

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

на правах рукописи

Волкова Наталья Вячеславовна

Получение экспериментальных ДНК-вакцин против лихорадки Марбург

1.5.3 – молекулярная биология

1.5.10 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

к.б.н. Щербаков Д.Н.

д.б.н. Казачинская Е.И.

Кольцово – 2021

Оглавление	
Список сокращений	6
Введение	8
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Структура MARV и основные его составляющие белки	13
1.2 Цикл репликации MARV	16
1.3 Мировой опыт по созданию вакцины против заболевания, вызванного MARV	19
1.3.1 Инактивированные вирусные и субъединичные белковые вакцины	20
1.3.2 Вакцины на основе репликонов вируса венесуэльского энцефалита лошадей.....	22
1.3.3. Вакцины на основе вируса везикулярного стоматита	23
1.3.4. Вакцины на основе вируса осповакцины	26
1.3.5. Вакцины на основе рекомбинантного цитомегаловируса.....	27
1.3.6. Вакцины на основе аденовирусного вектора	28
1.3.7. Вакцины на основе вирусоподобных частиц	29
1.3.8. ДНК-вакцины.....	31
1.3.8.1 Механизмы действия ДНК-вакцин.....	34
1.3.8.2 Конструирование ДНК-вакцины	37
Заключение по обзору литературы	40
Глава 2. Материалы и методы	42
2.1 Материалы	42
2.1.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы	42
2.1.2 Олигонуклеотидные праймеры и нуклеотидные последовательности структурных белков MARV	43

2.1.3 Растворы и питательные среды	43
2.1.4 Бактериальные штаммы <i>E. coli</i>	45
2.1.5 Культуры клеток.....	45
2.1.6 Лабораторные животные.....	45
2.2 Методы.....	46
2.2.1 Теоретический анализ, подбор праймеров для амплификации последовательностей, кодирующих структурные белки GP, NP и VP40 MARV	46
2.2.2 Полимеразная цепная реакция.....	47
2.2.3 Ферментативный гидролиз	47
2.2.4 Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле	47
2.2.5 Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля.....	47
2.2.6 Лигирование	48
2.2.7 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	48
2.2.8 Heat-shock трансформация.....	49
2.2.9 Отбор клонов для рестрикционного анализа	49
2.2.10 Определение нуклеотидной последовательности ДНК отобранных клонов	49
2.2.11 Программные обеспечения, используемые в работе	50
2.2.12 Трансфекция	50
2.2.16 Культивирование клеток <i>E. coli</i> штамма Neb Stable, трансформированные ДНК-вакциной конструкцией.....	52
2.2.17 Выделение ДНК.....	52
2.2.18 Иммунизация мышей линии Balb/c	53
2.2.19 Выделение спленоцитов у иммунизированных мышей линии Balb/c..	53
2.2.20 Стимуляция спленоцитов иммунизированных мышей линии Balb/c...	54

2.2.21 Метод внутриклеточного окрашивания цитокинов.....	54
2.2.22 Проведение анализа ELISPOT	55
2.2.23 Иммунизация морских свинок.....	56
2.2.24 Твердофазный иммуноферментный анализ	56
2.2.25 Антигены для оценки наличия специфических антител у иммунизированных животных	57
2.2.26 Реакция нейтрализации	58
2.2.27 Определение нейтрализующего титра сывороток крови при помощи анализа ингибирования бляшкообразования на культуры клеток Vero	59
2.2.28 Заражение морских свинок MARV	60
2.2.29 Статистическая обработка полученных результатов	60
ГЛАВА 3 Результаты и обсуждения	61
3.1 Дизайн и конструирование ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-GPDM	61
3.2 Дизайн и конструирование ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-2PM .	68
3.3 Дизайн и конструирование ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-3PM .	75
3.4 Изучение экспрессии целевых генов в клетках HEK293T, трансфицированных полученными плазмидами	83
3.5 Исследование способности экспериментальных ДНК-вакцинных конструкций стимулировать гуморальный и Т-клеточный иммунные ответы у мышей линии Balb/c.....	87
3.5.1 Анализ специфических антител сывороток крови мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями	87
3.5.2 Выбор антигенных пептидов для проведения Т-клеточного ответа	90

3.5.3 Сравнительное исследование иммуногенности ДНК-конструкций и выбор перспективного вакцинного кандидата, который индуцирует наиболее высокие уровни MARV-специфических ответов CD4+ и CD8+	91
3.6 Исследование способности ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-GPDM защищать морских свинок от инфекции, вызванной MARV	95
3.6.1 Анализ титров специфических антител сывороток морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM	95
3.6.2 Определение вируснейтрализующей активности антител в сывороток крови животных, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM	98
3.6.3 Оценка протективной эффективности экспериментальной ДНК-вакцины pVAKS-GPDM	101
Заключение	104
Список литературы	109
Благодарности	127

Список сокращений

АГ – антиген

а.о – аминокислотный остаток

АПК – антигенпрезентирующие клетки

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВВС – вирус везикулярного стоматита

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

В/см – вольт на сантиметр

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

дцДНК – двухцепочечной ДНК

ед. а – единиц активности

ИФА – иммуноферментный анализ

Мин – минуты

мМ – миллимоль

мкл – микролитр

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НТО – нетранслируемая область

ПААГ – полиакриламидный гель

ПАБ – патогенные биологические агенты

пМоль – пикомоль

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНП – рибонуклеопротеидный комплекс

ТМБ – 3,3'-Диаминобензидин

ТСБ-Т – трис-солевой буфер с TWEEN-20

Ц/ф – центрифугирование

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

AdV – (Adeno-based vaccines) аденовирусный вектор

CMV – (Cytomegalovirus) цитомегаловирус

E. coli – (*Escherichia coli*) кишечная палочка

EF – (Ebola Fever) лихорадка Эбола

GP – (glycoprotein) гликопротеин

GPDM – гликопротеин с делецией муциноподобного домена

IPTG – (isopropyl- β -D-thiogalactoside) изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

IFN γ – (interferon gamma) интерферон гамма

MARV – (Marburgvirus) вирус Марбург

MHC – (major histocompatibility complex) главный комплекс гистосовместимости

MLD – (mucin-like domain) муциноподобный домен

Nabs – (neutralizing antibodies) нейтрализующие антитела

NK – (natural killers) натуральные киллеры

NHPs – (non-human primates) нечеловекообразные приматы

NP – (nucleoprotein) нуклеопротеин

PBS – (phosphate-buffered saline) фосфатно-солевой буфер

PRR – (pattern-recognition receptors) образ-распознающие рецепторы

rRABV – (recombinant rabies virus) рекомбинантный вирус бешенства

rVSV – (recombinant vesicular stomatitis virus) рекомбинантный вирус везикулярного стоматита

SOB – Super Optimal Broth

VEEV – (Venezuelan equine encephalitis virus) вируса венесуэльского энцефалита лошадей

VLPs – (virus-like particle) вирусоподобные частицы

VRP – (virus-like replicon particles) вирусоподобные частицы репликона

Введение

Вирус Марбург (MARV) вызывает у людей и приматов лихорадку Марбург – заболевание, характеризующееся тяжёлым течением, высоким уровнем контагиозности и летальности (от 30 до 90%) (Schuh A.J. et al., 2017). Инфицирование людей MARV может происходить воздушно-капельным путём, при попадании вируса на конъюнктивы, а также на кожу (случайные уколы иглой или порезы), не исключается возможность полового пути передачи инфекции (вирус обнаруживался в семенной жидкости). Согласно современным литературным данным, природным резервуаром MARV являются рукокрылые вида *Rousettus aegyptiacus* (Pourrut X. et al., 2009; Towner J.S. et al., 2009; Amman B.R. et al., 2014; Schuh A.J. et al., 2017).

MARV занесен Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) в список патогенов, представляющих высокий риск для национальной безопасности и здравоохранения, и требующих разработки вакцин (Qiu X. et al., 2014). До сих пор простая удача или совпадение не позволяют лихорадке Марбург перерасти в более серьезные эпидемии, нет гарантии, что данное заболевание не окажется причиной более масштабной вспышки.

Отсутствие профилактических вакцин и терапевтических препаратов против заболевания, вызванного MARV – основная проблема, с которой сталкиваются врачи в очагах эпидемий и ученые, участвующие в исследовании этиологического агента этой болезни в лабораториях.

Получение вакцинных препаратов против лихорадки Марбург на основе инактивированного возбудителя не увенчалось успехом (Игнатьев Г.М. и др., 1991). В настоящее время ведутся работы по получению профилактических препаратов против заболевания, вызванного MARV, на основе репликонов вируса венесуэльского энцефалита лошадей, рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, модифицированного вируса осповакцины, аденовирусных векторов, вирусоподобных частиц и ДНК-конструкций (Волкова Н.В. и др., 2018). До клинических исследований (1 и 3 фазы испытаний) дошли вакцины на основе штамма Анкара вируса

осповакцины, аденовирусного вектора, рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, а также ДНК-вакцины (Suschak J. et al., 2019).

Одним из перспективных направлений являются ДНК-вакцины, так как они просты в конструировании и производстве, а также безопасны для человека. Существенным преимуществом является стабильность препаратов на основе ДНК, что может быть важным фактором в странах Африки с жарким климатом и слабым развитием инфраструктуры. Кроме того, при ДНК-иммунизации происходит формирование иммунного ответа только на целевой белок, в отличие от препаратов на основе вирусных векторов, в случае которых иммунитет направлен также на сам вирусный вектор.

Цель исследования: Конструирование и исследование специфической активности экспериментальных ДНК-вакцин против лихорадки Марбург, включающих гены структурных белков GP, NP и VP40.

Задачи исследования:

1. Провести дизайн и конструирование ДНК-вакцинных конструкций, включающих гены, кодирующие белки вируса Марбург и подтвердить экспрессию продуктов целевых генов.
2. Исследовать способность полученных ДНК-вакцинных конструкций стимулировать MARV-специфические ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у мышей линии Balb/c.
3. Провести сравнительное исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций и определить, какая из конструкций индуцирует наиболее высокие уровни MARV-специфические ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.
4. Изучить нейтрализующую активность сывороток крови животных, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями с использованием псевдовирусов и инактивированного MARV.
5. Исследовать протективность ДНК-вакцинных конструкций с использованием лабораторных животных.

Научная новизна и практическая ценность работы:

1. Впервые проведен дизайн ДНК-вакцинных конструкций pVAKS-2PM и pVAKS-3PM против лихорадки Марбург, включающих одновременно два структурных белка NP и VP40 и три белка NP, VP40 и GP MARV в качестве основы профилактической ДНК-вакцины.

2. Впервые показано, что трансфекция клеток HEK293T одновременно двумя ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM, и только одной плазмидой pVAKS-3PM приводит к формированию вирусоподобных частиц морфологически и иммунохимически схожих с нативным MARV.

3. Впервые в одном эксперименте при помощи методов Elispot и ICS проверена способность ДНК-вакцинных конструкций pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM индуцировать антиген-специфический CD4+ и CD8+T-клеточный иммунный ответ у мышей Balb/c.

4. Показано, что трехкратная иммунизация морских свинок экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM обеспечивает формирование антител, нейтрализующих псевдовирусы, содержащие поверхностный гликопротеин MARV.

5. Показано, что трехкратная иммунизация морских свинок экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM обеспечивает защиту морских свинок от летальной дозы MARV при внутримышечном введении.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Трансфекция клеток HEK293T одновременно двумя ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM, и только одной плазмидой pVAKS-3PM приводит к формированию вирусоподобных частиц морфологически и иммунохимически схожих с нативным MARV.

2. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM, содержащая ген, кодирующий поверхностный гликопротеин MARV без муциноподобного домена, при внутримышечной иммунизации морских свинок индуцирует

наработку антител, обладающих нейтрализующей активностью против MARV.

3. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM, содержащая ген, кодирующий поверхностный гликопротеин MARV без муциноподобного домена, обеспечивает защиту морских свинок от летальной инфекции, вызванной MARV.

Вклад автора:

Все основные эксперименты, включая дизайн и конструирование ДНК-вакцинных конструкций pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM их наработку для иммунизации, а также иммунизацию лабораторных животных (морских свинок и мышей линии Balb/c) и забор крови для анализа выполнены автором лично. Автором лично были проведены обработка и анализ результатов, подготовка публикаций и выступления на конференциях.

Иммунохимический анализ сывороток животных выполнен совместно с зав. сектором гибридных технологий отдела биоинженерии Казачинской Е.И. Нарработку препаративного количества рекомбинантных белков для постановки ИФА автор выполнял совместно со старшим научным сотрудником отдела Ивановой А.В. Определение нейтрализующей активности сывороток животных на псевдовиральной системе выполнен совместно со стажером-исследователем Зыбкиной А.В.

Заражение морских свинок MARV и постановка вируснейтрализации на культуре клеток Vero проводилось в лаборатории 4-го уровня биобезопасности ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора старшим научным сотрудником отдела «Коллекции микроорганизмов» Зайковской А.В. и зав. отделом «Коллекции микроорганизмов» Пьянковым О.В. Анализ образцов с помощью электронной микроскопии выполнен зав. отделом «Микроскопических исследований» Тарановым О.С. и в.н.с. Зайцевым Б. Н. Анализ Т-клеточного ответа проводили научные сотрудники отдела биоинженерии Старостина Е.В. и Боргоякова М.Б., а также стажер-исследователь Задорожным А.М. Синтез праймеров для создания ДНК-

вакцинных конструкций выполнен к.б.н., зав. лабораторией синтетической биологии ИХБФМ СО РАН Шевелевым Г.Ю. Секвенирование плазмидной ДНК выполнено сотрудником ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. к.б.н. Бондарем А.А.

Апробация работы:

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в реферируемых научных журналах, 8 тезисов. Результаты работы представлены на российских и международных конференциях:

1. VI Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2019 (22-25 октября 2019 г., р.п. Кольцово).

2. VI Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (30 октября-2 ноября 2019 г. Сочи.)

3. VII Международная научная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2020 (р.п. Кольцово, 22-25 октября 2020 г).

Структура и объем диссертации:

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 127 страницах, включает 34 рисунка, 4 таблицы. Список литературы включает 174 источника.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Структура MARV и основные его составляющие белки

MARV является одним из первых представителей семейства *Filoviridae*, с которым столкнулись ученые (Siebert R. et al., 1967). Первые случаи заражения вирусом были зафиксированы в лабораториях городов Марбург (Германия) (Чумаков М.П. и др., 1968; Bonin O., 1969) и Белград (Югославия, ныне Сербия) (Martini G., 1969). Тогда заболели работники, которые имели контакт с культурой клеток почек обезьян вида *Cercopithecus aethiops*. Из 31-ого случая заражения 7 закончились летальным исходом. После этого случая было еще несколько небольших вспышек болезней, вызванных MARV. В итоге, с первого случая заражения MARV и по сей день погибло более 400 человек (Qiu X. et al., 2014). В отличие от своего родственника вируса Эбола (EBOV) (вспышка 2014-2016 году, тогда погибло более 11 000 человек) он нанес не слишком большой урон, однако нет гарантии, что заболевания, вызванные MARV, не окажутся причиной более масштабной эпидемии (Qiu X. et al., 2014).

