

Т.Е.Сизикова, В.Н.Лебедев, С.И.Сыромятникова, С.В.Борисевич

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИН ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК, ВЫЗЫВАЕМЫХ АРЕНАВИРУСАМИ

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

Род *Arenavirus* (семейство *Arenaviridae*) в настоящее время включает в себя 26 отдельных видов вирусов. Разделяют две основные группы – аренавирусы Старого Света и Нового Света. Аренавирусы Нового Света разделяют на четыре клэйда: А, В, С, D. Вирусы Ласса, Лу́йо, Мачупо, Хунин, Гуанарито и Сабиа являются возбудителями особо опасных геморрагических лихорадок: Ласса, Лу́йо, Боливийской, Аргентинской, Венесуэльской и Бразильской лихорадок соответственно. Эти аренавирусы представляют потенциальную угрозу для отечественного здравоохранения вследствие возможности их случайного завоза на территорию России. Вакцинация групп риска является наиболее эффективным и экономичным способом защиты. **Целью** настоящего обзора является анализ разрабатываемых специфических средств профилактики аренавирусных геморрагических лихорадок. В качестве основных направлений создания эффективных вакцин в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок в настоящее время рассматривается создание живых вакцин на основе аттенуированных штаммов возбудителей, ДНК-вакцин, векторных рекомбинантных вакцин и вакцин на основе РНК-репликонов. В обзоре рассмотрены наиболее значимые результаты в направлении создания эффективных средств профилактики в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок.

**Ключевые слова:** геморрагические лихорадки, аренавирусы, вирус Ласса, вирус Мачупо, вирус Хунин, специфическая профилактика, живые вакцины, векторные рекомбинантные вакцины, РНК-репликоны, ДНК-вакцины.

Корреспондирующий автор: Борисевич Сергей Владимирович, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В. Современное состояние разработки вакцин для специфической профилактики геморрагических лихорадок, вызываемых аренавирусами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:30–36. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-30-36

T.E.Sizikova, V.N.Lebedev, S.I.Syromyatnikova, S.V.Borisevich

## The Current State of Vaccine Development for Specific Prophylactics of Arenaviral Hemorrhagic Fevers

Federal State Budgetary Institution «48<sup>th</sup> Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation

Presently, the Arenavirus genus (*Arenaviridae* family) includes 26 individual species of viruses. It is divided into two main groups – Old World arenaviruses and New World arenaviruses. The New World arenaviruses comprise four clades: A, B, C, D; pathogenic for humans New World arenaviruses are attributed to clade B. Lassa, Lujo, Machupo, Junin, Guanarito and Sabia viruses are the agents of extremely hazardous hemorrhagic fevers (Lassa hemorrhagic fever, Lujo hemorrhagic fever, Bolivian hemorrhagic fever, Argentinean hemorrhagic fever, Venezuelan hemorrhagic fever, Brazilian hemorrhagic fever, accordingly). These arenaviruses pose a potential threat to national public health due to the possibility of their accidental importation into the territory of the Russian Federation. The vaccination of risk group is the most effective and money-saving means of protection against epidemic spread. **Objective** of this review is to analyze the specific preparations for arenaviral hemorrhagic fever prevention that are currently under development. Production of live vaccines based on attenuated strains of the agents, the DNA vaccines, vector recombinant vaccines and vaccines on the basis of RNA-replicons is viewed as the main trends in the area. The most important results in the development of effective prophylactic means against arenaviral hemorrhagic fevers are discussed in this paper.

**Key words:** hemorrhagic fevers, arenaviruses, Lassa virus, Machupo virus, Junin virus, specific prophylactics, live vaccines, vector recombinant vaccines, RNA-replicons, DNA vaccines.

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

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Sergey V. Borisevich, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Sizikova T.E., Lebedev V.N., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V. The Current State of Vaccine Development for Specific Prophylactics of Arenaviral Hemorrhagic Fevers. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; 2:30–36. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-30-36

Вирусные геморрагические лихорадки представляют одну из наиболее серьезных проблем для мирового здравоохранения. Общее число случаев (годовая заболеваемость) вирусных геморрагических лихорадок гораздо меньше, чем таких вирусных за-

болеваний, как грипп и корь. Однако они ставят перед службами здравоохранения специфические проблемы, обусловленные их большой скоростью распространения, высокой смертностью, трудностями диагностики и специфического лечения [6].

Клинические проявления вирусных геморрагических лихорадок внешне во многом схожи. После 3–21-дневного инкубационного периода быстро развиваются признаки поражения многих внутренних органов, как правило, связанные с разрушением их клеток и патологической проницаемостью стенок капилляров. В большинстве случаев эта фаза продолжается около трех суток, а затем состояние больного внезапно ухудшается. В этот критический период наиболее характерна склонность к кровотечениям, особенно кожным геморрагиям, степень тяжести которых может широко варьировать. Клиническая картина болезни зависит от вида вызвавшего ее возбудителя, иногда от его штамма и иммунологического ответа инфицированного организма [4].

Целью настоящего обзора является анализ существующих и разрабатываемых специфических средств профилактики аренавирусных геморрагических лихорадок.

Род *Arenavirus* семейства *Arenaviridae* в настоящее время включает в себя 26 отдельных видов вирусов. Разделяют две основные группы – аренавирусы Старого Света (прототипные представители: вирусы лимфоцитарного хориоменингита и Ласса) и Нового Света (прототипный представитель – вирус Такарибе) [28].

