

А.А.Петров, В.Н.Лебедев, Т.М.Плеханова, Л.Ф.Стовба, О.Н.Сидорова, Е.В.Мельникова,
С.В.Борисевич

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ РНК-РЕПЛИКОНА ВИРУСА ВЕНЕСУЭЛЬСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЛОШАДЕЙ ПРОТИВ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Сергиев Посад,
Российская Федерация

Представители семейства *Filoviridae* (вирусы Марбург, Эбола) и *Arenaviridae* (вирусы Ласса, Луйо, Мачупо, Хунин, Гуанарито, Сэбиа) являются этиологическими агентами особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. Данные возбудители представляют потенциальную угрозу для здравоохранения вследствие возможности их случайного завоза в неэндемичные регионы, поэтому актуальным является вопрос о создании специфических медицинских средств защиты в отношении вызываемых ими заболеваний. По мнению ведущих специалистов, вакцинация групп риска является наиболее эффективным и экономичным способом защиты от развития эпидемии. В обзоре рассмотрено новое перспективное направление разработки защитных препаратов в отношении особо опасных вирусных инфекций – создание вакцин на основе репликонов альфавирусов. Разработка рекомбинантных репликонов не требует культивирования патогенных микроорганизмов. Особенностью РНК-репликонов является их неспособность продуцировать инфекционное потомство, что имеет особое значение при создании вакцин в отношении особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. Преимущества альфавирусных репликонов перед другими РНК-репликонами при разработке вакцин заключаются в высоком уровне экспрессии гетерологичных генов и резистентности к анти-векторному иммунитету. РНК-репликоны альфавирусов сочетают безопасность инактивированных и иммуногенность живых аттенуированных вакцин. Репликоны на основе альфавирусов пригодны для экспрессивной разработки вакцин с целью специфической профилактики вирусных инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей, РНК-репликон, альфавирусы, филовирусы, аренавирусы, вакцина, вектор.

A.A.Petrov, V.N.Lebedev, T.M.Plekhanova, L.F.Stobva, O.N.Sidorova, E.V.Mel'nikova, S.V.Borisevich

Future Developments and Applications of the Vaccines against Dangerous Viral Infections, RNA-Replicon-Based, Obtained from the Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus

“The 48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense, Sergiev Possad, Russian Federation

The members of the *Filoviridae* (Marburg and Ebola viruses) and *Arenaviridae* (Lassa, Lujo, Machupo, Junin, Guanarito, Sabia viruses) families are the etiological agents of particularly dangerous viral hemorrhagic fevers. These agents pose a potential threat to public health care in view of the possibility of their unintended import into the non-endemic regions, and thus construction of specific medical protectors as regards induced by them diseases is a pressing issue. According to leading experts, vaccination of the cohorts that fall in the risk groups is the most effective and least expensive method to prevent the development of epidemics.

The review contains information on a new prospective line of protective preparations development as regards particularly dangerous viral infections – construction of alphavirus-replicon-based vaccine. Elaboration of recombinant replicons does not require cultivation of pathogenic microorganisms. RNA-replicons are distinguished by their incapacity to produce infective progeny, which is of a great importance for the development of vaccines against particularly dangerous viral hemorrhagic fevers. Advantages of alphaviral replicons over other RNA-replicons are as follows: high levels of heterologous gene expression and resistance to anti-vector immunity. RNA-replicons of alphaviruses combine the safety of inactivated, and immunogenicity of live attenuated vaccines. Alphaviruses-based replicons are suitable for express vaccine development with the purpose of specific prophylaxis of viral infectious diseases.

Key words: Venezuelan equine encephalomyelitis virus, RNA-replicon, alphaviruses, filoviruses, arenaviruses, vaccine, vector.

Представители семейств *Filoviridae* (вирусы Марбург, Эбола) и *Arenaviridae* (вирусы Ласса, Луйо, Мачупо, Хунин, Гуанарито, Сэбиа) являются этиологическими агентами особо опасных вирусных геморрагических лихорадок (ООВГЛ). Они вызывают острые заболевания человека, характеризующиеся шоком, геморрагиями, мультиорганной недостаточностью, и заканчиваются летальным исходом в 22–90 % случаев [9, 20, 21].

Данные возбудители рассматриваются как угроза здравоохранению вследствие их неконтролируемого завоза в неэндемичные регионы, поэтому вопрос о создании специфических медицинских средств защиты в отношении вызываемых ими заболеваний является актуальным. Вакцинация групп риска является наиболее эффективным и экономичным спосо-

бом защиты от эпидемии, которая может возникнуть в результате завоза возбудителя [3, 7, 8, 15].

В качестве основных направлений создания эффективных вакцин для этих нозологических форм ранее рассматривали цельновирсионные убитые вакцины, вирусоподобные частицы, ДНК-вакцины, векторные рекомбинантные вакцины на основе аденовирусов и вируса везикулярного стоматита [4, 5, 11, 15, 19, 25, 28, 29, 33, 34].

