

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63

УДК 616.98:579.842.23(470)

Н.И. Микшис, В.В. Кутырев

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИН ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ЧУМЫ

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Возникновение в современный период в странах Африки и Южной Америки крупных вспышек чумы, характеризующихся высокой частотой развития легочной формы болезни (в том числе со смертельным исходом) поддерживает интерес ученых к проблемам разработки и испытания средств специфической профилактики этой особо опасной инфекционной болезни. На состоявшемся в 2018 г. семинаре ВОЗ были определены общие принципы оптимизации проектирования и испытания вакцин нового поколения, эффективно защищающих население от заражения чумой. Использование достижений биологических и медицинских наук для определения рациональной стратегии конструирования иммунобиологических препаратов позволило в последние годы достигнуть определенного прогресса в создании не только субъединичных вакцин на основе рекомбинантных антигенов, но также живых и векторных препаратов на платформе безопасных штаммов бактерий и реплицирующихся и нереплицирующихся вирусов. В обзоре подробно рассмотрены актуальные направления конструирования вакцин для профилактики чумы, определены преимущества использования современных методологий для повышения безопасности и эффективности вакцинации.

**Ключевые слова:** чума, *Y. pestis*, специфическая профилактика чумы, вакцины

*Корреспондирующий автор:* Микшис Наталья Ивановна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Для цитирования:* Микшис Н.И., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 1:50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63

N.I. Mikshis, V.V. Kutyrev

### Current State of the Problem of Vaccine Development for Specific Prophylaxis of Plague

*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

**Abstract.** Emergence of large-scale plague outbreaks in Africa and South America countries in the modern period, characterized by high frequency of pneumonic plague development (including with lethal outcome) keeps up the interest of scientists to the matters of development and testing of means for specific prophylaxis of this particularly dangerous infectious disease. WHO workshop that was held in 2018 identified the general principles of optimization of design and testing of new-generation vaccines effectively protecting the population from plague infection. Application of the achievements of biological and medical sciences for outlining rational strategy for construction of immunobiological preparations led to a certain progress in the creation of not only sub-unit vaccines based on recombinant antigens, but also live and vector preparations on the platform of safe bacterial strains and replicating and non-replicating viruses in recent years. The review comprehensively considers the relevant trends in vaccine construction for plague prevention, describes advantages of the state-of-the art methodologies for their safety and efficiency enhancement.

**Key words:** plague, *Y. pestis*, specific prophylaxis of plague, vaccines.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

*Corresponding author:* Natal'ya I. Mikshis, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Citation:* Mikshis N.I., Kutyrev V.V. Current State of the Problem of Vaccine Development for Specific Prophylaxis of Plague. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2019; 1:50–63. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63

*Received* 11.12.18. *Accepted* 18.02.19.

В соответствии с Международными медико-санитарными правилами (ММСП, 2005 г.) чума относится к группе инфекционных болезней, способных вызывать чрезвычайные ситуации международного масштаба, требующие уведомления ВОЗ в случаях явной угрозы глобального распространения. В исторической ретроспективе отмечено три пандемии чумы, унесшие жизни почти 200 млн человек. В отсутствие лечения легочная и септическая формы чумы приводят к смертельному исходу в течение 1–3 сут от начала заболевания. Возбудитель чумы – *Yersinia pestis*, в процессе приспособления к паразитическому образу жизни с циклической сменой хозяина и переносчика приобрел способность уклоняться от ответной реак-

ции иммунной системы на начальном этапе инфекционного процесса. Паттерн-распознающие рецепторы врожденного иммунитета, нацеленные на элиминацию любого патогена, не определяют внедрившийся микроорганизм как сигнал опасности, в результате происходит его безудержное размножение с синтезом факторов, реализующих цитотоксическое действие. Описан механизм, позволяющий одному из факторов патогенности *Y. pestis* – V антигену, использовать человеческий IFN- $\gamma$  для индукции апоптоза Т-клеток иммунной системы [1]. В целом, после отделения от общего предшественника в геноме *Y. pestis* произошли драматические изменения, позволившие микроорганизму обходить защитные эукариотические барьеры.

Природные резервуары чумы присутствуют в Азии, Африке, Северной и Южной Америке, отдельных регионах Европы. В последние годы в мире выделяются три страны с большим количеством зарегистрированных случаев заболевания людей – Мадагаскар, Демократическая Республика Конго и Перу. В 2017 г. на Мадагаскаре произошла одна из крупнейших вспышек чумы в современный период – Министерство здравоохранения сообщило в общей сложности о 2348 подтвержденных и подозрительных случаях этой особо опасной инфекционной болезни. Из общего числа случаев заражения чумой 202 – со смертельным исходом (коэффициент летальности – 8,6 %). Для сравнения за шестилетний период (с 2010 по 2015 год), по всему миру зарегистрировано 3248 заболеваний людей чумой, в том числе 584 летальных исхода. Вспышка на Мадагаскаре в 2017 г. характеризуется высокой долей легочной чумы (78,3 %) по сравнению с бубонной (14,5 %). В 9,2 % случаев уточнить форму болезни не удалось, у одного пациента отмечена септическая форма чумы [2]. Полногеномный SNP анализ выделяемых штаммов *Y. pestis* показал их принадлежность к филогенетическим кластерам 1.ORI.3.k и 1.ORI.3.d, характерным для Мадагаскара [3].

После снятия с производства инактивированной чумной вакцины USP (США), ввиду ее высокой реактогенности и низкой эффективности, ВОЗ не рекомендует использование вакцин первого поколения для специфической профилактики в природных очагах [4]. В условиях отсутствия лицензированной вакцины основной стратегией предупреждения вспышек заболевания чумой в странах Африканского континента и Америки является проведение эффективного эпиднадзора, оказание содействия в разработке планов обеспечения готовности к профилактическим мероприятиям и принятию мер по локализации очага инфекции.

В Российской Федерации насчитывается 11 природных очагов чумы общей площадью более 200 тыс. км<sup>2</sup>. На сопредельных территориях стран бывшего Советского Союза располагается еще 34 природных очага – в Казахстане, Узбекистане, Таджикистане, Туркменистане, Армении, Грузии, Кыргызстане и Азербайджане. Эпизоотии чумы и связанные с ними локальные вспышки регистрируют на граничащих с Россией территориях Монголии и Китая. После длительного эпидемического благополучия в Горно-Алтайском высокогорном очаге в 2014 и 2016 гг. на фоне развития эпизоотий в популяциях промыслового серого сурка имели место единичные случаи заражения чумой человека [5, 6].

Вакцинопрофилактика инфекционных болезней в России является одним из важных направлений государственной политики в области охраны здоровья населения и осуществляется на основании Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации № 125н «О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилак-

тических прививок по эпидемическим показаниям». В соответствии с национальным календарем по эпидемическим показаниям для специфической профилактики чумы используют лицензированную живую вакцину. Вакцина чумная живая (лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций) представляет собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ с добавлением стабилизатора. Прививкам подлежат взрослые и дети с 2 лет, проживающие на энзоотических по чуме территориях, а также лица, непосредственно контактирующие с живыми культурами возбудителя чумы. Вакцинацию проводят однократно, как правило, накожным способом. Одна доза препарата для накожного нанесения взрослым содержит от  $2,4 \cdot 10^9$  до  $3,6 \cdot 10^9$  живых микробных клеток (м.к.) в 0,15 мл. Вакцина вызывает развитие иммунитета к чуме длительностью до одного года. В настоящее время вакцину производит ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

Вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ содержит плазмиды pPst, pCad, pFra и лишен области пигментации (*pgm*-области) – фрагмента хромосомы протяженностью 102 т.п.н., включающего кластер генов, кодирующих биосинтез и транспорт сидерофора иерсиниабактина, и *hms*-локус, ответственный за сорбцию гемина. По морфологическим, культуральным и серологическим признакам штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ – типичный штамм возбудителя чумы восточного биовара. Полногеномный SNP анализ подтвердил наличие хромосомной делеции и принадлежность к филогенетической группе 1.ORI.3.k, предшествующей более современному кластеру мадагаскарских штаммов – 1.ORI.3.d [3,7]. По результатам секвенирования, помимо протяженной делеции в области пигментации, полностью исключая возможность спонтанной реверсии к вирулентному фенотипу, других значимых изменений в структурных и регуляторных генах вирулентности штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ обнаружить не удалось. Подобные вакцины на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* применяются в Китае и Индонезии.

Многолетняя практика использования лицензированной отечественной вакцины свидетельствует о ее иммунологической эффективности и относительной безопасности [8]. Вместе с тем для живой чумной вакцины, как и для большинства препаратов на основе аттенуированных многократным пассированием микроорганизмов, полностью не решена проблема реактогенности. Вызывает озабоченность недостаточная продолжительность напряженного иммунитета, проблематично применение живой вакцины для экстренной профилактики на фоне приема антибиотиков, не исключена вероятность драматических последствий при использовании вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ у лиц с гемохроматозом – редкой наследственной патологией, характеризующейся нарушением обмена железа [9].

Возникновение в современный период крупных вспышек чумы, характеризующихся высокой частотой развития легочной формы болезни, в том числе со смертельным исходом, необходимость быстрого реагирования при возникновении угрозы биотерроризма и неуклонное развитие вакцинных технологий содействуют возрождению интереса к разработке вакцин нового поколения. 23 апреля 2018 г. под эгидой ВОЗ состоялся семинар, посвященный проблемам вакцинопрофилактики чумы [2]. В нем приняла участие группа из 30 ведущих экспертов в области эпидемиологии чумы, разработки вакцин, нормативного обеспечения доклинических и клинических испытаний, математического моделирования эффективности вакцинации. Целью семинара стало определение общих принципов оптимизации проектирования вакцин, проведения испытаний и анализа полученных данных, исходя из современного состояния проблемы и с учетом уроков, извлеченных из работы органов здравоохранения во время вспышек чумы. На семинаре представлены последние данные по эпидемиологической обстановке по чуме в мире, обсуждены наиболее перспективные разработки кандидатных вакцин, определены общие методологические принципы оценки вакцин вне зависимости от вакцинных продуктов и согласованы предварительные рекомендации. Современные реалии привели к изменению позиции ВОЗ в отношении специфической профилактики чумы. Если ранее признавалась необходимость вакцинации только лиц, постоянно подвергающихся риску заражения (сотрудников специализированных лабораторий), то в настоящий момент ВОЗ отмечает потребность в вакцине не только на эндемичной по чуме территории, но и в районах, где не гарантируется своевременный доступ к диагностике и лечению (например, отдаленные сельские районы, районы конфликтов и др.) [2].

По данным ВОЗ, на начало 2018 г. насчитывалось 17 прототипов вакцин для специфической профилактики чумы, разрабатываемых профильными университетскими лабораториями и частными биофармацевтическими компаниями. Для двух из них завершена фаза 2 клинических исследований, несколько кандидатов планируют начать их испытания в 2019 г. Наиболее перспективные подходы к конструированию чумных вакцин находятся в рамках актуальных направлений создания вакцин для профилактики инфекционных болезней: создание вакцин на основе рекомбинантных иммуногенных антигенов; конструирование вакцин на платформе безопасных штаммов бактерий и вирусов; создание живых вакцин путем генетических модификаций штаммов *Y. pestis*.

