenza virus, vaccine development

Во время вспышки, вызванной высокопатогенным вирусом гриппа птиц подтипа H5N1 на птичьих фермах Гонконга в 1997 г., вирус преодолел межвидовой барьер и без предварительной адаптации инфицировал 18 человек с 6 смертельными исходами [42]. Быстрое уничтожение всех домашних птиц в этом районе позволило остановить распространение инфекции. Однако в 2002 г. в Гонконге было отмечено появление нового антигенного варианта вируса H5N1, который в апреле 2005 г. в Китае в районе оз. Цинхай вызвал массовую гибель диких птиц с последующим распространением вируса по всему земному шару [12]. До настоящего времени вирус продолжает циркулировать, заражая и убивая птиц и периодически людей. По данным ВОЗ, уже выявлены 535 случаев инфицирования людей вирусом H5N1, из них 316 со смертельным исходом, и это число постоянно растет [2]. Кроме того, периодически регистрируются случаи инфицирования людей птичьими вирусами подтипа H7. Так, в 2003 г. в Нидерландах во время наиболее широкомасштабной вспышки птичьего гриппа, вызванного высокопатогенным вирусом H7N7, было инфицировано 89 людей, из которых 1 человек умер [28]. До последнего времени случаи инфицирования людей птичьими вирусами гриппа рассматриваются

как зоонозы, однако их высокая патогенность и беспрецедентное распространение по всему миру создают опасность возникновения нового пандемического штамма.

Эффективность предотвращения пандемии находится в прямой зависимости от качества применяемых вакцинных препаратов [4, 5, 55]. Большинство лицензированных противогриппозных вакцин являются инактивированными (ИГВ), представляя собой суспензию очищенных инактивированных вирионов (цельновирioнная вакцина), разрушенного детергентом вируса (сплит вакцины) или очищенных вирусных поверхностных гликопротеинов (субъединичные вакцины). Лицензирована также живая холодоадаптированная (ХА) вакцина против гриппа (ЖГВ). Основной субстрат для производства вакцин в настоящее время – куриные эмбрионы. Однако в процессе репликации высокопатогенных вирусов гриппа птиц эмбрионы погибают, что создает определенную сложность для производства. Поэтому возникла необходимость разработки новых концепций конструирования вакцинных штаммов и производства вакцин против высокопатогенных вирусов гриппа птичьего происхождения.

Первая вакцина против вируса подтипа H5N1 получена на основе низкопатогенного для птиц штамма A/

Контактная информация:

Романова Юлия Романовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: j.romanova@greenhillsbiotech.com

Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3), антигенно родственного циркулирующему вирусу H5N1. Субъединичный препарат был произведен на куриных эмбрионах и испытан на волонтерах. Иммуногенность этой вакцины оказалась очень низкой и защитный уровень антител был достигнут только при введении вакцины с адьювантом MF-59 [34]. При этом защитная эффективность вакцины на модели мышей при реинфицировании гетерологичными штаммами достигала 100% даже при введении без адьюванта [53]. При испытаниях ИГВ, приготовленной на основе реассортанта с поверхностными антигенами другого низкопатогенного штамма A/Duck/Primorie/2621/2001(H5N2), уровень гетерологичной защиты составлял лишь 80% [6]. Таким образом, несмотря на возможность заблаговременного производства, что является преимуществом данного подхода, в случае антигенного несовпадения вакцинного и пандемического штаммов, кросспецифическая защита может оказаться недостаточно эффективной.

Второй подход предусматривает генно-инженерную модификацию сайта расщепления гемагглютинина (HA) высокопатогенных вирусов H5N1. Высокая вирулентность этих вирусов для людей, птиц (включая куриные эмбрионы) и других животных определяется наличием множественной последовательности основных аминокислот в месте разрезания HA, что обеспечивает активацию HA различными протеазами, в том числе фурином, присутствующими почти в каждой клетке. Таким образом, репликация высокопатогенных вирусов H5N1 не ограничивается клетками респираторного или желудочно-кишечного тракта, как в случае вирусов гриппа человека или низковирулентных вирусов гриппа птиц, и вирус способен диссеминировать в различные органы. В связи с этим было предложено модифицировать сайт расщепления, удалив часть аминокислот методом обратной генетики. Так, было получено и проверено в клинических испытаниях несколько вакцинных кандидатов, представляющих собой 2:6-реассортанты, приготовленные на основе высокорепродуктивного донора A/Puerto Rico/8/34(H1N1) (PR8) с HA (модифицированный сайт расщепления) и нейраминидазой (NA) изолированных от людей высокопатогенных вирусов серотипа H5N1 [22, 41, 54]. Суммируя результаты проведенных клинических испытаний, можно заключить, что инактивированные вакцины этого типа оказались также недостаточно иммуногенны. Только двукратная иммунизация субвирионной вакциной с двойным количеством антигена (30–45 мкг HA) обеспечивала протективный иммунитет у привитых [9, 47]. При такой эффективности в случае пандемии потребуются в 4 раза больше вакцины, чем обычно при вакцинации сезонными штаммами. Цельновирионная вакцина оказалась более иммуногенной и вызывала защитный уровень нейтрализующих антител уже в дозе 7,5–15 мкг при двойной иммунизации [15], вероятно, за счет адьювантного эффекта содержащейся в ней РНК [18]. Однако недостатком цельновирионных вакцин является повышенный уровень побочных реакций, особенно часто наблюдаемый у детей [55].