Следует подчеркнуть, что идеальная вакцина должна вызывать долговременный иммунитет при однократном введении, обладать перекрестной реактивностью к различным природным штаммам возбудителя и не вызывать поствакцинальных осложнений. Кроме того, стоимость вакцины не должна препятствовать ее массовому применению.

В настоящее время для ООВГЛ нет вакцинных препаратов, которые отвечали бы всем перечисленным условиям. Только для Аргентинской геморрагической лихорадки (АГЛ) разработан живой аттенуированный вакцинный штамм Candid 1 вируса Хунин. Он применяется в эндемичных регионах Аргентины и, несмотря на аттенуацию, является реактогенным для человека [21, 23].

Создание эффективных вакцин против ООВГЛ возможно с помощью системы обратной генетики, которая позволяет получить ценную информацию для понимания функций структурных белков вирионов, вирусной репликации и патогенеза, что необходимо для разработки вакцин.

Методы обратной генетики пригодны для получения вакцин и могут быть использованы при разработке живых аттенуированных вирусных вакцин в отношении рассматриваемых нозологических форм. Однако не поддающиеся точной оценке риски опасности, связанные с их использованием, могут сделать это направление бесперспективным. С нашей точки зрения, одним из наиболее перспективных направлений в сфере разработки и применения вакцин против ООВГЛ является получение вакцин на основе РНК репликонов, в частности, репликонов альфавирусов.

Репликоном называют наименьший генетический элемент, способный к самовоспроизведению. Эта искусственная РНК начинает производить новый белок. РНК репликоны могут быть получены на основе вирусов с РНК⁺ или РНК⁻ геномами. Они представляют собой вирусные векторы, которые не только являются авирулентными, но и даже потенциально (в отличие от многих используемых в качестве живых вакцин аттенуированных штаммов) не способны к реверсии к дикому типу вируса. Автономность РНК репликации дает возможность РНК репликонам накапливаться до высоких уровней, при этом происходит стимуляция гуморальной и клеточной ветвей иммунного ответа.

РНК репликоны на основе вирусов с РНК⁺ геномом (РНК⁺ репликоны) могут быть применены одним из трех способов:

Трансфекция нативной РНК. В этом случае РНК, полученная в результате транскрипции *in vitro*, применяется при внутримышечном введении [2, 10]. Недостатком указанного подхода является высокая чувствительность нативной РНК к действию РНКаз, что в значительной степени снижает эффективность процесса доставки *in vivo*.

Доставка репликонов в виде кДНК фрагмента геномной РНК возбудителя (ДНК репликоны). Этот подход напоминает таковой при использовании ДНК-вакцин. Однако в отличие от ДНК-вакцин в данном случае ДНК транскрибируется в ядрах клеток в репликоновую РНК [11, 12, 14, 16]. Эта РНК переносится из ядер в цитоплазму клеток, где и происходят процессы амплификации репликоновой РНК и трансляции вирусоспецифического белка. При этом (в отличие от ДНК-вакцин) достигаются высокие уровни экспрессии вирусного антигена. Недостатком этого способа является возможность рекомбинации векторной ДНК с хромосомной, что делает ее потен-

циально опасной [15].

Использование вирусных репликонов на основе альфавирусов. Репликоны продуцируются в клеточных линиях млекопитающих, которые трансфицируются *in vitro* транскрибированными РНК, включая репликоновую РНК, которая кодирует вирусные неструктурные белки вместе с гетерологичным антигеном и хелперную РНК, кодирующую вирусные структурные белки. В некоторых системах используются две хелперные РНК, чтобы избежать рекомбинации РНК с образованием способного к репликации вируса [1, 2, 6, 22, 30, 31]. Хелперные РНК содержат 5' и 3' концы вирусного генома и вирусный субгеномный 26S промотор. Следовательно, в присутствии субгеномного репликона реплицируются хелперные РНК и экспрессируются структурные белки. В результате этого происходит образование вирусных репликонов, которые высвобождаются в клеточный супернатант. Поскольку хелперные РНК не содержат сигналы, необходимые для упаковки, данному процессу подвергается только субгеномная репликоновая РНК.

Одним из вариантов метода, позволяющего избежать трансфекции многочисленных транскриптов, является использование упаковывающих клеточных линий, экспрессирующих гены хелперных РНК [2, 6, 10, 16, 26]. Репликоны, продуцируемые подобным методом, являются инфекционными и эффективно доставляют рекомбинантную репликоновую РНК в чувствительную клетку. Однако клетки не продуцируют инфекционное потомство, поскольку они, в отличие от клеток, инфицированных вирусом дикого типа, не могут обеспечить полноценную сборку вириона. Поэтому эти РНК-репликоны называются «одноцикловыми» или «неспособными к репродукции» векторами.

Изучение альфавирусных репликон-основанных вакцин было начато в конце прошлого века, когда они впервые использовались для экспрессии гетерологичных генов [12]. Повышение безопасности и улучшение конструкции репликоновых векторов значительно расширили возможности применения вакцин данного класса. Использование этих вакцин обеспечивает сильный и сбалансированный иммунный ответ с соответствующей защитой против различных заболеваний, которые имеют большое значение для ветеринарии и здравоохранения. Поэтому технология альфавирусных репликонов обладает большим потенциалом для создания следующих поколений вакцин против инфекционных заболеваний человека и животных.