**Создание вакцин на основе рекомбинантных иммуногенных антигенов.** К настоящему времени многочисленными экспериментальными исследованиями подтверждено доминирующее значение фракции 1 (F1) – капсульного антигена, и V антигена (LcrV) – компонента системы секреции

III типа, в обеспечении защиты от чумы. При их совместном использовании протективный эффект усиливается, проявляясь в той или иной мере при подкожном, внутривенном, интраназальном и аэрогенном инфицировании различных биомоделей высоковирулентными штаммами *Y. pestis*. В современный период направленное конструирование субъединичных вакцин осуществляют с использованием рекомбинантных белков. Кодирующие нуклеотидные последовательности клонируют, как правило, в составе высокоэкспрессирующих систем, обеспечивающих быструю и эффективную очистку целевых белков. Создание вакцин на основе рекомбинантных протективных антигенов в значительной мере решило проблему остаточной вирулентности и реактогенности, присущей живым вакцинам первого поколения на основе аттенуированных многократным пассированием микроорганизмов. Вместе с тем субъединичные вакцины пока так и не смогли приблизиться по эффективности к живым вакцинам, в частности, ввиду отсутствия у них патоген-ассоциированных молекулярных структур, направляющих иммунный ответ макроорганизма по Th1-пути с преимущественным развитием клеточных реакций.

Следует отметить, что прототипы вакцин против чумы на основе рекомбинантных антигенов достигли наибольшего продвижения в плане проведения доклинических исследований. Отдельные представители испытаны не только на мышах, крысах, морских свинках и кроликах, но и приматах. В их числе препараты, содержащие F1 и V антиген по отдельности [10, 11], F1 и V антиген, объединенные в химерную конструкцию [12, 13], F1 и V антиген с добавлением третьего компонента – флагеллина [14]. Во всех случаях в экспериментах определялся высокий уровень продукции специфических антител, в отдельных исследованиях установлена способность прототипов вакцин защищать макаков-циномолгус при интраназальном или аэрозольном заражении дозами от  $10^4$  до  $10^5$  КОЕ вирулентного штамма *Y. pestis* CO92. В оценке субъединичных вакцин нельзя не учитывать то обстоятельство, что успешные испытания на макаках-циномолгус и резус не всегда гарантируют высокий уровень защиты зеленых мартишек [15]. В этой связи могут возникнуть сложности с экстраполяцией результатов экспериментальных исследований на человека.

В постгеномный период существенно пополнился набор инструментов для разработки вакцин нового поколения. Современные технологии (геномика, протеомика, метаболомика, транскриптомика) способствуют выявлению протективных антигенов и определению рационального дизайна вакцин. Для идентификации иммунодоминантных эпитопов и соответствующих нейтрализующих антител применяют структурную вакцинологию. Сведения о T-клеточных эпитопах белковых антигенов получают на основании ассоциации с генами главного комплекса гистосовместимости человека. С целью

активизации Т-клеточного звена иммунитета в компонентный состав субъединичных вакцин включают дополнительные антигены и адъюванты нового поколения – модификаторы сигнальных путей рецепторов врожденного иммунитета.

*Прототипы рекомбинантных вакцин против чумы, прошедшие клинические исследования.* Необходимыми условиями для получения экспериментальных серий прототипов субъединичных вакцин для клинических исследований являются стандартизация технологических пиний и процедур очистки в соответствии с требованиями GMP, всесторонняя характеристика получаемых антигенов с использованием современных технологий

В 2005 г. опубликованы результаты клинических испытаний вакцины, содержащей F1 и рекомбинантный V антиген. В исследовании фазы 1 разработанного английскими учеными препарата приняло участие 38 человек. Испытывали дозы антигенов от 5 до 40 мкг при двукратном введении с интервалом в 21 сут. Серьезных случаев поствакцинальных осложнений не выявлено [16].

В 2016 г. в Китае завершена фаза 2а клинических исследований прототипа вакцины, содержащего нативный капсульный антиген и рекомбинантный V антиген. В исследовании участвовало 240 волонтеров, вакцину вводили двукратно с интервалом в 28 сут. Титры антител к F1 и V антигену детектировали на протяжении 12 месяцев наблюдения. Отмечена зависимость выраженности иммунного ответа от дозы вводимых антигенов и отсутствие влияния увеличения дозы на профиль безопасности препарата [17].

В 2017 г. в США сообщалось о результатах фазы 1 клинических исследований (июнь 2011 – декабрь 2016 г.) прототипа вакцины на основе химерного белка, объединяющего F1, V антиген и иммунодоминантную часть флагеллина *Salmonella enterica*. Последний компонент активизирует структуры врожденного иммунитета – толл-подобные рецепторы 5 типа, тем самым, усиливая адаптивный иммунный ответ. В рандомизированном, плацебо контролируемом исследовании приняло участие 60 человек. Респондентов вакцинировали двукратно с интервалом 28 сут. Помимо клинического обследования изучалась выраженность гуморальных и клеточных реакций после введения различных доз (1, 3, 6 и 10 мкг) препарата. Установлено дозозависимое увеличение иммуногенности и хорошая переносимость во всех дозах [18].

В 2017 г. Управление по санитарному надзору за качеством продуктов и лекарств США (FDA) присвоила разработке компании DynPort – Plague vaccine injectable, статус орфанного препарата, что предполагает государственную поддержку и является важным стимулом для продолжения исследований [19]. Программа FDA по присвоению орфанного статуса применима к тем лекарствам и биологическим средствам, которые создаются для безопасного и эффективного лечения, диагностики или профилактики

редких болезней (1:1500 человек в США). Вакцина против чумы на основе рекомбинантных F1 и V антигена – Plague vaccine injectable или rF1V, изначально разработана учеными из Военно-Медицинского Научно-Исследовательского Института Инфекционных Болезней США (USAMRIID). В последующем расширенные доклинические исследования осуществляла биофармацевтическая компания DynPort [12, 20]. В период с 2006 по 2012 год (фаза 2а клинических исследований) изучалось действие вакцины при трехкратном введении в различных дозах. В 2017 г. фаза 2 клинических исследований rF1V продолжилась. Текущая разработка финансируется за счет программы Medical Countermeasures Systems-Joint Vaccine Acquisition Program (MCS-JVAP) и контракта Министерства обороны DAMD17-98-C-8024.

В 2018 г. Министерством здравоохранения Российской Федерации зарегистрирована химическая вакцина для специфической профилактики чумы – вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (регистрационный номер – ЛП-004808). Препарат разработан специалистами ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». Вакцина представляет собой лиофилизат для подкожного введения, состоит из рекомбинантных антигенов F1 и V, заключенных в микрокапсулы. Продуцент V антигена (G113) – рекомбинантный штамм *E. coli* BL21(DE3)/pETV-I-3455. Вследствие спонтанной точечной мутации в позиции 113 аминокислотной последовательности LcrV произошла замена триптофана на глицин, что привело к изменению физических свойств белковой молекулы и повышению иммуногенности [21]. Продуцент капсульного антигена – рекомбинантный штамм *Y. pseudotuberculosis* EV11M/pFSK3/9, содержащий плазмиду pFSK с включенным в ее состав локусом *cafI* оперона *Y. pestis*. В экспериментальных исследованиях вакцина защищала не менее 70 % мышей и морских свинок от заражения дозой 10–30 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Препарат позиционируется, прежде всего, как средство специфической профилактики чумы у личного состава войск Министерства обороны Российской Федерации и МЧС, действующих в чрезвычайных ситуациях. Первичная иммунизация проводится двукратно по 0,5 мл с интервалом в 21 сут. Вакцина может быть использована для ревакцинации после первичной вакцинации живой чумной вакциной. Одна доза для подкожного введения содержит в 0,5 мл: по 25–30 мкг рекомбинантных антигенов F1 и V, а также гидроокись алюминия, стабилизаторы и консерванты [22].

*Способы повышения эффективности прототипов рекомбинантных субъединичных вакцин.* Считается, что протективная активность препаратов на основе V антигена обусловлена способностью специфических антител препятствовать транслокации Yop эффекторных белков, что приводит к сбою в ключевом звене патогенеза чумной

инфекции. В-клеточные эпитопы идентифицированы на N-конце и в центральной части белковой молекулы V антигена [23]. Вместе с тем существуют справедливые опасения, что белковые продукты рекомбинантных технологий слабо воздействуют на Т-клеточное звено иммунитета и, следовательно, не могут обеспечить должный иммунный ответ макроорганизма. Последнее подтверждение этому – исследование на приматах прототипа вакцины, разработанной китайскими авторами. Макак циномоглус иммунизировали четырехкратно (с интервалами 0, 2, 4 и 6 недель) препаратом, содержащим нативный F1 и рекомбинантный V антиген (дозами по 15 и 30 мкг каждого антигена). Вакцина вызывала высокие уровни сывороточных антител против F1 и V антигена и небольшое увеличение  $IFN\gamma$  и IL-2. Отмечали обратимое увеличение количества эозинофилов периферической крови, увеличение уровня IgE в сыворотке у нескольких животных и гистопатологические изменения гранулемы в местах инъекций при отсутствии грубых изменений со стороны органов и тканей. Сделан вывод, что субъединичная вакцина безопасна и вызывает у макак циномоглус ярко выраженный гуморальный иммунный ответ на фоне низкого уровня клеточных иммунных реакций [24].

В этой связи важное значение имеет обнаружение антигенных эпитопов, ассоциированных с активацией Т-клеточного звена иммунитета. Так, CD4+ Т-клеточный эпитоп идентифицирован вблизи С-терминального конца F1 [25]. В 2017 г. опубликована работа израильских авторов, представляющая комбинированные высокопроизводительные вычислительные и экспериментальные усилия по идентификации эпитопов для Т-клеток (CD8). Все 4067 белков *Y. pestis* проанализированы с помощью новейших алгоритмов прогнозирования, направленных на отображение потенциальных связующих веществ главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I. Впоследствии 1532 пептида тестировали на способность вызывать специфический Т-клеточный ответ, ориентируясь на уровни продукции  $IFN\gamma$  спленоцитами иммунизированных мышей. В результате отобрано 178 новых Т-клеточных эпитопов *Y. pestis*, охватывающих 113 белков *Y. pestis*. В дальнейшем предполагается подтвердить их защитный потенциал и, следовательно, их вклад в будущую мощную субъединичную вакцину [26].

Необходимо отметить, что и ранее осуществлялся поиск иммуногенных антигенов *Y. pestis*, вносящих дополнительный вклад в реализацию протективного действия, однако в постгеномный период для этой цели используют инновационные методологии, включая биоинформационный и протеомный анализы, технологию белковых микрочипов и другие. В качестве потенциальных иммуногенов в разное время рассматривались: активатор плазминогена – Pla, белки внешней мембраны – OmpA, OmpX, Ail, липопротеин наружной мембраны – MlpA, каталаза-пероксидаза – KatY, белок YscC комплекса – VirG,

Yop регулятор – LcrG, Yop негативный регулятор – YopD, другие компоненты системы секреции III типа – YopE, YopH, YopM, YopK, YopN, YpkA, YscB и YscF [27, 28, 29, 30]. В экспериментах на лабораторных животных показана способность некоторых из перечисленных кандидатов, например YopD, YopE, YpkA и YscF, обеспечивать частичную защиту мышей или отдалять сроки их смерти при подкожном заражении вирулентным штаммом *Y. pestis*. При моделировании легочной формы чумы частичную защиту обеспечивали Pla, OmpA, OmpX и Ail [29].