Добавление лицензированных адьювантов (гидроксид или фосфат алюминия) улучшало иммуногенность цельновирионных, но не субъединичных вакцин [25, 35]. Применение ряда новых адьювантов,

полученных на основе водно-масляных эмульсий, позволило повысить специфичность индуцируемых антител к конформационным эпитопам первой субъединицы HA [26] и иммуногенность субъединичных H5N1-вакцин в целом [8, 32–34, 38].

С целью повышения защитной эффективности вакцин за счет индукции местного иммунитета, в том числе антител класса IgA в мукозе респираторного тракта, проводили исследования интраназального введения ИГВ [49]. В опытах на мышах полной защиты от вирусов H5N1 удалось добиться только при двукратном введении вакцины с адьювантом – термолabileм токсином LT(R192G) *E. coli* [41]. В клинических испытаниях интраназальной ИГВ, содержащей 7,5 мкг HA (H5N3) и 30 мкг энтеротоксина LTK63, повышение уровня местных IgA-антител отмечено у 47% вакцинируемых при двукратной иммунизации, которая, однако, не вызывала достоверные приросты сывороточных нейтрализующих антител [40].

Необходимо отметить, что при подготовке инактивированных H5N1 вакцин, например из штамма NIBRG-14, отмечалась низкая репродуктивная активность вируса в куриных эмбрионах по сравнению с донором PR8 [22] и низкое содержание HA в получаемом на выходе препарате [20]. Изучение вирусов, содержащих химерный HA, в котором отдельные участки гена H5 были заменены на соответствующие участки гена HA вируса PR8, позволило предположить, что пониженное содержание HA в препарате очищенного вируса определяется свойствами H5-белка [19]. Повышение уровня репродукции вируса в куриных эмбрионах наблюдали при включении в состав вириона полимеразы PB1 птичьего вируса [6]. Таким образом, производство необходимого количества доз вакцины для полноценной защиты населения может потребовать значительно больше времени, чем при производстве вакцин из сезонных штаммов вируса гриппа.

Еще одна возможность усовершенствования технологии производства вакцин подтипа H5N1 состоит в замене куриных эмбрионов на тканевые культуры. Преимуществом тканевых культур является возможность культивирования летальных для эмбрионов высокопатогенных штаммов, а также независимость производства от наличия большого количества свободных от патогенов куриных эмбрионов, что особенно актуально в случае пандемии птичьего вируса гриппа. Две клеточные линии – MDCK и Vero уже лицензированы в отдельных странах для производства ИГА – Novartis (Швейцария) и Baxter (Австрия). Клинические испытания H5N1-вакцины, произведенной на культуре клеток Vero из немодифицированного высокопатогенного штамма A/Vietnam/1203/04, показали ее безопасность и иммуногенность, схожие с аналогичными свойствами классических H5-препаратов [15]. В стадии разработки находится полностью охарактеризованная и стандартизованная клеточная линия человеческого происхождения PER.C6® [29]. Однако клинические испытания вакцины, произведенной на линии клеток PER.C6® из штамма с поверхностными антигенами высокопатогенного вируса серотипа H7N1, показали очень низкую иммуногенность препарата [13].