Как правило, репликон альфавирусов содержит последовательность нуклеиновой кислоты (НК), кодирующую 5'-концевую последовательность альфавирусов, по крайней мере, одну последовательность НК, кодирующую неструктурный белок альфавирусов, один альфавирусный субгеномный промотор, одну внутреннюю последовательность рибосомальной НК (IRES-элемент), одну гетерологичную НК и последовательность НК, кодирующую 3'-концевую последовательность альфавирусов [13, 14, 17, 18, 22, 24, 26, 27]. 3'-концевые и 5'-концевые последовательности, необходимые для обеспечения естественного

цикла репликации альфавирусов, в рекомбинантном репликоне могут быть исключены. Так как структурные гены альфавирусов в репликоне отсутствуют и не могут экспрессироваться после вакцинации, то неспецифический антивекторный иммунный ответ является минимальным [24, 26].

В клетках эукариот задействованы два различных механизма для инициации трансляции. В одном из них, так называемый «кэп», расположенный на 5'-конце мРНК, распознается фактором инициации (eIF4F). При этом происходит связывание транспортной РНК метионина и взаимодействие с рибосомальной субъединицей 40S («кэп»-зависимая трансляция) [24].

Альтернативный механизм предусматривает инициацию трансляции посредством IRES-элементов, которая инициирует трансляцию с внутреннего кодона инициации мРНК с помощью трансактивирующего фактора – «кэп»-независимая трансляция. IRES-элементы обнаружены в многочисленных транскриптах вирусов позвоночных, беспозвоночных и растений, а также в транскриптах генов позвоночных и беспозвоночных [24, 26].

В настоящее время описаны альфавирусные векторы, экспрессирующие требуемые гены. Во всех примерах описана модификация генов неструктурных белков или 26S субгеномного промотора для регулирования репликации вектора или транскрипции. Альфавирусный 26S субгеномный промотор управляет транскрипцией в процессе репликации альфавирусов. Он может модифицироваться таким образом, что его функциональная активность может быть уменьшена, увеличена или сохранена [26].

Гетерологичная НК является нуклеотидной последовательностью, отсутствующей и/или не представленной в геноме дикого типа в том же порядке, что и в рекомбинантном альфавирусном геноме. Когда рекомбинантная НК содержит гены одного и более структурных белков, она может продуцировать дефектные частицы альфавирусов [24, 26]. Гетерологичная НК может кодировать белки или пептиды, которые являются антигенами, индуцирующими факторы иммунного ответа в отношении различных инфекционных заболеваний.

Альфавирусные репликон-основанные вакцины пригодны для разработки вакцин «нового поколения». Первые экспериментальные вакцины против гриппа, основанные на альфавирусных репликонах, были сконструированы с использованием вируса леса Семлики. Репликон, экспрессировавший ген нуклеопротеина (NP), вызывал сильный гуморальный и клеточный иммунный ответы [35].

В настоящее время описано использование рекомбинантных альфавирусных репликонов, кодирующих структурные белки вирусов гриппа, парагриппа, вируса метапневмонии, респираторного синцитиального вируса, вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита человека 1 типа, ортопоксвирусов, вирусов желтой лихорадки, Западного Нила, японского энцефалита, лихорадки долины Рифт, Конго-Крымской геморрагической лихорадки, герпеса, гепатита В и возбудителей других

инфекционных заболеваний [10, 11, 14, 17, 24, 27].

Репликон на основе альфавирусов был использован для быстрой разработки вакцины в ходе пандемии, вызванной вирусом гриппа А/Н1N1/pdm09. Защита, обеспечиваемая данной вакциной, сходна с таковой после гомологичной иммунизации [32].

Наличие пригодного для иммунизации человека штамма ТС 83 вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ) определяет перспективы создания РНК-репликона на основе генома этого возбудителя. Данный штамм может быть использован для получения репликоновой системы, экспрессирующей протективные гены возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Так как получение рекомбинантных репликонов не требует культивирования патогенных микроорганизмов, разработка и производство селективных агентов в репликон-основанных вакцинах может проводиться в условиях, не требующих соблюдения мер специальной биобезопасности [24].

Вектор на основе РНК-репликона аттенуированного вируса ВЭЛ состоит из РНК репликонового экспрессирующего вектора, РНК пакующего хелпера и РНК, продуцируемых *in vitro* с транскрипционных плазмид. РНК-репликона кодирует встроенный ген и транскриптазу вируса ВЭЛ, которая контролирует репликацию и транскрипцию гетерологичного гена. При совместной трансфекции эукариотических клеток полученным репликоном и двумя хелперными РНК, кодирующими структурные белки вируса ВЭЛ (гликопротеины и нуклеокапсид), происходит упаковка РНК-репликона в вирусоподобные частицы, которые служат в качестве векторов для доставки, амплификации и экспрессии *in vivo* встроенных генов [26].

