

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-86-91

УДК 616.91:615.37

О.А. Полежаева, А.В. Зыбкина, А.В. Зайковская, О.В. Пьянков, С.А. Пьянков, А.В. Семенова,  
Г.В. Кочнева, Д.Н. Щербаков

## ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА Y, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ВИРУС МАРБУРГ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация

**Цель** – изучение возможности индукции куриных антител, нейтрализующих вирус Марбург (MARV), с использованием различных иммуногенов. **Материалы и методы.** В качестве иммуногенов использовали рекомбинантный вирус осповакцины, экспрессирующий трансген поверхностного гликопротеина (GP) MARV штамма Musoke, и псевдовиральные частицы, экспонирующие GP трех штаммов MARV: Popp, Musoke и DRC2000, – на основе лентивируса и рекомбинантного штамма вируса везикулярного стоматита (VSV). В иммунизации участвовало две группы птиц. Кур иммунизировали девять раз: в первый раз вводили рекомбинантный вирус осповакцины, а затем 8 раз – псевдовиральные частицы (на основе лентивируса и рекомбинантного штамма вируса везикулярного стоматита). Первую группу иммунизировали очищенным и концентрированным иммуногеном, а вторую группу им же, но в комплексе с неполным адъювантом Фрейнда. Накопление специфических антител оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для анализа накопления нейтрализующих антител использовали рекомбинантный VSV, экспонирующий GP MARV, и натуральный MARV штамма Popp. **Результаты и обсуждение.** Разработана эффективная схема иммунизации кур тремя рекомбинантными конструктами, презентующими GP MARV, в результате которой происходит индукция куриных антител класса IgY против вируса Марбург с титром в ИФА от 1:100 до 1:1 млн. Полученные IgY нейтрализуют псевдовirusы MARV (штаммы Popp, DRC2000, Musoke) в разведении от 1/256 до 1/1024 и натуральный вирус MARV штамма Popp в разведении 1/8. Более стабильные результаты продемонстрировала схема иммунизации с использованием неполного адъюванта Фрейнда.

**Ключевые слова:** вирус Марбург, антитела, IgY, вирусоподобные частицы.

Корреспондирующий автор: Щербаков Дмитрий Николаевич, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Полежаева О.А., Зыбкина А.В., Зайковская А.В., Пьянков О.В., Пьянков С.А., Семенова А.В., Кочнева Г.В., Щербаков Д.Н. Получение иммуноглобулинов класса Y, нейтрализующих вирус Марбург. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:86–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-86-91  
Поступила 27.04.20. Принята к публ. 28.05.20.

О.А. Polezhaeva, A.V. Zybina, A.V. Zaikovskaya, O.V. P'yankov, S.A. P'yankov, A.V. Semenova,  
G.V. Kochneva, D.N. Shcherbakov

## Preparation of Class Y Immunoglobulins that Neutralize the Marburg Virus

State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation

**Abstract. The aim** was to study the possibility of inducing Marburg-neutralizing chicken antibodies (MARV) using various immunogens. **Materials and methods.** Recombinant vaccinia virus expressing the surface glycoprotein (GP) transgene MARV of Musoke strain and pseudovirus particles exhibiting GP of three strains of MARV – Popp, Musoke and DRC2000 based on lentivirus and recombinant strain of vesicular stomatitis virus (VSV) were used as immunogens. Two groups of birds were involved in the study. Chickens were immunized 9 times: first time they were injected with the recombinant vaccinia virus, and then 8 times – with pseudovirus particles (based on lentivirus and a recombinant strain of the vesicular stomatitis virus). The accumulation of specific antibodies was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We used recombinant VSV exhibiting GP MARV, and natural MARV strain Popp for the analysis of accumulation of neutralizing antibodies. **Results and discussion.** We have developed an effective immunization schedule for chickens with three recombinant constructs presenting GP MARV, which results in the induction of chicken IgY antibodies against Marburg virus with a titer in ELISA from 1:100 to 1:1 million. The obtained IgY neutralize MARV pseudoviruses (Popp, DRC2000, Musoke) at a dilution of 1/256 to 1/1024 and the natural MARV virus of the Popp strain at a dilution of 1/8. More stable results were demonstrated by immunization using Freund's incomplete adjuvant.

**Key words:** Marburg virus, antibodies, IgY, virus-like particles.

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

**Funding:** The study was conducted with the financial support of the Russian Foundation of Fundamental Research within the framework of the scientific project No. 18-34-00512 mol-a.

Corresponding author: Dmitry N. Shcherbakov, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

Citation: Polezhaeva O.A., Zybina A.V., Zaikovskaya A.V., P'yankov O.V., P'yankov S.A., Semenova A.V., Kochneva G.V., Shcherbakov D.N. Preparation of Class Y Immunoglobulins that Neutralize the Marburg Virus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 4:86–91. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-86-91

Received 27.04.20. Accepted 28.05.20.