В последнее время ведется усиленная работа, чтобы обеспечить возможность получения антигенов вируса гриппа экспрессией в клетках насекомых,

растений или грибов. Данный подход является безопасным и позволяет произвести вакцину достаточно быстро в необходимом количестве, поэтому выбор оптимального антигена может быть отложен до проявления более четкой эпидемиологической ситуации. Рекомбинантные белки – это высокоочищенные продукты и полученные на их основе вакцины менее реактогенны. Высокая эффективность данной системы позволяет произвести большое количество вакцины в короткие сроки. Кроме того, использование рекомбинантной технологии дает возможность контролировать сиквенс гена НА и избежать нежелательные адаптационные мутации. Рекомбинантная вакцина, состоящая из НА вируса A/Hong Kong/156/97(H5N1), экспрессированного в клетках насекомых Sf9, была одной из первых пандемических вакцин, испытанных на волонтерах. Испытания показали, что только двукратная иммунизация в дозе 90 мкг НА приводила к 4-кратным приростам нейтрализующих антител у 50% привитых [48]. Повышение иммуногенности препаратов рекомбинантного H5 НА было отмечено в экспериментах на мышах при использовании для иммунизации НА олигомеров вместо тримеров [52] или химерных молекул эктодомена НА с пришитым фрагментом IgG2a-Fc. Причиной усиления иммуногенности, вероятно, является дополнительная активация Fcγ-рецепторов [56].

Одновременная экспрессия нескольких вирусных белков, например НА и М вируса гриппа, может приводить к образованию вирусоподобных частиц (ВПЧ). Полученные с помощью бакуловируса в клетках насекомых ВПЧ имеют округлую форму и морфологически похожи на вирионы. Преимуществом ВПЧ является презентация антигенов в нативной конформации, а также стимуляция эффективного захвата антигена дендритными клетками [11]. Недостатком ВПЧ является сложный и пока несовершенный процесс очистки от клеток Sf9, клеточных составляющих и остаточного бакуловируса, который инактивируют β-пропиолактоном. Помимо бакуловируса, ВПЧ также могут быть получены на основе нереплицирующегося кода ретровируса лейкемии мышей. Подобные ВПЧ, содержащие НА, NA и M2 вируса гриппа подтипов H5N1 и H7N1, вызывали высокие титры нейтрализующих антител у мышей [45]. В доклинических испытаниях ВПЧ активировали Т-клеточный иммунный ответ 1 типа и превосходили препараты рекомбинантного НА подтипа H5 по иммуногенности и протективной эффективности при реинфицировании гетерологичным штаммом [10]. Клинические испытания (фаза I) вакцины H5N1 на основе ВПЧ показали ее безопасность и относительно высокую иммуногенность. При двукратном введении относительно малой дозы (20 мкг НА) без адьюванта вакцина удовлетворяла 2 из 3 критериев CPMP (European Committee for Proprietary Medicinal Products) [17, 31].

Мечтой исследователей остается создание универсальной вакцины против гриппа, которая могла бы вызывать защиту на многие годы от любого возможного варианта вируса. Наиболее разработан подход, основанный на использовании высококонсервативного эктодомена белка M2 вируса гриппа, который в незначительном количестве представлен на поверхности вирусной частицы, но обильно синтезируется в инфицированной клетке. Недостаток этого подхода

состоит в том, что антитела к M2-белку не нейтрализуют вирус, а только способствуют элиминации инфицированных клеток, что определяет более слабый защитный эффект по сравнению с эффектом лицензированных вакцин. В доклинических испытаниях вакцинного препарата на основе M2e была продемонстрирована защита мышей только от гибели, но не от реинфицирования летальными вирусами H5N1 [57]. Изучается возможность включения нескольких доменов M2e различных штаммов в липосомы, что может повысить защитный эффект препарата [16].

Еще одно направление представляют ДНК-вакцины. С точки зрения производства, ДНК-вакцины обладают всеми преимуществами рекомбинантных вакцин: простотой производства, экономичностью, безопасностью, контролем нуклеотидной последовательности антигена. Кроме того, экспрессия антигена осуществляется в клетках организма, что способствует его презентации в МНС-I-комплексе и выработке CTL-клеточного ответа [51]. Недостаточно изученным остается вопрос безопасности вакцин, связанный с возможной интеграцией целевой ДНК в геном клетки хозяина. В испытаниях на мышах ДНК-вакцина, несущая ген НА H5-сероподтипа, проявила слабую иммуногенность даже после повторного введения, но защищала 100% животных от летальной реинфекции [27]. Ограниченные клинические испытания H5-ДНК-вакцины также показали ее низкую иммуногенность в отношении индукции антигемагглютинирующих антител (только 50% ответчиков после двукратного введения в дозе 1 мг с адьювантом), однако положительную индукцию длительного Т-клеточного ответа у 75–100% вакцинированных [39].