Поскольку в хелперных РНК отсутствуют «пакующие сигналы», необходимые для дальнейшей репродукции полученной конструкции, инфекционный процесс ограничен одним циклом репликации [24, 26].

Преимущества альфавирусных репликонов по сравнению с живыми вирусными векторами состоят в том, что генная экспрессия ограничивается первоначально инфицированными клетками; диссеминации инфекции не происходит, что повышает безопасность вакцины. Гены экспрессируются в цитоплазме клеток с РНК-репликонов, что дает возможность им сплайсироваться. Экспрессия на высоком уровне обусловлена двумя раундами генной амплификации: первая – за счет репликации РНК-вектора, вторая – за счет генной транскрипции с 26S промотора. Клетками-мишенями репликонов *in vivo* является лимфоидная ткань, включая антиген-презентативные дендритные клетки.

Репликоны могут индуцировать иммунитет к двум патогенам при иммунизации комбинацией репликонов или двуэкспрессирующим репликоном. Это определяет перспективы использования рекомбинантных репликонов вируса ВЭЛ для конструирования на их основе вакцин против ООВГЛ.

В работе Р.С. Pushko *et al.* [22] проведена оценка моновалентной вакцины против вируса Ласса и бивалентной вакцины против вирусов Ласса и Эбола, осно-

ванных на векторной конструкции – РНК-репликоне аттенуированного штамма ВЭЛ. Необходимость создания бивалентной вакцины против вирусов Ласса и Эбола вызвана тем, что заболевания, обусловленные ими, имеют перекрывающиеся ареалы в африканских странах, расположенных к югу от пустыни Сахара. Завозные случаи лихорадки Ласса были зарегистрированы в США и Европе [21].

Основные элементы стратегии получения защитных препаратов против лихорадки Ласса разработаны ранее, когда были получены рекомбинантные штаммы вируса вакцины, экспрессирующие гены нуклеопротеина (NP) или гликопротеина (GP) вируса Ласса, которые защищали лабораторных животных (морские свинки, обезьяны) против летального заражения этим вирусом. При введении рекомбинантных вирусов вакцины со встроенными генами GP или NP макакам-резусам в первом случае наблюдали более выраженную защиту [22]. Подобные результаты были получены при исследовании рекомбинантных вирусов вакцины со встроенными генами NP и GP вируса Эбола [8, 11]. Однако эти исследования лишь успешно идентифицировали иммунодоминантные антигены, которые осуществляли защиту против летального заражения упомянутыми вирусами. Использование в качестве векторов живых неаттенуированных вирусов всегда оставляло открытым вопрос о безопасности этих конструкций, особенно для лиц с иммунодефицитными состояниями, что предполагало поиск новых, более безопасных векторов.

На первом этапе работы авторы исследовали репликоны ВЭЛ со встроенными генами NP и GP вируса Ласса в виде монопрепаратов и смеси обоих репликонов. Морских свинок через 4 недели после последней иммунизации инфицировали вирусом Ласса в дозе 160 LD₅₀. У иммунизированных животных не выявлено никаких симптомов заболевания, все контрольные неиммунизированные животные погибли [22].

Авторами была проведена оценка протективных свойств смеси из двух репликонов, экспрессирующих гликопротеины вирусов Ласса и Эбола, а также векторного репликона с двойной экспрессией генов GP данных возбудителей, причем каждый из них экспрессировался под контролем собственного 26S промотора. Результаты этих исследований показали наличие экспрессии генов и трансляцию гликопротеинов обоих вирусов, к которым вырабатывались специфические антитела, связывающиеся с полноценными гликопротеинами обоих вирусов [22].

Следует отметить, что иммунизированные морские свинки были устойчивы к последующему заражению вирулентным штаммом вируса ВЭЛ, несмотря на то, что было выявлено, что с этих репликонов, даже после слепых пассажей в культуре клеток, живой вирус ВЭЛ никогда не регенерируется [24].

Несмотря на сравнительно невысокий титр антител против GP вируса Ласса, после иммунизации смесью двух репликонов и двуэкспрессирующим репликоном животные выжили после заражения летальной дозой вирусов Ласса и Эбола. Авторы объясняют это тем, что основную протективную роль про-

тив вируса Ласса играют факторы клеточного иммунитета (в частности, CD4⁺ киллерные клетки) [22].

M.C.Hevey *et al.* [12] при создании эффективной вакцины для защиты людей от геморрагической лихорадки Марбург разработали генетическую конструкцию на основе репликона вируса ВЭЛ. В соответствии с выбранной стратегией конструирования вакцины ген, кодирующий структурный гликопротеин вируса Марбург, встроен в гены структурных белков вируса ВЭЛ. В результате получена самореплицирующаяся молекула РНК, обладающая собственными репликационными и транскрипционными функциями, содержащая мРНК, кодирующую структурный гликопротеин вируса Марбург. Результаты исследований свидетельствовали о том, что иммунизированные морские свинки защищены от последующего инфицирования инфекционным вирусом Марбург в большей степени, чем животные, иммунизированные разработанной ранее конструкцией на основе бакуловируса, экспрессирующей ген гликопротеина возбудителя лихорадки Марбург. Разработанная конструкция предложена авторами в качестве кандидата в вакцины для иммунизации людей против геморрагической лихорадки Марбург [13].