Polezhaeva O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4256-5064>

Zaikovskaya A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>

Shcherbakov D.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Согласно международной классификации, вирус Марбург (MARV) является представителем рода *Marburgvirus* семейства *Filoviridae* порядка *Mononegavirales*. MARV способен передаваться от рукокрылых к людям с последующей передачей от человека к человеку, при этом у людей он способен вызывать тяжелую геморрагическую лихорадку. Уровень смертности в очагах лихорадки Марбург варьирует от 24 до 88 %. Развитие международной торговли и туризма в последнее время, активный импорт животных для проведения биомедицинских исследований и в зоопарки создают реальную угрозу инфицирования людей, проживающих за пределами Экваториальной Африки.

Наиболее эффективным способом противодействия любой вирусной инфекции является использование профилактических вакцин, однако для MARV лицензированные вакцины отсутствуют. Другим способом борьбы с инфекцией могут быть противовирусные препараты. Эффективность на модели морских свинок показали препараты на основе антисмысловых РНК и малые интерферирующие РНК [1–3]. Ведутся работы по поиску низкомолекулярных веществ – блокаторов проникновения вируса в клетку [4]. Одной из групп перспективных противовирусных препаратов, обладающих высокой избирательностью действия, являются моноклональные антитела. Все существующие методы получения моноклональных антител базируются на отборе отдельных вариантов антител из разнообразия, представленного иммунной системой либо переболевшего человека, либо иммунизированных лабораторных животных. Так как лихорадка Марбург является редким заболеванием, наиболее доступным источником может служить иммунная система лабораторных животных.

Стимуляция выработки антител, нейтрализующих MARV в организме лабораторных животных, является нетривиальной задачей [5–8]. Так, иммунизация морских свинок инактивированным вирусом стимулировала выработку специфических антител, однако они не проявляли активность в тесте ингибирования бляшкообразования [6, 8]. Использование инактивированного вируса для иммунизации приматов привело к активации их гуморального иммунитета, но, несмотря на появление специфических антител в титре 1/2500, нейтрализующие антитела отсутствовали [9]. Иммунизация морских свинок вирусоподобными частицами на основе белков VP40 и GP или VP40, NP и GP обеспечивала полную защиту животных от заражения гомологичными и гетерологичными штаммами MARV, однако так же, как в случае с инактивированным вирусом, нейтрализующие антитела не обнаружены [6, 8]. Сходные результаты наблюдались при иммунизации вирусоподобными частицами приматов: животные выжили, однако нейтрализующие антитела отсутствовали [10]. Обнадешающие результаты показывают иммуногены на основе рекомбинантных вирусных векторов, при вакцинации которыми обнаружены

нейтрализующие антитела, что отражено в ряде работ [11, 12].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение индукции нейтрализующих MARV антител у кур. Куры в качестве источника разнообразия антигенраспознающих доменов антител имеют ряд преимуществ. Все разнообразие нуклеотидных последовательностей, кодирующих вариабельные фрагменты тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей антител, у птиц фланкировано тремя консенсусными последовательностями [13], что облегчает в дальнейшем получение моноклональных антител с использованием технологии фагового дисплея. Кроме того, динамику накопления специфических антител можно регистрировать для каждой курицы индивидуально, анализируя желток снесенных ею яиц, не прибегая к травматичным инвазивным процедурам.

## Материалы и методы

В качестве иммуногена выбраны рекомбинантный вирус осповакцины, содержащий GP вируса Марбург штамма Musoke (GP<sub>mus</sub>), и псевдовиральные частицы, экспонирующие GP MARV, на основе VSV и ВИЧ-1. Для псевдотипирования использовали нуклеотидные последовательности, кодирующие поверхностный гликопротеин трех штаммов MARV: Popp (GenBank: Z29337.1), Musoke (GenBank: DQ217792.1) и DRC 2000 (GenBank: JX458848.1), при этом также использовали варианты GP без муциноподобного домена ( $\Delta$ MLD). Синтез нуклеотидных последовательностей осуществлен коммерческой фирмой («ДНК-синтез», Москва).

Рекомбинантный вирус осповакцины (штамм Л-ИВП, GenBank: KP233807) со встройкой трансгена GP<sub>mus</sub> (VACV-GP<sub>mus</sub>) получали методом временной доминантной селекции с использованием векторной плазмиды pGEM-Puro-UN-DS, которая является универсальной конструкцией для встройки любых трансгенов в геном штамма Л-ИВП в район делеции фрагмента гена C11R и экспрессии этих трансгенов под контролем ранне-позднего синтетического промотора pE/L [14]. Лентивирусные псевдовirusы MARV получали котрансфекцией эукариотических клеток HEK293T двумя плазмидами, одна из которых экспрессирует ген, кодирующий белок GP MARV, а вторая является пакующей плазмидой pSG3 $\Delta$ Env, как описано ранее [15]. Спустя двое суток после котрансфекции проводили сбор урожая псевдовirusов Lenti-GP $\Delta$ MLD-DRC.