Филовирусные частицы длинные и нитевидные. Частицы могут образовывать удлинённые стержни или изгибаться один, или несколько раз, придавая им вид струны (рисунок 1А). Необычная морфология стала причиной названия этой группы вирусов – *Filoviridae* от латинского «*filum*», что означает «нить». Хотя нити вириона имеют постоянный диаметр около 80 нм, длина частиц может меняться. Было определено, что средняя длина вириона для инфекционной частицы составляет около 900 и 1000 нм для MARV и EBOV соответственно (Geisbert T.W. et al., 1995).

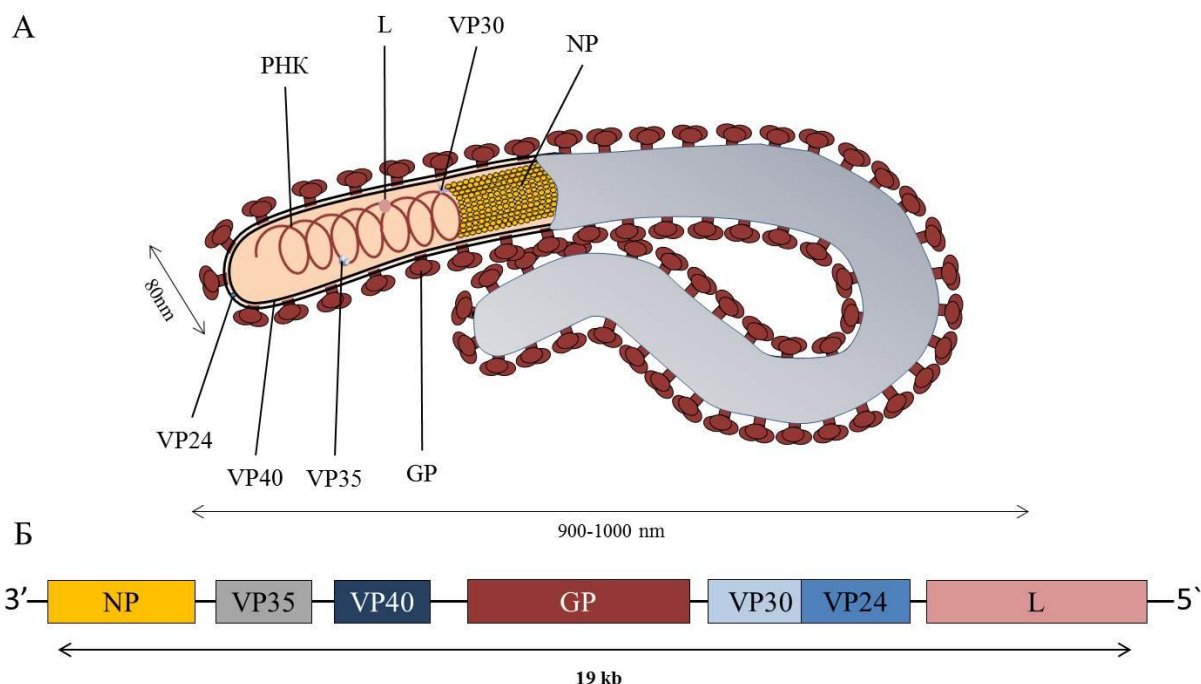


Рисунок 1. Схематическое изображение структуры и генома MARV
А. Структура вируса MARV.

Б. Геном изображен в ориентации от 3' до 5'. Гены названы в честь белков, кодируемых каждым из них. В геноме MARV выявлено 7 открытых рамок трансляции: поверхностный гликопротеин GP, четыре белка нуклеокапсида – NP, VP35, VP30, РНК-зависимая РНК-полимераза L, два матричных белка VP40, VP24. Филовирусы имеют необычно длинные некодирующие области на 5'- и 3'-концах их мРНК. Области генома, соответствующие этим небелковым кодирующим последовательностям, не масштабированы.

Геном MARV представлен в виде линейной одноцепочечной односегментированной (-) РНК: 3' -NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5' (Щелканов М.Ю. и др., 2017). Тип симметрии филовиров – спиральный. Длина генома приблизительно равна 19200 нуклеотидов (рисунок 1). В геноме MARV выявлено семь открытых рамок трансляции: поверхностный гликопротеин (GP), четыре белка нуклеокапсида – NP, VP30, VP35 и РНК-зависимая РНК-полимераза L, два матричных белка VP40 и VP24 (Feldmann H. et al., 1999).

Сложная морфология филовиров является следствием комплекса взаимодействий белок-белок, белок - РНК и белок-мембрана. Нуклеопротеин (NP) и белок нуклеокапсида VP30 взаимодействуют с РНК, этот комплекс вместе с полимеразой L и VP35 образует рибонуклеопротеин (РНП). Этот

комплекс, в свою очередь, заключен во внешнюю оболочку, происходящую из плазматической мембраны клетки-хозяина, выстланной матриксным белком VP40. На поверхности оболочки выступают закрепленные в мембране тримеры GP (Emanuel J. et al., 2018). Список белков и краткое описание их функции представлены в таблице 1.

Таблица 1. Краткое описание функций белков MARV

Положение в геноме	Наименование белок	Функция белка	Молекулярная масса, (kDa)
1	NP	Основной нуклеопротеин, компонент РНП. При экспрессии в клетках млекопитающих образует цитоплазматические тельца включения способен неспецифически связываться с РНК клетки-хозяина, образуя спирали.	90-104
2	VP35	Нуклеопротеин, кофактор полимеразы, компонент РНП, противодействует врожденному иммунному ответу хозяина, активно блокируя IFN посредством взаимодействия с регуляторным фактором IFN 3 (IRF3) и IRF7.	35
3	VP40	Матриксный белок, играет важную роль на последних стадиях сборки вирионов, а именно способствует формированию вириона в плазматической мембране.	5-40
4	GP	Поверхностный белок. Обеспечивает вход вируса в клетку, связывание с рецептором, слияние мембран. Формирует шипы-рецепторы длиной 7-10 нм.	150-170
5	VP30	Минорный нуклеопротеин, компонент РНП, также напрямую связывает РНК и предпочтительно связывает вирусную геномную РНК в структуре стержень-петля рядом с лидерной последовательностью.	27-30
6	VP24	Играет роль в «раздевании» вируса при проникновении в клетку.	24-25
7	L	РНК-зависимая РНК-полимераза, компонент РНП. Синтез матричных РНК с вирусной РНК, и на поздней стадии саму вирусную РНК на матрице.	~270

1.2 Цикл репликации MARV

Механизм проникновения филовирусов изучается в течение нескольких десятилетий. За последнее десятилетие был пролит свет на довольно сложную последовательность событий проникновения филовирусов в клетку, однако некоторые шаги по-прежнему вызывают споры среди исследователей филовирусов.

Для того чтобы вирус попал в клетку и начал цикл воспроизведения, необходим рецептор NPC1, белок, участвующий в транспорте холестерина в клетки. После того, как вирусная частица прикрепляется к рецептору клетки, она поглощается главным образом посредством макропиноцитоза (Nanbo A. et al., 2010; Saeed M.F. et al., 2010; Aleksandrowicz P. et al., 2011). В различных исследованиях показан ряд альтернативных путей проникновения вируса, возможно также сочетание нескольких путей (Sanchez A., 2007; Aleksandrowicz P. et al., 2011; Hunt C.L. et al. 2012), ключевым событием в любом из случаев является попадание вирусных частиц в кислую среду эндосом клетки (рисунок 2).

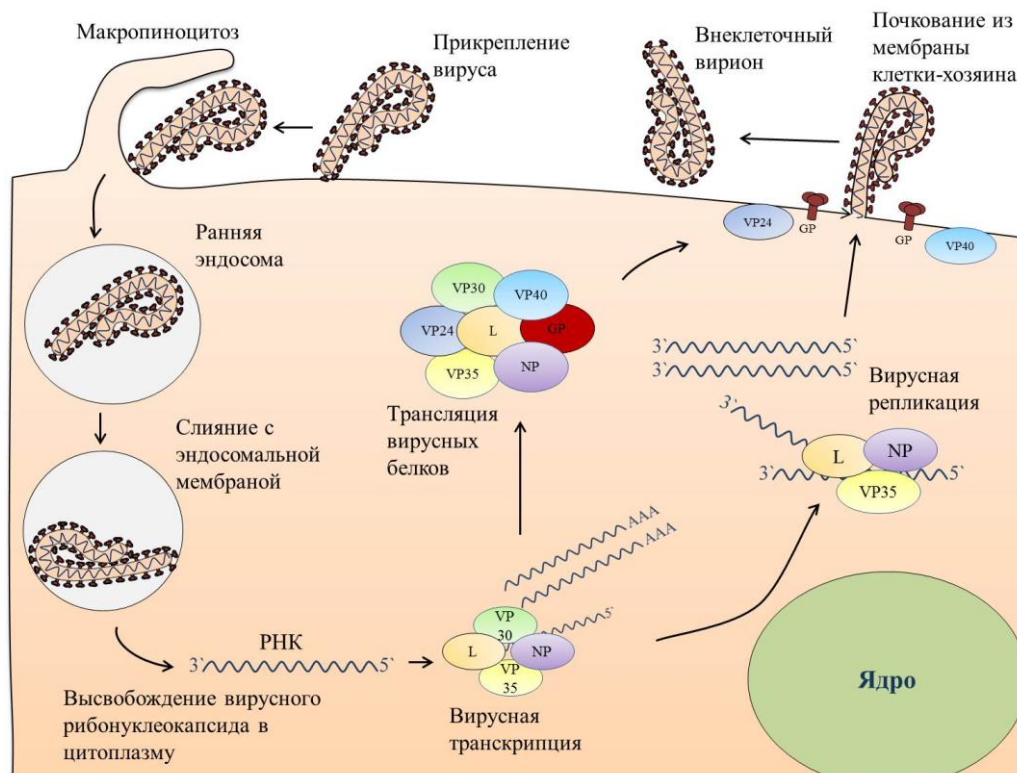


Рисунок 2. Жизненный цикл MARV

После снижения pH в клетке происходит активация клеточных протеаз (в частности ингибитора катепсина В и L), с последующим протеолитическим процессингом GP (Chandran K. et al., 2005), результатом чего является слияние вирусной мембраны с мембраной эндосомы клетки-хозяина, и последующее высвобождения вирусного нуклеокапсида в цитоплазму клетки (Carette J.E. et al., 2011; Cote M. et al. 2011). Эндосомные кальциевые каналы хозяина, называемые двухпоровыми каналами, играют важную роль в эндосомном переносе поступающих вирусных частиц к месту слияния (Sakurai Y, et al., 2015). GP опосредует слияние вирусной и эндосомальной мембран, высвобождая вирусный рибонуклеокапсид в цитоплазму, где геном РНК с (-) цепью подвергается транскрипции и репликации (Muhlberger E., 2007).

Механизм репликации филовирсов подробно изучен с использованием систем искусственной репликации, таких как мини-геномы (Muhlberger E. et al., 1998). Все филовирсы кодируют белки, необходимые для образования РНК-зависимого РНК-полимеразного комплекса, который продуцирует (+) цепь РНК, которая служит матрицей для репликации (-) цепи геномной РНК. Для MARV было показано, что NP, VP35 и L необходимы и достаточны для поддержки репликации генома. Это механизм схож с аналогичными процессами при репликации парамиксо- и рабдовирусов, требующие наличия только белков N, P и L (Conzelmann K.K., 2004; Whelan S. et al., 2004). Были установлены ключевые взаимодействия белков NP-VP35 и VP35-L, подчеркивающие важную структурную роль VP35 в вирусном полимеразном комплексе (Becker S. et al., 1998; Groseth A. et al., 2009). Было показано, что белки, участвующие в репликации генома, изменяют локализацию в ходе клеточной инфекции: сначала они распределяются в цитоплазматических включениях, которые обнаруживаются около ядра, затем разбиваются на более мелкие части и впоследствии локализуются вблизи плазматической мембраны (Nanbo A. et al., 2013).

Как говорилось выше, нуклеиновая кислота филовирусов кодируют семь моноцистронных транскрипционных единиц (генов). Репликация нуклеиновой кислоты филовирусов проходят в цитоплазме инфицированных клеток. В процессе транскрипции синтезируется семь моноцистронных полиаденилированных субгеномных мРНК, комплементарных геномной РНК, каждая из которых кодирует один из вирусных белков (Feldmann H. et al., 1992). Синтез мРНК белка NP EBOV наблюдается в клетках через 7 ч, синтез аналогичной мРНК MARV – через 12 ч после инфицирования. Спустя 18 ч в общем пуле РНК выявляется мРНК, кодирующие другие вирусные белки. Трансляция вирусных белков осуществляется белоксинтезирующей системой клетки-хозяина либо на рибосомах, связанных с шероховатым эндоплазматическим ретикуломом, либо на свободных рибосомах цитоплазмы клеток (Feldmann H. и Klenk H.D., 1996).

РНК-зависимая РНК-полимераза L филовирусов в комплексе с кофакторами осуществляет процессы репликации, транскрипции, полиаденилирования и, по-видимому, кэпирования вирусных субгеномных мРНК.

Процесс репликации и транскрипции осуществляется полимеразным вирусным комплексом (белки VP24, VP35 и L-РНК-зависимая РНК-полимераза). Вновь синтезированная геномная РНК инкапсидируется белком NP и формирует вирусный РПН, на основе которого формируются новые вирусные частицы (Feldmann H. et al., 1992).

Образование зрелых вирусных частиц включает в себя стадии сборки нуклеокапсида и дальнейшей инкапсуляции в оболочку из плазмолеммы инфицированной клетки, с которой ассоциированы молекулы GP и VP40. Механизмы сборки вирионов филовирусов еще не достаточно понятны, однако исследования последних лет показали, что сборка нуклеокапсида происходит в цитоплазме клеток-хозяина, после чего вирус выходит во внеклеточное пространство посредством почкования (Feldmann H. et al., 2007).

1.3 Мировой опыт по созданию вакцины против заболевания, вызванного MARV

Недавняя эпидемия EBOV в Западной Африке показала важность разработки вакцин и профилактических препаратов против заболеваний, вызванных филовирусами, для общественного здравоохранения (WHO, 2016). Вакцина против филовирусных инфекций, прежде всего, нужна исследователям и врачам, непосредственно имеющим контакт с вирусом (Hensley L.E. et al., 2005).