Ведется также разработка векторных вакцин. По сравнению с ДНК-вакцинами они обеспечивают более эффективную доставку и длительную экспрессию целевой ДНК в клетках. В доклинических испытаниях протестированы H5-векторные вакцины на основе дефектного по репликации аденовируса, поксвируса, вируса болезни Ньюкасла, альфа-вируса [23, 44, 50]. Вакцина на основе аденовирусного вектора, несущего ген НА H5, обеспечивала эффективную защиту мышей, предотвращая размножение гетерологичного вируса после двух внутримышечных иммунизаций [21].

Живые аттенуированные вакцины принципиально отличаются от инактивированных, индуцируя местный и клеточный иммунитет. Иммунизация живыми вакцинами вызывает более длительную защиту не только против вакцинного штамма, но и против антигенных вариантов того же сероподтипа [7]. Кроме того, живая вакцина также эффективна при вакцинации детей и лиц, не контактировавших ранее с гриппом, уже после однократной иммунизации [1]. Эти преимущества обеспечивают возможность значительно скорее защитить население в случае пандемии. Существенным недостатком живых вакцин является длительная репродукция отдельных вакцинных штаммов в респираторном тракте людей, которая может привести к нежелательному распространению вакцинного вируса или его генетического материала в популяции людей. Результаты испытаний живой ХА вакцины, подготовленной из вирусов гриппа сероподтипа H5, дали противоречивые результаты. В доклинических исследованиях на хорьках вакцинных кандидатов, полученных на основе донора A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) и

содержащих поверхностные антигены вирусов H5N1 A/Vietnam/1203/04 или A/Hong Kong/213/03, показана их иммуногенность (после двукратной вакцинации), несмотря на слабую репродукцию вируса в верхнем отделе респираторного тракта животных [43]. Однако при иммунизации волонтеров выявлено почти полное отсутствие репродукции вируса в респираторном тракте и очень слабый иммунный ответ у большинства привитых [24]. Другая ХА-вакцина, приготовленная на основе донора А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), содержащая НА низкопатогенного птичьего штамма A/Duck/Potsdam/1402-6/86(H5N2), показала значительно более высокую иммуногенность после однократного введения мышам [3]. При иммунизации людей вакцинный штамм интенсивно реплицировался в верхнем отделе респираторного тракта привитых (до 11 дней) и вызывал прирост антител у 31% вакцинируемых [37]. Промежуточное положение занимают результаты испытаний ХА-вакцины на основе А/Ann Arbor/6/60 с поверхностными антигенами низкопатогенного вируса подтипа H7N3, в которых отмечено умеренное выделение вируса привитыми и прирост антител у 14% вакцинированных после однократной и у 62% после двукратной иммунизации [46]. Причины таких различий в иммуногенности живых вакцин до настоящего момента не выяснены.

Представляет интерес новый тип живой интраназальной вакцины, предусматривающий объединение сильных сторон живой и инактивированной вакцин. Этот подход основан на производстве аттенуированных штаммов, дефектных по репродукции в интерферонкомпетентных клетках за счет удаления открытой рамки считывания белка NS1 [14]. В доклинических испытаниях на мышах и макаках показана безопасность и полная кросс-специфичная защитная эффективность delNS-вакцинного штамма, полученного из вируса A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Несмотря на полное отсутствие репликации, вакцина вызывала сероконверсию у 100% макак уже после однократной иммунизации. На мышинной модели иммуногенность была гораздо ниже [36]. Улучшить иммуногенность вакцины удалось путем повышения стабильности трехмерной структуры вирусного НА за счет введения точечной мутации (K58I) во вторую субъединицу НА [30].