Для получения псевдовirusов на основе VSV нами использован подход на основе рекомбинантного VSV (rVSV $\Delta$ G-G) с делецией гена поверхностного гликопротеина (G), описанный ранее [16]. Клетки HEK293FT трансфицировали плазмидой, кодирующей GP MARV, через 24 ч проводили смену ростовой среды и добавляли rVSV $\Delta$ G-G. Спустя двое суток после трансфекции производили сбор урожая псевдовirusов VSV-GP $\Delta$ MLD<sub>pop</sub>.

Функциональную активность лентивирусных псевдовирюсов определяли на клетках TZM-bl – генетически модифицированной клеточной линии HeLa, презентующей на своей поверхности большое число рецепторов для GP MARV и содержащей репортерный ген люциферазы светлячка под контролем Tat-индуцируемого промотора. Функциональную активность псевдовирюсов на основе VSV определяли на культуре клеток HEK293T. В обоих случаях уровень вирусной инфекции оценивали по величине сигнала люминесценции, регистрируемого планшетным люминометром Stat Fax 4400. Величину сигнала люминесценции, которая прямо пропорциональна количеству зараженных клеток, выражали в относительных люциферазных единицах (RLU).

После наработки псевдовирюсных частиц в эукариотических клетках HEK293FT (рабдовирюсные псевдовирюсы) и HEK293T (лентивирусные псевдовирюсы) культуральную жидкость фильтровали через фильтр с диаметром пор 22 мкм и концентрировали центрифугированием через слой 20%-й сахарозы при 70000 g в течение 3–4 часов. Осадок растворяли в фосфатно-солевом буфере и хранили при температуре -80 °C.

Для иммунизации использовали 6 кур породы Лекгорн. На первом этапе всем курам однократно вводили рекомбинантный вирус осповакцины VACV-GP<sub>mus</sub> в дозе  $1 \cdot 10^8$  БОЕ на курицу (праймирование). Затем кур разделили на 2 равные группы и иммунизировали еще 8 раз псевдовирюсами MARV. Для первых пяти иммунизаций использовали псевдовирюсы на основе рабдовирюсной системы, экспонирующие ΔMLD GP штамма Popp, в дозе  $1,4 \cdot 10^7$  RLU на птицу. Во время следующих трех иммунизаций куриц прививали смесью лентивирусных псевдовирюсов, экспонирующих ΔMLD GP штамма DRC 2000, и рабдовирюсных псевдовирюсов, экспонирующих ΔMLD GP штамма Popp MARV, в соотношении 1:1. Все иммунизации проводили внутримышечно, объем инокулята составил 500 мкл. Первой группе птиц псевдовирюсы вводили в фосфатно-солевом буфере, второй – в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ). Все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также одобрены соответствующими комитетами.

Выделение из яиц иммунизированных птиц желточных антител класса IgY проводили методом электроосаждения, описанным ранее [17]. С этой целью из яиц извлекали желточный мешок и растворяли его содержимое в дистиллированной воде, доводили водородный показатель смеси до pH 5 и помещали в морозильную камеру с температурой -20 °C не менее чем на 12 часов. Далее раствор пропускали через бумажный фильтр, добавляли хлорид натрия до конечной концентрации 8,8 % и доводили pH раствора до 4. Выпавший осадок центрифугировали. Для очистки препарата антител от примесей хлорида натрия проводили диализ.

Анализ специфических антител проводили при помощи ИФА. В качестве специфического иммуносорбента использовали очищенный концентрированный инактивированный препарат вируса Марбург штамма Popp (номер V 626 в коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Для его получения на 7-е сутки инкубации собирали с монослоя зараженных клеток Vero 100 мл культуральной вируссодержащей жидкости. Осаждали вирусные частицы центрифугированием с 8 % полиэтиленгликоля ПЭГ-8000, полученный осадок ресуспендировали в растворе Хенкса и осаждали ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы, собирая опалесцирующую фракцию. Вирус инактивировали инкубацией раствора антигена с добавлением 0,2 % пропиолактона при 37 °C. Контроль отсутствия остаточной инфекционности проводили методом пассажа на инъецированных препаратом антигена восприимчивых к вирусу Марбург морских свинок, параллельно с пассажами контаминированного этим препаратом монослоя клеточной культуры Vero. Полученный препарат разводили в 100 раз в растворе 0,05 М натрия углекислого и вносили по 100 мкл в лунки полистиролового планшета. Сорбцию антигена проводили в течение 18 часов, после чего проводили ИФА.

Для оценки нейтрализующей активности IgY использовали псевдовирюсы MARV на основе rVSVΔG. В иммунологическом 96-луночном планшете готовили 4-кратные разведения препарата антител, затем во все лунки добавляли одинаковое количество псевдовирюсов (40000 RLU). После получасовой инкубации смеси антител и псевдовирюсов переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета с клетками HEK293T. Через 48 ч проверяли уровень люминесценции на планшетном люминометре Stat Fax 4400.