Основные усилия разработчиков вакцин против болезней, вызванных филовирусами, сосредоточены на использовании в качестве антигена GP, так как он содержит иммуногенные эпитопы (Hevey M. et al., 2001), которые являются мишенью нейтрализующих антител (NAbs) вирус. Наличие гуморального иммунного ответа, направленного на GP, является основным элементом защиты организма (Ascenzi P. et al., 2008). GP единственный поверхностный белок MARV, тримеры которого образуют шипы на поверхности вириона, которые прикрепляются к клетке, с помощью него РНК MARV проникает в чувствительные клетки. Также в качестве мишеней при создании вакцин используют белки NP и VP40 MARV (Emanuel J. et al., 2018). В данном случае защита обусловлена индукцией Т-клеточного иммунитета.

Несмотря на то, что MARV и EBOV являются близкородственными вирусами, по антигенной структуре вирусных белков они имеют значительные отличия. На это обстоятельство в 1977 г., обратили внимание исследователи пытаясь сравнить впервые выделенный EBOV с MARV. Дальнейшие исследования филовирусов подтвердили их антигенные отличия, хотя появлялись сообщения о кросс-реактивности антител с гетерологичными нативными антигенами в реакциях ИФА и иммунофлуоресценции. В исследованиях с использованием микрочиповых технологий, было показано, что антитела сывороток людей, переболевшими

MF или лихорадкой Эбола (EF), в разной степени перекрестно взаимодействуют с гетерологичными инаktivированными MARV и EBOV, а также рекомбинантными белками GP, NP и VP40 (Hevey M. et al., 2001). Нет сообщений о перекрестной защите против этих инфекций гетерологичными поликлональными или моноклональными антителами. В связи с этим, создание эффективной вакцины против заболеваний, вызванных MARV и EBOV, требует получение специфичных препаратов против каждой геморрагической лихорадки.

1.3.1 Инаktivированные вирусные и субъединичные белковые вакцины

Как и в большинстве случаев инфекционных заболеваний, первой разработанной вакциной против заболеваний, вызванных филовирусами, была инаktivированная цельновирусная вакцина. Первой вакциной на основе такой платформы была против заболевания, вызываемого EBOV.

Результаты этих исследований были противоречивыми. Первоначально были созданы две отдельные инаktivированные вакцины с использованием тепловой обработки или обработки формалином вирионов EBOV (Lupton H.W. et al., 1980). Обе вакцины были протестированы на морских свинках. Хотя оба метода инаktivации вируса позволили получить вакцины с защищающим эффектом животных, у нескольких животных после заражения EBOV развились симптомы лихорадочного заболевания, включая лихорадку и потерю веса. Дальнейшее развитие науки привело к появлению новых методов создания вакцин на основе инаktivированных филовирусов. В работе (Warfield K. L. et al., 2007) инаktivировали вирионы EBOV обработкой фотоиндуцируемым алкилирующим агентом 1,5 иодонафтилазидом (INA). Инаktivация INA приводит к образованию вирионов, которые морфологически неотличимы от живого вируса. Вакцина INA EBOV защищала 80% вакцинированных мышей от заболевания, вызванного EBOV, вероятно, за счет индукции EBOV-специфических антител и CD8 + Т-клеток. Сходные уровни защиты были получены в

исследованиях по созданию вакцины на основе инактивированного MARV (штамм *Musoke* и *RAVV*). Препарат на основе гамма-облученных цельных вирионов MARV полностью защищал морских свинок от гомологичного заражения. Однако полученные результаты не воспроизводились на нечеловекообразных приматах (NHPs) (Hevey M. et al., 1997; Warfield K.L. et al., 2004). Вакцинация препаратом, содержащим гамма-облученные частицы EBOV, вызвала сероконверсию у всех NHPs и выработку Nabs против заболевания, вызванного EBOV. Однако эти вакцины не смогли защитить NHPs от заболевания, вызванного EBOV.

Точно так же инактивированная вакцина против болезни, вызванной MARV, обеспечивала только 50% защиту (Ignatyev G.M, et al., 1996). Был получен вирусный препарат, выращенный на диплоидных клетках легкого эмбриона человека (Л68). Исследование показало, что двукратная иммунизация с интервалом две недели при дозе 7 мкг на животное, вызывало формирование специфического гуморального иммунитета у обезьян *Macaca mulatta* и морских свинок, но антитела, вырабатываемые у иммунизированных животных, не защищали их от гибели. Введение инактивированного препарата MARV, так же, как и инфекционного, приводило к формированию клеточного иммунитета: активировалась продукция цитокинов и повышалась активность натуральных киллеров (NK). У выживших после заражения животных активность цитокинов была зафиксирована на 1-2 сутки. Далее активность цитокинов снижалась.

Иммунизация животных инактивированным цельновирионным MARV (штамм *Musoke*), индуцировала наработку NAbs, что привело к 80%-му выживанию животных при подкожном заражении и аэрозольном заражении летальной дозой вируса (Hevey M. et al., 2001).

Инактивированные вакцины против филовиральных инфекций, даже в случае успеха на животных моделях, вряд ли могут быть использованы на людях из-за риска развития смертельного заболевания при неполной инактивации (Hevey M. et al., 2001). Кроме того, производство

инактивированных филовиральных препаратов сопряжено с опасностью для персонала.

1.3.2 Вакцины на основе репликонов вируса венесуэльского энцефалита лошадей

Одним из вариантов создания вакцинных препаратов против болезней, вызванных филовиралами, является использование конструкций на основе репликонов вируса венесуэльского энцефалита лошадей. Как для EBOV, так и для MARV антиген-мишень, кодируемый вирусоподобными частицами репликона (VRP), обычно является GP (Maruyama T. et al., 1999; Wilson J. A. et al., 2000; Parren P.W. et al., 2002), так же есть исследования, в которых говорится об использовании VRP, одновременно экспрессирующих EBOV GP, NP, VP24, VP30, VP35 и VP40 (Olinger G.G. et al., 2005).

В работе Hevey M. et al. рассмотрены репликоны VEEV, обеспечивающие презентацию GP и NP MARV (Hevey M. et al., 1998). Использование репликонов обеспечивало защиту морских свинок при заражении MARV (штамм *Musoke*). Макаки *Cynomolgus*, иммунизированные репликонами VEEV, презентующих GP MARV (штамм *Musoke*), отдельно или вместе с NP MARV, также были защищены от филовиральной инфекции, вызванной гомологичным штаммом, но не гетерологичным RAVV. Эти многообещающие результаты привели к дальнейшим исследованиям эффективности вакцины на NHPs. Макаки *Cynomolgus* трижды вакцинировали VRP-MARV GP и VRP-MARV NP (Hevey M. et al., 1998). Вакцинация VRP-MARV GP в комбинации с VRP-MARV NP обеспечивала полную защиту от гомологичного заражения MARV с минимальными клиническими симптомами заболевания. Вакцина, которая содержала только NP MARV, была гораздо менее эффективна: один примат погиб от болезни MARV, а два выживших тяжело перенесли болезнь.

От летальной дозы EBOV и MARV, были также защищены *Cynomolgus macaques*, иммунизированные поливалентной вакциной на основе репликона

VEEV, презентирующего GP EBOV (штаммы *Sudan* и *Zaire*) и MARV. Результаты, полученные в ходе этих исследований, не однозначны, поэтому необходимы дальнейшие исследования.

Как и в случае любой вакцинной платформы на основе вектора, ранее существовавший иммунитет к вектору может оказывать пагубное влияние на эффективность вакцины, поэтому использование данных вакцин для лечения заболеваний, вызванных филовирусами, остается под вопросом.

1.3.3. Вакцины на основе вируса везикулярного стоматита

Весьма перспективным кандидатом вакцины против заболеваний, вызванных филовирусами, является препарат на основе вируса везикулярного стоматита. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита (rVSV) представляет собой РНК-вирус семейства *Rhabdoviridae*. Его геном кодирует пять белков: G, L, М, Р и N. Система обратной генетики, разработанная Роузом и его коллегами, позволяет экспрессировать чужеродные антигенные белки из вектора VSV (Schnell M.J. et al., 1996; Rose N.F. et al., 2000). Легкость, с которой VSV можно культивировать до чрезвычайно высоких титров *in vitro* и *in vivo* делают его оптимальным вектором для вакцины. Также было показано, что вектор VSV является мощным индуктором врожденных и адаптивных иммунных ответов (Rose N.F et al., 2001).

Эти преимущества побудили Garbutt et al. для создания первого rVSV, содержащего GP EBOV (штамм *Mayinga*), GP MARV (штамм *Musoke*) и GPC LASV (штамм *Josiah*) (Garbutt M. et al., 2004). rVSV был протестирован в многочисленных исследованиях иммуногенности и защитной эффективности. Первое исследование эффективности VSV-EBOV и VSV-MARV было проведено на NHPs в 2005 году (Daddario S.M. et al., 2005). В этом исследовании однократная доза VSV-EBOV и VSV-MARV защищала NHPs, зараженных через 28 дней после вакцинации (Daddario S.M. et al., 2005). Примечательно, что ни у одного из животных не появилось

клинических признаков заболевания, а также rVSV не обнаружено в выделениях у вакцинированных NHPs. Интересно, что у NHPs, вакцинированных VSV-EBOV, развивались как гуморальный, так и клеточный иммунные ответы, но VSV-MARV индуцировал в первую очередь гуморальный иммунитет. Всем животным, первоначально зараженным MARV, повторно вводили родственный MARV (штамм *Popp*). Наблюдалась полная защита животных.

В ходе проведенных доклинических исследований установили, что вакцины против болезней, вызванных филовирусами, на основе rVSV могут быстро вызывать защитный иммунный ответ у NHPs (Geisbert T.W. et al., 2008; Geisbert T.W. et al., 2009). Для изучения потенциального использования вакцины VSV-EBOV в качестве средства экстренной профилактики Feldmann et al. проводили вакцинацию морских свинок и мышей через 24 часа после заражения EBOV (Feldmann H. et al., 2007). В ходе эксперимента выживаемость морских свинок и мышей составила 50% и 100% соответственно (Feldmann H. et al., 2007; Geisbert T.W. et al., 2008). Сходные уровни защиты наблюдались у вакцинированных макак-резус через 9 часов после заражения MARV (Geisbert T.W. et al., 2010).

Вспышка EBOV в Западной Африке в 2014 г. вызвала ряд клинических испытаний. Первые два испытания фазы I были предназначены для проверки безопасности и иммуногенности доз вакцины – либо разовой дозы, либо двух идентичных доз VSV-EBOV (NCT02269423 и NCT02280408) (Regules J.A. et al., 2017).

Аналогичная вакцина против болезни, вызванной MARV, находится на доклинических испытаниях. Однократная внутримышечная иммунизация *Cynomolgus macaques* rVSV, содержащего ген, кодирующий GP MARV (штамм *Musoke*) в дозе 2×10^7 БОЕ, вызвала сильный иммунный ответ и полную защиту от внутримышечного заражения (через 28 дней) дозой 10^3 БОЕ. Также было показано, что вакцинная платформа rVSV на 100 % эффективна на NHPs против аэрозольного заражения MARV (штамм *Musoke*)

(Geisbert T.W. et al., 2010). В данной работе показано, что трехвалентная однократная вакцина, состоящая из равных количеств трех векторов rVSV, каждый из которых содержал гены, кодирующие GP EBOV (штаммы *Zaire* и *Sudan*) и MARV (штамм *Musoke*), защищала *Cynomolgus macaques* от заражения летальными дозами EBOV (штаммы *Zaire*, *Sudan* и *TaiForest*) и MARV (*Musoke*) (Geisbert T.W. et al., 2010).

На NHPs была проведена оценка длительности иммунного ответа после иммунизации rVSV-GP MARV. Иммунизация дозой 2×10^7 БОЕ, привела к индукции антител, в титре 1/12800 (реакция ИФА), которые сохранились в сыворотке крови у животных через год после вакцинации. Это позволило обеспечить защиту животных при заражении летальной дозой MARV (штамм *Musoke*). При этом уровень NAbs сохранялся на среднем уровне (от 1/1606 до 1/7250), что может говорить об участии в защите от вирусов механизмов антителозависимой клеточно- или комплемент-опосредованной цитотоксичности (Mire C.E. et al., 2014).

Для конструирования трехвалентной вакцины против заболеваний, вызванных EBOV (штаммы *Zaire*, *Sudan*) и MARV (штамм *Angola*), использовали аттенуированный rVSV, с целью снижения побочных эффектов, таких как кожные высыпания и артрит, которые наблюдались при испытании вакцины против заболевания, вызванного EBOV, на основе rVSV. Анализ данной вакцины, состоящей из равной смеси трех векторов аттенуированного rVSV, каждый из которых содержал гены, кодирующие GP EBOV (штаммы *Zaire*, *Sudan*) и MARV (штамм *Angola*), проводили на мышах и NHPs. У животных, иммунизированных внутримышечно, на 14-й день развивался сбалансированный Т-клеточный иммунитет и сильный гуморальный иммунный ответ, специфичный в отношении GP всех вирусных штаммов. Однако специфический иммунный ответ в отношении белка GP MARV был значительно ниже при иммунизации трехвалентной вакциной по сравнению с соответствующим моновалентным вариантом, что может быть следствием векторной интерференции или иммунологической конкуренции

между различными филовирусными белками GP, когда они представлены в виде многовалентной вакцины (Matassov D. et al., 2017).

Несмотря на описанные выше успехи, вакцины на основе rVSV имеют два основных недостатка. Вакцинные векторы, экспонирующие G-белок, нельзя использовать повторно из-за иммуногенных свойств этого белка. Во-вторых, VSV является нейротропным вирусом. И использование живого рекомбинантного вируса, способного к репликации, вызывает опасения в отношении заболеваний, связанных с нейротоксичностью (Clarke D.K., 2006).

1.3.4. Вакцины на основе вируса осповакцины

Вирус осповакцины — это большой, сложный ДНК-вирус, принадлежащий к семейству *Poxviridae*. В последние годы этот вирус использовался в качестве вирусного вектора из-за большой емкости генома, позволяющего проводить большие вставки чужеродных генов. Рекомбинантный вектор осповакцина был одним из первых репликационно-компетентных вакцинных векторов, которые были апробированы на способность эффективно доставлять гены филовирусов и вызывать защитный иммунитет.

Несмотря на низкую эффективность платформы на основе рекомбинантного вируса осповакцины, кодирующего GP EBOV (штамм *Zaire*) при испытаниях на животных (Geisbert T.W. et al., 2010; Marzi A. et al., 2016), продолжаются исследования иммуногенности и безопасности поливалентной вакцины против филовирусных инфекций на основе вируса осповакцины (Modified Vaccinia Ankara, MVA), кодирующего GP EBOV (штаммы *Zaire* и *Sudan*), MARV и NP EBOV. В I фазе клинических испытаний было задействовано 87 добровольцев. Вакцинация препаратами MVA-BN-Filo или Ad26.ZEBOV не привела к серьезным нежелательным последствиям (Milligan I.D. et al., 2016).