В заключение стоит отметить, что для профилактики высокопатогенного гриппа птичьего происхождения разработано и апробировано большое количество классических, а также абсолютно новых типов вакцин. Однако проблема низкой иммуногенности данных вакцин остается нерешенной. Если учесть, что высокопатогенные вирусы продолжают циркулировать до настоящего момента среди диких водоплавающих птиц и периодически инфицировать людей, исследования в данной области по-прежнему актуальны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. М.: Наука; 1994.
2. Всемирная Организация Здравоохранения. Электронный ресурс: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/en/
3. Дешева Ю.А., Лу Х., Рекстин А.Р. и др. Прививочные свойства реассортантного холодаадаптированного штамма вируса гриппа А(H5N2) при интраназальном введении мышам. Вопросы вирусологии. 2007; 52 (4): 27–31.
4. Киселев О.И. Прогресс в создании пандемических противогриппозных вакцин и технологии их производства. Биотехнология. 2010; 2: 1–17.
5. Киселев О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И. Состояние разработки вакцин против вируса гриппа H5N1 в мире и России. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006 (5): 28–38.
6. Руднева И.А., Каверин Н.В., Тимофеева Т.А. и др. Оптимизация генного состава реассортантов, содержащих гемагглютинин вируса гриппа подтипа H5, и их эффективность в опытах перекрестной иммунной защиты. Вопросы вирусологии. 2008; 53 (1): 24–7.
7. Belshe R.B., Gruber W.C., Mendelman P.M. et al. Efficacy of vaccination with live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine against a variant (A/Sydney) not contained in the vaccine. J. Pediatr. 2000; 136: 168–75.
8. Bernstein D.L., Edwards K.M., Dekker C.L. et al. Effects of adjuvants on the safety and immunogenicity of an avian influenza H5N1 vaccine in adults. J. Infect. Dis. 2008; 197: 667–75.
9. Bresson J.L., Perronne C., Launay O. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial. Lancet. 2006; 367: 1657–64.
10. Bright R.A., Carter D.M., Crevar C.J. et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. PLoS One. 2008; 3: e1501.
11. Buonaguro L., Tornesello M.L., Tagliamonte M. et al. Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. J. Virol. 2006; 80: 9134–43.
12. Chen H., Li Y., Li Z. et al. Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. J. Virol. 2006; 80: 5976–83.
13. Cox R.J., Madhun A.S., Hauge S. et al. A phase I clinical trial of a PER.C6 cell grown influenza H7 virus vaccine. *Vaccine*. 2009; 27: 1889–97.
14. Egorov A., Brandt S., Sereinig S. et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. J. Virol. 1998; 72: 6437–41.
15. Ehrlich H.J., Muller M., Oh H.M. et al. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. N. Engl. J. Med. 2008; 358: 2573–84.
16. Ernst W.A., Kim H.J., Tumpey T.M. et al. Protection against H1, H5, H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines. *Vaccine*. 2006; 24: 5158–68.
17. European Committee for Proprietary Medicinal Products. Guideline on dossier structure and content for pandemic influenza vaccine marketing authorization application. CPMP/VEG/4717/03. 2003.
18. Geeraedts F., Goutagny N., Hornung V. et al. Superior immunogenicity of inactivated whole virus H5N1 influenza vaccine is primarily controlled by Toll-like receptor signaling. PLoS Pathog. 2008; 4: e1000138.
19. Harvey R., Nicolson C., Johnson R.E. et al. Improved haemagglutinin antigen content in H5N1 candidate vaccine viruses with chimeric haemagglutinin molecules. *Vaccine*. 2010; 28: 8008–14.
20. Harvey R., Wheeler J.X., Wallis C.L. et al. Quantitation of haemagglutinin in H5N1 influenza viruses reveals low haemagglutinin content of vaccine virus NIBRG-14 (H5N1). *Vaccine*. 2008; 26: 6550–4.
21. Hoelscher M.A., Garg S., Bangari D.S. et al. Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. Lancet. 2006; 367: 475–81.
22. Horimoto T., Takada A., Fujii K. et al. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*. 2006; 24: 3669–76.
23. Karaca K., Swayne D.E., Grosenbaugh D. et al. Immunogenicity of fowlpox virus expressing the avian influenza virus H5 gene (TROVAC AIV-H5) in cats. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005; 12: 1340–2.
24. Karron R.A., Talaat K., Luke C. et al. Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults. *Vaccine*. 2009; 27: 4953–60.
25. Keitel W.A., Campbell J.D., Treanor J.J. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated influenza A/H5N1 vaccine given with or without aluminum hydroxide to healthy adults: results of a phase I-II randomized clinical trial. J. Infect. Dis. 2008; 198: 1309–16.
26. Khurana S., Chearwae W., Castellino F. et al. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. Sci. Transl. Med. 2010; 2 (15): 15ra5.