Анализ нейтрализующей активности также проводили при помощи реакции ингибирования бляшкообразования MARV штамма Popp на монослое клеток Vero. Реакция проводилась на суточной культуре клеток Vero под полужидким агаровым покрытием, как описано ранее [18]. Полученные результаты учитывали на 7-е сутки.

### Результаты и обсуждение

В нашей работе для индукции нейтрализующих MARV антител в качестве иммуногенов использовали рекомбинантный вирус осповакцины и псевдовирюсы (рекомбинантные вирусы одного цикла). Выбор продиктован простотой и относительной безопасностью работы с такими иммуногенами при сохранении иммунологических особенностей, характерных для натурального вируса.

Для индукции кросс-нейтрализующих антител использовали прайм-бустерную стратегию, заключающуюся в использовании гетерологичных псевдовирюсных частиц (лентивирусные и на осно-



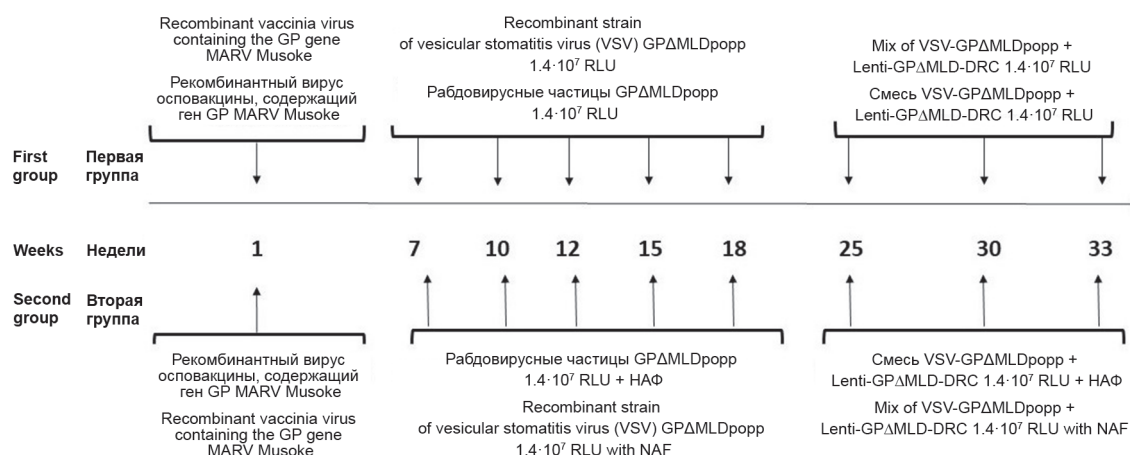


Рис. 1 Схема иммунизации кур. В первой иммунизации в качестве иммуногена использовался рекомбинантный вирус осповакцины, экспрессирующий трансген GP MARV штамма Musoke. Первая группа птиц далее иммунизирована очищенными псевдовirusами VSV-GPΔMLDpopp в концентрации  $1.4 \cdot 10^7$  RLU. Вторая группа птиц получала тот же антиген в комплексе с ИФА. Последние три иммунизации выступали в роли буста и птицам вводили смесь VSV-GPΔMLDpopp и Lenti-GPΔMLD-DRC

Fig. 1. Chicken immunization schedule. During the first immunization, a recombinant vaccinia virus expressing the GP MARV transgene of the Musoke strain was used as an immunogen. The first group of birds was further immunized with purified VSV-GPΔMLDpopp pseudoviruses at a concentration of  $1.4 \cdot 10^7$  RLU. The second group of birds received the same antigen in combination with Freund's incomplete adjuvant. The last 3 immunizations served as boost ones and the birds were injected with a mixture of VSV-GPΔMLDpopp and Lenti-GPΔMLD-DRC

ве рабдовирусной системы), а также гетерологичных GP MARV (Popp и DRC 2000). Известно, что присутствующий в составе GP муциноподобный домен филовирuсов способен негативно влиять на гуморальный иммунный ответ, направленный против MARV [19]. Поэтому для разработки иммуногена использовали варианты плазмид, в которых участок, кодирующий этот домен гликопротеина, удален. Во время иммунизации выбрано девять контрольных точек для оценки эффективности гуморального ответа: каждая через 19–20 дней после инъекции. Схема иммунизации представлена на рис. 1.