Недавно было проведено исследование (Malherbe D.C. et al., 2020), в котором представлена вакцина против заболевания, вызванного MARV,

сочетающая преимущества иммуногенности аттенуированного варианта MVA с аутентичной морфологией вирусоподобных частиц (VLPs). Иммунизация морских свинок вызвала наработку NAbs и индуцировала Fc-опосредованные эффекторные функции врожденного иммунитета, включая активацию NK-клеток и антителозависимый фагоцитоз нейтрофилами и моноцитами и продемонстрировала 100%-ную защиту морских свинок.

1.3.5. Вакцины на основе рекомбинантного цитомегаловируса

Цитомегаловирус (CMV) – широко распространенный вирус β -герпеса, поражающий людей. CMV-инфекция у здоровых взрослых носит стойкий характер, но обычно бессимптомна. CMV вызывает значительный интерес как вакцинный вектор из-за своей строгой видовой специфичности и непрерывной репликации в организме хозяина (Rizvanov A.A. et al., 2003; Friedrich B.M. et al., 2012; Humphreys I. и Sebastian S., 2018). CMV может повторно инфицировать хозяина независимо от ранее существовавшего иммунитета (Moreno Y. et al., 2011). Кроме того, векторы CMV индуцируют существенные Т-клеточные ответы, что делает их идеальными для выработки клеточного иммунитета (Klenerman P., и Oxenius A., 2016). В исследовании, подтверждающем концепцию, сконструировали мышинный реплицирующийся вектор CMV, который обеспечивал презентацию EBOV NP (MCMV/EBOV NPCTL). MCMV/EBOV NPCTL, индуцировал при этом высокие уровни EBOV NP-специфичных CD8⁺ Т-клеток, но не обеспечивал выработку NAbs против заболевания, вызванного EBOV, у мышей (Tsuda Y. et al., 2015). Однако все вакцинированные животные выжили после заражения EBOV. Последующее исследование показало, что однократная доза MCMV/EBOV NPCTL обеспечивала стойкий защитный иммунитет в течение 119 дней после вакцинации. Эти данные свидетельствуют о важности Т-клеточного иммунного ответа в защите от филовирусов.

В недавнем исследовании на NHPs протестировали рекомбинантную вакцину CMV, обеспечивающую презентацию GP EBOV с

оптимизированным кодонным составом (Marzi A. et al., 2016). Схема первичной/бустерной вакцинации вырабатывала GP-специфические антитела и защищала 3/4 (75%) макаков от летального заражения EBOV. У выживших NHPs наблюдались легкие признаки заболевания, но кинетика виремии была отложенной и никогда не достигала уровня, наблюдаемого у контрольных животных.

Самая большая проблема при разработке вакцин на основе CMV, подходящих для клинического использования - это разработка непатогенных векторов, которые могли бы быть безопасными для их использования даже у лиц с ослабленным иммунитетом, сохраняя при этом их иммуногенность и способность инфицировать ранее серопозитивных хозяев.

1.3.6. Вакцины на основе аденовирусного вектора

Все более привлекательной стратегией вакцинации в последнее время является использование рекомбинантных аденовирусных векторов. Аденовирусные векторы с дефектом репликации обладают высокой иммуногенностью и могут генерировать устойчивые В- и Т-клеточные ответы на вирусные антигены (Yang Y. et al., 1995; Yang Y. et al., 1996). Часто используемой платформой для создания вакцин является репликативно-дефектный вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа (Kobinger G.P. et al., 2006).

Двукратная иммунизация морских свинок трехвалентным вектором rAd5, содержащим последовательности генов, кодирующих GP трех штаммов MARV (штаммы *Ci67*, *Musoke* и *Ravn*) в дозе $5 \times 10^{7-8}$ БОЕ обеспечила 100 %-ную защиту животных от летальных доз вирусов. Однократная внутримышечная иммунизация вектором rAd5, содержащим последовательность гена, кодирующего GP MARV (штамм *Angola* в дозе 10^{11} вирусных частиц), позволила полностью защитить обезьян от высокой дозы инфицирования равной 1000 БОЕ гомологичного вируса. Комплексное использование ДНК-вакцины и аденовирусного вектора так же обеспечило

100 %-ную выживаемость обезьян. Пятивалентная вакцина rAd5, кодирующая гликопротеины трех штаммов MARV (штаммы *Musoke*, *Ci67* и *Ravn*), а также гликопротеины двух штаммов EBOV (штаммы *Zaire* и *Sudan*), обеспечивала 100 %-ную защиту обезьян *Cynomolgus macaques* от заражения летальными дозами данных штаммов вирусов (Nakayama E. и Saijo M., 2013).

Главной проблемой, ограничивающей использование векторов на основе Ad5, заключается в широкой распространенности в популяции предсуществующего иммунитета к Ad5 (наличие Ad5- NAbs). Показано, что наличие антител к Ad5 до вакцинации приводит к индукции более низкого GP-специфичного гуморального и Т-клеточного ответа после вакцинации. По литературным данным, распространенность антител к Ad5 в общей популяции населения Земли составляет до 60 %, а в странах Африки до 83 % (Nakayama E. и Saijo M., 2013).

1.3.7. Вакцины на основе вирусоподобных частиц

VLPs структурно имитируют аутентичные вирионы, но не содержат генетического материала. Поэтому вакцины на основе VLPs не являются инфекционными и более безопасны, чем репликативные вакцины (Nakayama E. и Saijo M., 2013).

Матриксный белок VP40 филовирюсов играет ключевую роль в процессе почкования вирионов. Экспрессия полноразмерного гена, кодирующего VP40 EBOV, клонированного в составе экспрессионного вектора, после трансфекции клеток приводит к выходу VLPs, состоящих только из одного белка VP40 (Noda T. et al., 2002). В работе (Licata J. et al., 2004) показано, что матриксный белок не только самостоятельно формирует VLPs, но и повышает их выход при ко-экспрессии с другими генами филовирюсов. Комбинация VP40 с GP или с NP увеличивала в 5 раз выход VLPs. Сочетание VP40+GP+NP, обеспечивало максимальный выход VLPs EBOV (Licata J. et al., 2004). Иммуногенность VLPs, состоящих из белков GP и VP40 MARV (штамм *Musoke*), полученных в культуре клеток

HEK293T, была оценена на *Cynomolgus macaques* и морских свинок. Морские свинки, иммунизированные внутримышечно трехкратно были полностью защищены от заражения адаптированными штаммами *Ci6*, *Musoke* и *Ravn*. Защита *Cynomolgus macaques* была так же достигнута при внутримышечной иммунизации тремя дозами VLPs в концентрации 1 мг в сочетании с адъювантом, QS-21 (Swenson D. L. et al., 2008). VLPs, полученные с использованием бакуловирусной системы, содержащие структурные белки GP, NP и VP40 MARV (штамм *Angola*), защищали макаков *Cynomolgus macaques* от летальной инфекции MARV (штамм *Angola*) (Dye J.M. et al., 2016).

В настоящее время тенденция развития вакцин показывает, что антигены часто не обладают достаточной иммуногенностью и необходимо использование мощных адъювантов для увеличения или моделирования гуморального и клеточного иммунитета. Особенно актуальны природные безопасные адъюванты. Показано, что VLPs, полученные с использованием бакуловирусного вектора, содержащего гены, кодирующие GP и VP40 MARV, при введении макакам *Rhesus* с адъювантом (полисахаридом кокоса), продуцировали GP-специфический ответ в титре антител 1:1280, с нейтрализующим титром 1:320. Кроме того, VLPs вызвали активацию Т-клеточного иммунитета в виде секреции α -интерферона и интерлейкина-4. Эти данные показывают, что VLPs с полисахаридным адъювантом обладают превосходной иммуногенностью и могут быть кандидатной вакциной против заболевания, вызванного MARV (Saijo M. et al., 2006).

Однако, использование VLPs как платформу для создания вакцин против заболеваний, вызываемыми филовирусами, остается под большим вопросом. При производстве вакцин на основе VLPs все еще остаются технические проблемы, касающиеся дизайна, очистки и хранения. Во-первых, стабильность вакцины на основе VLPs является одной из наиболее важных проблем. VLPs представляют собой мультимерные структуры, которые, как правило, более стабильны, чем субъединичные вакцины, однако

отсутствие вирусного генома делает их нестабильными при изменении условий, особенно во время последующей обработки (DSP) (Vicente T., 2011.). Как правило, VLPs, имеющие оболочку, происходящую от хозяина, более чувствительны к внешней среде, чем VLPs, содержащие только белок. Изменения условий, например температуры, силы сдвига и химической обработки, могут нарушить целостность и стабильность частиц, это структурное разрушение дополнительно приводит к снижению иммуногенности VLPs.

Во-вторых, уровень экспрессии вирусных белков на разных платформах значительно различается. В целом секреторная экспрессия гликопротеинов затруднена. Поскольку отпочкование от клеточной мембраны для получения оболочки является ключевым этапом в процессе образования VLPs, если VLPs секретируется неэффективно, может потребоваться клеточный лизис или другой этап экстракции, и эти этапы усложняют дальнейшую очистку (Chang G.J., 2003).

Наконец, вакцины на основе вирусоподобных частиц могут содержать многочисленные примеси, что представляет собой серьезную проблему. Загрязнения, связанные с технологическим процессом, в основном связаны с примесями клетки-хозяина, такими как клеточный дебрис, белки, ДНК и липиды клетки-хозяина (Ulmer J.B., 2006).

1.3.8. ДНК-вакцины

ДНК-вакцина – это нереплицирующаяся плаزمиды, содержащая ген, кодирующий один или несколько антигенов исследуемого патогена, находящийся под контролем эукариотических сигналов инициации и терминации транскрипции (Tang D., 1992). ДНК-вакцины оказались одной из универсальных и многообещающих платформ для вакцин. Это часто связывают со способностью ДНК-вакцин стимулировать мощные врожденные и адаптивные иммунные ответы. Более того, продукция эндогенного антигена клетками-хозяевами, трансфицированными ДНК-

вакциной, вызывает сильные гуморальные и клеточно-опосредованные иммунные ответы.

Сегодня процесс получения ДНК-вакцин хорошо отработан, созданы относительно безопасные системы, которые доставляют ДНК в клетки. Нужный протективный ген встраивают в плазмиду или в безопасный вирус. Этот носитель-вектор проникает в ядро клетки, где транскрибируется и экспрессирует соответствующие антигены, вызывающие в организме привитого формирование иммунитета.

ДНК-вакцины способны работать в организме длительный период – 3-4 недели, иногда до года (Медуницын Н.В., 2005; Зверев В.Н., 2006; Канашкова Т.А., 2009; Попов Ю.А. и Микшис Н.И., 2010). За это время ДНК-вакцина индуцирует Т- и В-клеточный иммунитет (Медуницын Н.В., 2005). Известно, что ДНК-вакцинация обеспечивает высокий уровень защиты от вирусной инфекции и приводит к полноценному иммунному ответу, однако многие механизмы развития иммунного ответа на ДНК-вакцины остаются до сих пор неизученными.

ДНК-вакцины обладают множеством достоинств. Например, ДНК-вакцины индуцируют как клеточный ответ, так и гуморальный иммунный ответ с образованием большого пула клеток иммунологической памяти. В отличие от вакцин, созданных на основе вирусных векторов, при использовании ДНК-вакцины отсутствует риск реверсии вирулентности. Важным аспектом является то, что технология создания ДНК-вакцин позволяет сочетать в одном поливалентном препарате детерминанты, кодирующие синтез различных гомо- и гетерологичных антигенов. Также, существует возможность модификации генов, например, путем сайт-специфического мутагенеза.

Достоинством ДНК-вакцин является также рентабельность их производства. Относительно низкая цена конечного продукта обусловлена технологичностью производства и простотой конструирования рекомбинантной ДНК. Также к преимуществам относится устойчивость

препаратов к резкому перепаду температур, что позволяет не использовать «холодовую» цепи при транспортировке препарата.

Однако существуют небезосновательные сомнения в эффективности ДНК-вакцины, особенно при экстраполяции на крупных млекопитающих и человека (Попов Ю.А. и Микшис Н.И., 2010). Так, для получения длительного иммунитета иногда требуется дополнительная одно- или двукратная иммунизация лабораторных животных. До сих пор остается открытым вопрос об эффективной доставке ДНК-вакцинных препаратов в антигенпрезентирующие клетки (АПК).

Плазмиды, содержащие ген, кодирующий GP MARV (штаммы *Musoke* и *Ravn*), при введении подкожно (доза 10 мкг на животное) трех- и четырехкратно, продемонстрировали эффективность в защите морских свинок против летальной дозы каждого гомологичного штамма, адаптированного к этим животным. При трехкратном подкожном введении (доза 20 мкг на животное) ДНК-вакцины, содержащей ген, кодирующего GP MARV (штамм *Musoke*), защита была зафиксирована только в 67% от числа инфицированных *Cynomolgus macaques* (Riemenschneider J. et al., 2003). При четырехкратном введении внутримышечно (доза 4 мг на животное) ДНК-вакцины, кодирующей GP MARV *Angola*, была достигнута 100%-ная защита *Cynomolgus macaques* (Geisbert T.W. et al., 2010).

Исследования моно и трехвалентной ДНК-вакцины (NCT00997607) против заболеваний, вызванных MARV (штамм *Angola*) и EBOV (штаммы *Sudan* и *Zaire*), в Уганде на добровольцах в возрастном диапазоне 18-50 лет, так же показало, что данные вакцины вызывают гуморальный и клеточный иммунные ответы и не вызывают побочных эффектов (Kibuuka H. et al., 2015). Это первое поливалентных вакцинных конструкций, вводимых одновременно.

Также были проведены исследования иммуногенности и безопасности трехвалентной ДНК-вакцины (NCT00605514) против заболеваний, вызванных MARV (штамм *Angola*) и EBOV (штаммы *Sudan* и *Zaire*), на

добровольцах в возрастном диапазоне 18-60 лет. При 3-х разовом внутримышечном введении препарата (доза составила 4 мг) у всех добровольцев наблюдался анти-GP ответ. Показано, что уровень CD8+-клеточного ответа был выше, чем ответ, обусловленный CD4+ клетками. Важно отметить, что ДНК-вакцины не вызвали у добровольцев серьезных побочных эффектов (Sarwar U.N. et al., 2015).

Несмотря на некоторые недостатки ДНК-вакцин, потенциальные преимущества использования подобных препаратов весьма значительны и очевидны. Разработки в области генетических вакцин проводятся широко во многих странах мира и сегодня.