В группу аренавирусов Старого Света входят вирусы Ласса, ЛХМ, Луио, Иппи, Луна, Мобала, Мопейя, Морогоро.

Аренавирусы Нового света разделяют на четыре клайда: А – вирусы Алпахуйо, Флексал, Парана, Пичинде, Пиритал; В – вирусы Амапари, Чапаре, Купикси, Гуанарито, Хунин, Мачупо, Сабиа и Такарибе; С – вирусы Латино и Оливерос; D – вирусы BearCanyon и Тамиами [31].

Филогенетическое родство не определяет патогенность возбудителя. Так, среди аренавирусов Нового Света, относящихся к клайду В, встречаются и патогенные, и непатогенные для человека аренавирусы [10].

Шесть аренавирусов (Ласса и Луио – представители филогенетической группы Старого Света; Мачупо, Хунин, Гуанарито, Сабиа – представители филогенетической группы Нового Света) способны вызывать у человека тяжелые проявления геморрагической лихорадки [13, 14, 15, 19, 21, 34].

К нозологическим формам относят геморрагические лихорадки Ласса и Луио, Боливийскую (БГЛ), Аргентинскую (АГЛ), Венесуэльскую (ВГЛ) и Бразильскую (БрГЛ) геморрагические лихорадки. Уровень летальности среди заболевших лихорадкой Луио и БГЛ достигает 80 % [37].

Все аренавирусы имеют сходное строение. Поскольку особенности структурной организации их генома имеют непосредственное отношение к стратегии разработки средств специфической профилактики, рассмотрим основные физико-химические и молекулярно-биологические характеристики данной группы возбудителей.

Геномная РНК состоит из двух сегментов одноцепочечной «минус» РНК (L-большой сегмент размером 7,1 тысяч нуклеотидных оснований (т.н.о.), S-малый сегмент размером 3,4 т.н.о.). РНК геномные сегменты соединены между собой консервативными комплементарными последовательностями на 3' и 5' концах [13, 19, 28].

S-сегмент кодирует белок нуклеокапсида (N) и предшественник гликопротеинов (GPC). Гены, кодирующие указанные белки, расположены у 3' и 5'-концов S-сегмента. Посттрансляционная модификация включает расщепление белка GPC на гликопротеины GP-1 и GP-2 с молекулярной массой (ММ) [23, 24]. Белок GP-1 содержит эпитопы, ответственные за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами. Белок GP-2 отвечает за проникновение вирионов через мембрану инфицированных клеток. Белок нуклеокапсида, формирует комплекс с геномной РНК [38].

L-сегмент РНК содержит гены, содержащие информацию о синтезе L-белка вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (соответствующая последовательность расположена у 3'-конца L-сегмента геномной РНК) и цинк-связанного белка (Z-белок) (соответствующая последовательность расположена у 5'-конца L-сегмента геномной РНК) [38]. Для L-сегмента характерна амбисенсная стратегия реализации генетической информации [5, 13].

В качестве основных направлений создания эффективных вакцин в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок в настоящее время рассматривается создание нескольких видов препаратов: живые вакцины на основе аттенуированных штаммов возбудителей, вакцины на основе вирусоподобных частиц, ДНК-вакцины, векторные рекомбинантные вакцины, вакцины на основе репликонов альфавирусов [12, 20, 24, 30, 32, 33].

Несмотря на разнообразие имеющихся подходов у них отчетливо просматривается общая задача – создание препарата, стоимость которого не должна препятствовать его массовому применению, вызывающего долговременный иммунитет (желательно при однократном введении) и обладающего перекрестной реактивностью по отношению к различным природным штаммам возбудителя при полном отсутствии риска возникновения поствакцинальных осложнений.

Рассмотрим наиболее значимые результаты в направлении создания эффективных вакцин в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок (таблица).

**Аттенуированные живые вакцины.** Из всех аренавирусных геморрагических лихорадок только для нозологической формы – АГЛ – разработана живая вакцина. Аттенуированный вакцинный штамм Candid 1 вируса Хунин получен в 1985 г. Вакцина на основе этого штамма изготовлена в Институте Солка (США) и применяется в Аргентине для вакцинации групп риска в эндемичных регионах с 1990 г. [27].

Результаты изучения эффективности вакцин нового поколения против аренавирусных инфекций  
Assessment results of the efficiency of new generation vaccines against arenaviral infections

Исследуемый препарат	Животные	Схема иммунизации	Иммунизирующая доза	Медиана титра антител к вирусу Ласса Эбола (обратная величина) перед инфицированием	Доля выживших животных, %	Источник
Векторная рекомбинантная вакцина на основе вируса вакцины со встроенным геном GP вируса Ласса	Макаки-резус	Двукратно	1·10 <sup>7</sup> БОЕ (в пересчете на вирус вакцины)	40 (ВНА)	100	[12]
Векторная рекомбинантная вакцина на основе вируса вакцины со встроенным геном NP вируса Ласса				10 (ВНА)	70	
ГИВ Car <sup>91</sup> вируса Мачупо	Морские свинки	Однократно	1·10 <sup>7</sup> БОЕ	640 (ВНА)	100	[18]
ДНК-вакцина LASDNA022-01-NP	Морские свинки	Трехкратно	5,0 мкг/особь	< 100 (ИФА)	40	[22]
Вакцина на основе векторной конструкции – РНК-репликона вируса ВЭЛ			0,1 мкг/особь	40 (ВНА)	100	[30]

С 1991 г. более 240 тыс. человек вакцинированы. Эффективность вакцинации превышает 95 %, при этом наблюдается снижение заболеваемости АГЛ. Так, с 2000 г. в Аргентине ежегодно регистрируют не более 20 подтвержденных случаев заболевания, в то время как до начала вакцинации этот показатель составлял сотни и тысячи [21].