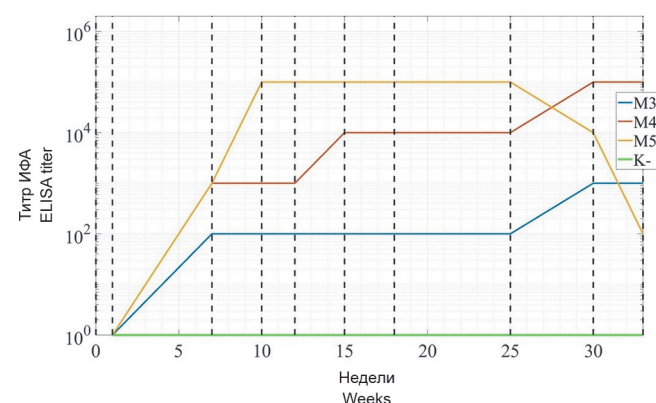


Рис. 2. Динамика накопления специфических антител против природного очищенного концентрированного инактивированного антигена вируса Марбург штамма Popp. Первая группа птиц:

Пунктирными линиями отмечены иммунизации. Синей линией обозначена курица М3, красной – М4, желтой – М5, зеленой – контрольная группа, иммунизированная физраствором. Титр ИФА выражен величиной, обратной разведению

Fig. 2. Dynamics of accumulation of specific antibodies against the natural purified concentrated inactivated antigen of the MARV Popp. The first group of birds:

Dotted lines indicate immunizations. The blue line indicates chicken M3, red – M4, yellow – M5, green – control group immunized with NaCl. The titer of ELISA is expressed as the reciprocal of the dilution

ИФА препаратов антител класса IgY, выделенных из желтков иммунизированных птиц, показал нарастание титров специфических антител. В первой группе титры специфических антител после последней иммунизации достигли значений от 1:100 до 1:100000. В образцах, полученных от птиц второй группы, титр антител оказался существенно выше и составил от 1:100000 до 1:1 млн (рис. 2, 3), что можно объяснить использованием адьюванта. Как следует из рис. 2 и 3, после четвертой иммунизации повышение титра специфических антител существенно затормозилось, поэтому решено провести

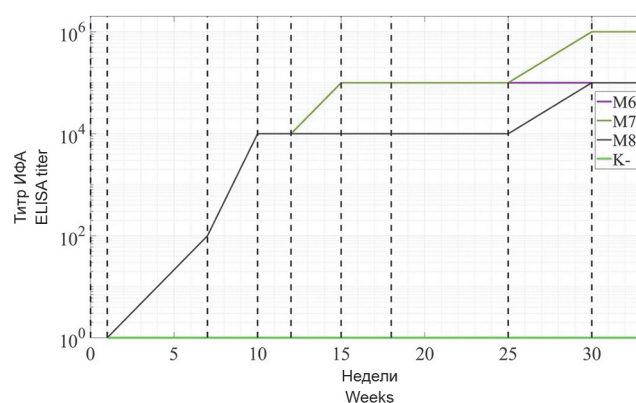


Рис. 3. Динамика накопления специфических антител против природного очищенного концентрированного инактивированного антигена вируса Марбург штамма Popp. Вторая группа птиц:

Пунктирными линиями отмечены даты иммунизации. Фиолетовой линией обозначена курица М6, зеленой – М7, черной – М8, светло-зеленой – контрольная неиммунизированная группа. Титр ИФА выражен величиной, обратной разведению

Fig. 3. Dynamics of accumulation of specific antibodies against the natural purified concentrated inactivated antigen of MARV Popp strain. The second group of birds:

Dotted lines indicate immunization dates. The violet line indicates chicken M6, green – M7, black – M8, light-green – control non-immunized group. The titer of ELISA is expressed as the reciprocal of the dilution

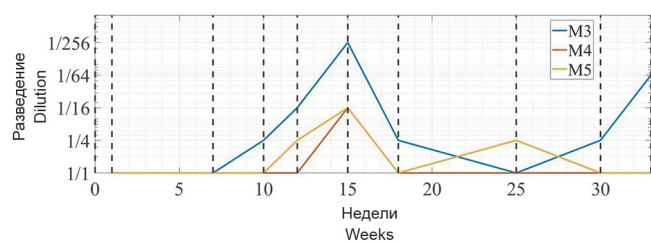


Рис. 4. Динамика накопления нейтрализующих антител. Первая группа птиц:

Пунктирными линиями отмечены даты иммунизации. Синей линией обозначена курица M3, красной – M4 и желтой – M5

Fig. 4. Dynamics of accumulation of neutralizing antibodies. The first group of birds:

Dotted lines indicate immunization dates. The blue line indicates the chicken M3, red – M4, and yellow – M5

бустирование при помощи гетерологичного иммуногена, представляющего собой смесь рабдовирусных и лентивирусных частиц. Это позволило добиться дополнительного увеличения титра специфических антител, за исключением одной птицы (M5) из первой группы, для которой наблюдался обратный эффект (рис. 2).

Анализ нейтрализующих антител при помощи гVSVΔG, экспонирующих GP MARV, выявил сходную картину (рис. 4–5). Пик нейтрализующих антител в обеих группах наблюдался после четвертой иммунизации, затем происходило снижение титров специфических антител. Введение гетерологического иммуногена стимулировало наработку нейтрализующих антител, однако этот эффект оказался нестабильным. Более стабильная наработка нейтрализующих антител наблюдается во второй группе птиц, иммунизированной по схеме с добавлением НАФ (рис. 5).