1.3.8.1 Механизмы действия ДНК-вакцин

Считается, что презентация чужеродных антигенов, кодируемых плазмидной ДНК, может происходить тремя путями (Li L., и Petrovsky N., 2016). Общие механизмы действия ДНК-вакцин представлен на рисунке 3.

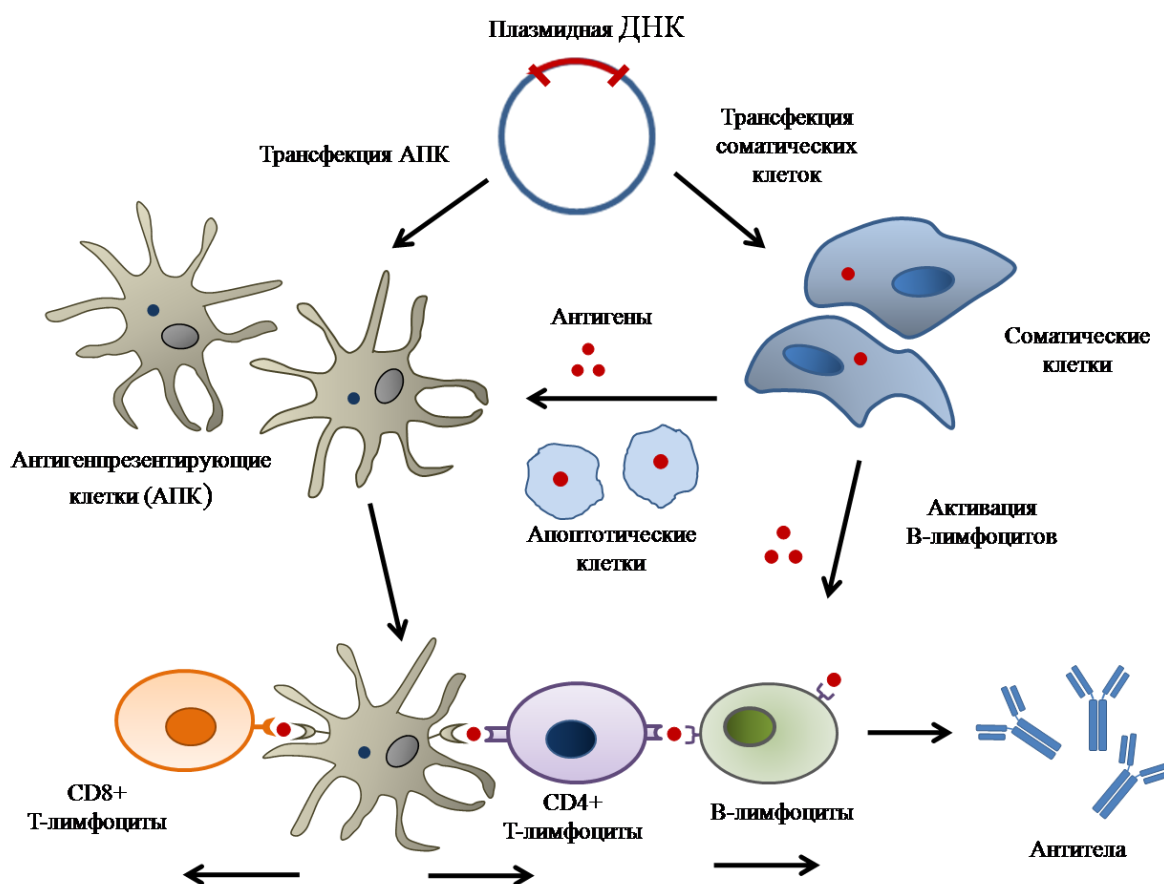


Рисунок 3. Механизмы действия ДНК-вакцин

Существует три механизма действия ДНК-вакцин:

1. Плазмидная ДНК трансфицирует соматические клетки и экспрессирует антигены, которые либо процессируются и представляются CD8+ Т-лимфоцитам по пути МНС I класса, либо секретируются и представляются В-лимфоцитам для стимуляции синтеза антител.

2. АПК, находящиеся в местах инъекции, трансфицируются плазмидной ДНК, и экспрессированные антигены процессируются и представляются CD4+ и CD8+ Т-клеткам по пути МНС I и II классов соответственно.

3. АПК фагоцитируют трансформированные соматические клетки, что приводит к перекрестному праймированию и презентации антигена как CD4+, так и CD8+ Т-клеткам.

Поскольку соматические клетки не способны представлять антиген по пути МНС II класса, стимуляция Т-лимфоцитов-хелперов осуществляется путем презентации антигена с помощью АПК (Li L., и Petrovsky N., 2016).

Внутренние элементы плазмидной ДНК, содержащие неметилированные цитозин-гуаниновые (CPG) мотивы, также могут активировать врожденный иммунный ответ, тем самым усиливая адаптивные механизмы против экспрессируемых антигенов. Механизмы врожденной иммунной системы используют образ-распознающие рецепторы (PRR) для определения вторжения патогенов и индукции синтеза интерферонов типа I и провоспалительных цитокинов (Li L., и Petrovsky N., 2016). В частности, как у мыши, так и у человека toll-like рецептор-9 (TLR9) представляет собой один из цитозольных PRR, который связывает последовательности ДНК, содержащие CpG мотивы, что приводит к активации MyD88-зависимых сигнальных путей (Hemmi H. et al., 2000). Было высказано предположение, что ДНК-вакцины способны активировать TLR9 (Tudor D. et al., 2005; Rottembourg D. et al., 2010).

Другие цитозольные ДНК-сенсоры могут также способствовать иммуногенности ДНК-вакцины. Одним из таких PRR является циклическая GMP-AMP (сGAMP) синтетаза (сGAS), которая после распознавания дцДНК индуцирует сGAMP для активации стимулятора генов интерферона (STING) (Gao P. et al., 2013; Sun L. et al., 2013; Zhang Y. et al., 2014). Другим PRR, распознающим ДНК, является DAI (DLM-1/ZBP1), который также активирует STING и индуцирует экспрессию интерферона I типа (Такаока А. et al., 2007).

Еще одним важным сенсором цитозольной ДНК является AIM2, который индуцирует активацию инфламмасом и продукцию воспалительных цитокинов (Schroder K. et al., 2009; Fernandes-Alnemri T. et al., 2010). Недавнее исследование показало, что как гуморальный, так и клеточный антиген-специфический иммунный ответ на ДНК-вакцины был значительно снижен у мышей с дефицитом AIM2 (Suschak J.J. et al., 2015). Белки геликазы, DHX29 и RIG-I также распознают цитозольные нуклеиновые кислоты и могут способствовать действию ДНК-вакцины (Sugimoto N. et al., 2014).

1.3.8.2 Конструирование ДНК-вакцины

Эффективность ДНК-вакцины в первую очередь определяется уровнем экспрессии целевого гена. На этот процесс в первую очередь влияет тип используемого промотора, сигнал полиаденилирования и структура гена, кодирующего целевой антиген (Doria-Rose N. и Haigwood N.L., 2003). Первым шагом создания ДНК-вакцин является выбор плазмидного вектора (рисунок 4). В качестве векторов используют хорошо изученные плазмиды грамотрицательных бактерий (в основном *E. coli*), в частности pUC19, pBR322, pcDNA3, pcDNA3.1, pVAX1, pCI, VR1012 DNA, pJW4303, pVAC1-mcs и pVAC2-mcs. Из вирусных векторов чаще всего используются дефектный по репликации аденовирус серотипа 5 (AD5), ортопоксвирусы и модифицированные вирусы осповакцины, альфавирусы, обеспечивающие более высокий уровень экспрессии целевого антигена.

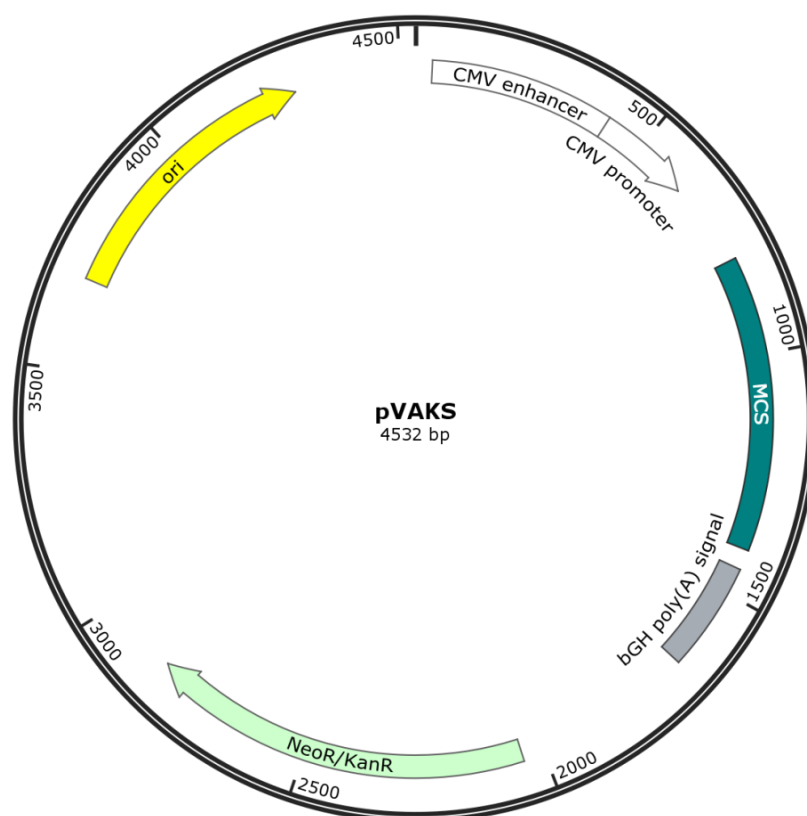


Рисунок 4. Схематическая структура вектора для создания ДНК-вакцины Ori – участок начала репликации; CMV promoter – цитомегаловирусный промотор; MCS – сайт для множественного клонирования генов; bGH poly(A) signal – терминатор с сигналом полиаденилирования гена гормона роста быка; NeoR/KanR – ген устойчивости к неомицину/канамицину.

В ряде исследований показано, что промотор CMV в комплексе с CMV энхансером способствует наиболее высокому уровню экспрессии целевого гена, и поэтому он широко используется для конструирования ДНК-вакцин (Cheng L. et al., 1993; Manthorpe M. et al., 1993). Так же для увеличения продукции целевого гена используют промотор β -актина, промоторы вируса SV40 и промоторы, специфичные для определенных видов ткани. Экспрессию целевого гена без участия транскрипционной системы клеток макроорганизма и, соответственно, без перемещения вектора в ядро позволяет осуществлять промотор и системы синтеза бактериофага T7 (Donnelly J.J. и Ulmer J.B., 1999).

Для усиления иммунной реакции организма в составе ДНК-вакцины включают CpG-мотивы бактерий. В ряде исследований показано, что ДНК,

содержащая CpG-мотивы, стимулирует пролиферацию лимфоцитов, NK и АПК, и опосредует секрецию полиреактивных IgM, иммуномодулирующих цитокинов и хемокинов (Krieg A.M. et al., 1995; Klinman D.M. et al., 1996; Lipford G.B. et al., 1997; Sparwasser T. et al., 1998; Takeshita S. et al., 2000)

Ген, кодирующий целевой белок-антиген может содержать дополнительные нуклеотидные последовательности, кодирующие лиганды для рецепторов АПК, например гены маркерного белка CD40, внеклеточного домена Fms-подобной тирозинкиназы-3. Для усиления протеолитического расщепления антигена в его последовательность встраивают либо последовательность, кодирующую убиквитин, либо сигнал убиквитинирования (Стародубова Е.С. и др., 2010).

Расположенная непосредственно перед иницирующим ATG-триплетом целевого гена последовательность Козака обеспечивает более высокий уровень экспрессии (Kozak M., 1997).

После целевого гена следуют сигналы полиаденилирования, например, β -глобина кролика, вируса SV40, гормона роста быка.

Заключение по обзору литературы

Вспышка EBOV в Западной Африке в 2014 г. стала переломным моментом в разработке вакцин против болезней, вызываемыми филовирусами. За год до этого события было разработано ограниченное количество профилактических или терапевтических средств против данных болезней. Отсутствие масштабных разработок можно объяснить отсутствием долгие годы глобальной угрозы. Однако вспышки, обусловленные данными болезнями последних десяти лет, изменили парадигму, подчеркнув необходимость создания вакцинных платформ, способных обеспечить быструю разработку и внедрение вакцин.

В настоящее время ведутся работы по получению профилактических вакцин против болезней, вызванных филовирусами, на основе репликонов вируса венесуэльского энцефалита лошадей, рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, модифицированного вируса осповакцины, аденовирусных векторов, вирусоподобных частиц и ДНК-конструкций.

Одним из перспективных подходов являются ДНК-вакцины. ДНК-вакцины имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными вакцинами. Конструирование таких вакцин обычно требует только одно-двухэтапной встройки в плазмидный вектор, что снижает стоимость и время производства. Введение плазмидной ДНК, как правило, легко переносится людьми. Наиболее частыми побочными эффектами являются легкое воспаление в месте инъекции. Технология рекомбинантной ДНК дает возможность проводить практически любые молекулярные манипуляции с плазмидной ДНК, в том числе вводить *in vitro* мутации, позволяющие быстро изменить дизайн антигенов. Плазмидная ДНК стабильна при комнатной температуре, что позволяет избежать использования холодной цепи во время транспортировки.

Самое главное, ДНК-вакцины позволяют индуцировать клеточный иммунный ответ. ДНК-вакцины способны обеспечивать презентацию антигенам в комплексе с молекулами МНС как класса I, так и класса II, тем

самым стимулируя как CD4+, так и CD8+ Т-клетки. В настоящее время ряд вакцин применяемых в области ветеринарии. Применение этой технологии для людей запаздывает, в основном из-за низкой иммуногенности по сравнению с другими вакцинными платформами. Однако, интенсивное развитие данной отрасли вакцинологии, вероятно, уже в ближайшее время обеспечит реальный выход в виде безопасных и эффективных вакцин.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы

Реактивы производства «Сибэнзим» (Россия): эндонуклеазы рестрикции BseX3I, AsuNHI, PspOMI, XbaI, XmaI, AspA2I, CciNI и AfeI с прилагаемыми буферами, ДНК-лигаза фага T4 с прилагаемым буфером, Pfu-ДНК-полимераза с прилагаемым буфером, маркер молекулярных весов ДНК 1 kb, dNTPs, щелочная фосфатаза с прилагаемым буфером.

Реактивы производства «Serva» (Германия): акриламид, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин, трис (гидроксиметил) аминометан. N, N-метиленбисакриламид, isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), додецилсульфат натрия (SDS).

Реактивы производства AppliChem GmbH (Германия): ацетат аммония, лизоцим.