В настоящее время проведено сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей штамма Candid 1 и вирулентных штаммов XJ13 и XJ44 вируса Хунин. Выявлены точечные мутации, определяющие аттенуированный фенотип [36].

Следует отметить, что вакцинный штамм Candid 1 вируса Хунин, в отличие от вирулентных штаммов данного возбудителя, индуцирует образование интерферона в макрофагах и моноцитах человека. Данное обстоятельство, видимо, является одной из причин перекрестной защиты, которую обеспечивает штамм Candid 1 при разрешении иммунитета у иммунизированных морских свинок вирулентным штаммом вируса Мачупо [25]. Тем не менее, несмотря на свою аттенуацию, штамм Candid 1 вируса Хунин является реактогенным для человека [27].

Несмотря на то, что вакцинный штамм Candid 1 вызывает перекрестную защиту экспериментальных животных при разрешении патогенными для человека аренавирусами Нового Света, продолжают исследования по разработке применительно к отдельным возбудителям аттенуированных штаммов, которые могут быть предложены в качестве кандидатов в вакцинные штаммы.

Golden J.W. *et al.* [18] получили генетически измененный вариант (ГИВ) штамма Carvallo вируса Мачупо (Car<sup>91</sup>), полностью аттенуированный для морских свинок.

Геномный анализ исходного штамма Carvallo и варианта Car<sup>91</sup> позволили определить нуклеотидные вариации, приводящие к аттенуации. Эти вариации сводятся к замене у варианта Car<sup>91</sup> в гене белка L (при сравнении кДНК геномных РНК):

- С на Т в позиции 399;

- делеции в позиции 409–443 в регионе между генами L и Z;

- замене Т на С в позициях 1683, 2883 и 2946.

Поскольку изменений в S-сегментах геномных РНК не выявлено, указанные замены в структуре L-сегмента представляют единственные различия между вирулентным штаммом Carvallo вируса Мачупо и аттенуированным ГИВ.

Авторами проведено сравнение варианта Car<sup>91</sup>, штамма Carvallo и штамма Chicava вируса Мачупо. Каждой исследуемой вирусосодержащей культурой внутрибрюшинно инфицировали по восемь морских свинок (заражающая доза 1·10<sup>3</sup> БОЕ), наблюдали гибель животных, изменение их массы и наличие у них лихорадки.

У всех животных, инфицированных штаммом Chicava, зарегистрирована лихорадка. Все животные к 24-м суткам п.и. погибли.

У животных, инфицированных штаммом Carvallo, наблюдали снижение массы тела между 9-ми и 21-ми сутками п.и., но ни у одной морской свинки не зарегистрировано лихорадки. Пять из восьми инфицированных животных погибли (летальность 62,5 %).

У животных, инфицированных вариантом Car<sup>91</sup> вируса Мачупо, признаки заболевания отсутствовали. Анализ сывороток животных, инфицированных данным вариантом Car<sup>91</sup>, взятых на 30-е сутки п.и., показал наличие ВНА в расчетных значениях T<sub>50</sub> (обратная величина титра ВНА, обеспечивающая 50 % нейтрализацию вируса), от 269 до 1251.

Иммунизация морских свинок вариантом Car<sup>91</sup> вируса Мачупо обеспечивала 100 % защиту животных не только против гомологичного вируса, но и против гетерологичного аренавируса Нового Света Гуанарито [18].

Другим направлением исследований является изучение возможности использования в качестве живой вакцины апатогенного для человека вируса Мопейя или его реассортантов с вирулентными для человека аренавирусами [26]. Так был получен

штамм МЛ-29, являющийся реассортантом вирусов Ласса и Мопейя. Данный штамм выделен при смешанном культивировании вирусов Ласса и Мопейя в культуре клеток Vero с последующим его клонированием. Геном МЛ-29 представлен L-сегментом геномной РНК вируса Мопейя и S-сегментом геномной РНК вируса Ласса. В МФА, ИФА отмечено специфическое взаимодействие антигена МЛ-29 с антителами к штаммам Джозиа и Сьера-Леоне вируса Ласса и с антителами к вирусу Мопейя. Для изучения протективных свойств МЛ-29 использовали мышей линии СВА. Животных иммунизировали дважды с интервалом 7 сут. Через 10 сут. после заключительной иммунизации мышей инфицировали интрацеребрально в дозе 10 ЛД<sub>50</sub> вируса Ласса. Установлено, что иммунизация штаммом МЛ-29 обеспечивает 100 % защиту животных [5]. Однако исследования данного препарата остановились на уровне доклинических испытаний.

Анализ практических результатов по направлению создания аттенуированных живых вакцин позволяет говорить, что практическое значение имеет только вакцина на основе аттенуированного вируса Хунин, штамм Candid 1. Низкая стоимость вакцины (цена одной иммунизирующей дозы составляет около трех долларов США) позволяет проводить массовую иммунизацию населения в сельских регионах, представляющих многочисленную группу риска. Однако разработка живых вакцин вряд ли будет оправдана при создании специфических средств профилактики против других аренавирусных инфекций человека. Не поддающиеся точной оценке риски опасности, связанные с практическим использованием вакцин на основе аттенуированных штаммов других аренавирусов, могут сделать это направление бесперспективным. Следует отметить, что областью применения вакцины на основе аттенуированного штамм Candid 1 вируса Хунин в настоящее время является профилактика заболеваний, вызываемых патогенными для человека аренавирусами Нового Света (но не Старого). При выборе возможных препаратов для иммунизации ограниченных по численности групп риска, и, в первую очередь, персонала специализированных лабораторий целесообразно рассмотреть вакцинные препараты других классов.