27. Kodihalli S., Goto H., Kobasa D.L. et al. DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J. Virol.* 1999; 73: 2094–8.
28. Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet.* 2004; 363: 587–93.
29. Koudstaal W., Hartgroves L., Havenga M. et al. Suitability of PER. C6 cells to generate epidemic and pandemic influenza vaccine strains by reverse genetics. *Vaccine.* 2009; 27: 2588–93.
30. Krenn B.M., Egorov A., Romanovskaya-Romanko E. et al. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS One.* 2011; 6: e18577.
31. Landry N., Ward B.J., Trépanier S. et al. Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS One.* 2010; 5: e15559.
32. Levie K., Leroux-Roels I., Hoppenbrouwers K. et al. An adjuvanted, low-dose, pandemic influenza A (H5N1) vaccine candidate is safe, immunogenic, and induces cross-reactive immune responses in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 2008; 198: 642–9.
33. Lin J., Zhang J., Dong X. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial. *Lancet.* 2006; 368: 991–7.
34. Nicholson K.G., Colegate A.E., Podda A. et al. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet.* 2001; 357: 1937–43.
35. Nolan T.M., Richmond P.C., Skeljo M.V. et al. Phase I and II randomised trials of the safety and immunogenicity of a prototype adjuvanted inactivated split-virus influenza A (H5N1) vaccine in healthy adults. *Vaccine.* 2008; 26: 4160–7.
36. Romanova J., Krenn B.M., Wolschek M. et al. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. *PLoS One.* 2009; 4: e5984.
37. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S. et al. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I-II clinical trials). *Influenza Other Respi. Viruses.* 2008; 2 (6): 203–9.
38. Rumke H.C., Bayas J.M., de Juanes J.R. et al. Safety and reactogenicity profile of an adjuvanted H5N1 pandemic candidate vaccine in adults within a phase III safety trial. *Vaccine.* 2008; 26: 2378–88.
39. Smith L.R., Wloch M.K., Ye M. et al. Phase I clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine.* 2010; 28: 2565–72.
40. Stephenson I., Zambon M.C., Rudin A. et al. Phase I evaluation of intranasal trivalent inactivated influenza vaccine with nontoxic Escherichia coli enterotoxin and novel biovector as mucosal adjuvants, using adult volunteers. *J. Virol.* 2006; 80: 4962–70.
41. Subbarao K., Chen H., Swaine D. et al. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology.* 2003; 305: 192–200.
42. Subbarao K., Klimov A., Katz J. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science.* 1998; 279: 393–6.
43. Suguitan A.L. Jr., McAuliffe J., Mills K.L. et al. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PLoS Med.* 2006; 3: e360.
44. Sylte M.J., Hubby B., Suarez D.L. Influenza neuraminidase antibodies provide partial protection for chickens against high pathogenic avian influenza infection. *Vaccine.* 2007; 25: 3763–72.
45. Szecsi J., Boson B., Johnsson P. et al. Induction of neutralizing antibodies by virus-like particles harboring surface proteins from highly pathogenic H5N1 and H7N1 influenza viruses. *Viol. J.* 2006; 3: 70.
46. Talaat K.R., Karron R.A., Callahan K.A. et al. A live attenuated H7N3 influenza virus vaccine is well tolerated and immunogenic in a Phase I trial in healthy adults. *Vaccine.* 2009; 27: 3744–53.
47. Treanor J.J., Campbell J.D., Zangwill K.M. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 1343–51.
48. Treanor J.J., Wilkinson B.E., Maseoud F. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine.* 2001; 19: 1732–7.
49. Tumpey T.M., Renshaw M., Clements J.D., Katz J.M. Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection. *J. Virol.* 2001; 75: 5141–50.
50. Veits J., Wiesner D., Fuchs W. et al. Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103: 8197–8202.
51. Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 1993; 259: 1745–9.
52. Wei C.J., Xu L., Kong W.P. et al. Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus. *J. Virol.* 2008; 82: 6200–8.
53. Wood J.M., Major D., Daly J. et al. Vaccines against H5N1 influenza. *Vaccine.* 1999; 18: 579–80.
54. Wood J.M., Major D., Newman R.W. et al. Preparation of vaccines against H5N1 influenza. *Vaccine.* 2002; 20 (suppl. 2): S84–7.
55. Wright P.F., Thompson J., Vaughn W.K. et al. Trials of influenza A/New Jersey/76 virus vaccine in normal children: an overview of age-related antigenicity and reactogenicity. *J. Infect. Dis.* 1977; 136 (suppl.): S731–41.
56. Zaharatos G.J., Yu J., Pace C. et al. HIV-1 and influenza antigens synthetically linked to IgG2a Fc elicit superior humoral responses compared to unmodified antigens in mice. *Vaccine.* 2011; 30: 42–50.
57. Zhao G., Lin Y., Du L. et al. An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses. *Viol. J.* 2010; 7: 9.