Интересный подход предложен объединенной группой ученых из Католического университета Америки, Национального института аллергических и инфекционных заболеваний и Техасского университета США. Исследование по разработке двунаправленной рекомбинантной вакцины, защищающей одновременно от чумы и сибирской язвы, финансировалось Национальными институтами здравоохранения США. Созданный препарат представляет собой химерный трехкомпонентный антиген, включающий F1 и V антиген из *Y. pestis* и протективный антиген из *B. anthracis*. Растворимый трехкомпонентный антиген сохранял функциональные и иммуногенные свойства всех трех составляющих. Примечательно, что двукратная иммунизация с интервалом в 21 сут химерной конструкцией, сорбированной на Alhydrogel®, вызывала выработку антител у мышей, крыс и кроликов и обеспечивала полную защиту от ингаляционной сибирской язвы и легочной чумы. Заражение осуществляли 1 LD<sub>100</sub> летального токсина и 200 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* CO92 для мышей, 400 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* CO92 для крыс (интраназально), 200 LD<sub>50</sub> *B. anthracis* Ames для кроликов (ингаляционно) [31].

В работе S. Verma *et al.* для стимуляции Т-клеточного ответа использовали белок теплового шока *Mycobacterium tuberculosis* – HSP70. Гены *caf1*, *lcrV* и фрагмент гена *hsp70*, кодирующий домен 2 белка теплового шока, объединяли в одну рамку считывания. Результирующую конструкцию *caf1-lcrV-hsp70* встраивали в плазмидный вектор и клонировали для экспрессии в штамме *Escherichia coli*. Мышей иммунизировали адсорбированным на альгидрогеле очищенным рекомбинантным слитным белком F1-LcrV-HSP70(II). Показано, что добавление третьего компонента HSP70 приводит к стимуляции как гуморального, так и клеточного звена иммунитета, что выражается в значительном увеличении титров специфических антител, а также уровней продукции INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2. Трехкратная иммунизация мышей слитным белком F1-LcrV-HSP70(II) с адьювантом обеспечивала 100 % защиту при интраперитонеальном инфицировании 100 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* CO92 [32].

Применение адьювантов нового поколения в составе прототипов вакцин против чумы решает задачу оптимального представления антигенов иммунной системе, способствует формированию выраженного иммунного ответа с развитием как гуморальных, так

и клеточных иммунных реакций. Отличием современных адьювантов от традиционно используемых солей алюминия является способность взаимодействовать с рецепторами системы врожденного иммунитета, например, толл-подобными рецепторами (toll-like receptors, TLR). TLR ассоциированы с молекулярными структурами, контролирующими распознавание и деструкцию внедряющихся патогенов. В результате активации TLR происходит широкий спектр биологических реакций – от индукции синтеза противовоспалительных цитокинов и интерферона до экспрессии костимулирующих молекул, которые являются промоторами Т-клеточной активации [33].

При конструировании современных рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы принимаются во внимание иммуностимулирующие свойства CpG-ODN (цитозин-гуанин олигодезоксинуклеотиды) [34]. Последовательности CpG, содержащие неметилированный мотив, присущий только бактериальной ДНК, взаимодействуют с TLR 9 типа. Показано, что интраназальное введение линейным мышам CpG-ODN, даже без добавления антигенов за 1 день до экспериментального моделирования бубонной чумы, обеспечивает существенную защиту от развития патологических процессов в макроорганизме [35]. В доклинических и клинических испытаниях прототипа противочумной вакцины показана эффективность использования флагеллина, являющегося агонистом TLR 5 типа [36]. Для стимуляции Т-клеточного звена иммунитета использовали также DL-лактаидные микрочастицы [37], дендритные клетки [38], комплекс катионных липосом с нуклеиновыми кислотами [39], костимулирующую молекулу SA-4-1BBL [40]. Добавление SA-4-1BBL в сочетании с гидроксидом алюминия к rF1-LcrV приводило к стимуляции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, увеличению продукции TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  и позволяло достичь 100 % защиты мышей линии C57BL/6 от бубонной формы чумы.

**Конструирование вакцин на платформе безопасных штаммов бактерий и вирусов.** В качестве основ для создания безопасных и эффективных вакцин предлагаются: штаммы условно-патогенных и непатогенных бактериальных видов; реплицирующиеся и не реплицирующиеся штаммы аттенуированных вирусов.

Оптимальными платформами для клонирования детерминант иммуногенности патогенного микроорганизма служат безопасные штаммы, прошедшие доклинические или клинические испытания. Для создания эффективных генетических конструкций применяют элементы синтетической биологии, современные стратегии клонирования в составе хромосомы, низкокопийных плазмид или сбалансированных суицидных систем (например, *asd*-system), не содержащих маркеры антибиотикорезистентности.

**Бактериальные платформы.** Как правило, в качестве основы для создания прототипов живых муккозальных вакцин против чумы используют аттенуи-

рованные штаммы *Y. pseudotuberculosis* и *Salmonella typhimurium*. Пероральное введение подобных препаратов имеет свои преимущества. Непосредственный контакт со слизистыми оболочками приводит к активации располагающихся там клеток врожденного иммунитета, что запускает каскад реакций, индуцирующих и направляющих развитие адаптивного иммунного ответа.

Французские ученые создали прототип живой однодозовой вакцины для перорального применения на платформе *Y. pseudotuberculosis* [41, 42]. Обладая высокой степенью гомологии с *Y. pestis*, вид *Y. pseudotuberculosis* характеризуется низкой патогенностью и большей стабильностью. Первоначально штамм *Y. pseudotuberculosis* дикого типа IP32953 был модифицирован за счет удаления генов, кодирующих три основных фактора вирулентности. Однократная иммунизация штаммом *Y. pseudotuberculosis* IP32680 обеспечивала 75, а двукратная – 88 % защиту мышей от подкожного заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* CO92. Впоследствии ген, кодирующий F1, с помощью транспозонного мутагенеза был встроен в хромосому генетически ослабленного штамма *Y. pseudotuberculosis*. Результирующий штамм VTnF1 стабильно продуцировал капсулу, при введении перорально мышам сохранялся в течение двух недель в кишечнике и вызывал выраженный гуморальный ответ. Отмечено участие в иммунном ответе клеток с эффекторным профилем Th1-Th17, продуцирующих IFN $\gamma$ , IL-17 и IL-10. Одна пероральная доза (10<sup>8</sup> КОЕ) штамма VTnF1 обеспечивала 100 % защиту от ингаляционного заражения большой дозой (3300 LD<sub>50</sub>) вирулентного штамма *Y. pestis* CO92. Кроме того, иммунизация защищала от бубонной чумы 100 % мышей при заражении 100 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* и 93 % – при заражении 10000 LD<sub>50</sub>. Через шесть месяцев после иммунизации 93 и 50 % мышей выжили от бубонной и легочной чумы соответственно. Примечательно, что иммунизированные мыши были также защищены от бубонной и легочной чумы, вызванной высокой дозой лишенной капсулы штамма *Y. pestis* (F1<sup>-</sup>) [41]. В экспериментах на модели аутбредных и инбредных мышей показано, что доминирующая роль в обеспечении защиты от чумы при использовании данного штамма принадлежит антителам к F1 [42]. Для дальнейшего продвижения препарата необходимо расширение линейки используемых биомоделей с включением приматов.

В отличие от *Y. pseudotuberculosis*, вакцинные и аттенуированные штаммы *S. typhimurium* хорошо изучены в доклинических и клинических исследованиях, что делает их привлекательными в плане создания на их основе живых пероральных вакцин. Новое поколение генетически модифицированных штаммов *S. typhimurium* RASV отличает регулируемая экспрессия клонированных генов, а также способность к колонизации и персистенции в лимфоидной ткани без развития инфекционного процесса. Долгое время попытки использова-

ния безопасных штаммов *S. typhimurium* в качестве платформы для создания вакцин против чумы были не вполне удачными. Протективная активность, особенно при моделировании легочной чумы, выражена даже в меньшей степени, чем при иммунизации рекомбинантными антигенами [43]. Большинство создаваемых прототипов демонстрировало свою эффективность в прайм-бустерной схеме иммунизации мышей – при сочетании дву- или трехкратной иммунизации живой вакциной с последующим введением антигенного препарата. Как правило, в аттенуированных штаммах *S. typhimurium* клонировали гены *cafI* и *lcrV*, по отдельности или объединенные в одну рамку считывания. С целью поиска дополнительных факторов иммуногенности изучались конструкции на основе *S. typhimurium*, экспрессирующие белки наружной мембраны чумного микроба – PsaA, адгезин и HmuR [44], компоненты системы секреции III типа – YopD и YscF, а также Psn [45, 46].

На настоящий момент в рамках данного направления самой результативной оказалась стратегия, при которой часть генов клонируют в составе низкокопийной плазмиды, а часть интегрируют в хромосому безопасного штамма *S. typhimurium*. Данный метод, позволяющий сбалансировать секрецию антигенов, использован S. Sanapala *et al.* при создании конструкции на платформе *S. typhimurium* RASV с клонированными генами *cafI*, *lcrV* (фрагмент, кодирующий LcrV196) и *psn*. Однократная пероральная иммунизация мышей этим штаммом создавала 100 % защиту от подкожного заражения 570 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* CO92. При моделировании легочной формы чумы удалось достичь пока только 60 % выживаемости при заражении 50 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма [47].

В качестве универсальной платформы для экспрессии генов, кодирующих факторы иммуногенности возбудителей чумы, туляремии и сибирской язвы предложены вакцинные штаммы *Francisella tularensis* и *Listeria monocytogenes*. В штамме живой туляремийной вакцины для повышения степени аттенуации дополнительно удален ген *capB*. Генетические конструкции испытаны в прайм-бустерной схеме иммунизации при интраназальном заражении мышей летальными дозами вирулентных штаммов *Y. pestis*, *B. anthracis* и *F. tularensis*. Иммунизация индуцировала развитие клеточных и гуморальных реакций. Однако на фоне высокого уровня защиты от туляремии достигнуть протективного эффекта, сопоставимого со штаммом *Y. pestis* EV, не удалось. При инфицировании иммунизированных лабораторных животных дозой 8 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* CO92 выжило не более 50 % особей [48].

**Вирусные платформы.** Вирусные векторы являются универсальной платформой для включения протективных антигенов патогенных микроорганизмов, особенно в тех случаях, когда для полноценной защиты абсолютно необходим клеточный иммунный ответ. Вакцины на основе вирусных векторов ими-

тируют живую инфекцию, экспрессируя антигены *in situ*. Важно, что они индуцируют Т-клеточный ответ, в частности, продукцию цитотоксических Т-лимфоцитов. Данная технологическая платформа весьма перспективна для оперативной разработки вакцин против возникающих инфекций. Замена рекомбинантных антигенов не представляет особых проблем, что ускоряет принятие решений о разработке и применении вакцин в случае возникновения новых эпидемически опасных микроорганизмов (сокращается время на проведение доклинических и клинических исследований). Опасения возникают в основном по поводу безопасности генетической конструкции и наличия предшествующего иммунитета в случае использования в качестве платформы аттенуированного вируса, исходно патогенного для человека. Однако современная методология и технологии будущего позволят свести к минимуму возможные риски.