Основными иммунодоминантными эпитопами аренавирусов являются два оболочечных гликопротеина G1 и G2, которые образуются при протеолитическом расщеплении клеточно-ассоциированного предшественника GPC [21].

A.V.Seregin *et al.* [27] провели оценку защитной эффективности иммунизации морских свинок репликоном на основе вируса ВЭЛ, штамм TC 83, содержащим вставку гена GPC РНК вируса Хунин, при последующем заражении заведомо летальной дозой возбудителя АГЛ.

Авторами был создан и изучен *in vitro* и *in vivo* TC 83-репликон на основе вируса ВЭЛ, экспрессирующий предшественник гликопротеинов вируса Хунин, штамм Candid 1. Эта конструкция содержала РНК-элементы и гены неструктурных белков генома вируса ВЭЛ, которые требуются для репликации и транскрипции субгеномной РНК, т.е. 5'- и 3'-концы нетранслируемой области, субгеномный промотор, локализованный выше субгеномного РНК-транскрипционного сайта, и концевой кодон открытой рамки считывания гена неструктурного белка. Упаковку репликонов проводили при использовании дефектных хелперов, кодирующих либо капсид, либо гликопротеины вируса ВЭЛ штамма TC 83 [27]. Этот принцип ранее был использован для экспрессии гликопротеинов других вирусов [15, 16, 24]. Наличие экспрессии GPC в клетках *vero*, инфицированных упакованным репликоном, подтверждено при использовании моноклональных антител к гликопротеину G1 [27].

Иммуногенность рекомбинантного репликона определяли по наличию вируснейтрализующих антител к вирусу Хунин. Через 7 недель после однократной подкожной иммунизации у 4 из 5 морских свинок титр специфических антител находился в диапазоне от 1:5 до 1:160. После бустерной иммунизации титр нейтрализующих антител у всех животных повысился

и составлял 1:640–1:2560. При последующем инфицировании иммунизированных морских свинок вирусом Хунин в дозе 100 LD₅₀ все животные выжили. Полученные результаты указывают на то, что GPC является иммунодоминантным эпитопом, индуцирующим протективный иммунный ответ против вируса Хунин, и открывают перспективы разработки эффективной нереактогенной вакцины в отношении АГЛ.

Как уже упоминалось, преимуществом РНК-репликонов является их неспособность продуцировать инфекционное потомство. Однако это ограничивает диссеминацию антигена и, таким образом, число дендритных клеток, представляющих антиген. Этот недостаток преодолим за счет экспрессии рекомбинантных растворимых антигенов [24, 26], которые могут секретироваться клетками. Экспрессию костимуляторных цитокинов и хемокинов, которые высвобождаются клетками, можно увеличить, направляя дендритные клетки к сайту доставки вакцины [6, 10, 14, 26].

Идеальный РНК-репликоновый вектор в плане эффективности вакцинации – это репликон, который специфически нацеливает дендритные клетки [26]. Подобные репликоны нецитотоксичны, что позволяет дендритным клеткам выполнять их иммунологическую функцию в процессинге вакцинных антигенов, созревании и миграции к лимфоузлам для активации адаптивного иммунного ответа.

Использование специализированных клеточных линий для генерирования РНК-репликонов значительно облегчит создание эффективных вакцин, поскольку подобные основаны на свойственной вирусам системе доставки их собственного генетического материала. Критическим аспектом в данном случае является генерирование транзгенного хелпера или пакующих клеточных линий для репродукции РНК-репликонов. Эти клеточные линии могут дать высокий выход РНК-репликонов в соответствии с наивысшими стандартами биологической безопасности. Полностью исключается регенерация способного к размножению вируса, что имеет особое значение при создании вакцин против ООВГЛ.

Разумеется, предполагаемая стоимость альфавирусных РНК-репликонов при использовании их в качестве вакцин пока что несопоставима с этим показателем для живых вакцин. Однако с учетом того, что для защиты от эпидемии, которая может возникнуть в результате завоза возбудителей ООВГЛ, необходима иммунизация достаточно ограниченной группы риска, предполагаемые затраты на разработку и производство вакцин на основе альфавирусных РНК-репликонов в отношении указанных возбудителей будут полностью оправданы.

Таким образом, РНК-репликоны альфавирусов сочетают безопасность инактивированных с иммуногенностью живых аттенуированных вакцин. Преимуществом РНК-репликонов является их неспособность продуцировать инфекционное потомство, что имеет особое значение при создании вакцин в отношении ООВГЛ. Репликоны на основе альфавирусов пригодны для быстрой разработки вакцины в ходе возможных эпидемий и эпидемических вспышек.