**Рекомбинантные вакцины.** Достижения в области генетической инженерии и молекулярной генетики возбудителей инфекционных заболеваний сделали возможным конструирование генно-инженерных конструкций (ГИК), которые могут быть использованы для создания нового поколения медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) [1, 8, 29]. ГИК представляет из себя совокупность целевого гена и вектора, который используют для его амплификации.

Используемые в настоящее время векторы можно условно разделить на две категории: вирусные и невирусные [1, 6]. Из первых наиболее часто используемыми в настоящее время являются ретрови-

русные и ортопоксвирусные [2, 3, 9].

Преимущества вируса вакцины как вектора включают в себя:

- способность экспрессии рекомбинантного гена в широком круге хозяев;
- быстрая наработка рекомбинантного белка при высокой множественности инфицирования;
- синтетические промоторы позволяют осуществлять высокие уровни экспрессии чужеродного белка и определенную степень контроля за ним;
- высокомолекулярный геном обладает высокой емкостью для встраивания чужеродной ДНК (определено более 10 сайтов для встраивания);
- при иммунизации происходит стимуляция факторов гуморального и клеточного иммунитета.

Основные элементы стратегии получения рекомбинантной вакцины в отношении аренавирусных инфекций разработаны ранее при получении векторной рекомбинантной вакцины против лихорадки Ласса. Полученные рекомбинантные штаммы вируса вакцины, экспрессировали гены нуклеопротеина (NP) или гликопротеина (GP) вируса Ласса, которые защищали лабораторных животных (морские свинки, обезьяны) против летального заражения этим вирусом. При введении рекомбинантные вирусы со встроенным геном GP обеспечивали более выраженную защиту макаков-резусов по сравнению с таковыми со встроенным геном NP [11].

Установлено, что рекомбинантный белок NP вируса Ласса при иммунизации белых мышей вызывает формирование гуморального и клеточного иммунитета. Установлена защита от гибели 53 % животных при последующем внутримозговом инфицировании вирусом Ласса, штамм Josiah [7]. Кроме того, доказано, что рекомбинантный вирус вакцины, экспрессирующий белок NP вируса Ласса, защищал иммунизированных морских свинок от последующего инфицирования вирулентным штаммом вируса Ласса [17].

Следует отметить, что именно ортопоксвирусные векторы могут иметь приоритетное значение для создания на их основе эффективных рекомбинантных вакцин против аренавирусных геморрагических лихорадок.

В качестве перспективного направления в первую очередь необходимо оценить возможность получения векторных рекомбинантных вакцин на основе штамма MVA (modified vaccinia Ankara), который в настоящее время является аттенуированным штаммом вируса вакцины.

**ДНК-вакцины.** Тем не менее, при всех преимуществах использования вирусов как векторов для создания ГИК требуемой специфичности, необходимо признать, что этот тип амплификации генов является потенциально опасным.

Вследствие этого, в настоящее время уделяется внимание разработке методов амплификации целевых генов с помощью невирусных конструкций, главным образом рекомбинантных плазмид.



Плазмида, как правило, содержит один элемент, ответственный за ее воспроизводство в микроорганизме, и остальные, которые отвечают за экспрессию целевого гена [29].

По уровню репликации бактериальные плазмиды разделяют на две группы: со строгим контролем (1–5 копий в клетке) и с ослабленным контролем (несколько десятков копий в клетке). Оба типа природных плазмид одинаково стабильно сохраняются при длительном культивировании плазмидсодержащих клеток *E. coli* [29]. К несомненным достоинствам *E. coli* относится высокий выход плазмидной ДНК и хорошо отлаженный процесс ее выделения. Наличие липополисахаридов (ЛПС) на ее поверхностной мембране позволяет использовать для очистки плазмидной ДНК метод ионообменной хроматографии.

В качестве наиболее распространенных путей доставки ДНК-вакцин в организм рассматриваются электропорация, метод *gen gun* (генное ружье) и упаковка в липосомы [16, 22].

На рубеже XX и XXI вв. ДНК-вакцины рассматривали как наиболее перспективное средство специфической профилактики особо опасных инфекционных заболеваний вирусной этиологии, в том числе и аренавирусных геморрагических лихорадок. Однако низкая иммуногенность разработанного экспериментального образца ДНК-вакцины против лихорадки Ласса [22], а также недостатки рассмотренных выше существующих методов доставки препаратов данного класса привели к уменьшению работ в этом направлении.

#### **Разработка вакцин на основе РНК-репликонов.**

Одним из наиболее перспективных направлений в сфере производства и применения вакцин в отношении особо опасных вирусных геморрагических лихорадок является разработка вакцин на основе РНК-репликонов, в частности, репликонов альфавирусов.

Репликонами называют наименьшие генетические элементы, способные к самовоспроизведению. 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. Разработка 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.