На сегодняшний день доступен широкий спектр реплицирующихся и нереплицирующихся векторов, в том числе прошедших развернутые доклинические и клинические испытания в составе вакцин для профилактики других инфекционных болезней. Технология конструирования вакцинных препаратов на основе живых вирусов – вируса везикулярного стоматита и вакцинного штамма вируса оспы, а также дефектных по репликации аденовирусов различного серотипа использована при создании наиболее продвинутых в плане клинических исследований отечественных и зарубежных вакцин против болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ).

Сообщалось о попытке создания векторной вакцины, представляющей собой вирус везикулярного стоматита с клонированным геном *lcrV* возбудителя чумы. Однократная иммунизация прототипом вакцины защищала 90 % мышей при интраназальном заражении 10 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* CO92 спустя 3 месяца после введения иммунизирующего препарата. В эксперименте отмечена важная роль CD4+ Т-клеток в реализации протективного действия [49]. Показана принципиальная возможность создания вакцин для специфической профилактики чумы на платформе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) и вируса табачной мозаики [50, 51].

Рекомбинантные вирусные частицы с дефицитом репликации могут служить «контейнером» для практически любых разновидностей вакцин. Они не способны размножиться *in vitro* и *in vivo*, представляют собой самособирающуюся систему, обеспечивающую доставку и экспрессию чужеродного генетического материала в клетки, вызывая надежный и быстрый гуморальный и клеточный иммунный ответ. Попадая в организм человека, подобные частицы представляются иммунной системой как возбудитель, а в отношении них вырабатывается полноценный иммунный ответ.

Основные преимущества использования псевдовирусных частиц – относительная безопасность

для людей, включая лиц с иммунодефицитными состояниями, выраженная иммуногенность с индукцией гуморального и клеточного иммунитета, возможность масштабирования производства. Производственный процесс включает в себя: накопление псевдовирусных частиц в специализированной культуре клеток млекопитающих, очистку полученных нановирусных структур, контроль качества полученных препаратов.

Впервые прототип чумной вакцины на основе аденовируса предложен группой R. Crystal [52, 53]. Они применили стратегию клонирования сначала гена *caf1*, а затем сочетания генов *caf1* и *lcrV* в аденовирусном векторе (Ad5). Однократная иммунизация рекомбинантным вирусом индуцировала гуморальный и клеточный иммунитет, обеспечивала защиту от развития легочной чумы у мышей. Впоследствии другой группой ученых аденовирус 5 серотипа с дефектом репликации использован для конструирования рекомбинантной трехвалентной вакцины rAd5-YFV. Гибридная конструкция, кодирующая химерный белок YscF-F1-LcrV, объединяла в одной рамке считывания три гена – *ycsF* (кодирует белок системы секреции 3 типа), *caf1* и *lcrV*. Иммунизация мышей прототипом вакцины rAd5-YFV обеспечивала 100 % защиту против бубонной и легочной чумы при парентеральном или интраназальном заражении дозой  $4,62 \cdot 10^5$  КОЕ вирулентного штамма *Y. pestis* CO92. Иммунизация макак циномоглус защищала 100 % биомоделей при интраназальном заражении  $1,32 \cdot 10^7$ – $8,08 \cdot 10^7$  КОЕ штамма *Y. pestis* CO92. Это пока единственное успешное исследование на приматах вакцины против чумы на вирусной платформе [54].

Вызывают интерес работы по созданию рекомбинантных вакцин на универсальной платформе бактериофага T4. Бактериофаг T4 используется в этих случаях как высокостабильный каркас наночастиц, вызывающий выраженный клеточный иммунный ответ, необходимый для элиминации патогенного микроорганизма. Первоначально, используя систему сборки *in vitro*, в состав капсида головки бактериофага включен слитный ген, объединяющий последовательности, кодирующие V-антиген с делецией иммуносупрессивной области (с 271 по 300 аминокислотный остаток) и мутантный F1 антиген с повышенной растворимостью. Прототип вакцины на основе бактериофага T4, синтезирующего химерный белок F1mutV, защищал 100 % мышей и крыс от интраназального заражения дозой 5000 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма *Y. pestis* [55].

В последующем к генетической конструкции, детерминирующей синтез двухкомпонентного белка F1mutV, присоединена полная последовательность гена *pag*, кодирующего синтез протективного антигена *B. anthracis*. Фаговые наночастицы, способные синтезировать ключевые антигены *Y. pestis* и *B. anthracis*, вызывали эффективные клеточные и гуморальные иммунные реакции, обеспечивающие

полную защиту мышей, крыс и кроликов при моделировании ингаляционной сибирской язвы и легочной чумы. Двукратная иммунизация крыс с интервалом в 21 сут прототипом трехкомпонентной вакцины защищала 100 % особей при интраназальном заражении на 42-е сутки дозой 400 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* CO92 и последующем внутривенном введении на 70-е сутки 1 LD<sub>100</sub> летального токсина возбудителя сибирской язвы [56].

**Создание живых вакцин путем генетических модификаций штаммов *Y. pestis*.** Расширяющиеся возможности прецизионной аттенуации, позволяющие осуществлять направленный сайт-специфический мутагенез без использования маркеров антибиотикорезистентности, привлечение геномного, протеомного и транскрипционного анализов возбудителя для определения рациональной стратегии конструирования авирулентных штаммов выводят на новый уровень процесс создания живых вакцин.

В рамках этого направления разделяют: снижение реактогенности и повышение иммуногенности штаммов *Y. pestis* с характерной делецией в области пигментации, прецизионную аттенуацию природных вирулентных штаммов *Y. pestis*.

**Снижение реактогенности и повышение иммуногенности штаммов *Y. pestis* с характерной делецией в области пигментации.** Как известно, протяженная делеция в *pgm*-области приводит к авирулентности штамма *Y. pestis*, риск реверсии к вирулентному фенотипу в условиях отсутствия возможности горизонтального переноса генов сведен к нулю. Дополнительные хромосомные мутации в ряде случаев приводят к некоторому увеличению степени его аттенуации и/или снижению вредного воздействия на макроорганизм. Неплохие результаты достигнуты при определении протективной активности сконструированного по этому принципу штамма *Y. pestis* 201 ΔpgmΔyscB [55]. Ген *yscB* кодирует один из компонентов системы секреции III типа. Достигнута 100 % выживаемость иммунизированных штаммом *Y. pestis* 201 ΔpgmΔyscB мышей при интраназальном заражении дозой  $1,24 \cdot 10^6$  КОЕ вирулентного штамма *Y. pestis*. С.А. Агеев и соавт. с целью создания менее реактогенного производного инактивировали методом рекомбинации ген *lpxM* в вакцинном штамме *Y. pestis* EV НИИЭГ [57]. Такой подход заимствован из практики конструирования аттенуированных штаммов энтеропатогенных бактерий и неплохо себя зарекомендовал при прецизионной аттенуации штаммов *Y. pestis*. Генетические модификации вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ или штамма с аналогичной делецией в *pgm*-области пока не привели к ожидаемому результату. Дополнительные мутации, снижающие реактогенность вакцинного штамма, не снимают проблему его недостаточной эффективности в отношении легочной чумы.

Повышение иммуногенности штаммов *Y. pestis* с характерной делецией в области пигментации, как правило, осуществляется за счет замены тетрацети-

лированной формы ЛПС на гексаацетилованную. Данная стратегия основывается на феномене температурной регуляции экспрессии гена *lpxP*, когда при температуре 28 °С образуется гексаацетилованная форма липида А, а при температуре тела хозяина 37 °С – тетраацетилованная [58]. Известно, что ЛПС с четырьмя жирно-кислотными остатками не распознается TLR 4 типа. Комплекс реакций врожденной иммунной системы инициирует формирование антибактериального адаптивного иммунитета с полноценным Т-клеточным ответом.

Показано, что введение в геном штамма *Y. pestis* с делетированной *pgm*-областью мультикопийной плазмиды с геном *lpxL* из *E. coli*, кодирующим ацетилтрансферазу LpxL, приводит к образованию при температуре 37 °С гексаацетилованной формы ЛПС и, как следствие, патогенный микроорганизм быстро распознается системой врожденного иммунитета [59]. Для обеспечения большей стабильности созданы генно-инженерные конструкции, в которых ген *lpxL* из *E. coli* встроены в хромосому. В одном из вариантов ген *lpxL* вводили в *pgm*<sup>-</sup> штамм, в другом – в *pgm*<sup>+</sup> штамм, но с направленной регуляцией гена *crp*. Иммунизация сконструированными штаммами защищала от 80 до 100 % мышей при парентеральном инфицировании дозой 3,5·10<sup>7</sup> КОЕ вирулентного штамма *Y. pestis* (моделирование бубонной формы чумы). При интраназальном заражении дозой 1,24·10<sup>6</sup> КОЕ выжили от 60 до 90 % биомоделей. Лучший результат – 100 и 90 % защиты от бубонной и легочной форм чумы, соответственно, оказался у *pgm*<sup>+</sup> штамма со встроенным геном *lpxL*. В последующем авторы планировали уменьшение возможной иммуносупрессии за счет дополнительных модификаций гена *lcrV* [60].

**Прецизионная аттенуация природных вирулентных штаммов *Y. pestis*.** В настоящее время ввиду высокого риска реверсии к исходному вирулентному фенотипу используют комбинаторный принцип мутационных изменений. Наиболее значительные успехи в идентификации детерминант вирулентности и направленном создании ослабленных и высокоиммуногенных штаммов возбудителя чумы достигнуты группой ученых из Техасского университета США. Сконструированные ими  $\Delta lpp\Delta msbB\Delta ail$  и  $\Delta lpp\Delta msbB\Delta pla$  производные штамма *Y. pestis* CO92 в случае двукратной иммунизации умеренной дозой (2·10<sup>6</sup> КОЕ) индуцировали у мышей и крыс развитие долгосрочных гуморальных и клеточно-опосредованных иммунных реакций, что обеспечивало 100 % защиту от развития легочной чумы при инфицировании дозой 2,3·10<sup>4</sup> КОЕ (46 LD<sub>50</sub>) вирулентного штамма *Y. pestis* CO92. Получены обнадеживающие результаты по всестороннему изучению безопасности данных штаммов для мышей и крыс (в сравнении *Y. pestis* EV76), что позволяет авторам после более глубокого изучения механизмов иммунной защиты надеяться на получение разрешения CDC на их дальнейшее продвижение для исследования

на приматах [61]. Базисом этой работы явились результаты предыдущих исследований, продемонстрировавших важную роль в проявлении патогенных свойств продуктов генов *lpp*, *msbB* [62], *pla* [63] и *ail* [64]. Ген *lpp* кодирует липопротеин Брауна (Lpp), активирующий TLR 2 типа, его делеция снижает вирулентность при моделировании легочной и бубонной чумы. Ген *pla* кодирует активатор плазминогена, ген *ail* – фактор, отвечающий за адгезивные и инвазивные свойства. Штамм *Y. pestis* с мутацией в гене *msbB* (*lpxM*) синтезирует менее реактогенную пентаацетилованную форму липида А.