Преимущества альфавирусных репликонов перед другими РНК-репликонами при разработке вакцин заключаются в высоком уровне экспрессии гетерологичных генов, тропизме к дендритным клеткам, резистентности к антивекторному иммунитету. Конструирование рекомбинантных репликонов не требует культивирования патогенных микроорганизмов. Разработка и производство селективных агентов в репликон-основанных вакцинах может проводиться в условиях, не требующих соблюдения мер специальной техники биобезопасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albarino C.G., Bird B.H., Chakrabarti A.K., Dodd K.A., Erickson B.R., Nichol S.T. Efficient rescue of recombinant Lassa virus reveals the Influence of S segment noncoding regions on virus replication and virulence. *J. Virol.* 2011; 85(8):4020–4.
2. Balasuriya U.B.R., Heidner H.W., Davis N.L., Johnston R.E., Wagner H.M., Hullinger P.J., Hedges J.F., Williams J.C., Johnston R.E., David Wilson W., Liu I.K., James MacLachlan N. Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine.* 2002; 20:1609–17.
3. Bausch D.G., Geisbert T.W. Development of vaccines for Marburg hemorrhagic fever. *Expert Rev. Vaccines.* 2007; 6:57–74.
4. Branco L.M., Grove J.N., Geske F.J., Boisen M.L., Muncy I.J., Magliato S.A., Magliato S.A., Henderson L.A., Schoepp R.J., Cashman K.A., Hensley L.E., Garry R.F. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *Virol. J.* 2010; 7:279.
5. Bredenbeek P.J., Molenkamp R., Spaan W.J.M., Deubel V., Marianneau P., Salvato M.S., Moshkoff D., Zapata J., Tikhonov I., Patterson J., Carrion R., Ticer A., Brasky K., Lukashovich I.S. A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology.* 2006; 345(2):299–4.
6. Davis N.L., West A., Reap E., MacDonald G., Collier M., Dryga S., Maughan M., Connell M., Walker C., McGrath K., Cecil C., Ping L.-H., Frelinger J., Olmsted R., Keith P., Swanstrom R., Williamson C., Johnson P., Montefiori D., Johnston R.E. Alphavirus replicon particles as candidate HIV vaccines. *IUBMB Life.* 2002; 53:209–11.
7. Dupuy L.C., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefence. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8:1739–54.
8. Falzarano D., Geisbert T.W., Feldmann H. Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use. *Expert Rev. Vaccines.* 2011; 10:63–77.
9. Feldman H., Klenk H.D., Sanchez A. Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch. Virol.* 1993; 7:81–100.
10. Fluet M.E., Whitmore A.C., Moshkoff D.A., Fu K., Tang Y., Collier M.L., West A., Moore D.T., Swanstrom R., Johnston R.E., Davis N.L. Effects of rapid antigen degradation and VEE glycoprotein specificity on immune responses induced by a VEE replicon vaccine. *Virology.* 2008; 370(1):22–32.
11. Grant-Klein R.J., Altamura L.A., Schmaljohn C.S. Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Virus Research.* 2011; 162(1–2):148–61.
12. 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.
13. Hevey M.C., Negley D.L., Pushko P., Smith J.F., Schmaljohn A.L. Marburg Virus Vaccine. US Patent 6,517,842 B1, 2003.
14. Lee J.S., Groebner J.L., Hadjipanayis A.G., Negley D.L., Schmaljohn A.L., Welkos S.L., Smith L.A., Smith J.F. Multiagent vaccines vectored by Venezuelan equine encephalitis virus replicon elicits immune responses to Marburg virus and protection against anthrax and botulinum neurotoxin in mice. *Vaccine.* 2006; 24:6886–92.
15. Lesley C.D., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefence. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8(12):1739–54.
16. Ljungberg K., Whitmore A.C., Fluet M.E., Moran T.P., Shabman R.S., Collier M.L., Kraus A.A., Thompson J.M., Montefiori D.C., Beard C., Johnston R.E. Increased immunogenicity of a DNA-launched Venezuelan equine encephalitis virus-based replicon DNA vaccine. *J. Virol.* 2007; 81:13412–23.
17. Lundstrom K. Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. *Expert Rev. Vaccines.* 2003; 2:447–59.
18. Nabel C., Yang Z., Sullivan N., Sanchez A. Development of a preventive vaccine for filovirus infection in primates. US Patent 8,124,592 B2, 2012.
19. Papaneri A.B., Schnell M.J., Wirblich C., Cooper K., Jahrling P.B., Blaney J.E. Further characterization of the immune response in mice to inactivated and live rabies vaccines expressing Ebola virus glycoprotein. *Vaccine.* 2012; 30(43):6136–41.
20. Peters C.J., Sanchez A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Murphy