REFERENCES

1. Aleksandrova G.I., Klimov A.I. *Moskov: Nauka*; 1994 (in Russian).
2. The World Health Organization. Electronnyy resurse: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/en/
3. Desheva Yu.A., Lu Kh., Rekstin A.R. et al. *Voprosy virusologii.* 2007; 52 (4): 27–31 (in Russian).
4. Kiselev O.I. *Biotehnologiya.* 2010; 2: 1–17 (in Russian).
5. Kiselev O.I., Tsybalova L.M., Pokrovskiy V.I. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii.* 2006; 5: 28–38 (in Russian).
6. Rudneva I.A., Kaverin N.V., Timofeeva T.A. et al. *Voprosy virusologii.* 2008; 53 (1): 24–7 (in Russian).
7. Belshe R.B., Gruber W.C., Mendelman P.M. et al. Efficacy of vaccination with live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine against a variant (A/Sydney) not contained in the vaccine. *J. Pediatr.* 2000; 136: 168–75.
8. Bernstein D.I., Edwards K.M., Dekker C.L. et al. Effects of adjuvants on the safety and immunogenicity of an avian influenza H5N1 vaccine in adults. *J. Infect. Dis.* 2008; 197: 667–75.
9. Bresson J.L., Perronne C., Launay O. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial. *Lancet.* 2006; 367: 1657–64.
10. Bright R.A., Carter D.M., Crevar C.J. et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. *PLoS One.* 2008; 3: e1501.
11. Buonaguro L., Tornesello M.L., Tagliamonte M. et al. Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. *J. Virol.* 2006; 80: 9134–43.
12. Chen H., Li Y., Li Z. et al. Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *J. Virol.* 2006; 80: 5976–83.
13. Cox R.J., Madhun A.S., Hauge S. et al. A phase I clinical trial of a PER.C6 cell grown influenza H7 virus vaccine. *Vaccine.* 2009; 27: 1889–97.
14. Egorov A., Brandt S., Sereinig S. et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 1998; 72: 6437–41.
15. Ehrlich H.J., Muller M., Oh H.M. et al. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 2573–84.
16. Ernst W.A., Kim H.J., Tumpey T.M. et al. Protection against H1, H5, H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines. *Vaccine.* 2006; 24: 5158–68.
17. European Committee for Proprietary Medicinal Products. Guideline on dossier structure and content for pandemic influenza vaccine marketing authorization application. CPMP/VEG/4717/03. 2003.
18. Geeraedts F., Goutagny N., Hornung V. et al. Superior immunogenicity of inactivated whole virus H5N1 influenza vaccine is primarily controlled by Toll-like receptor signaling. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e1000138.
19. Harvey R., Nicolson C., Johnson R.E. et al. Improved haemagglutinin antigen content in H5N1 candidate vaccine viruses with chimeric haemagglutinin molecules. *Vaccine.* 2010; 28: 8008–14.
20. Harvey R., Wheeler J.X., Wallis C.L. et al. Quantitation of haemagglutinin in H5N1 influenza viruses reveals low haemagglutinin content of vaccine virus NIBRG-14 (H5N1). *Vaccine.* 2008; 26: 6550–4.
21. Hoelscher M.A., Garg S., Bangari D.S. et al. Development of adeno-viral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet.* 2006; 367: 475–81.