Этой же группой ведутся весьма результативные исследования по поиску новых детерминант вирулентности, основанные на использовании высокотехнологичного метода мутагенеза *in vivo* (*in vivo* signature-tagged mutagenesis) [65]. Оригинальный способ включает несколько этапов: метод селекции, включающий создание библиотеки транспозонных мутантов, скрининг *in vivo* на основании ДНК-ДНК гибридизации, фрагментное секвенирование и тестирование вирулентности и иммуногенности. С применением указанного скрининга установлена важная роль в проявлении патогенных свойств для следующих генов: *rbsA* – кодирует АТФ-связывающий белок транспортной системы рибозы, *vasK* – кодирует важный компонент системы секреции 6 типа, *upo0815* – общий белок E (GspE) системы секреции 2 типа, *upo2884* – белок, гомологичный суперсемейству  $\beta\gamma$ -кристаллина, *cyoABCDE* – оперон цитохрома о-оксидазы, *hcr3* и *hcr6* – гомологи эфферентного гемолизинного белка системы секреции 6 типа. Аттенуированные штаммы на основе *Y. pestis* CO92 с сочетанными мутациями  $\Delta lpp\Delta cyoABCDE$ ,  $\Delta vasK\Delta hcr6$  и  $\Delta upo2720-2733\Delta hcr3$  обеспечивали защиту 55–100 % мышей после ингаляционного заражения 10 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма дикого типа. Важно, что оценка этих аттенуированных штаммов *in vitro* выявила особенности развития фагоцитоза и внутриклеточной выживаемости в макрофагах мыши и свидетельствовала о способности ингибировать цитотоксическое действие на макрофаги [65].

При инактивации только одного из генов вирулентности *Y. pestis*, например *yopH* или *nlpD*, кодирующих соответственно белок системы секреции III типа и NlpD липопротеин, также удавалось достичь высокой степени аттенуации (LD<sub>50</sub> > 10<sup>7</sup> КОЕ) и 100 % защиты мышей от подкожного заражения большими дозами (до 10<sup>5</sup> КОЕ). Вместе с тем при моделировании легочной формы чумы не наблюдалось 100 % выживаемости иммунизированных биомоделей. Штамм *Y. pestis* CO92  $\Delta yopH$  защищал 61,5 % особей при интраназальном заражении дозой 10<sup>5</sup> КОЕ вирулентного штамма чумного микроба, а штамм *Y. pestis* Kimberley53  $\Delta nlpD$  – 82 % животных при заражающей дозе 5,5·10<sup>3</sup> КОЕ [66, 67]. В работах, сообщающих об аттенуации вирулентных штаммов *Y. pestis* за счет мутационных изменений в генах *pcm*, *dam* и *guaBA*, кодирующих соответственно фак-

тор бактериального ответа на стресс, ДНК аденин метилазу и фермент биосинтеза гуанина [68, 69, 70], протективные свойства оценивались только при подожном заражении.

Несмотря на очевидные успехи в данном направлении, создание эффективной и безопасной живой вакцины по-прежнему проблематично ввиду сложности детерминации патогенных и иммуногенных свойств возбудителя чумы. Остается еще много невыясненных вопросов, касающихся тонких механизмов взаимодействия *Y. pestis* с организмом человека. Пока работы по прецизионной аттенуации природных вирулентных штаммов *Y. pestis* ограничиваются экспериментами на одной биологической модели (мыши), тем не менее, учитывая быстро развивающиеся технологии, потенциал подобных исследований остается высоким.

Таким образом, разработка вакцин против чумы ведется одновременно по нескольким направлениям. Совокупность накопленных знаний о механизмах патогенности и иммуногенности возбудителя чумы и расширяющиеся возможности современных методов исследования позволили в последние годы достигнуть определенного прогресса в конструировании как субъединичных вакцин на основе рекомбинантных антигенов, так и вакцин на основе генетически модифицированных штаммов *Y. pestis* или безопасных штаммов бактерий и вирусов. В ряде случаев созданные прототипы вакцин обеспечивали эффективную защиту лабораторных животных от развития легочной формы чумы при инфицировании весьма высокими дозами типичных вирулентных штаммов *Y. pestis*. Важно, что иммунизация сопровождалась развитием выраженных клеточных и гуморальных иммунных реакций. Полученный положительный опыт и современные темпы развития биологических и медицинских наук увеличивают шансы на создание в обозримом будущем вакцины нового поколения для профилактики особо опасной инфекционной болезни.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

### Список литературы

1. Abramov V., Kosarev I., Motin V., Khlebnikov V., Vasilenko R., Sakulin V., Machulin A., Uversky V., Karlyshev A. Binding of LcrV protein from *Yersinia pestis* to human T-cells induces apoptosis, which is completely blocked by specific antibodies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019; 122:1062–70. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.054.
2. WHO Target Product Profile for Plague Vaccines. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague\\_vaccines\\_workshop-23-april-2018/en/](http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague_vaccines_workshop-23-april-2018/en/). (дата обращения 07.08.2018 г.).
3. Mead P. Plague in Madagascar. A Tragic Opportunity for Improving Public Health. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(2):106–8. DOI: 10.1056/NEJMp1713881.
4. Plague. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/plague>. (дата обращения 12.08.2018 г.).
5. Попова А.Ю., Кутырев В.В., Балахонов С.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Попов Н.В., Косилко С.А., Дубровина В.И., Корзун В.М., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Рождественский Е.Н.,

Бугоркова С.А., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Топорков В.П., Слудский А.А., Раздорский А.С., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Лопатин А.А., Щербакова С.А. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 4:5–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-5-10.

6. Попов Н.В., Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Федоров Ю.М., Попов В.П., Корзун В.М., Вержужский Д.Б., Чипанин Е.В., Косилко С.А., Малецкая О.В., Григорьев М.П., Дубянский В.М., Шкарлет Г.П., Топорков В.П., Лопатин А.А., Зенкевич Е.С., Безсмертный В.Е., Балахонов С.В., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; 1:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-5-12.
7. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ полногеномной последовательности штаммов *Yersinia pestis* на основе ступенчатого 680-SNP алгоритма. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; 3:49–54. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-3-49-54.
8. Бывалов А.А., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011; 2:97–104.
9. Quenee L., Hermanas T., Ciletti N., Louvel H., Miller N., Elli D., Blaylock B, Mitchell A, Schroeder J, Krausz T, Kanabrocki J, Schneewind O. Hereditary hemochromatosis restores the virulence of plague vaccine strains. *J. Infect. Dis.* 2012; 206(7):1050–8. DOI: 10.1093/infdis/jis433.
10. Cornelius C., Quenee L., Overheim K., Koster F., Brasel T., Elli D., Ciletti N., Schneewind O. Immunization with recombinant V10 protects cynomolgus macaques from lethal pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2008; 76(12):5588–97. DOI: 10.1128/IAI.00699-08.
11. Williamson E., Packer P., Waters E., Simpson A., Dyer D., Hartings J., Twenhafel N., Pitt M. Recombinant (F1+V) vaccine protects cynomolgus macaques against pneumonic plague. *Vaccine.* 2011; 29(29–30):4771–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.084.
12. Fellows P., Price J., Martin S., Metcalfe K., Krile R., Barnewall R., Hart M., Lockman H. Characterization of a Cynomolgus Macaque Model of Pneumonic Plague for Evaluation of Vaccine Efficacy. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 22(9):1070–8. DOI: 10.1128/CI.00290-15.
13. Chichester J., Musiychuk K., Farrance C., Mett V., Lyons J., Mett V., Yusibov V. A single component two-valent LcrV-F1 vaccine protects non-human primates against pneumonic plague. *Vaccine.* 2009; 27(25–26):3471–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.050.
14. Mizel S., Graff A., Sriranganathan N., Ervin S., Lees C., Lively M., Hantgan R., Thomas M., Wood J., Bell B. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16(1):21–8. DOI: 10.1128/CI.00333-08.
15. Verma S., Tuteja U. Plague Vaccine Development: Current Research and Future Trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.
16. Williamson E., Flick-Smith H., LeButt C., Rowland C., Jones S., Waters E., Gwyther R., Miller J., Packer P., Irving M. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and rV antigens. *Infect. Immun.* 2005; 73(6):3598–608. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3598-3608.2005.
17. Chu K., Hu J., Meng F., Li J., Luo L., Xu J., Yuan Z., Li Z., Chen W., Jiao L., Chang Y., Wang B., Hu Y. Immunogenicity and safety of subunit plague vaccine: A randomized phase 2a clinical trial. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(9):2334–40. DOI: 10.1080/21645515.2016.1175261.
18. Frey S., Lottenbach K., Graham I., Anderson E., Bajwa K., May R., Mizel S., Graff A., Belshe R. A phase I safety and immunogenicity dose escalation trial of plague vaccine, Flagellin/F1/V, in healthy adult volunteers (DMID 08-0066). *Vaccine.* 2017; 35(48 Pt B):6759–65. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.070.
19. FDA Grants Orphan Drug Designation for Plague Vaccine. [Электронный ресурс]. URL: <https://globalbiodefence.com/2017/03/10/fda-grants-orphan-drug-designation-plague-vaccine/>. (дата обращения 13.09.2018 г.).
20. Price J.L., Manetz T.S., Shearer J.D., House R.V. Preclinical safety assessment of a recombinant plague vaccine (rF1V). *Int. J. Toxicol.* 2013; 32(5):327–5. DOI: 10.1177/1091581813497405.
21. Копылов П.Х., Бахтеева И.В., Анисимов А.П., Дентовская С.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Левчук В.П., Панферев Е.А., Платонов М.Е., Светог Т.Э., Титарева Г.М. Нуклеотидная последовательность, кодирующая иммуногенный полипептид LcrV (G113), вызывающий защитный иммунный ответ против *Yersinia pestis*, рекомбинантная плазмидная ДНК pETV-I-3455, кодирующая иммуногенный полипептид LcrV(G113); рекомбинантный штамм *Escherichia coli* BL21/DE3 pETV-I-3455 – продуцент иммуногенного полипептида LcrV(G113); полипептид LcrV(G113) и способ его получения. Патент РФ № 2439155, опубл. 10.01.2012 г. Бюл. № 1.
22. Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная

- ная (ВЧММ). *Бактериология*. 2018; 3(1):74–5.
23. Hill J., Leary S., Smither S., Best A., Pettersson J., Forsberg A., Lingard B., Lipka A., Brown K., Williamson E., Titball R. N255 is a key residue for recognition by a monoclonal antibody which protects against *Yersinia pestis* infection. *Vaccine*. 2009; 27(50):7073–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.061.
24. Liu L., Wei D., Qu Z., Sun L., Miao Y., Yang Y., Lu J., Du W., Wang B., Li B. A safety and immunogenicity study of a novel subunit plague vaccine in cynomolgus macaques. *J. Appl. Toxicol.* 2018; 38(3):408–17. DOI: 10.1002/jat.3550.
25. Musson J.A., Ingram R., Durand G., Ascough S., Waters E.L., Hartley M.G., Robson T., Maillere B., Williamson E.D., Sriskandan S., Altmann D., Robinson J.H. Repertoire of HLA-DR1-restricted CD4 T-cell responses to capsular CafI antigen of *Yersinia pestis* in human leukocyte antigen transgenic mice. *Infect Immun.* 2010; 78(10):4356–62. DOI: 10.1128/IAI.00195-10.
26. Zvi A., Rotem S., Zauberman A., Elia U., Aftalion M., Bar-Haim E., Mamroud E., Cohen O. Novel CTL epitopes identified through a *Y. pestis* proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague. *Vaccine*. 2017; 35(44):5995–6006. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.092.
27. Li B., Zhou L., Guo J., Wang X., Ni B., Ke Y., Yang R. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 2009; 77(10):4356–61. DOI: 10.1128/IAI.00242-09.
28. Matson J.S., Durick K.A., Bradley D.S., Nilles M.L. Immunization of mice with YscF provides protection from *Yersinia pestis* infections. *BMC Microbiol.* 2005; 24(5):38. DOI: 10.1186/1471-2180-5-38.
29. Erova T., Rosenzweig J., Sha J., Suarez G., Sierra J., Kirtley M., van Lier C., Telepnev M., Motin V., Chopra A. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2):227–38. DOI: 10.1128/CVI.00597-12.
30. Andrews G.P., Strachan S.T., Benner G.E., Sample A.K., Anderson G.W.Jr, Adamovicz J.J., Welkos S.L., Pullen J.K., Friedlander A.M. Protective efficacy of recombinant *Yersinia* outer proteins against bubonic plague caused by encapsulated and non-encapsulated *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1999; 67(3):1533–7. PMID: PMC96493. PMID: 10024607.
31. Tao P., Mahalingam M., Zhu J., Moayeri M., Kirtley M.L., Fitts E.C., Andersson J.A., Lawrence W.S., Leppla S.H., Chopra A.K., Rao V.B. A Bivalent Anthrax-Plague Vaccine That Can Protect against Two Tier-1 Bioterror Pathogens, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. *Front. Immunol.* 2017; 8:687. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00687.
32. Verma S., Batra L., Tuteja U. A Recombinant Trivalent Fusion Protein F1-LcrV-HSP70(II) Augments Humoral and Cellular Immune Responses and Imparts Full Protection against *Yersinia pestis*. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1053. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01053.
33. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015; 77(1):14.12.1–14.12.10. DOI: 10.1002/0471142735.im1412s77.
34. Amemiya K., Meyers J.L., Rogers T.E., Fast R.L., Bassett A.D., Worsham P.L., Powell B.S., Norris S.L., Krieg A.M., Adamovicz J.J. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague. *Vaccine*. 2009; 27(16):2220–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.016.
35. Hickey A.J., Lin J.S., Kummer L.W., Szaba F.M., Duso D.K., Tighe M., Parent M.A., Smiley S.T. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2013; 81(6):2123–32. DOI: 10.1128/IAI.00316-13.
36. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J., Mizel S.B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2006; 74(2):1113–20. DOI: 10.1128/IAI.74.2.1113-1120.2006.
37. Uppada J.B., Khan A.A., Bhat A.A., Deshmukh R., Rao D.N. Humoral immune responses and protective efficacy of sequential B- and T-cell epitopes of V antigen of *Yersinia pestis* by intranasal immunization in microparticles. *Med. Microbiol. Immunol.* 2009; 198(4):247–56. DOI: 10.1007/s00430-009-0124-7.
38. Do Y., Koh H., Park C.G., Dudziak D., Seo P., Mehndru S., Choi J.H., Cheong C., Park S., Perlin D.S., Powell B.S., Steinma R.M. Targeting of LcrV virulence protein from *Yersinia pestis* to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. *Eur. J. Immunol.* 2010. 40(10):2791–6. DOI: 10.1002/eji.201040511.
39. Jones A., Bosio C., Duffya A., Goodyear A., Schriever M., Dow S. Protection against pneumonic plague following oral immunization with a non-replicating vaccine. *Vaccine*. 2010; 28(36):5924–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.020.
40. Dinc G., Pennington J.M., Yolcu E.S., Lawrenz M.B., Shirwan H. Improving the Th1 cellular efficacy of the lead *Yersinia pestis* rF1-V subunit vaccine using SA-4-IBBL as a novel adjuvant. *Vaccine*. 2014; 32(39):5035–40. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.07.015.
41. Derbise A., Hanada Y., Khalife M., Carniel E., Demeure C.E. Complete Protection against Pneumonic and Bubonic Plague after a Single Oral Vaccination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(10):e0004162. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004162.
42. Demeure C.E., Derbise A., Carniel E. Oral vaccination against plague using *Yersinia pseudotuberculosis*. *Chem. Biol. Interact.* 2017; 267:89–95. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.03.030.
43. Demeure C.E., Derbise A., Guillas C., Gerke C., Cauchemez S., Carniel E., Pizarro-Cerdá J. Humoral and cellular immune correlates of protection against bubonic plague by a live *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine. *Vaccine*. 2019; 37(1):123–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.11.022.
44. Yang X., Hinnebusch B.J., Trunkle T., Bosio C.M., Suo Z., Tighe M., Harmsen A., Becker T., Crist K., Walters N., Avci R., Pascual D.W. Oral vaccination with *Salmonella* simultaneously expressing *Yersinia pestis* F1 and V antigens protects against bubonic and pneumonic plague. *J. Immunol.* 2007; 178(20):1059–67. PMID: 17202369.
45. Sun W., Roland K., Curtiss R. Developing live vaccines against plague. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5:614–27. DOI: 10.3855/jidc.2030.
46. Branger C.G., Sun W., Torres-Escobar A., Perry R., Roland K.L., Fetherston J., Curtiss R. 3<sup>rd</sup>. Evaluation of Psn HmuR and a modified LcrV protein delivered to mice by live attenuated *Salmonella* as a vaccine against bubonic and pneumonic *Yersinia pestis* challenge. *Vaccine*. 2010; 29(2):274–82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.10.033.
47. Sanapala S., Rahav H., Patel H., Sun W., Curtiss R. Multiple antigens of *Yersinia pestis* delivered by live recombinant attenuated *Salmonella* vaccine strains elicit protective immunity against plague. *Vaccine*. 2016; 34(21):2410–16. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.03.094.
48. Jia Q., Bowen R., Dillon B.J., Masleša-Galić S., Chang B.T., Kaidi A.C., Horwitz M.A. Single vector platform vaccine protects against lethal respiratory challenge with Tier 1 select agents of anthrax, plague, and tularemia. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):7009. DOI: 10.1038/s41598-018-24581-y.
49. Chattopadhyaya A., Park S., Delmas G., Suresh R., Senina S., Perlin D.S., Rose J.K. Single-dose, virus-vectored vaccine protection against *Yersinia pestis* challenge: CD4+ cells are required at the time of challenge for optimal protection. *Vaccine*. 2008; 26(50):6329–37. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.09.031.
50. Arnaboldi P.M., Sambir M., D'Arco C., Peters L.A., Seegers J.F., Mayer L., McCormick A.A., Dattwyler R.J. Intranasal delivery of a protein subunit vaccine using a *Tobacco Mosaic Virus* platform protects against pneumonic plague. *Vaccine*. 2016; 34(47):5768–76. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.09.063.
51. Brewoo J.N., Powell T.D., Stinchcomb D.T., Osorio J.E. Efficacy and safety of a modified vaccinia Ankara (MVA) vectored plague vaccine in mice. *Vaccine*. 2010; 28(36):5891–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.054.
52. Boyer J.L., Sofer-Podesta C., Ang J., Hackett N.R., Chiuchiolo M.J., Senina S., Perlin D., Crystal R.G. Protective immunity against a lethal respiratory *Yersinia pestis* challenge induced by V antigen or the F1 capsular antigen incorporated into adenovirus capsid. *Hum. Gene Ther.* 2010; 21(7):891–901. DOI: 10.1089/hum.2009.148.
53. Chiuchiolo M.J., Boyer J.L., Krause A., Senina S., Hackett N.R., Crystal R.G. Protective immunity against respiratory tract challenge with *Yersinia pestis* in mice immunized with an adenovirus-based vaccine vector expressing V antigen. *J. Infect. Dis.* 2006; 194:1249–57. DOI: 10.1086/507644.
54. Sha J., Kirtley M.L., Klages C., Erova T.E., Telepnev M., Ponnusamy D., Fitts E.C., Baze W.B., Sivasubramani S.K., Lawrence W.S., Patrikeev I., Peel J.E., Andersson J.A., Kozlova E.V., Tiner B.L., Peterson J.W., McWilliams D., Patel S., Rothe E., Motin V.L., Chopra A.K. A Replication-Defective Human Type 5 Adenovirus-Based Trivalent Vaccine Confers Complete Protection against Plague in Mice and Nonhuman Primates. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(7):586–600. DOI: 10.1128/CVI.00150-16.
55. Tao P., Mahalingam M., Kirtley M.L., van Lier C.J., Sha J., Yeager L.A., Chopra A.K., Rao V.B. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines. *PLOS Pathogens*. 2013; 9(7):e1003495. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003495.
56. Tao P., Mahalingam M., Zhu J., Moayeri M., Sha J., Lawrence W.S., Leppla S.H., Chopra A.K., Rao V.B. A Bacteriophage T4 Nanoparticle-Based Dual Vaccine against Anthrax and Plague. *MBio*. 2018; 9(5):e01926-18. DOI: 10.1128/mBio.01926-18.
57. Агеев С.А., Шайхутдинова П.З., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Конструирование кандидата в вакцинные штаммы *Yersinia pestis* с пониженной реактогенностью. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011; 1:70–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-70-73.
58. Rebeil R., Ernst R.K., Jarrett C.O., Adams K.N., Miller S.I., Hinnebusch B.J. Characterization of late acyltransferase genes of

*Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. *J. Bacteriol.* 2006; 188:1381–8. DOI: 10.1128/JB.188.4.1381-1388.2006.

59. Szaba F.M., Kummer L.W., Wilhelm L.B., Lin J.S., Parent M.A., Montminy-Paquette S.W., Lien E., Johnson L.L., Smiley S.T. D27-pLpxL, an avirulent strain of *Yersinia pestis*, primes T cells that protect against pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2008; 77:4295–304. DOI: 10.1128/IAI.00273-09.

60. Sun W., Six D., Kuang X., Roland K.L., Raetz C.R., Curtiss R. 3rd. A live attenuated strain of *Yersinia pestis* KIM as a vaccine against plague. *Vaccine.* 2011; 29(16):2986–98. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.099.

61. Tiner B.L., Sha J., Cong Y., Kirtley M.L., Andersson J.A., Chopra A.K. Immunisation of two rodent species with new live-attenuated mutants of *Yersinia pestis* CO92 induces protective long-term humoral- and cell-mediated immunity against pneumonic plague. *NPJ Vaccines.* 2016; 1:16020. DOI: 10.1038/npjvaccines.2016.20.

62. Sha J., Kirtley M.L., van Lier C.J., Wang S., Erova T.E., Kozlova E.V., Cao A., Cong Y., Fitts E.C., Rosenzweig J.A., Chopra A.K. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. *Infect. Immun.* 2013; 81(3):815–28. DOI: 10.1128/IAI.01067-12.

63. van Lier C.J., Sha J., Kirtley M.L., Cao A., Tiner B.L., Erova T.E., Cong Y., Kozlova E.V., Popov V.L., Baze W.B., Chopra A.K. Deletion of Braun lipoprotein and plasminogen-activating protease-encoding genes attenuates *Yersinia pestis* in mouse models of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2014; 82(6):2485–503. DOI: 10.1128/IAI.01595-13.

64. Tiner B.L., Sha J., Kirtley M.L., Erova T.E., Popov V.L., Baze W.B., van Lier C.J., Ponnusamy D., Andersson J.A., Motin V.L., Chauhan S., Chopra A.K. Combinational deletion of three membrane protein-encoding genes highly attenuates *Yersinia pestis* while retaining immunogenicity in a mouse model of pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2015; 83(4):1318–38. DOI: 10.1128/IAI.02778-14.