Реактивы производства «Sigma» (США): бромистый этидий, бычий сывороточный альбумин (БСА), агароза, ацетат калия, β -меркаптоэтанол, бакто-агар, бакто-триптон, дрожжевой экстракт, диметилсульфоксид (ДМСО), антивидовые антитела меченные пероксидазой.

Реактивы производства ООО «Гротекс» (Россия): вода для инъекций, 40% глюкоза.

Реактивы производства «Евроген» (Россия): наборы для выделения ДНК и выделение ДНК из реакционной смеси и геля Cleanup Standard.

Реактивы производства «Thermo Fisher Scientific» (США): РНКаза, липофектимин 3000.

Реактивы производства «Реахим» (Россия): соляная кислота, хлорид натрия, натрия гидроокись, спирт этиловый, изопропиловый спирт; ледяная уксусная кислота. Степень очистки реактивов — не ниже х.ч.

Реактивы производства ОАО «Синтез»: антибиотики ампициллин и канамицин.

Реактивы производства ООО «Росмедбио» (Россия): натрий-фосфатный буфер (PBS).

Реактивы производства Promega (США): Luciferase Assay System (LAR), 1х лизирующий буфер для проведения реакции нейтрализации.

Материалы производства Nunc (США): полистироловые планшеты.

Материалы производства «Millipore» (США): нитроцеллюлозная мембрана.

Материалы производства Axygen (США): пробирки с закручивающимися крышками объемом 15 мл.

2.1.2 Олигонуклеотидные праймеры и нуклеотидные последовательности структурных белков MARV

Синтез праймеров и нуклеотидных последовательностей GPDM, VP40 и NP MARV были синтезированы в составе коммерческой плазмиды рGH в коммерческой научно-производственной фирме ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва).

2.1.3 Растворы и питательные среды

Питательные среды

LB: 10 г/л бактотриптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl, довести 5M NaOH до pH 7,2, стерилизовать автоклавированием при 1,2 атм (127°C) в течение 30 мин.

LB/agar: в среду LB добавить бактоагар 15 г и стерилизовать автоклавированием при 1,2 атм (127°C) в течение 30 мин.

SOB среда: 20 г/л тритона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 0,037 г/л KCl, стерилизовать автоклавированием при 1,2 атм (127°C) в течение 30 мин.

Буферные растворы

ТАЕ буфер для проведения электрофореза: 40 мМ Трис-HCl, 40 мМ CH₃COOH, 2 мМ ЭДТА, pH 8.0

Буфер для нанесения образца на электрофорез: 0.25%-ный бромфеноловый синий, 0.25%-ный ксиленцианол, 50%-ный водный раствор глицерина.

1X трис-ацетатный буферный раствор 40 мМ Tris-HCl, 40 мМ уксусной кислоты, 2 мМ EDTA. pH 8,0

ТСБ-Т буферный раствор: 0,15M NaCl, 0,02M трис-HCl, 0,05% TWEEN-20. pH 7,4

Растворы для трансформации клеток *E. coli*

1 буфер: 10мМ HEPES, 55мМ MgCl₂ × 6 H₂O, 15мМ CaCl₂, 250мМ KCl. Раствор стерилизуется фильтрованием через нитроцеллюлозный фильтр диаметром пор 0,22 мкм.

2 буфер: 1M MgCl₂ × 6 H₂O, 1M MgSO₄ × 7 H₂O. Раствор стерилизуется фильтрованием через нитроцеллюлозный фильтр диаметром пор 0,22 мкм.

Растворы для проведения вертикального электрофореза

Разрешающий гель: 44% акриламид, 1,5 М трис-HCl pH=8,8, 50 мг персульфата аммония, 1 мкл/мл TEMED

Концентрирующий гель: 30% акриламид, 0,5 М трис-HCl pH=6,8, 50 мг персульфата аммония, 1 мкл/мл TEMED

Кумасси R-250: 400 мг Кумасси R-250, растворяли в 20 мл 96%-ного этилового спирта, добавляли воды 80 мл и 25 мл хлорной кислоты, перемешивали на магнитной мешалке, после чего доводили 200 мл водой.

Растворы для проведения твердофазного иммуноферментного анализа

Для сорбции антигенов: 0,05 М натрий-фосфатного буферного раствора. pH 8,0.

Блокировка сорбционной активности: ТСБ-Т:015М NaCl; 0,02М трис-HCl pH=7,4; 0,05М TWEEN-20, 0,5% раствор казеина в ТСБ-Т.

Блокировка реакции: 1N HCl.

2.1.4 Бактериальные штаммы *E. coli*

В работе использовали бактериальный штамм *Escherichia coli* Neb Stable (Производитель New England Biolabs): F' proA+B+lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC).

2.1.5 Культуры клеток

Для наработки VLPs на основе rVSV использовали культуру клеток НЕК293Т. Для определения вируснейтрализующей активности антител иммунизированных животных использовали культуру клеток Vero.

2.1.6 Лабораторные животные

Мыши линии Balb/c в количестве 36 штук, пол мужской, массой 16-18 г свободные от посторонней микрофлоры были получены из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Их содержали на стандартном рационе питания и свободном доступе к воде в питомнике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Аутбредные морские свинки в количестве 30 штук, пол мужской, массой 200-250 г свободные от посторонней микрофлоры были получены из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Их содержали на стандартном рационе питания и свободном доступе к воде в питомнике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

2.2 Методы

2.2.1 Теоретический анализ, подбор праймеров для амплификации последовательностей, кодирующих структурные белки GP, NP и VP40 MARV

Из базы данных Genbank были взяты нуклеотидные последовательности, кодирующие структурные белки GP, NP и VP40 MARV. С помощью программного обеспечения SnapGene 3.2.1 (SnapGene, 2016) были рассчитаны праймеры для амплификации генов. Синтез олигонуклеотидных праймеров (табл. 2) и генов в составе плазмидного вектора pGH был проведен в коммерческой научно-производственной фирме ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва).

Для амплификации нуклеотидной последовательности генов, кодирующих структурные белки MARV, расчет условий и кинетики ПЦР нуклеотидной последовательности осуществляли с помощью программного обеспечения SnapGene.

Таблица 2. Праймеры использованные в работе для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки GP, VP40 и NP MARV

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность
F_GPMarb_AsuNHI	5'- aaaaa GCTAGCCGCCACC atgaagaccacatgtctctt -3 '
R_GP Marb_BseX3I	5'-aaaaa CGGCCGCGCCACC taccgatataatttggtaaa -3'
F_VP40_XmaI	5'- aaaaa CCCGGGCGCCACC atggccagttccagcaattac-3'
R_VP40-p2A	5'- acgtctccagcctgcttcagcaggctgaagtagtggcaacggcactgagcggttgat-3'
F_NP-P2A	5'-ctgaagcaggtggagacgtggaggagaaccctggacctatggatttacatagcttgta-3'
R_NP_AspA2I	5'- aaaaa CCTAGGCGCCACC attctaagcgtctacaagttcatagcaacat-3'
F_IRES_AfeI	5'- aaaaa AGCGCTCGCCACC gcagccgctaggccggccg -3'
R_IRES-GP	5'-aagagacatgtggtcttcattggttggtggccatattatcat-3'
F_IRES_GP	5'- gatgataatatggccacaaccatgaagaccacatgtctctt -3'
R_GP_NoI	5'- aaaaa GCGGCCGCGCCACC taccgatataatttggtaaa-3'

Примечания: **Жирным** шрифтом выделены сайты рестрикции, **красным** шрифтом выделена последовательность Козака.

2.2.2 Полимеразная цепная реакция

Реакционная смесь, объемом 50 мкл содержала 10×буфер, 25 мМ dNTP, праймеры в количестве 10 пмоль каждого, 5 ед. а. Pfu-полимеразы, 1 мкл раствора плазмидной ДНК. Реакцию проводили в амплификаторе "БИС" М-111-02-96. Программа полимеразной цепной реакции (ПЦР): плавление – 95°C – 5 мин. (1 цикл). 95°C – 30 секунд. Отжиг – 58°C – 30 секунд, элонгация – 72°C – 30 секунд (30 циклов).

2.2.3 Ферментативный гидролиз

Реакционная смесь содержала 1-2 мкг ДНК, рестриктазу из расчета 1-2 е.а. на 1 мкг. ДНК и 2-х мкл соответствующего рестриктазе буфера 1-кратной концентрации. Общий объем реакционной смеси составил 20 мкл. Гидролиз проводился при условиях согласно инструкциям производителя «Сибэнзим» (Россия).

2.2.4 Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле

Готовили пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1% с добавлением специального красителя ДНК бромистого этидия. При заливке с помощью гребенок в геле формируют специальные лунки, в которые в дальнейшем вносят образцы. Пластины геля помещали в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключали источник постоянного напряжения (Маниатис Т. и др., 1984).

После окончания электрофореза, продолжающегося 1 час, гель помещали на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254-310 нм).

2.2.5 Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля

Элюцию фрагментов ДНК из агарозного геля при помощи набора Cleanup Standard проводили в соответствии с рекомендациями производителя

ЗАО «Евроген» (Россия). К вырезанной полосе агарозного геля, содержащий нужный фрагмент ДНК, добавляли 3V «Связывающего раствора» и помещали в термостат при 50°C на 10 мин. до полного растворения геля. Затем добавляли 1V изопропанола и перемешивали. Раствор наносили на спин-колонку, и ц/ф при 13 200 об/мин в течение 1 мин. при комнатной температуре. Фильтрат удаляли и в спин-колонку добавляли «Промывочный раствор» объемом 750 мкл, ц/ф при 13 200 об/мин в течение 1 мин. при комнатной температуре. Фильтрат удаляли и ц/ф пустую колонку 1 мин. для полного удаления «Промывочного раствора» при комнатной температуре. Затем перемещали колонку в новую пробирку и наносили в центр мембраны 50 мкл воды. Инкубировали 2 мин. при комнатной температуре, затем ц/ф при 13 200 об/мин в течение 1 мин.

2.2.6 Лигирование

Реакцию лигирования проводили 30 мин. при комнатной температуре, используя смесь из 2 мкг ампликонов с ДНК-матрицы, 1 мкг векторной плазмиды и 20 е.а. ДНК-лигазы фага T4 в прилагаемом к коммерческому набору реакционном буфере производства «Сибэнзим» (Россия). Полученную лигазную смесь использовали для трансформирования культуры компетентных клеток *E. coli* штамм Neb Stable.

2.2.7 Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Индивидуальную колонию клеток *E. coli*, выращенную на агаризованной среде, засекали в 50 мл SOB среды и 500 мкл буфера 2 (см. в материалах). Выдерживали при температуре 37°C до оптической плотности $D_{565} = 0,4$ при интенсивной аэрации. Дальнейшие манипуляции проводили во льду. В 50 мл центрифужный стакан перемещали полученную суспензию клеток и охлаждали во льду 15 мин, затем ц/ф при 3000 об/мин при +4°C в течение 12 мин. Надосадочную жидкость тщательно удаляли, осадок ресуспендировали в 1 буфере (см. в материалах), предварительно

охлажденном, и инкубировали во льду 10 мин. Затем ц/ф при 3000 об/мин при +4°C в течение 10 мин. В течение ц/ф приготовили смесь: 4,65 мл буфера 1 + 350 мкл ДСМО и оставили охлаждаться во льду до окончания ц/ф. После ц/ф надосадочную жидкость тщательно удалили, осадок растворяли в выше приготовленной смеси и инкубировали 10 мин. во льду. Далее клетки расфасовывали в предварительно охлажденные 1,5 мл пробирки по 100 мкл и хранили при - 80°C.

2.2.8 Heat-shock трансформация

К «компетентным» клеткам *E.Coli* штамм Neb Stable добавляли 10 мкл лигазной смеси (отношение 1:10), инкубировали на льду в течение 30 мин. После этого клетки подвергали «температурному шоку» при 42°C в течение 45 сек. Охлаждали клетки на льду в течение 2 мин, затем добавляли 200 мкл среды SOB и выдерживали при температуре 37°C в течение 60 мин. По окончании инкубации трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB, содержащей антибиотик (канамицин, 50мкг/мл).

2.2.9 Отбор клонов для рестрикционного анализа

Клетки *E. coli* штамма Neb Stable, трансформированные ДНК-вакциной конструкцией селективно культивировали в 10 мл жидкой питательной среды LB с добавлением канамицина в рабочей концентрации 25 мкг/мл.

2.2.10 Определение нуклеотидной последовательности ДНК отобранных клонов

Секвенирование проводили по методу Сэнгера в центре секвенирования ЦКП "Геномика" СО РАН. Использовался набор CEQ2000Dye Terminator Cycle Sequencing Kit и 16-капиллярный автоматический секвенатор ABI 3130xl.

2.2.11 Программные обеспечения, используемые в работе

Для выравнивания нуклеотидных и соответствующих им нуклеотидных последовательностей данных использовали программное обеспечение SnapGene [122].

Моделирование функции выживания проводили с помощью множительной оценки Каплана-Мейера, сравнение выживания с контрольной группой с помощью критерия Манталя-Кокса с использованием пакетов survival (v.2.44-1.11) (Kassambara A. и Kosinski M., 2019; Therneau T.A., 2020; Terry M. et al. 2020) для языка программирования и среды статистического анализа R (v.3.6.1) (R Core Team, 2016).

2.2.12 Трансфекция

Трансфекцию полученными ДНК-вакцинными конструкциями проводили с помощью Lipofectamine 3000, согласно рекомендациям производителя. В качестве положительного контроля использовали плазмиду pHMGFP, в составе которой присутствует флуоресцентный белок для определения эффективности трансфекции. Эффективность трансфекции клеток НЕК293Т оценивали визуально с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа «Olympus CKX53».

2.2.13 Микроскопические исследования образцов, полученных после трансфекции

Для изучения процесса почкования ВПЧ при помощи электронной микроскопии образцы клеток НЕК293Т фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида при +4°C в течение 48 ч. После обработки растворе параформальдегидом дополнительно фиксировали 1%-ным раствором осмиевой кислоты, обезвоживали по стандартной методике в растворах этилового спирта и ацетона возрастающей концентрации, после чего добавляли смесь Epon-Araldit (производитель «БиоФармЭксперт»). Ультратонкие срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг. Полученные срезы

и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония), фотосъемку и анализ изображения проводили с помощью встроенной цифровой камеры Veleta (SIS, Германия) и программного пакета iTEM (SIS, Германия).

2.2.14 Белковый электрофорез

Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в 1X трис-глицин-SDS буферном растворе. Биологический материал смешивали с буферным раствором для нанесения, выдерживали при температуре 98°C 5 мин. и наносили в верхний концентрирующий гель. SDS-ПААГ (Остерман Л. А., 2002) вели при напряжении ~10 В/см в концентрирующем геле, ~180 В в разрешающем геле. Окраску гелей проводили при помощи раствора Кумасси G-250. Гель от красителя отмывали кипячением в дистиллированной воде (Маниатис Т. и др., 1984).