Pushko P.C. *et al.* [30] провели оценку моновалентной вакцины против вируса Ласса и бивалентной вакцины против вирусов Ласса и Эбола, основанных на векторной конструкции – РНК репликоне аттенуированного штамма венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ). Авторы изучили защитную эффективность репликонов на основе вируса ВЭЛ со встроенными генами NP и GP вируса Ласса в виде монопрепаратов и в комбинации. Морских свинок

через четыре недели после последней иммунизации инфицировали вирусом Ласса в дозе 160 LD<sub>50</sub>. У иммунизированных животных не выявлено никаких симптомов заболевания, хотя все контрольные неиммунизированные животные погибли [30].

При оценке протективных свойств смеси из двух репликонов, экспрессирующих гликопротеины вирусов Ласса и Эбола, а также векторного репликона с двойной экспрессией генов GP данных возбудителей, установлено наличие экспрессии генов и трансляции гликопротеинов обоих вирусов, к которым вырабатывались специфические антитела [30]. Защита от летальной инфекции морских свинок, иммунизированных смесью двух репликонов и двухэкспрессирующим репликоном, после заражения заведомо летальной дозой вирусов Ласса и Эбола при относительно невысоком титре антител против GP вируса Ласса указывает на то, что основную протективную роль против вируса Ласса играют факторы клеточного иммунитета (в частности, CD4<sup>+</sup> киллерные клетки) [30].

В ходе оценки защитной эффективности вакцины на основе репликона вируса ВЭЛ (штамм TC83), содержащего вставку гена предшественника гликопротеинов (GPC) РНК вируса Хунин, установлено, что через семь недель после однократной подкожной иммунизации у четырех из пяти морских свинок титр специфических антител находился в диапазоне от 1:5 до 1:160. После бустерной иммунизации титр нейтрализующих антител повысился у всех животных и составлял 1:640...1:2560. При разрешающем инфицировании иммунизированных морских свинок в дозе 100 ЛД<sub>50</sub> вируса Хунин все иммунизированные животные выжили [35].

Разработанная конструкция содержала РНК элементы и гены неструктурных белков генома вируса ВЭЛ, которые требуются для репликации и транскрипции субгеномной РНК, то есть 5' и 3'-концы нетранслируемой области, субгеномный промотор, локализованный выше субгеномного РНК-транскрипционного сайта, и концевой кодон открытой рамки считывания гена неструктурного белка. Наличие экспрессии GPC в клетках Vero, инфицированных упакованным репликоном, подтверждено при использовании моноклональных антител к гликопротеину G1 [35].

Полученные результаты указывают на возможность разработки эффективной не реактогенной вакцины в отношении АГЛ.

Анализ данных по имеющимся вакцинным препаратам против геморрагических лихорадок, вызываемых аренавирусами Старого и Нового Света, позволяет сделать следующие выводы:

- наличие эффективной живой вакцины против АГЛ, обладающей перекрестной активностью в отношении других аренавирусных геморрагических лихорадок Нового Света, определяет требования к свойствам вакцин нового поколения в отношении соответствующих нозологических форм;

- отсутствие живой вакцины против аренавирусных геморрагических лихорадок Старого Света, и, в первую очередь, против лихорадки Ласса, обуславливает актуальность исследований по получению вакцин нового поколения в отношении соответствующих нозологических форм.

Разработки эффективных средств специфической профилактики нового поколения еще достаточно далеки от завершения, поэтому исследования в этой области являются актуальными для обеспечения биологической безопасности Российской Федерации.