- F.A. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock P.M., Memick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E., editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P. 1161–76.
21. Peters C.J., Buchmeier M., Rollin P.E., Ksiazek T.O. Arenaviridae. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock P.M., Memick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E. editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P. 1521–51.
22. Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001; 75:11677–85.
23. Radoshitzky S.R., Kuhn J.H., de Kok-Mercado F., Jahrling P.B., Bavari S. Drug discovery technologies and strategies for Machupo virus and other New World arenaviruses. *Exp. Opin. Drug Discov.* 2012; 7(7):613–32.
24. Rayner J.O., Dryga S.A., Kamrud K.I. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(5):279–96.
25. Richardson J.S., Yao M.K., Tran K.N., Croyle M.A., Strong J.E., Feldmann H., Kobinger G.P. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5308. doi: 10.1371/journal.pone.0005308.
26. Smith J.F., Kamrud K.I., Rayner J.O. Alphavirus replicons and helper constructs. US Patent 7,442,381 B2, 2008.
27. Seregin A.V., Yun N.E., Poussard A.L., Peng B.H., Smith J.K., Smith J.N., Salazar M., Paessler S. TC83 replicon vectored vaccine provides protection against Junin virus in guinea pigs. *Vaccine*. 2010; 28:4713–8.
28. Swenson D.L., Wang D., Luo M., Warfield K.L., Woraratanadharm J., Holman D.H., Dong J.Y., Pratt W.D. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15(3):460–7.
29. Swenson D.L., Warfield K.L., Larsen T., Alves D.A., Coberley S.S., Bavari S. Monovalent virus-like particle vaccine protect guinea pigs and nonhuman primates against infection with multiple Marburg virus. *Exp. Rev. Vaccines*. 2008; 7:417–29.
30. Thompson J.M., Whitmore A.C., Konopka J.L., Collier M.L., Richmond E.M., Davis N.L., Staats H.F., Johnston R.E. Mucosal and systemic adjuvant activity of alphavirus replicon particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(10):3722–7.
31. Vander Veen R.L., Harris D.L., Kamrud K.I. Alphavirus replicon vaccines. *Anim. Health Res. Rev.* 2012; 13:1–9.
32. Vander Veen R.L., Loynachan A.T., Mogler M.A., Russell B.J., Harris D.L., Kamrud K.I. Safety, immunogenicity, and efficacy of an alphavirus replicon-based swine influenza virus hemagglutinin vaccine. *Vaccine*. 2012; 30:1944–50.
33. Wang D., Raja N.U., Trubey C.M., Juompan L.Y., Luo M., Woraratanadharm J., Deitz S.B., Yu H., Swain B.M., Moore K.M., Pratt W.D., Hart M.K., Dong J.Y. Development of a cAdVax-based bivalent Ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J. Virol.* 2006; 80:2738–46.
34. Warfield K.L., Aman M.J. Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 3):S1053–9.
35. Zimmer G. RNA replicons – a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. *Viruses*. 2010; 2:413–34.
9. Feldman H., Klenk H.D., Sanchez A. Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch. Virol.* 1993; 7:81–100.
10. Fluet M.E., Whitmore A.C., Moshkoff D.A., Fu K., Tang Y., Collier M.L., West A., Moore D.T., Swanstrom R., Johnston R.E., Davis N.L. Effects of rapid antigen degradation and VEE glycoprotein specificity on immune responses induced by a VEE replicon vaccine. *Virology*. 2008; 370(1):22–32.
11. Grant-Klein R.J., Altamura L.A., Schmaljohn C.S. Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Virus Research*. 2011; 162(1–2):148–61.
12. Hevey M., Negley D., Pushko P., Smith J., Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protects guinea pigs and non-human primates. *Virology*. 1998; 251(1):28–37.
13. Hevey M.C., Negley D.L., Pushko P., Smith J.F., Schmaljohn A.L. Marburg Virus Vaccine. US Patent 6,517,842 B1, 2003.
14. Lee J.S., Groebner J.L., Hadjipanayis A.G., Negley D.L., Schmaljohn A.L., Welkos S.L., Smith L.A., Smith J.F. Multiagent vaccines vectored by Venezuelan equine encephalitis virus replicon elicits immune responses to Marburg virus and protection against anthrax and botulinum neurotoxin in mice. *Vaccine*. 2006; 24:6886–92.
15. Lesley C.D., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefense. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8(12):1739–54.
16. Ljungberg K., Whitmore A.C., Fluet M.E., Moran T.P., Shabman R.S., Collier M.L., Kraus A.A., Thompson J.M., Montefiori D.C., Beard C., Johnston R.E. Increased immunogenicity of a DNA-launched Venezuelan equine encephalitis virus-based replicon DNA vaccine. *J. Virol.* 2007; 81:13412–23.
17. Lundstrom K. Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. *Expert Rev. Vaccines*. 2003; 2:447–59.
18. Nabel C., Yang Z., Sulliva N., Sanches A. Development of a preventive vaccine for filovirus infection in primates. US Patent 8,124,592 B2, 2012.
19. Papaneri A.B., Schnell M.J., Wirblich C., Cooper K., Jahrling P.B., Blaney J.E. Further characterization of the immune response in mice to inactivated and live rabies vaccines expressing Ebola virus glycoprotein. *Vaccine*. 2012; 30(43):6136–41.
20. Peters C.J., Sanchez A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Murphy F.A. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock P.M., Memick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E., editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P. 1161–76.
21. Peters C.J., Buchmeier M., Rollin P.E., Ksiazek T.O. Arenaviridae. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock P.M., Memick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E. editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P. 1521–51.
22. Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001; 75:11677–85.
23. Radoshitzky S.R., Kuhn J.H., de Kok-Mercado F., Jahrling P.B., Bavari S. Drug discovery technologies and strategies for Machupo virus and other New World arenaviruses. *Exp. Opin. Drug Discov.* 2012; 7(7):613–32.
24. Rayner J.O., Dryga S.A., Kamrud K.I. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(5):279–96.
25. Richardson J.S., Yao M.K., Tran K.N., Croyle M.A., Strong J.E., Feldmann H., Kobinger G.P. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5308. doi: 10.1371/journal.pone.0005308.
26. Smith J.F., Kamrud K.I., Rayner J.O. Alphavirus replicons and helper constructs. US Patent 7,442,381 B2, 2008.
27. Seregin A.V., Yun N.E., Poussard A.L., Peng B.H., Smith J.K., Smith J.N., Salazar M., Paessler S. TC83 replicon vectored vaccine provides protection against Junin virus in guinea pigs. *Vaccine*. 2010; 28:4713–8.
28. Swenson D.L., Wang D., Luo M., Warfield K.L., Woraratanadharm J., Holman D.H., Dong J.Y., Pratt W.D. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15(3):460–7.
29. Swenson D.L., Warfield K.L., Larsen T., Alves D.A., Coberley S.S., Bavari S. Monovalent virus-like particle vaccine protect guinea pigs and nonhuman primates against infection with multiple Marburg virus. *Exp. Rev. Vaccines*. 2008; 7:417–29.
30. Thompson J.M., Whitmore A.C., Konopka J.L., Collier M.L., Richmond E.M., Davis N.L., Staats H.F., Johnston R.E. Mucosal and systemic adjuvant activity of alphavirus replicon particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(10):3722–7.
31. Vander Veen R.L., Harris D.L., Kamrud K.I. Alphavirus replicon vaccines. *Anim. Health Res. Rev.* 2012; 13:1–9.
32. Vander Veen R.L., Loynachan A.T., Mogler M.A., Russell B.J., Harris D.L., Kamrud K.I. Safety, immunogenicity, and efficacy of an alphavirus replicon-based swine influenza virus hemagglutinin vaccine. *Vaccine*. 2012; 30:1944–50.
33. Wang D., Raja N.U., Trubey C.M., Juompan L.Y., Luo M., Woraratanadharm J., Deitz S.B., Yu H., Swain B.M., Moore K.M., Pratt W.D., Hart M.K., Dong J.Y. Development of a cAdVax-based bivalent Ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J. Virol.* 2006; 80:2738–46.
34. Warfield K.L., Aman M.J. Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 3):S1053–9.
35. Zimmer G. RNA replicons – a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. *Viruses*. 2010; 2:413–34.