Интересно отметить, что рекомбинантный вирус осповакцины VACV-GP<sub>mus</sub>, продуцирующий GP MARV в процессе вирусной репликации в виде неструктурного белка, не экспонированного на поверхности вирионов, не индуцировал образование вируснейтрализующих антител. Однако VACV-GP<sub>mus</sub> эффективно «праймировал» синтез не нейтрализующих анти-MARV антител, выявляемых в ИФА. Нейтрализующие антитела детектировались уже после первой иммунизации рекомбинантным рабдовирусом VSV-GPΔMLD<sub>porr</sub>, экспонирующим на поверхности вирионов GP<sub>porr</sub> MARV. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости презентации GP MARV в виде мембранного поверхностного гликопротеина для повышения протективности вакцинации.

Анализ нейтрализующей активности в реакции ингибирования бляшкообразования с использованием натурального вируса Марбург штамма Porr показал наличие нейтрализующей активности антител в титрах от 1/8 до 1/16.

Таким образом, в ходе работы проведен сравнительный анализ иммуногенной активности анти-

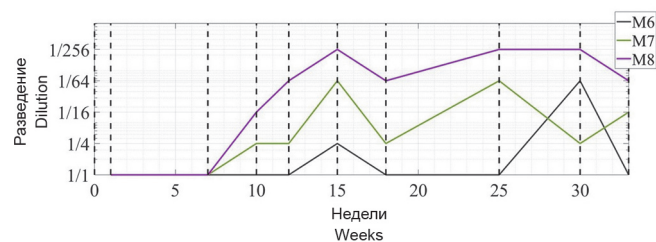


Рис. 5. Динамика накопления нейтрализующих антител. Вторая группа птиц:

Пунктирными линиями отмечены даты иммунизации. Черной линией обозначена курица M6, зеленой – M7 и фиолетовой – M8

Fig. 5. Dynamics of accumulation of neutralizing antibodies. The second group of birds:

Dotted lines indicate immunization dates. The black line indicates the chicken M6, green – M7 and purple – M8

генов на основе рекомбинантного вируса осповакцины, а также лентивирусной и рабдовирусной систем, представляющих собой псевдовирусные частицы, несущие на своей поверхности GP MARV (штампы Porr, DRC2000, Musoke). Определена наиболее эффективная схема иммунизации кур, стимулирующая наработку специфических антител класса IgY с титром в ИФА от 1:100 до 1:1 млн. Полученные IgY нейтрализуют псевдовирусы MARV (штампы Porr, DRC2000, Musoke) в разведении от 1/256 до 1/1024 и натуральный вирус MARV штамма Porr в разведении 1/8.

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

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-34-00512 мол\_а.

### Список литературы

1. Geisbert T.W., Hensley L.E., Kagan E., Yu E.Z., Geisbert J.B., Daddario-DiCaprio K., Fritz E.A., Jahrling P.B., McClintock K., Phelps J.R., Lee A.C.H., Judge A., Jeffs L.B., MacLachlan I. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal Ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *J. Infect. Dis.* 2006; 193(12):1650–7. DOI: 10.1086/504267.
2. Enterlein S., Warfield K.L., Swenson D.L., Stein D.A., Smith J.L., Gamble C.S., Kroeker A.D., Iversen P.L., Bavari S., Mühlberger E. VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(3):984–93. DOI: 10.1128/AAC.50.3.984-993.2006.
3. Warfield K.L., Swenson D.L., Olinger G.G., Nichols D.K., Pratt W.D., Blouch R., Stein D.A., Aman M.J., Iversen P.L., Bavari S. Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog.* 2006; 2(1):e1. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020001.
4. Sokolova A.S., Baranova D.V., Yarovaya O.I., Baev D.S., Tolstikova T.G., Salakhutdinov N.F., Polezhaeva O.A., Zybina A.V., Shcherbakov D.N. Synthesis of (1S)-(+)-camphor-10-sulfonic acid derivatives and investigations *in vitro* and *in silico* of their antiviral activity as the inhibitors of filovirus infections. *Russ. Chem. Bull.* 2019; 68(5):1041–6. DOI: 10.1007/s11172-019-2517-0.
5. Flyak A.I., Ilinykh P.A., Murin C.D., Garron T., Shen X., Fusco M.L., Hashiguchi T., Bornholdt Z.A., Slaughter J.C., Sappapapu G., Klages C., Ksiazek T.G., Ward A.B., Saphire E.O., Bukreyev A., Crowe J.E. Jr. Mechanism of human antibody-mediated neutralization of Marburg virus. *Cell.* 2015; 160(5):893–903. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.031.
6. Hevey M., Negley D., Geisbert J., Jahrling P., Schmaljohn A. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants. *Virology.* 1997; 239(1):206–



16. DOI: 10.1006/viro.1997.8883.

7. Hevey M., Negley D., Pushko P., Smith J., Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology*. 1998; 251(1):28–37. DOI: 10.1006/viro.1998.9367.