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

### Список литературы

- Альтштейн А.Д. Вирусные инфекции и генетическая инженерия. *Биотехнология*. 1987; 3(3):276–83.
- Беляев А.С., Дмитриев И.П., Игнатьев Г.М., Мизенко Г.А., Путинцева Н.И., Сабиров А.Н., Самуков В.В., Семенов Л.Н., Аммосов А.Д., Рукавишников М.Ю., Красавина И.Н., Муратов П.Ю., Микрюков И.Н., Шевлягина Л.Р., Константинов А.П., Сандахчиев Л.С. Рекombинантный вирус осповакцины, экспрессирующий средний рге-S2-S-белок оболочки вируса гепатита В. Индукция гуморального и клеточного иммунитета при иммунизации лабораторных животных. Доклады Академии наук СССР. 1990; 314(2):488–91.
- Борисевич С.В., Михайлов В.В., Бектемиров Т.А., Перекрест В.В., Махлай А.А., Подкуйко В.Н., Борисевич И.В., Ручко В.М., Стомба Л.Ф., Левитов А.Т., Логинова С.Я., Кириллов В.Б., Максимов В.А., Рыбак С.И., Васильев Н.Т. Оценка возможности использования аттенуированных штаммов вируса вакцины для конструирования на их основе рекombинантной вакцины против СПИДа. *Русский журнал ВИЧ/СПИД и родственные проблемы*. 2001; 5(2):75–89.
- Борисевич И.В., Маркин В.А., Фирсова И.В., Хамитов Р.А., Максимов В.А., Евсеев А.А. Эпидемиология, профилактика и лечение геморрагических лихорадок (Марбург, Эбола, Ласса и Боливийской). *Вопросы вирусологии*. 2006; 5(51):8–16.
- Васючков А.Д., Фидаров Ф.М., Лукашевич И.С. Штамм-реассортант вирусов Ласса и Мопейя для получения иммунобиологических препаратов. Патент СССР № 4899495/13, опубл. 1991.
- Вирусные геморрагические лихорадки. Доклад комитета экспертов ВОЗ. Женева; 1986. 120 с.
- Игнатьев Г.М. Иммуногенные и протективные свойства рекombинантного белка NP вируса Ласса. *Вопросы вирусологии*. 2002; 2:28–31.
- Полимеразная цепная реакция (polymerase chain reaction, PCR) раздел «генная инженерия». Биотехнология. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8\\_2.htm](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_2.htm) (дата обращения 10.05.2017).
- Прасолов В.С., Иванов Д.С. Ретровирусные векторы в генной терапии. *Вопросы медицинской химии*. 2000; 46(3):207–25.
- Abraham J., Kwong J.A., Albariño C.G., Lu J.G., Radonitzky S.R., Salazar-Bravo J., Farzan M., Spiropoulou C.F., Choe H. Host-species transferring receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic New World Clade B arenaviruses. *PLoS Pathog.* 2009; 5(4):e1000358. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000358.
- Auperin D.D., Esposito J.J., Lange J.V., Bauer S.P., Knight J., Sasso D.R., McCormick J.B. Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the Lassa virus glycoprotein gene and protection of guinea pigs from a lethal Lassa virus infection. *Virus. Res.* 1988; 9(2–3):233–48. PMID: 3354260.
- Branco L.M., Grove J.N., Geske F.J., Bolsen M.L., Muncy I.J., Magliaro S.A., Henderson L.A., Schoepp R.J., Cashman K.A., Hensley L.E., Garry R. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *Viol.* 2010; 7:279. DOI: 10.1186/1743-422X-7-279.
- Cajimat M.N.B. Genetic diversity and taxonomical relationships among the Tacaribe serocomplex viruses (family *Arenaviridae*). Dph Dissertation. Texas University Press; 2007. 98 с.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bolivian hemorrhagic fever – El Beni Department, Bolivia 1994. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1994; 43(50):943–6. PMID: 7990799.
- Charrel R.N., de Lamballerie X. Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral. Res.* 2003; 57(1–2):89–100. DOI: 10.1016/S0166-3542(02)00202-4.
- Chattergoon M., Boyer J., Weiner D.B. Genetic immunization a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J.* 1997; 11(10):753–63. PMID: 9271360.
- Clegg J.C., Lloyd G. Vaccine recombinant expressing Lassa-virus internal nucleocapsid protein protects guinea pigs against Lassa fever. *Lancet.* 1987; 2(8552):186–8. PMID: 2885642.
- Golden J.W., Beitzel B., Ladner J.T., Mucker E.M., Kwilas S.A., Palacios G., Hooper J.W. An attenuated Machupo virus with a disrupted L-segment intergenic region protects guinea pigs against lethal Guanarito virus infection. *Sci. Rep.* 2017; 7:4679. DOI: 10.1038/s41598-017-04889-x.
- Gonsales J.P., Bowen M.D., Nichol S.T., Rico-Hesse R. Genetic characterization and phylogeny of Sabia virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology.* 1996; 221(2):318–24. DOI: 10.1006/viro.1996.0381.
- Dupuy L.C., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefence. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8(12):1739–54. DOI: 10.1586/erv.09.132.
- Enria D., Barrera O.J.G. Junin virus vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002; 263:239–61. PMID: 11987817.
- Ferraro B., Morrow M.P., Huntick N.A., Shin T.H., Lucke C.E., Weiner D.B. Clinical application of DNA vaccines: current progress. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 53(3):296–302. DOI: 10.1093/cid/cir334.
- Gonsales J.P., Bowen M.D., Nichol S.T., Rico-Hesse R. Genetic characterization and phylogeny of Sabia virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology.* 1996; 221(2):318–24. DOI: 10.1006/viro.1996.0381.
- Grant-Klein R.J., Altamura L.A., Schmaljohn C.S. Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Virus. Res.* 2011; 162(1–2):148–61. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.09.005.
- Huang C., Kolokoltseva O.A., Yun N.E., Seregin A.V., Poussard A.L., Walker A.G., Brasier A.R., Zhao Y., Tian B., de la Torre J.C., Paessler S. Junin virus infection activates the types I interferon pathway in a PIG-1-dependent manner. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(5):e1659. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001659.
- Iwasaki M., Cubbit B., Teijaro J.R., de la Torre J.C. General molecular strategy for development of arenavirus live-attenuated vaccines. *J. Virol.* 2015; 89(23):12166–77. DOI: 10.1128/jvi.02075-15.
- Maiztegui J.L., McKee K.T.Jr., Barrera Oro J.G., Harrison L.H., Gibbs P.H., Feuillade M.R., Enria D.A., Briggiler A.M., Levis S.C., Ambrosio A.M., Halsey N.A., Peters C.J. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *AHF Study Group. J. Infect. Dis.* 1998; 177(2):277–83. PMID: 9466512.
- 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.
- Potential use of live viral and bacterial vectors for vaccines: WHO meeting, Geneva, June 19–22, 1989. *Vaccine.* 1990; 8(5):425–37. DOI: 10.1016/0264-410X(90)90241-D.
- Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P.B., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001; 75(23):11677–85. DOI: 10.1128/jvi.75.23.11677-11685.2001.
- Radoshitzky S.R., Bao Y., Buchmeier M.J., Charrel R.N., Clawson A.N., Clegg C.S., DeRisi J.L., Emonet S., Gonzales J.P., Kuhn J.H., Lukashevich I.S., Peters C.J., Romanowski V., Salvato M.S., Stanglone M.D., de la Torre J.C. Past, present and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* 2015; 160(7):1851–74. DOI: 10.1007/s00705-015-2418-y.
- 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. *Expert. Opin. Drug. Discov.* 2012; 7(7):613–32. DOI: 10.1517/17460441.2012.687719.
- Rayner J.O., Dryga S.A., Kamrud K.I. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(5):279–96. DOI: 10.1002/rmv.360.
- Salas R., Pacheco M.E., Ramos B., Taibo M.E., Jaimes E., Vasquez C., Querales J., de Manzione N., Godoy O., Betancourt A., Araoz F., Bruzual R., Garcia J., Tesh R.B., Rico-Hesse R., Shops R.E. Venezuelan hemorrhagic fever. *Lancet.* 1991; 338(8774):1033–6. DOI: 10.1016/0140-6736(91)91899-6.
- Seregin A.V., Yun N.E., Poussard A.L., Peng B.H., Smith J.K., Smith J.N., Paessler S. TC83 replicon vectored vaccine provides protection against Junin virus in guinea pigs. *Vaccine.* 2010; 28(30):4713–8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.077.
- Stephan B.I., Lozano M.E., Goñi S.E. Watching every step of the way: Junin virus attenuation markers in the vaccine lineage. *Curr. Genomics.* 2013; 14(7):415–24. DOI: 10.2174/138920291407131220153526.
- Vela E. Animal models, profilaxis, and therapeutics for Arenavirus infection. *Viruses.* 2012; 4(9):1802–9. DOI: 10.3390/v4091802.
- Weber E.B., Buchmeier M.J. Fine mapping of a peptide se-