65. Andersson J.A., Sha J., Erova T.E., Fitts E.C., Ponnusamy D., Kozlova E.V., Kirtley M.L., Chopra A.K. Identification of New Virulence Factors and Vaccine Candidates for *Yersinia pestis*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017; 7:448. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00448.

66. Bubeck S.S., Dube P.H. *Yersinia pestis* CO92 delta yopH is a potent live, attenuated plague vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(9):1235–8. DOI: 10.1128/CVI.00137-07.

67. Tidhar A., Flashner Y., Cohen S., Levi Y., Zauberman A., Gur D., Gur D., Aftalion M., Elhanany E., Zvi A., Shafferman A., Mamroud E. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plague. *PLoS One.* 2009; 4(9):e7023. DOI: 10.1371/journal.pone.0007023.

68. Flashner Y., Mamroud E., Tidhar A., Ber R., Aftalion M., Gur D., Lazar S., Zvi A., Bino T., Ariel N., Velan B., Shafferman A., Cohen S. Generation of *Yersinia pestis* attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. *Infect. Immun.* 2004; 72(2):908–15. PMID: 14742535. PMCID: PMC321629.

69. Robinson V.L., Oyston P.C., Titball R.W. A dam mutant of *Yersinia pestis* is attenuated and induces protection against plague. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 252(2):251–6. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.09.001.

70. Oyston P.C., Mellado-Sanchez G., Pasetti M.F., Nataro J.P., Titball R.W., Atkins H.S. A *Yersinia pestis* guaBA mutant is attenuated in virulence and provides protection against plague in a mouse model of infection. *Microb. Pathog.* 2010; 48(5):191–5. DOI: 10.1016/j.micpath.2010.01.005.

References

1. Abramov V., Kosarev I., Motin V., Khlebnikov V., Vasilenko R., Sakulin V., Machulin A., Uversky V., Karlyshev A. Binding of LcrV protein from *Yersinia pestis* to human T-cells induces apoptosis, which is completely blocked by specific antibodies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019; 122:1062–70. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.054.

2. WHO Target Product Profile for Plague Vaccines. [Internet]. (Cited 07 Aug 2018). Available from: [http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague\\_vaccines\\_workshop-23-april-2018/en/](http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague_vaccines_workshop-23-april-2018/en/).

3. Mead P. Plague in Madagascar. A Tragic Opportunity for Improving Public Health. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(2):106–8. DOI: 10.1056/NEJMp1713881.

4. Plague. [Internet]. (Cited 12 Aug 2018). Available from: <http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/plague>.

5. Popova A.Y., Kuttyrev V.V., Balakhonov S.V., Ezhlova E.B., Demina Y.V., Paskina N.D., Shchuchinov L.V., Popov N.V., Kosilko S.A., Dubrovina V.I., Korzun V.M., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Rozhdzhevskiy E.N., Bugorkova S.A., Eroshenko G.A., Krasnov Y.M., Toporkov V.P., Sludsky A.A., Razdorsky A.S., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A. [Coordination of measures of Plague Control Institutions, aimed at

rehabilitation and sanitation of Gorno-Altai high-mountain natural plague focus in 2016. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):5–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-5-10.

6. Popov N.V., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Kuznetsov A.A., Fedorov Yu.M., Popov V.P., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Maletskaya O.V., Grigor'ev M.P., Dubyansky V.M., Shkarlet G.P., Toporkov V.P., Lopatin A.A., Zenkevich E.S., Bezsmertny V.E., Balakhonov S.V., Kuttyrev V.V. [Epidemiology of Natural Plague Foci in the Russian Federation in 2016, and Prognosis for 2017]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (1):5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-5-12.

7. Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Shavina N.Y., Kuttyrev V.V. [Analysis of the genome wide sequence of *Yersinia pestis* strains based on the consecutive 680-SNP algorithm]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (3):49–54. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-3-49-54.

8. Byvalov A.A., Kuttyrev V.V. [Current state of the problem of improving the tools for plague vaccine prophylaxis]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii.* 2011; 2:97–104.

9. Quenee L., Hermanas T., Ciletti N., Louvel H., Miller N., Elli D., Blaylock B., Mitchell A., Schroeder J., Krausz T., Kanabrocki J., Schneewind O. Hereditary hemochromatosis restores the virulence of plague vaccine strains. *J. Infect. Dis.* 2012; 206(7):1050–8. DOI: 10.1093/infdis/jis433.

10. Cornelius C., Quenee L., Overheim K., Koster F., Brasel T., Elli D., Ciletti N., Schneewind O. Immunization with recombinant V10 protects cynomolgus macaques from lethal pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2008; 76(12):5588–97. DOI: 10.1128/IAI.00699-08.

11. Williamson E., Packer P., Waters E., Simpson A., Dyer D., Hartings J., Twenhafel N., Pitt M. Recombinant (F1+V) vaccine protects cynomolgus macaques against pneumonic plague. *Vaccine.* 2011; 29(29–30):4771–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.084.

12. Fellows P., Price J., Martin S., Metcalfe K., Krile R., Barnewall R., Hart M., Lockman H. Characterization of a *Cynomolgus* Macaque Model of Pneumonic Plague for Evaluation of Vaccine Efficacy. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 22(9):1070–8. DOI: 10.1128/CVI.00290-15.

13. Chichester J., Musiychuk K., Farrance C., Mett V., Lyons J., Mett V., Yusibov V. A single component two-valent LcrV-F1 vaccine protects non-human primates against pneumonic plague. *Vaccine.* 2009; 27(25–26):3471–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.050.

14. Mizel S., Graff A., Sriranganathan N., Ervin S., Lees C., Lively M., Hantgan R., Thomas M., Wood J., Bell B. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16(1):21–8. DOI: 10.1128/CVI.00333-08.

15. Verma S., Tuteja U. Plague Vaccine Development: Current Research and Future Trends. *Front. Immunol.* 2016; 7:602. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.

16. Williamson E., Flick-Smith H., LeButt C., Rowland C., Jones S., Waters E., Gwyther R., Miller J., Packer P., Irving M. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and rV antigens. *Infect. Immun.* 2005; 73(6):3598–608. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3598-3608.2005.

17. Chu K., Hu J., Meng F., Li J., Luo L., Xu J., Yuan Z., Li Z., Chen W., Jiao L., Chang Y., Wang B., Hu Y. Immunogenicity and safety of subunit plague vaccine: A randomized phase 2a clinical trial. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(9):2334–40. DOI: 10.1080/21645515.2016.1175261.

18. Frey S., Lottenbach K., Graham I., Anderson E., Bajwa K., May R., Mizel S., Graff A., Belshe R. A phase I safety and immunogenicity dose escalation trial of plague vaccine, Flagellin/F1/V, in healthy adult volunteers (DMID 08-0066). *Vaccine.* 2017; 35(48 Pt B):6759–65. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.070.

19. FDA Grants Orphan Drug Designation for Plague Vaccine. [Internet]. (Cited 13 Sep 2018). Available from: <https://globalbiodefense.com/2017/03/10/fda-grants-orphan-drug-designation-plague-vaccine/>.

20. Price J.L., Manetz T.S., Shearer J.D., House R.V. Preclinical safety assessment of a recombinant plague vaccine (rF1V). *Int. J. Toxicol.* 2013; 32(5):327–5. DOI: 10.1177/1091581813497405.

21. Kopylov P.Kh., Bakhteeva I.V., Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Ivanov S.A., Kiseleva N.V., Levchuk V.P., Panfirtsev E.A., Platonov M.E., Svetoeh T.E., Titareva G.M. [Nucleotide sequence encoding immunogenic polypeptide LcrV (G113), inducing protective immune response to *Yersinia pestis*, recombinant plasmid DNA pETV-I-3455 encoding L immunogenic polypeptide crV (G113); recombinant strain *Escherichia coli* BL21/ DE3 pETV-I-3455 – producer of immunogenic polypeptide LcrV (G113); polypeptide LcrV (G113) and method for its production]. RF Patent No 2439155, publ. January 10, 2012. Bulletin No 1.

22. [Molecular micro-encapsulated plague vaccine (MMPV)]. *Bakteriologiya.* 2018; 3(1):74–5.

23. Hill J., Leary S., Smither S., Best A., Pettersson J., Forsberg A., Lingard B., Lipka A., Brown K., Williamson E., Titball R. N255