22. Horimoto T, Takada A, Fujii K. et al. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*. 2006; 24: 3669–76.
23. Karaca K, Swayne D.E., Grosenbaugh D. et al. Immunogenicity of fowlpox virus expressing the avian influenza virus H5 gene (TROVAC AIV-H5) in cats. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12: 1340–2.
24. Karron R.A., Talaat K., Luke C. et al. Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults. *Vaccine*. 2009; 27: 4953–60.
25. Keitel W.A., Campbell J.D., Treanor J.J. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated influenza A/H5N1 vaccine given with or without aluminum hydroxide to healthy adults: results of a phase I-II randomized clinical trial. *J. Infect. Dis.* 2008; 198: 1309–16.
26. Khurana S., Chearwae W., Castellino F. et al. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Sci. Transl. Med.* 2010; 2 (15): 15ra5.
27. Kodihalli S., Goto H., Kobasa D.L. et al. DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J. Virol.* 1999; 73: 2094–8.
28. Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*. 2004; 363: 587–93.
29. Koudstaal W., Hartgroves L., Havenga M. et al. Suitability of PER. C6 cells to generate epidemic and pandemic influenza vaccine strains by reverse genetics. *Vaccine*. 2009; 27: 2588–93.
30. Krenn B.M., Egorov A., Romanovskaya-Romanko E. et al. Single HA2 mutation increases the infectivity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 intranasal influenza vaccine candidate lacking NS1. *PLoS One*. 2011; 6: e18577.
31. Landry N., Ward B.J., Trépanier S. et al. Preclinical and clinical development of plant-made virus-like particle vaccine against avian H5N1 influenza. *PLoS One*. 2010; 5: e15559.
32. Levie K., Leroux-Roels L., Hoppenbrouwers K. et al. An adjuvanted, low-dose, pandemic influenza A (H5N1) vaccine candidate is safe, immunogenic, and induces cross-reactive immune responses in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 2008; 198: 642–9.
33. Lin J., Zhang J., Dong X. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial. *Lancet*. 2006; 368: 991–7.
34. Nicholson K.G., Colegate A.E., Podda A. et al. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet*. 2001; 357: 1937–43.
35. Nolan T.M., Richmond P.C., Skeljo M.V. et al. Phase I and II randomised trials of the safety and immunogenicity of a prototype adjuvanted inactivated split-virus influenza A (H5N1) vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2008; 26: 4160–7.
36. Romanova J., Krenn B.M., Wolschek M. et al. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. *PLoS One*. 2009; 4: e5984.
37. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S. et al. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I-II clinical trials). *Influenza Other Respi. Viruses*. 2008; 2 (6): 203–9.
38. Rumke H.C., Bayas J.M., de Juanes J.R. et al. Safety and reactogenicity profile of an adjuvanted H5N1 pandemic candidate vaccine in adults within a phase III safety trial. *Vaccine*. 2008; 26: 2378–88.
39. Smith L.R., Wloch M.K., Ye M. et al. Phase I clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine*. 2010; 28: 2565–72.
40. Stephenson I., Zambon M.C., Rudin A. et al. Phase I evaluation of intranasal trivalent inactivated influenza vaccine with nontoxicogenic *Escherichia coli* enterotoxin and novel biovector as mucosal adjuvants, using adult volunteers. *J. Virol.* 2006; 80: 4962–70.
41. Subbarao K., Chen H., Swayne D. et al. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology*. 2003; 305: 192–200.
42. Subbarao K., Klimov A., Katz J. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*. 1998; 279: 393–6.
43. Suguitan A.L. Jr., McAuliffe J., Mills K.L. et al. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PLoS Med.* 2006; 3: e360.
44. Sylte M.J., Hubby B., Suarez D.L. Influenza neuraminidase antibodies provide partial protection for chickens against high pathogenic avian influenza infection. *Vaccine*. 2007; 25: 3763–72.
45. Szecsi J., Boson B., Johnsson P. et al. Induction of neutralizing antibodies by virus-like particles harboring surface proteins from highly pathogenic H5N1 and H7N1 influenza viruses. *Virol. J.* 2006; 3: 70.
46. Talaat K.R., Karron R.A., Callahan K.A. et al. A live attenuated H7N3 influenza virus vaccine is well tolerated and immunogenic in a Phase I trial in healthy adults. *Vaccine*. 2009; 27: 3744–53.
47. Treanor J.J., Campbell J.D., Zangwill K.M. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 1343–51.
48. Treanor J.J., Wilkinson B.E., Masseoud F. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine*. 2001; 19: 1732–7.
49. Tumpey T.M., Renshaw M., Clements J.D., Katz J.M. Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection. *J. Virol.* 2001; 75: 5141–50.
50. Veits J., Wiesner D., Fuchs W. et al. Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103: 8197–8202.
51. Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993; 259: 1745–9.
52. Wei C.J., Xu L., Kong W.P. et al. Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus. *J. Virol.* 2008; 82: 6200–8.
53. Wood J.M., Major D., Daly J. et al. Vaccines against H5N1 influenza. *Vaccine*. 1999; 18: 579–80.
54. Wood J.M., Major D., Newman R.W. et al. Preparation of vaccines against H5N1 influenza. *Vaccine*. 2002; 20 (suppl. 2): S84–7.
55. Wright P.F., Thompson J., Vaughn W.K. et al. Trials of influenza A/New Jersey/76 virus vaccine in normal children: an overview of age-related antigenicity and reactogenicity. *J. Infect. Dis.* 1977; 136 (suppl.): S731–41.
56. Zaharatos G.J., Yu J., Pace C. et al. HIV-1 and influenza antigens synthetically linked to IgG2a Fc elicit superior humoral responses compared to unmodified antigens in mice. *Vaccine*. 2011; 30: 42–50.
57. Zhao G., Lin Y., Du L. et al. An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses. *Virol. J.* 2010; 7: 9.

Поступила 25.06.12