quence containing an antigenic site conserved among arenaviruses. *Virology*. 1988; 164(1):30–8. DOI: 10.1016/0042-6822(88)90616-2.

## References

- Al'tshtein A.D. [Viral infections and genetic engineering]. *Biokhimiya*. 1987; 3(3): 276–83.
- Belyaev A.S., Dmitriev I.P., Ignat'ev G.M., Mizenko G.A., Putintseva N.I., Sabirov A.N., Samukov V.V., Semenova L.N., Ammosov A.D., Rukavishnikov M.Yu., Krasavina I.N., Muratov P.Yu., Mikryukov I.N., Shevlyagina L.R., Konstantinov A.P., Sandakhchiev L.S. [Recombinant vaccinia virus expressing medium pre-S2-S-protein of the husk of Hepatitis B virus. Induction of humoral and cellular immunity in case of laboratory animals' vaccination]. *Reports of the Academy of Sciences of USSR*. 1990; 314 (2): 488–91.
- Borisevich S.V., Mikhailov V.V., Bektimirov T.A., Perekrest V.V., Makhlay A.A., Podkuiko V.N., Borisevich I.V., Ruchko V.M., Stobva L.F., Levitov A.T., Loginova S.Ya., Kirillov V.B., Maksimov V.A., Rybak S.I., Vasil'ev N.T. [Assessment of the possibility of using attenuated vaccinia strains for the construction of recombinant vaccine against AIDS]. *Russky Zhurnal VICH/SPID i Rodstvennye Problemy*. 2001; 5(2): 75–89.
- Borisevich I.V., Markin V.A., Firsova I.V., Khaitov R.A., Maksimov V.A., Evseev A.A. [Epidemiology, prophylaxis and treatment of hemorrhagic fevers (Marburg, Ebola, Lassa, Bolivian one)]. *Voprosy Virusologii*. 2006; 5(51): 8–16.
- Vasyukov A.D., Fidarov F.M., Lukashevich I.S. [Strain-reassortant of Lassa and Mopeya viruses for immune-biological preparation production]. *USSR Patent No 4899495/13*, 1991.
- [Viral Hemorrhagic Fevers]. Report of the WHO Expert Committee. Geneva, 1986. 120 p.
- Ignat'ev G.M. [Immunogenic and protective properties of recombinant protein NP of Lassa virus]. *Voprosy Virusologii*. 2002; 2: 28–31.
- [Polymerase chain reaction, PCR; "Gene Engineering" Section]. *Biokhimiya*. [Internet]. (Cited 10 May 2017). Available from: [http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8\\_2.htm](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_2.htm).
- Prasolov V.S., Ivanov D.S. [Retroviral vectors in gene therapy]. *Voprosy Meditsinskoj Khimii*. 2000; 46(3):207–25.
- Abraham J., Kwong J.A., Albariño C.G., Lu J.G., Radonitzky S.R., Salazar-Bravo J., Farzan M., Spiropoulou C.F., Choe H. Host-species transferring receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic New World Clade B arenaviruses. *PLoS Pathog.* 2009; 5(4):e1000358. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000358.
- Auperin D.D., Esposito J.J., Lange J.V., Bauer S.P., Knight J., Sasso D.R., McCormick J.B. Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the Lassa virus glycoprotein gene and protection of guinea pigs from a lethal Lassa virus infection. *Virus. Res.* 1988; 9(2–3):233–48. PMID: 3354260.
- Branco L.M., Grove J.N., Geske F.J., Bolsen M.L., Muncy I.J., Magliaro S.A., Henderson L.A., Schoepp R.J., Cashman K.A., Hensley L.E., Garry R. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *Virol. J.* 2010; 7:279. DOI: 10.1186/1743-422X-7-279.
- Cajimat M.N.B. Genetic diversity and taxonomical relationships among the Tacaribe serocomplex viruses (family *Arenaviridae*). Dph Dissertation. Texas University Press; 2007. 98 c.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bolivian hemorrhagic fever – El Beni Department, Bolivia 1994. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1994; 43(50):943–6. PMID: 7990799.
- Charrel R.N., de Lamballerie X. Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral. Res.* 2003; 57(1–2):89–100. DOI: 10.1016/S0166-3542(02)00202-4.
- Chattergoon M., Boyer J., Weiner D.B. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J.* 1997; 11(10):753–63. PMID: 9271360.
- Clegg J.C., Lloyd G. Vaccine recombinant expressing Lassa-virus internal nucleocapsid protein protects guinea pigs against Lassa fever. *Lancet*. 1987; 2(8552):186–8. PMID: 2885642.
- Golden J.W., Beitzel B., Ladner J.T., Mucker E.M., Kwilas S.A., Palacios G., Hooper J.W. An attenuated Machupo virus with a disrupted L-segment intergenic region protects guinea pigs against lethal Guanarito virus infection. *Sci. Rep.* 2017; 7:4679. DOI: 10.1038/s41598-017-04889-x.
- Gonsales J.P., Bowen M.D., Nichol S.T., Rico-Hesse R. Genetic characterization and phylogeny of Sabiá virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology*. 1996; 221(2):318–24. DOI: 10.1006/viro.1996.0381.