8. Hevey M., Negley D., VanderZanden L., Tammariello R.F., Geisbert J., Schmaljohn C., Smith J.F., Jahrling P.B., Schmaljohn A.L. Marburg virus vaccines: comparing classical and new approaches. *Vaccine*. 2001; 20(3–4):586–93. DOI: 10.1016/s0264-410-x(01)00353-x.

9. Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Streltsova M.A., Kashentseva E.A. Inactivated Marburg virus elicits a nonprotective immune response in Rhesus monkeys. *J. Biotechnol.* 1996; 44(1–3):111–8. DOI: 10.1016/0168-1656(95)00104-2.

10. Dye J.M., Warfield K.L., Wells J.B., Unfer R.C., Shulenin S., Vu H., Nichols D.K., Aman M.J., Bavari S. Virus-like particle vaccination protects nonhuman primates from lethal aerosol exposure with Marburgvirus (VLP vaccination protects macaques against aerosol challenges). *Viruses*. 2016; 8(4):94. DOI: 10.3390/v8040094.

11. Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Ströher U., Hensley L.E., Grolla A., Fritz E.A., Feldmann F., Feldmann H., Jones S.M. Cross-protection against Marburg virus strains by using a live, attenuated recombinant vaccine. *J. Virol.* 2006; 80(19):9659–66. DOI: 10.1128/JVI.00959-06.

12. Mire C.E., Geisbert J.B., Agans K.N., Satterfield B.A., Versteeg K.M., Fritz E.A., Feldmann H., Hensley L.E., Geisbert T.W. Durability of a vesicular stomatitis virus-based Marburg virus vaccine in nonhuman primates. *PLoS One*. 2014; 9(4):e94355. DOI: 10.1371/journal.pone.0094355.

13. Andris-Widhopf J., Rader C., Steinberger P., Fuller R., Barbas C.F. 3rd. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *J. Immunol. Methods*. 2000; 242(1–2):159–81. DOI: 10.1016/s0022-1759(00)00221-0.

14. Кочнева Г.В., Бабкина И.Н., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Юдин П.В., Сиволобова Г.Ф., Швалов А.Н., Попов Е.Г., Бакин И.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. Апоптин усиливает онколитическую активность вируса осповакцины *in vitro*. *Молекулярная биология*. 2013; 47(5):842–52. DOI: 10.7868/S0026898413050078.

15. Полежаева О.А., Щербakov Д.Н. Разработка панели псевдовиральных частиц, экспонирующих гликопротеин вируса Марбург. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2017; 8-2:27–30. DOI: 10.23670/IRJ.2017.62.018.

16. Whitt M.A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant ΔG-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J. Virol. Methods*. 2010; 169(2):365–74. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.08.006.

17. Hodek P., Trefil P., Simunek J., Hudecek J., Stiborova M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013; 8:113–24.

18. Устинова Е.Н., Шестопалов А.М., Бакулина Л.Ф., Чепурнов А.А. Титрование вирусов Эбола и Марбург по бляшкообразованию под полужидким агаровым покрытием. *Вопросы вирусологии*. 2003; 48(1):43–4.

19. Hashiguchi T., Fusco M.L., Bornholdt Z.A., Lee J.E., Flyak A.I., Matsuoka R., Kohda D., Yanagi Y., Hammel M., Crowe J.E. Jr., Saphire E.O. Structural basis for Marburg virus neutralization by a cross-reactive human antibody. *Cell*. 2015; 160(5):904–12. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.041.

## References

1. Geisbert T.W., Hensley L.E., Kagan E., Yu E.Z., Geisbert J.B., Daddario-DiCaprio K., Fritz E.A., Jahrling P.B., McClintock K., Phelps J.R., Lee A.C.H., Judge A., Jeffs L.B., MacLachlan I. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal Ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *J. Infect. Dis.* 2006; 193(12):1650–7. DOI: 10.1086/504267.

2. Enterlein S., Warfield K.L., Swenson D.L., Stein D.A., Smith J.L., Gamble C.S., Kroeker A.D., Iversen P.L., Bavari S., Mühlberger E. VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(3):984–93. DOI: 10.1128/AAC.50.3.984-993.2006.

3. Warfield K.L., Swenson D.L., Olinger G.G., Nichols D.K., Pratt W.D., Blouch R., Stein D.A., Aman M.J., Iversen P.L., Bavari S. Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog.* 2006; 2(1):e1. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020001.

4. Sokolova A.S., Baranova D.V., Yarovaia O.I., Baev D.S., Tolstikova T.G., Salakhutdinov N.F., Polezhaeva O.A., Zybikina A.V., Shcherbakov D.N. Synthesis of (1S)-(+)-camphor-10-sulfonic acid derivatives and investigations *in vitro* and *in silico* of their antiviral activity as the inhibitors of filovirus infections. *Russ. Chem. Bull.* 2019; 68(5):1041–6. DOI: 10.1007/s11172-019-2517-0.