- is a key residue for recognition by a monoclonal antibody which protects against *Yersinia pestis* infection. *Vaccine*. 2009; 27(50):7073–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.061.
24. Liu L., Wei D., Qu Z., Sun L., Miao Y., Yang Y., Lu J., Du W., Wang B., Li B. A safety and immunogenicity study of a novel subunit plague vaccine in cynomolgus macaques. *J. Appl. Toxicol.* 2018; 38(3):408–17. DOI: 10.1002/jat.3550.
25. Musson J.A., Ingram R., Durand G., Ascough S., Waters E.L., Hartley M.G., Robson T., Maillere B., Williamson E.D., Sriskandan S., Altmann D., Robinson J.H.. Repertoire of HLA-DR1-restricted CD4 T-cell responses to capsular CafI antigen of *Yersinia pestis* in human leukocyte antigen transgenic mice. *Infect Immun.* 2010; 78(10):4356–62. DOI: 10.1128/IAI.00195-10.
26. Zvi A., Rotem S., Zauberman A., Elia U., Aftalion M., Bar-Haim E., Mamroud E., Cohen O. Novel CTL epitopes identified through a *Y. pestis* proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague. *Vaccine*. 2017; 35(44):5995–6006. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.092.
27. Li B., Zhou L., Guo J., Wang X., Ni B., Ke Y., Yang R. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunospot assay. *Infect. Immun.* 2009; 77(10):4356–61. DOI: 10.1128/IAI.00242-09.
28. Matson J.S., Durick K.A., Bradley D.S., Nilles M.L. Immunization of mice with YscF provides protection from *Yersinia pestis* infections. *BMC Microbiol.* 2005; 24(5):38. DOI: 10.1186/1471-2180-5-38.
29. Erova T., Rosenzweig J., Sha J., Suarez G., Sierra J., Kirtley M., van Lier C., Telepnev M., Motin V., Chopra A. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2):227–38. DOI: 10.1128/CVI.00597-12.
30. Andrews G.P., Strachan S.T., Benner G.E., Sample A.K., Anderson G.W.Jr, Adamovitz J.J., Welkos S.L., Pullen J.K., Friedlander A.M. Protective efficacy of recombinant *Yersinia* outer proteins against bubonic plague caused by encapsulated and non-encapsulated *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1999; 67(3):1533–7. PMID: PMC96493. PMID: 10024607.
31. Tao P., Mahalingam M., Zhu J., Moayeri M., Kirtley M.L., Fitts E.C., Andersson J.A., Lawrence W.S., Leppla S.H., Chopra A.K., Rao V.B. A Bivalent Anthrax-Plague Vaccine That Can Protect against Two Tier-1 Bioterror Pathogens, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. *Front. Immunol.* 2017; 8:687. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00687.
32. Verma S., Batra L., Tuteja U. A Recombinant Trivalent Fusion Protein F1-LcrV-HSP70(II) Augments Humoral and Cellular Immune Responses and Imparts Full Protection against *Yersinia pestis*. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1053. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01053.
33. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015; 77(1):14.12.1–14.12.10. DOI: 10.1002/0471142735.im1412s77.
34. Amemiya K., Meyers J.L., Rogers T.E., Fast R.L., Bassett A.D., Worsham P.L., Powell B.S., Norris S.L., Krieg A.M., Adamovitz J.J. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague. *Vaccine*. 2009; 27(16):2220–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.016.
35. Hickey A.J., Lin J.S., Kummer L.W., Szaba F.M., Duso D.K., Tighe M., Parent M.A., Smiley S.T. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2013; 81(6):2123–32. DOI: 10.1128/IAI.00316-13.
36. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J., Mizel S.B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2006; 74(2):1113–20. DOI: 10.1128/IAI.74.2.1113-1120.2006.
37. Uppada J.B., Khan A.A., Bhat A.A., Deshmukh R., Rao D.N. Humoral immune responses and protective efficacy of sequential B- and T-cell epitopes of V antigen of *Yersinia pestis* by intranasal immunization in microparticles. *Med. Microbiol. Immunol.* 2009; 198(4):247–56. DOI: 10.1007/s00430-009-0124-7.
38. Do Y., Koh H., Park C.G., Dudziak D., Seo P., Mehndru S., Choi J.H., Cheong C., Park S., Perlin D.S., Powell B.S., Steinma R.M. Targeting of LcrV virulence protein from *Yersinia pestis* to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. *Eur. J. Immunol.* 2010. 40(10):2791–6. DOI: 10.1002/eji.201040511.
39. Jones A., Bosio C., Duffya A., Goodyear A., Schriever M., Dow S. Protection against pneumonic plague following oral immunization with a non-replicating vaccine. *Vaccine*. 2010; 28(36):5924–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.020.
40. Dinc G., Pennington J.M., Yolcu E.S., Lawrenz M.B., Shirwan H. Improving the Th1 cellular efficacy of the lead *Yersinia pestis* rF1-V subunit vaccine using SA-4-1BBL as a novel adjuvant. *Vaccine*. 2014; 32(39):5035–40. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.07.015.
41. Derbise A., Hanada Y., Khalifé M., Carniel E., Demeure C.E. Complete Protection against Pneumonic and Bubonic Plague after a Single Oral Vaccination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(10):e0004162. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004162.
42. Demeure C.E., Derbise A., Carniel E. Oral vaccination against plague using *Yersinia pseudotuberculosis*. *Chem. Biol. Interact.* 2017; 267:89–95. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.03.030.
43. Demeure C.E., Derbise A., Guillas C., Gerke C., Cauchemez S., Carniel E., Pizarro-Cerdá J. Humoral and cellular immune correlates of protection against bubonic plague by a live *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine. *Vaccine*. 2019; 37(1):123–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.11.022.
44. Yang X., Hinnebusch B.J., Trunkle T., Bosio C.M., Suo Z., Tighe M., Harmsen A., Becker T., Crist K., Walters N., Avci R., Pascual D.W. Oral vaccination with *Salmonella* simultaneously expressing *Yersinia pestis* F1 and V antigens protects against bubonic and pneumonic plague. *J. Immunol.* 2007; 178(20):1059–67. PMID: 17202369.
45. Sun W., Roland K., Curtiss R. Developing live vaccines against plague. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5:614–27. DOI: 10.3855/jidc.2030.
46. Branger C.G., Sun W., Torres-Escobar A., Perry R., Roland K.L., Fetherston J., Curtiss R. 3<sup>rd</sup>. Evaluation of Psn HmuR and a modified LcrV protein delivered to mice by live attenuated *Salmonella* as a vaccine against bubonic and pneumonic *Yersinia pestis* challenge. *Vaccine*. 2010; 29(2):274–82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.10.033.
47. Sanapala S., Rahav H., Patel H., Sun W., Curtiss R. Multiple antigens of *Yersinia pestis* delivered by live recombinant attenuated *Salmonella* vaccine strains elicit protective immunity against plague. *Vaccine*. 2016; 34(21):2410–16. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.03.094.
48. Jia Q., Bowen R., Dillon B.J., Masleša-Galić S., Chang B.T., Kaidi A.C., Horwitz M.A. Single vector platform vaccine protects against lethal respiratory challenge with Tier 1 select agents of anthrax, plague, and tularemia. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):7009. DOI: 10.1038/s41598-018-24581-y.
49. Chattopadhyaya A., Park S., Delmas G., Suresh R., Senina S., Perlin D.S., Rose J.K. Single-dose, virus-vectored vaccine protection against *Yersinia pestis* challenge: CD4+ cells are required at the time of challenge for optimal protection. *Vaccine*. 2008; 26(50):6329–37. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.09.031.
50. Arnaboldi P.M., Sambir M., D'Arco C., Peters L.A., Seegers J.F., Mayer L., McCormick A.A., Dattwyler R.J. Intranasal delivery of a protein subunit vaccine using a *Tobacco Mosaic Virus* platform protects against pneumonic plague. *Vaccine*. 2016; 34(47):5768–76. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.09.063.
51. Brewoo J.N., Powell T.D., Stinchcomb D.T., Osorio J.E. Efficacy and safety of a modified vaccinia Ankara (MVA) vectored plague vaccine in mice. *Vaccine*. 2010; 28(36):5891–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.054.
52. Boyer J.L., Sofer-Podesta C., Ang J., Hackett N.R., Chiuchiolo M.J., Senina S., Perlin D., Crystal R.G. Protective immunity against a lethal respiratory *Yersinia pestis* challenge induced by V antigen or the F1 capsular antigen incorporated into adenovirus capsid. *Hum. Gene Ther.* 2010; 21(7):891–901. DOI: 10.1089/hum.2009.148.
53. Chiuchiolo M.J., Boyer J.L., Krause A., Senina S., Hackett N.R., Crystal R.G. Protective immunity against respiratory tract challenge with *Yersinia pestis* in mice immunized with an adenovirus-based vaccine vector expressing V antigen. *J. Infect. Dis.* 2006; 194:1249–57. DOI: 10.1086/507644.
54. Sha J., Kirtley M.L., Klages C., Erova T.E., Telepnev M., Ponnusamy D., Fitts E.C., Baze W.B., Sivasubramani S.K., Lawrence W.S., Patrikeev I., Peel J.E., Andersson J.A., Kozlova E.V., Tiner B.L., Peterson J.W., McWilliams D., Patel S., Rothe E., Motin V.L., Chopra A.K. A Replication-Defective Human Type 5 Adenovirus-Based Trivalent Vaccine Confers Complete Protection against Plague in Mice and Nonhuman Primates. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(7):586–600. DOI: 10.1128/CVI.00150-16.
55. Tao P., Mahalingam M., Kirtley M.L., van Lier C.J., Sha J., Yeager L.A., Chopra A.K., Rao V.B. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines. *PLoS Pathogens*. 2013; 9(7):e1003495. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003495.
56. Tao P., Mahalingam M., Zhu J., Moayeri M., Sha J., Lawrence W.S., Leppla S.H., Chopra A.K., Rao V.B. A Bacteriophage T4 Nanoparticle-Based Dual Vaccine against Anthrax and Plague. *MBio*. 2018; 9(5):e01926-18. DOI: 10.1128/mBio.01926-18.
57. Ageev S.A., Shaikhutdinova R.Z., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kombarova T.I., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Construction of candidate *Yersinia pestis* vaccine strains with reduced reactogenicity]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; (1):70–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-70-73.
58. Rebeil R., Ernst R.K., Jarrett C.O., Adams K.N., Miller S.I., Hinnebusch B.J. Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. *J. Bacteriol.* 2006; 188:1381–8. DOI: 10.1128/JB.188.4.1381-1388.2006.

59. Szaba F.M., Kummer L.W., Wilhelm L.B., Lin J.S., Parent M.A., Montminy-Paquette S.W., Lien E., Johnson L.L., Smiley S.T. D27-pLpxL, an avirulent strain of *Yersinia pestis*, primes T cells that protect against pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2008; 77:4295–304. DOI: 10.1128/IAI.00273-09.
60. Sun W., Six D., Kuang X., Roland K.L., Raetz C.R., Curtiss R. 3rd. A live attenuated strain of *Yersinia pestis* KIM as a vaccine against plague. *Vaccine.* 2011; 29(16):2986–98. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.099.
61. Tiner B.L., Sha J., Cong Y., Kirtley M.L., Andersson J.A., Chopra A.K. Immunisation of two rodent species with new live-attenuated mutants of *Yersinia pestis* CO92 induces protective long-term humoral- and cell-mediated immunity against pneumonic plague. *NPJ Vaccines.* 2016; 1:16020. DOI: 10.1038/npjvaccines.2016.20.
62. Sha J., Kirtley M.L., van Lier C.J., Wang S., Erova T.E., Kozlova E.V., Cao A., Cong Y., Fitts E.C., Rosenzweig J.A., Chopra A.K. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. *Infect. Immun.* 2013; 81(3):815–28. DOI: 10.1128/IAI.01067-12.
63. van Lier C.J., Sha J., Kirtley M.L., Cao A., Tiner B.L., Erova T.E., Cong Y., Kozlova E.V., Popov V.L., Baze W.B., Chopra A.K. Deletion of Braun lipoprotein and plasminogen-activating protease-encoding genes attenuates *Yersinia pestis* in mouse models of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2014; 82(6):2485–503. DOI: 10.1128/IAI.01595-13.
64. Tiner B.L., Sha J., Kirtley M.L., Erova T.E., Popov V.L., Baze W.B., van Lier C.J., Ponnusamy D., Andersson J.A., Motin V.L., Chauhan S., Chopra A.K. Combinational deletion of three membrane protein-encoding genes highly attenuates *Yersinia pestis* while retaining immunogenicity in a mouse model of pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2015; 83(4):1318–38. DOI: 10.1128/IAI.02778-14.
65. Andersson J.A., Sha J., Erova T.E., Fitts E.C., Ponnusamy D., Kozlova E.V., Kirtley M.L., Chopra A.K. Identification of New Virulence Factors and Vaccine Candidates for *Yersinia pestis*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017; 7:448. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00448.
66. Bubeck S.S., Dube P.H. *Yersinia pestis* CO92 delta yopH is a potent live, attenuated plague vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(9):1235–8. DOI: 10.1128/VI.00137-07.
67. Tidhar A., Flashner Y., Cohen S., Levi Y., Zauberan A., Gur D., Gur D., Aftalion M., Elhanany E., Zvi A., Shafferman A., Mamroud E. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plague. *PLoS One.* 2009; 4(9):e7023. DOI: 10.1371/journal.pone.0007023.
68. Flashner Y., Mamroud E., Tidhar A., Ber R., Aftalion M., Gur D., Lazar S., Zvi A., Bino T., Ariel N., Velan B., Shafferman A., Cohen S. Generation of *Yersinia pestis* attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. *Infect. Immun.* 2004; 72(2):908–15. PMID: 14742535. PMCID: PMC321629.
69. Robinson V.L., Oyston P.C., Titball R.W. A dam mutant of *Yersinia pestis* is attenuated and induces protection against plague. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 252(2):251–6. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.09.001.
70. Oyston P.C., Mellado-Sanchez G., Pasetti M.F., Nataro J.P., Titball R.W., Atkins H.S. A *Yersinia pestis* guaBA mutant is attenuated in virulence and provides protection against plague in a mouse model of infection. *Microb. Pathog.* 2010; 48(5):191–5. DOI: 10.1016/j.micpath.2010.01.005.

**Authors:**

Mikshis N.I., Kutuyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Об авторах:**

Микшис Н.И., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 11.12.18.

Принята к публ. 18.02.19.