2.2.15 Иммуноблоттинг

Препараты после белкового электрофореза переносили на нитроцеллюлозную мембрану в течение 1,5 часов при напряжении 80 В в 0,025М трис-HCl буфере, содержащем 0,192 М глицина (pH 8,3) и 20% этанола. Места неспецифического связывания насыщали 1%-ным раствором казеина при 37°C в течение 2 часов в ТСБ-Т буфере. Затем мембрану, содержащую рекомбинантный и вирусные белки, инкубировали со специфическими антителами 4 часа при 20-22°C в буфере ТСБ-Т, содержащем 0,5% казеина. После отмывки в ТСБ-Т буфере мембраны обрабатывали антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена - Goat anti-mouse, Goat anti-human или белок G, меченный пероксидазой для козьих антител в рабочих разведениях в 0,5%-ном растворе казеина в ТСБ-Т в течение 2-х часов при 37°C. Затем полоски мембраны промывали ТСБ-Т буфером и проявляли в растворе хромагена. Реакцию останавливали отмыванием полосок в дистиллированной воде. Специфическое

взаимодействие антител с белками проявлялось в виде ярких коричневых полос.

2.2.16 Культивирование клеток *E. coli* штамма Neb Stable, трансформированные ДНК-вакциной конструкцией

Согласно рекомендациям производителя коммерческого набора Qiagen EndoFree Plasmid GigaKit высококопийные плазмиды необходимо выделять из 2,5 л культуральной жидкости. Культивирование клеток *E. coli* штамма Neb Stable, трансформированные ДНК-вакциной конструкцией проводили в круглодонных колбах V=150 мл питательной среды LB. В колбу добавляли в соотношении 1:100 дневной культуры клеток *E. coli* штамма Neb Stable, трансформированных ДНК-конструкцией и 1:1000 антибиотика канамицина. Культивирование проводили при 37°C 16 часов.

2.2.17 Выделение ДНК

К осадкам бактериальной биомассы добавляли по 125 мл раствора P1 (ресуспендирующий буфер), осадки ресуспендировали. Затем добавляли по 125мл раствора P2 (лизирующий буфер), осторожно перемешивали путем плавного перекачивания, инкубировали не более трех мин. При этом происходил лизис клеток, раствор становился более прозрачным и менее вязким. Далее добавляли 125 мл раствора P3 (нейтрализующий буфер), плавно перемешивали, появлялся творожистый осадок, раствор оставляли во льду на 10 мин. Далее ц/ф при 15 000 об/мин 20 мин. при + 4°C.

Надосадочную жидкость пропускали через колонку с анионообменной смолой. Далее колонку промывали 600 мл Wash buffer. Элюировали ДНК с колонки с помощью буферного раствора QN. После элюции ДНК с колонки добавляли 0,7 V изопропилового спирта для осаждения ДНК из раствора и инкубировали 10 мин. при комнатной температуре для лучшего осаждения ДНК. Затем ц/ф при 15 000 об/мин 20 мин. при + 4°C. Надосадочную жидкость убирали и промывали осадок 100 мл 70%-ного спирта. Полученный

осадок сушили около 5 мин. Финальным этапом является растворение полученного осадка в нужном объеме физиологического раствора.

2.2.18 Иммунизация мышей линии Balb/c

В работе использовали мышей линии Balb/c в количестве 36 штук, пол мужской, массой 16-18 г. Условия содержания животных и проведения экспериментов соответствовали Федеральному закону "Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации" от 27.12.2018 N 498-ФЗ. Исследования с использованием лабораторных животных были одобрены биоэтической комиссией (Регистрационный номер 06-07.2017; дата утверждения: 29.08.2017; № протокола: №3).

Мышей линии Balb/c иммунизировали трехкратно с интервалом 21 суток, внутримышечно дозой 100 мкг ДНК в 100 мкл физиологического раствора на животное. В качестве отрицательного контроля использовали мышей линии Balb/c, которым внутримышечно вводили трехкратно с интервалом 21 суток 100 мкл физиологического раствора.

Через 63 сутки после третьей иммунизации брали образец крови из ретроорбитального синуса для определения Т-клеточного иммунного ответа. Сыворотку получали путем инкубирования крови при 37°C в течение 1 часа, далее кровь инкубировали при +4°C в течение 20 часов с последующим обведении сгустка крови в пробирке стерильным инструментом и ц/ф данного образца в течение 10 мин при 5000g. Препараты сывороток хранили при температуре - 20°C.

2.2.19 Выделение спленоцитов у иммунизированных мышей линии Balb/c

Выделение спленоцитов проводили в стерильных условиях. Селезенки животных пропускали через нейлоновые клеточные сита с диаметром пор 40 мкм (BD Falcon™), ресуспендировали клетки в 5 мл полной среды RPMI-

1640 с 10 % FBS в пробирках с закручивающимися крышками на 15 мл (Axygen, США) с помощью поршнем 2 мл шприца. Клетки ц/ф 5 мин со скоростью 1800 об/мин при + 4°C. Надосадочную жидкость удаляли. Полученный осадок растворяли в 5 мл раствора Бройля для лизиса эритроцитов и в 5 мл среды RPMI-1640 с 10 % FBS, и инкубировали при комнатной температуре 5 мин. Полученную клеточную суспензию ц/ф 5 мин со скоростью 1800 об/мин при + 4°C. Надосадочную жидкость удаляли, клетки промывали 2 раза с использованием 10 мл среды RPMI-1640. Осадок тщательно ресуспендировали в 1 мл полной среды RPMI-1640 с 10 % FBS с добавлением антибиотика гентамицина. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

2.2.20 Стимуляция спленоцитов иммунизированных мышей линии Balb/c

Суспензию спленоцитов расфасовывали в пробирки типа Eppendorf по 2 мл в концентрации 1×10^6 клеток/мл полной среды RPMI-1640 с 10 % FBS. Стимуляцию спленоцитов, выделенных у иммунизированных животных проводили смесью синтетических пептидов MARV, соответствующих выбранному эпитопам. Пептиды растворяли в соответствии с протоколом, прилагаемым к ним. Была экспериментально установлена рабочая концентрации пептидов – 20 мкг/мл каждого пептида на 1×10^6 клеток. Инкубировали спленоциты с пептидами 18 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °C.

2.2.21 Метод внутриклеточного окрашивания цитокинов

К суспензии активированных пептидами спленоцитов добавляли на 1×10^6 клеток по 1 мкл ингибитора транспорта белков BD GolgiStop из набора Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD). Клетки с ингибитором инкубировали 5 ч в CO₂-инкубаторе.

После инкубации клетки ц/ф 5 мин со скоростью 1600 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок промывали в 1 мл PBS, затем снова

ц/ф 5 мин 1600 об/мин при + 4°C. Надосадочную жидкость удаляли и проводили фиксацию и пермеабиллизацию мембраны клеток с использованием набора Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. К клеткам добавляли 250 мкл буфера Cytofix/Cytoperm™. Данную манипуляцию проводили с выключенным освещением. Клетки с буфером Cytofix/Cytoperm™ инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Далее проводили отмывку с использованием 750 мкл Wash Buffer и ц/ф 7 мин при 1800 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и снова промывали Wash Buffer (V=1 мл), ц/ф 8 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли пипеткой, осадок ресуспендировали в 80 мкл Wash Buffer и проводили окрашивание следующими моноклональными антителами: PerCP Rat Anti-Mouse CD4 (2 мкл/1 млн клеток), FITC Rat Anti-Mouse CD8a (2 мкл/1 млн клеток), PE Hamster Anti-Mouse CD3ε (1 мкл/1 млн клеток), APC Rat Anti-Mouse IFNγ (3 мкл/1 млн клеток) (3 мкл/1 млн клеток). Инкубировали клетки с моноклональными антителами 30 мин при + 4 °C. Далее клетки промывали в 1 мл Wash Buffer и ресуспендировали в 350 мкл PBS. После этого проводили анализ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur.

2.2.22 Проведение анализа ELISPOT

Величину Т-клеточного иммунного ответа определяли с помощью метода ELISPOT с использованием набора Mouse IFNγ ELISPOT Set (BD, USA). На 96-луночном планшете из набора были собрированы антитела: (BD Pharmingen): FITC Rat Anti-Mouse CD8a, PE Hamster Anti-Mouse CD3ε, и APC Rat Anti-Mouse IFNγ. Планшеты инкубировали в течение ночи на + 4°C. После блокировки планшета RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) спленоциты были пассированы в количестве $1,0 \times 10^6$ клеток на лунку и простимулированы смесью пептидов в концентрации 20 мкг/мл каждого пептида. Клетки инкубировали 20 часов при 37°C, 5% CO₂, затем планшеты отмывали, добавляли биотинилированные антитела против мышинового IFNγ,

которые проявляли с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена и субстрата АЕС. Количество IFN γ -продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpot-ридера (Carl Zeiss, Germany).

2.2.23 Иммунизация морских свинок

В работе использовали морских свинок в количестве 30 штук, пол мужской, массой 200-250 г. Исследования с использованием лабораторных животных были одобрены биоэтической комиссией (Регистрационный номер 07-08.2017; дата утверждения: 29.08.2017; № протокола: №4).

Морских свинок иммунизировали трехкратно с интервалом 28 суток, внутримышечно дозой 600 мкг ДНК-плазмиды в 200 мкл физиологического раствора на животное. В качестве отрицательного контроля использовали морских свинок, которым внутримышечно трехкратно вводили 600 мкг исходной плазмиды pVAKS в 200 мкл физиологического раствора.

Через 63 сутки после третьей иммунизации брали кровь из сердца для определения гуморального иммунного ответа морских свинок. Сыворотку получали путем инкубирования крови при 37°C в течение 1 часа, далее кровь инкубировали при +4°C в течение 20 часов с последующим обведении сгустка крови в пробирке стерильным инструментом и ц/ф данного образца в течение 10 мин при 5000g. Препараты сывороток хранили при температуре - 20°C.

2.2.24 Твердофазный иммуноферментный анализ

В лунках полистироловых планшетов сорбировали антигены в рабочих концентрациях в объёме 100 мкл в 0,05 М натрий-фосфатного буферного раствора (рН 8,0) при 22°C в течение 18 часов. Блокировку сорбционной активности осуществляли 1%-ным раствором казеина в ТСБ-Т в течение 45 мин при 37°C. Специфические антитела титровали двойным шагом и выдерживали в 0,5%-ном растворе казеина в ТСБ-Т в течение 2 часа при 37°C или 18 часов при 40°C. Использовали антивидовые антитела меченный

пероксидазой в рабочих разведениях в течение 1 часа при 37°C. Проявление иммунной реакции проводили с использованием жидкого субстрата на основе ТМБ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine). Блокировали реакцию добавлением 100 мкл 1 N HCl на каждую лунку и измеряли ОП субстратно-индикаторной смеси на спектрофотометре «Uniscan» при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку неиммунизированной морской свинки.

2.2.25 Антигены для оценки наличия специфических антител у иммунизированных животных

В работе в качестве антигенов для проверки наличия специфических антител у иммунизированных животных использовали:

1. Инактивированный MARV сконцентрированный и очищенный из суспензии инфицированной культуры клеток Vero;
2. Рекомбинантные белки: GPDM, NP и VP40 MARV в прокариотической системе экспрессии *E. Coli*;
3. Рекомбинантные белки: GP, NP и VP40 EBOV в прокариотической системе экспрессии *E. Coli*;
4. VLPs на основе rVSV в эукариотической системе на культуре клеток HEK293T.

При создании рекомбинантных аналогов NP и VP40 MARV были использованы полные последовательности генов, кодирующие белки. Из последовательности кодирующей GP MARV была удалена нуклеотидная последовательность соответствующая муциноподобному домену (mucin-likedomain, MLD). Из-за удаления MLD, а также отсутствия гликозилирования и сайта протеолиза, молекулярная масса полученного рекомбинантного белка GP отличается от нативной.

Последовательности, кодирующие структурные белки MARV были клонированы в составе экспрессионного вектора pET-21a. Были

использованы эндонуклеазы рестрикции Sfr274I и AsuNHI, («Сибэнзим», Россия).

Культуру трансформированных клеток, содержащих рекомбинантную плазмиду с встроенным геном, культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавлением натриевой соли ампициллина в рабочей концентрации 20 мкг/мл. Синтез целевых рекомбинантных белков индуцировали 0,5 mM IPTG. Отбор клонов *E. coli*-продуцентов проводили по наличию синтезируемых целевых белков по результатам электрофореза лизатов клеток в 10% -ном SDS-ПААГ. В качестве отрицательного контроля использовали, полученный аналогичным способом, лизат клеток *E. coli* штамма BL21/DE3(+), содержащий исходную плазмиду pET-21a, не содержащую последовательность белков.

Очистку рекомбинантных белков, содержащих полигистидиновый блок, проводили аффинной хроматографией на Ni-хеллатной смоле, согласно протоколу фирмы-производителя Qiagen (набор Ni-NTA Fast Start).

Полученные клеточные лизаты штамма *E. coli*-продуцента и очищенный рекомбинантный белок анализировали методом белкового электрофореза по методу Лэммли в SDS-ПААГ (Остерман Л. А., 2002). В качестве контроля использовали полученный аналогичным способом лизат клеток *E. coli* штамма BL21/DE3(+), содержащий векторную плазмиду pET-21a. Концентрацию рекомбинантных белков измеряли при помощи набора «Bio-Rad Protein Assay Kit» в соответствии с рекомендациями производителя на спектрофотометре при длине волны 495 нм и оценивали путем калибровки по овальбумину в 4 М растворе мочевины (pH 8,0).

2.2.26 Реакция нейтрализации

Реакцию нейтрализации вируса сыворотками крови иммунизированных животных проводили при помощи VLPs (на основе rVSV, содержащего белок GP MARV) (Соколова А.С. и др., 2019). В лунках 96-луночного планшета титровали (в трехкратном повторе) образцы сывороток крови в питательной

среде ДМЕМ без добавления фетальной бычьей сыворотки и затем в каждую лунку добавляли суспензию VLPs по 50 мкл (с физическим титром 10^{10} частиц/мл). Инкубировали клетки с внесенной смесью 30 мин. в CO₂-инкубаторе при 37°C. По истечению времени в лунки вносили 50 мкл суспензии клеток HEK293T (100 тыс. VLPs /мл) и инкубировали 48 часов в CO₂-инкубаторе при 37°C. Затем из лунок планшета удаляли ростовую среду и промывали лунки с 100 мкл PBS. Затем добавляли 40 мкл 1-х лизирующего буфера и инкубировали 10 мин при 25°C. Суспендировали лизированные клетки и переносили по 35 мкл суспензии в оптический планшет, добавляя 35 мкл LAR. Регистрацию сигнала люминесценции проводили на люменометре (LuMate).