- Dupuy L.C., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefence. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8(12):1739–54. DOI: 10.1586/erv.09.132.
- Enria D., Barrera O.J.G. Junin virus vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002; 263:239–61. PMID: 11987817.
- Ferraro B., Morrow M.P., Huntick N.A., Shin T.H., Lucke C.E., Weiner D.B. Clinical application of DNA vaccines: current progress. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 53(3):296–302. DOI: 10.1093/cid/cir334.
- Gonsales J.P., Bowen M.D., Nichol S.T., Rico-Hesse R. Genetic characterization and phylogeny of Sabiá virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology*. 1996; 221(2):318–24. DOI: 10.1006/viro.1996.0381.
- Grant-Klein R.J., Altamura L.A., Schmaljohn C.S. Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Virus. Res.* 2011; 162(1–2):148–61. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.09.005.
- Huang C., Kolokoltseva O.A., Yun N.E., Seregin A.V., Poussard A.L., Walker A.G., Brasier A.R., Zhao Y., Tian B., de la Torre J.C., Paessler S. Junin virus infection activates the types I interferon pathway in a PIG-1-dependent manner. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(5):e1659. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001659.
- Iwasaki M., Cubbit B., Teijaro J.R., de la Torre J.C. General molecular strategy for development of arenavirus live-attenuated vaccines. *J. Virol.* 2015; 89(23):12166–77. DOI: 10.1128/jvi.02075-15.
- Maiztegui J.L., McKee K.T.Jr., Barrera Oro J.G., Harrison L.H., Gibbs P.H., Feuillade M.R., Enria D.A., Briggiler A.M., Levis S.C., Ambrosio A.M., Halsey N.A., Peters C.J. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *AHF Study Group. J. Infect. Dis.* 1998; 177(2):277–83. PMID: 9466512.
- 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.
- Potential use of live viral and bacterial vectors for vaccines: WHO meeting, Geneva, June 19–22, 1989. *Vaccine*. 1990; 8(5):425–37. DOI: 10.1016/0264-101X(90)90241-D.
- Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P.B., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001; 75(23):11677–85. DOI: 10.1128/jvi.75.23.11677-11685.2001.
- Radoshitzky S.R., Bao Y., Buchmeier M.J., Charrel R.N., Clawson A.N., Clegg C.S., DeRisi J.L., Emonet S., Gonzales J.P., Kuhn J.H., Lukashevich I.S., Peters C.J., Romanowski V., Salvato M.S., Stangl M.D., de la Torre J.C. Past, present and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* 2015; 160(7):1851–74. DOI: 10.1007/s00705-015-2418-y.
- 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. *Expert. Opin. Drug. Discov.* 2012; 7(7):613–32. DOI: 10.1517/17460441.2012.687719.
- Rayner J.O., Dryga S.A., Kamrud K.I. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(5):279–96. DOI: 10.1002/rmv.360.
- Salas R., Pacheco M.E., Ramos B., Taibo M.E., Jaimes E., Vasquez C., Querales J., de Manzione N., Godoy O., Betancourt A., Araoz F., Bruzual R., Garcia J., Tesh R.B., Rico-Hesse R., Shops R.E. Venezuelan hemorrhagic fever. *Lancet*. 1991; 338(8774):1033–6. DOI: 10.1016/0140-6736(91)91899-6.
- Seregin A.V., Yun N.E., Poussard A.L., Peng B.H., Smith J.K., Smith J.N., Paessler S. TC83 replicon vectored vaccine provides protection against Junin virus in guinea pigs. *Vaccine*. 2010; 28(30):4713–8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.077.
- Stephan B.I., Lozano M.E., Goñi S.E. Watching every step of the way: Junin virus attenuation markers in the vaccine lineage. *Curr. Genomics*. 2013; 14(7):415–24. DOI: 10.2174/138920291407131220153526.
- Vela E. Animal models, prophylaxis, and therapeutics for Arenavirus infection. *Viruses*. 2012; 4(9):1802–9. DOI: 10.3390/v4091802.
- Weber E.B., Buchmeier M.J. Fine mapping of a peptide sequence containing an antigenic site conserved among arenaviruses. *Virology*. 1988; 164(1):30–8. DOI: 10.1016/0042-6822(88)90616-2.

## Authors:

Sizikova T.E., Lebedev V.N., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V. 48<sup>th</sup> Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Possad, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mail.ru.

## Об авторах:

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Поступила 21.06.18.

Отправлена на доработку: 28.05.18.

Принята к публ.: 04.06.18.