5. Flyak A.I., Ilinykh P.A., Murin C.D., Garron T., Shen X., Fusco M.L., Hashiguchi T., Bornholdt Z.A., Slaughter J.C., Sapparapu G., Klages C., Ksiazek T.G., Ward A.B., Saphire E.O., Bukreyev A., Crowe J.E. Jr. Mechanism of human antibody-mediated neutralization of Marburg virus. *Cell*. 2015; 160(5):893–903. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.031.

6. Hevey M., Negley D., Geisbert J., Jahrling P., Schmaljohn A. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants. *Virology*. 1997; 239(1):206–16. DOI: 10.1006/viro.1997.8883.

7. Hevey M., Negley D., Pushko P., Smith J., Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology*. 1998; 251(1):28–37. DOI: 10.1006/viro.1998.9367.

8. Hevey M., Negley D., VanderZanden L., Tammariello R.F., Geisbert J., Schmaljohn C., Smith J.F., Jahrling P.B., Schmaljohn A.L. Marburg virus vaccines: comparing classical and new approaches. *Vaccine*. 2001; 20(3–4):586–93. DOI: 10.1016/s0264-410-x(01)00353-x.

9. Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Streltsova M.A., Kashentseva E.A. Inactivated Marburg virus elicits a nonprotective immune response in Rhesus monkeys. *J. Biotechnol.* 1996; 44(1–3):111–8. DOI: 10.1016/0168-1656(95)00104-2.

10. Dye J.M., Warfield K.L., Wells J.B., Unfer R.C., Shulenin S., Vu H., Nichols D.K., Aman M.J., Bavari S. Virus-like particle vaccination protects nonhuman primates from lethal aerosol exposure with Marburgvirus (VLP vaccination protects macaques against aerosol challenges). *Viruses*. 2016; 8(4):94. DOI: 10.3390/v8040094.

11. Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Ströher U., Hensley L.E., Grolla A., Fritz E.A., Feldmann F., Feldmann H., Jones S.M. Cross-protection against Marburg virus strains by using a live, attenuated recombinant vaccine. *J. Virol.* 2006; 80(19):9659–66. DOI: 10.1128/JVI.00959-06.

12. Mire C.E., Geisbert J.B., Agans K.N., Satterfield B.A., Versteeg K.M., Fritz E.A., Feldmann H., Hensley L.E., Geisbert T.W. Durability of a vesicular stomatitis virus-based Marburg virus vaccine in nonhuman primates. *PLoS One*. 2014; 9(4):e94355. DOI: 10.1371/journal.pone.0094355.

13. Andris-Widhopf J., Rader C., Steinberger P., Fuller R., Barbas C.F. 3rd. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *J. Immunol. Methods*. 2000; 242(1–2):159–81. DOI: 10.1016/s0022-1759(00)00221-0.

14. Кочнева Г.В., Бабкина И.Н., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Юдин П.В., Сиволобова Г.Ф., Швалов А.Н., Попов Е.Г., Бакин И.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. [Apoptin enhances the oncolytic activity of vaccinia virus *in vitro*]. *Молекулярная Биология [Molecular Biology]*. 2013; 47(5):842–52. DOI: 10.7868/S0026898413050078.

15. Polezhaeva O.A., Shcherbakov D.N. [Development of a panel of pseudoviral particles exhibiting the glycoprotein of the Marburg virus]. *Mezhdunarodny Nauchno-Issledovatel'sky Zhurnal [International Research Journal]*. 2017; 8-2:27–30. DOI: 10.23670/IRJ.2017.62.018.

16. Whitt M.A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant ΔG-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J. Virol. Methods*. 2010; 169(2):365–74. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.08.006.

17. Hodek P., Trefil P., Simunek J., Hudecek J., Stiborova M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013; 8:113–24.

18. Устинова Е.Н., Шестопалов А.М., Бакулина Л.Ф., Чепурнов А.А. [Titration of Ebola and Marburg viruses by plaque formation under semi-liquid agar coating]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2003; 48(1):43–4.

19. Hashiguchi T., Fusco M.L., Bornholdt Z.A., Lee J.E., Flyak A.I., Matsuoka R., Kohda D., Yanagi Y., Hammel M., Crowe J.E. Jr., Saphire E.O. Structural basis for Marburg virus neutralization by a cross-reactive human antibody. *Cell*. 2015; 160(5):904–12. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.041.

## Authors:

Polezhaeva O.A., Zybikina A.V., Zaikovskaya A.V., P'yankov O.V., P'yankov S.A., Semenova A.V., Kochneva G.V., Shcherbakov D.N. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

## Об авторах:

Полежаева О.А., Зыбикина А.В., Зайковская А.В., Пьянков О.В., Пьянков С.А., Семенова А.В., Кочнева Г.В., Щербakov Д.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.