References

1. Albarino C.G., Bird B.H., Chakrabarti A.K., Dodd K.A., Erickson B.R., Nichol S.T. Efficient rescue of recombinant Lassa virus reveals the influence of S segment noncoding regions on virus replication and virulence. *J. Virol.* 2011; 85(8):4020–4.
2. Balasuriya U.B.R., Heidner H.W., Davis N.L., Johnston R.E., Wagner H.M., Hullinger P.J., Hedges J.F., Williams J.C., Johnston R.E., David Wilson W., Liu I.K., James MacLachlan N. Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine*. 2002; 20:1609–17.
3. Bausch D.G., Geisbert T.W. Development of vaccines for Marburg hemorrhagic fever. *Expert Rev. Vaccines*. 2007; 6:57–74.
4. Branco L.M., Grove J.N., Geske F.J., Boisen M.L., Muncy I.J., Magliato S.A., Magliato S.A., Henderson L.A., Schoepp R.J., Cashman K.A., Hensley L.E., Garry R.F. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *J. Virol.* 2010; 7:279.
5. Bredenbeek P.J., Molenkamp R., Spaan W.J.M., Deubel V., Marianneau P., Salvato M.S., Moshkoff D., Zapata J., Tikhonov I., Patterson J., Carrion R., Ticer A., Brasky K., Lukashovich I.S. A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology*. 2006; 345(2):299–4.
6. Davis N.L., West A., Reap E., MacDonald G., Collier M., Dryga S., Maughan M., Connell M., Walker C., McGrath K., Cecil C., Ping L.-H., Frelinger J., Olmsted R., Keith P., Swanstrom R., Williamson C., Johnson P., Montefiori D., Johnston R.E. Alphavirus replicon particles as candidate HIV vaccines. *IUBMB Life*. 2002; 53:209–11.
7. Dupuy L.C., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefense. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8:1739–54.
8. Falzarano D., Geisbert T.W., Feldmann H. Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use. *Expert Rev. Vaccines*. 2011; 10:63–77.

Authors:

Petrov A.A., Lebedev V.N., Plekhanova T.M., Stobva L.F., Sidorova O.N., Mel'nikova E.V., Borisevich S.V. "The 48th Central Research Institute" of the Ministry of Defense, Sergiev Possad, Russian Federation

Об авторах:

Петров А.А., Лебедев В.Н., Плекханова Т.М., Стомба Л.Ф., Сидорова О.Н., Мельникова Е.В., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны. Российская Федерация, Сергиев Посад.

Поступила 08.04.14.