2.2.27 Определение нейтрализующего титра сывороток крови при помощи анализа ингибирования бляшкообразования на культуры клеток Vero

Нейтрализующий титр сывороток крови животных определяли при помощи анализа ингибирования бляшкообразования на культуры клеток Vero. Для этого в каждую пробирку с разведениями сывороток крови добавили 250 мкл рабочего разведения вируса (титр 2,8 lg БОЕ/мл). Смесь тщательно встряхивали и инкубировали при 37°C 60 мин в термостате. На монослой клеток с конфлюентностью 100%, в 24-х луночном культуральном планшете наносили смеси, подготовленные на 1-м этапе в объеме 200 мкл не менее чем в двух повторах. В 2 контрольные лунки вносили по 0,2 мл раствора Хенкса с антибиотиком. Инфицированный культуральный планшет помещали на твердотельный термостат при 37°C на 60 мин, в течение этого времени планшет покачивали каждые 10 мин. Затем в каждую лунку вносили агаровое покрытие в объеме 1 мл. Культуральный планшет помещали в термостат при 37°C, 5% CO₂ на 7 суток. Для регистрации результатов в каждую лунку культурального планшета добавляли краситель (0,2% раствор

генциана фиолетового) в объеме 1 мл, через 24 часа планшет промывали и проводили учет количества бляшек.

2.2.28 Заражение морских свинок MARV

Все исследования с инфекционным материалом проводили на базе отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Центр имеет лицензию и санитарно-эпидемиологическое разрешение на проведение работ с вирусами I-II группы патогенности. Работу проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ и требованиями Санитарных правил по работе с возбудителями I-II групп патогенности с требуемым уровнем биобезопасности.

Морские свинки в количестве 30 штук, пол мужской, массой 200-250 г. подвергались внутрибрюшинному заражению с предварительно определенной летальной дозой MARV для морских свинок.

2.2.29 Статистическая обработка полученных результатов

Статистический анализ данных выполнен совместно с сотрудником отдела биоинженерии Кисаковым Д.Н. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1. Данные обработаны статистически и представлены как медиана с диапазоном вариации.

Достоверность рассчитывалась с использованием непараметрического критерия сравнения выборок U-критерия Манна-Уитни. Для подтверждения различия провели односторонний дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Различия между двумя группами считались достоверными, когда установленное значение Р (или модифицированное значение Р при множественном тестировании) было $\leq 0,01$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Дизайн и конструирование ДНК-вакциной конструкции pVAKS-GPDM

При планировании работы по созданию ДНК-вакцины необходимо было определить гены MARV, кодирующие протективно-значимые белки. Согласно литературным данным гены, кодирующие структурные белки: GP, NP и VP40 несут основные антигенные детерминанты гуморального и клеточного иммунного ответа (Hevey M. et al, 1998; Riemenschneider J. et al., 2003; Daddario S.M. et al., 2005; Daddario-DiCaprio K. M. et al., 2006; Geisbert T. W. et al., 2008; Swenson D.L. et al., 2008; Swenson D. L. et al., 2008; Geisbert T.W. et al., 2009; Geisbert T. W. et al., 2010; Dye J.M. et al., 2016). Именно эти гены выбрали для создания ДНК-вакцинных конструкций.

В первую очередь была создана ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM, в составе которой содержится ген, кодирующий GP MARV (рисунок 5). Этот белок играет определяющую роль в тропизме вируса к клеткам-мишеням. GP MARV состоит из субъединиц GP1 и GP2 (170 и 46 кДа, соответственно), связанных дисульфидными связями (Mittler E. A. et al., 2018).

Выбор GP в качестве мишени очевиден, он является единственной мишенью защитных антител, поскольку GP является единственным вирусным белком на поверхности вириона и, следовательно, обеспечивает проникновение вируса в клетку. В ряде научных работ доказано, что иммунный ответ против GP обеспечивает защиту от инфекции (Swenson D.L. et al., 2008; Geisbert T. W. et al., 2010; Dye J.M. et al., 2016; Milligan I.D. et al., 2016).

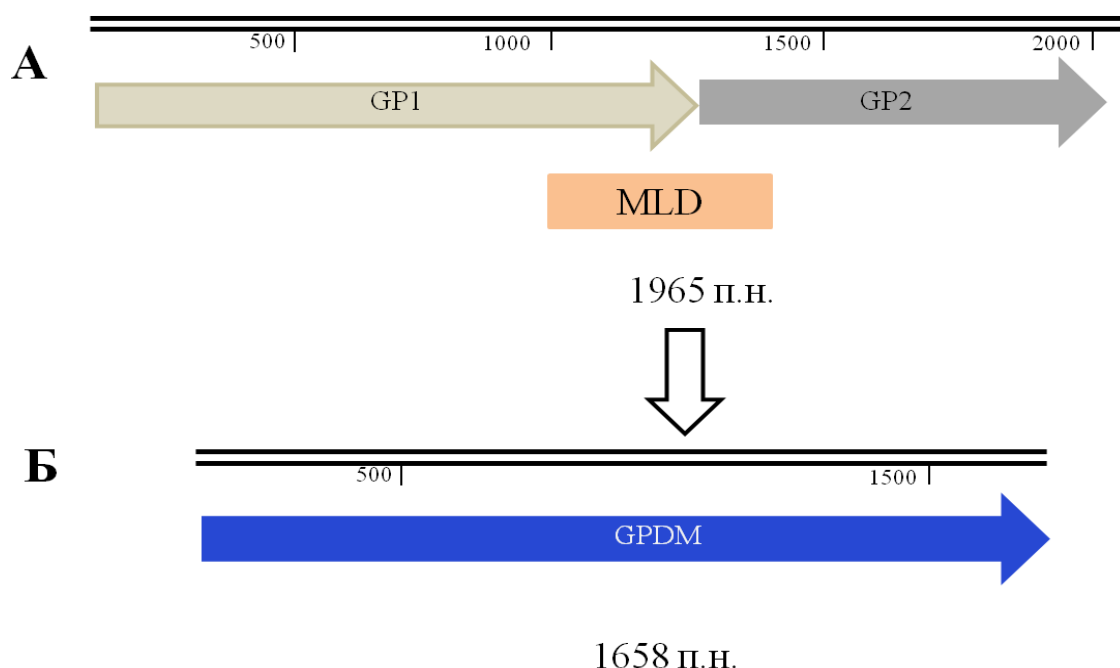


Рисунок 5. Схематическое изображение гена, кодирующего GP MARV. Серым цветом выделены субъединицы GP1 и GP2 поверхностного гликопротеина MARV. Оранжевым цветом выделена область MLD. Синим цветом выделан ген, кодирующий поверхностный гликопротеин MARV без MLD.

Подробное картирование эпитопов GP EBOV, показало, что большое число эпитопов с которыми взаимодействуют антитела, расположены в MLD (Takada A. et al., 2001), но эти антитела не играют определяющую роль в защите. Исследование специфичности репертуара антител выживших людей, в ходе вспышки EF 2014-2015 года показало, что MLD наименее важный регион для развития успешного гуморального иммунного ответа (Bornholdt Z.A. et al., 2016), поэтому было решено при разработке ДНК-вакциной конструкции pVAKS-GPDM использовать последовательность GP без MLD (GPDM) (рисунок 5). На рисунке 6 изображена схематическая структура ДНК-вакциной конструкции pVAKS-GPDM, содержащая ген GPDM.

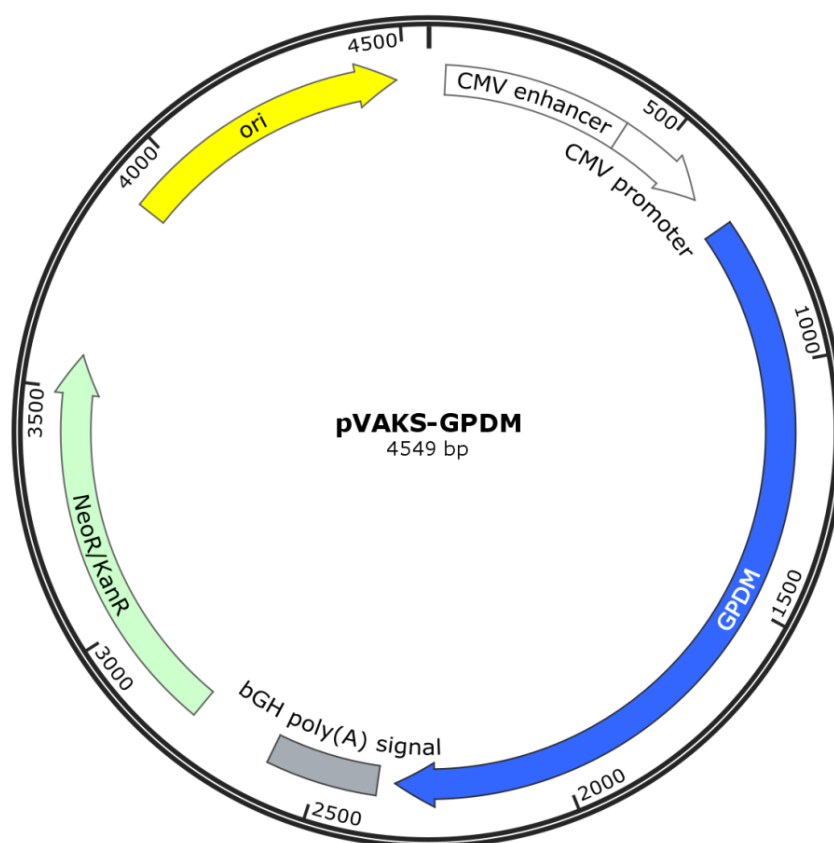


Рисунок 6. Схематическая структура ДНК-вакциной конструкции pVAKS-GPDM

Ori – участок начала репликации; CMV promoter – цитомегаловирусный промотор; GPDM – ген, кодирующий GP MARV без MLD; bGH poly(A) signal – терминатор с сигналом полиаденилирования гена гормона роста быка; NeoR/KanR – ген устойчивости к неомицину/канамицину

Для увеличения эффективности экспрессии гена, кодирующего GPDM MARV, была проведена оптимизация его кодонного состава с помощью online-сервиса Thermofisher.

На рисунке 7 представлена схема получения ДНК-вакциной конструкции pVAKS-GPDM, содержащей ген, кодирующий GPDM MARV. В качестве акцепторного вектора использовали плазмиду pVAKS (рис. 4), разработанную для презентации ДНК-вакцинных конструкций (Волкова Н.В. и др. 2020). В составе вектора отсутствуют гомологичные последовательности из генома млекопитающих, что исключает возможную интеграцию плазмидной ДНК в их хромосомы клеток.

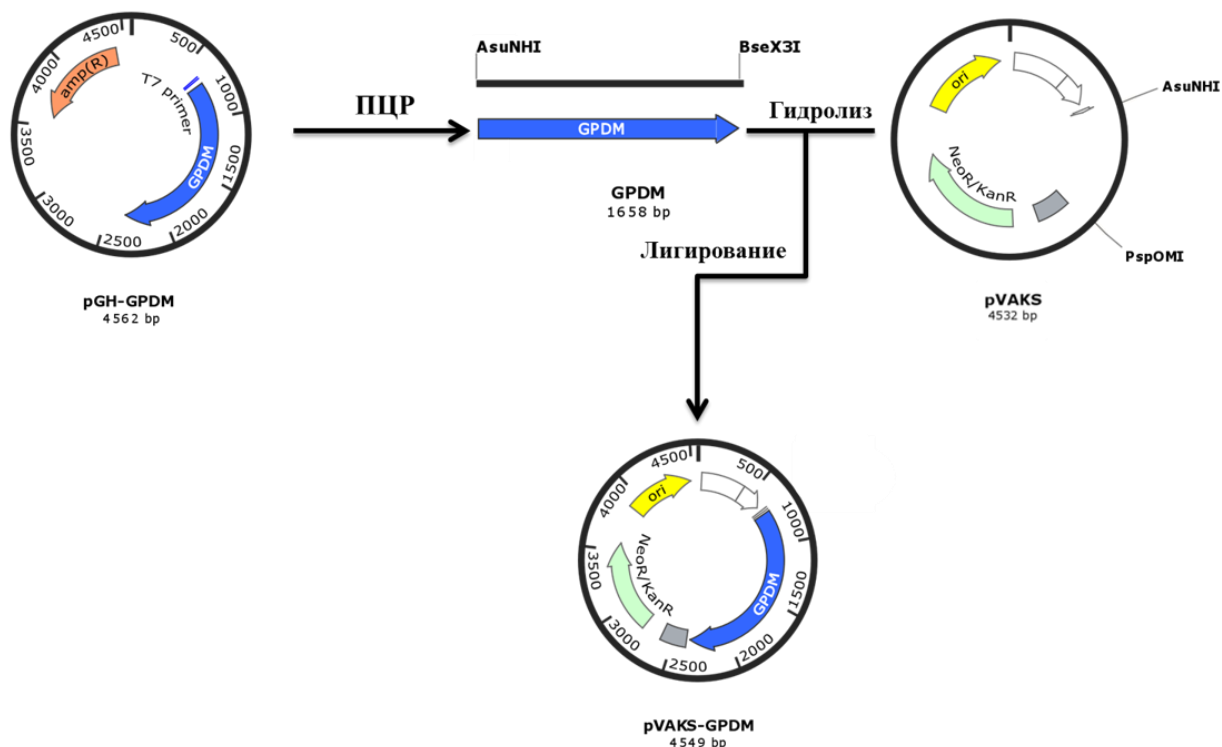


Рисунок 7. Схема получения плазмиды pVAKS-GPDM. Ферментативный гидролиз гена GPDM и вектора pVAKS проводили с помощью пар эндонуклеаз рестрикции *AsuNHI* и *BseX3I*, *AsuNHI* и *PspOMI* соответственно.

Для амплификации гена GPDM были рассчитаны праймеры F_GP Marb_*AsuNHI* и F_GP Marb_*BseX3I* (таблица 2). В состав праймеров были включены последовательности соответствующие сайтам гидролиза *AsuNHI* и *BseX3I* для последующего клонирования гена в составе вектора pVAKS. Для эффективной экспрессии гена в клетках млекопитающих в состав конструкции была введена последовательность Козака (см. таблицу 2 в главе материалы и методы).

В качестве матрицы для амплификации гена GPDM использовали плазмиду pGH-GPDM (рисунок 7). Анализ продуктов амплификации проводили при помощи электрофоретического разделения реакционной смеси в агарозном геле (рисунок 8). Полученный ПЦР-продукт GPDM соответствует теоретически рассчитанному.

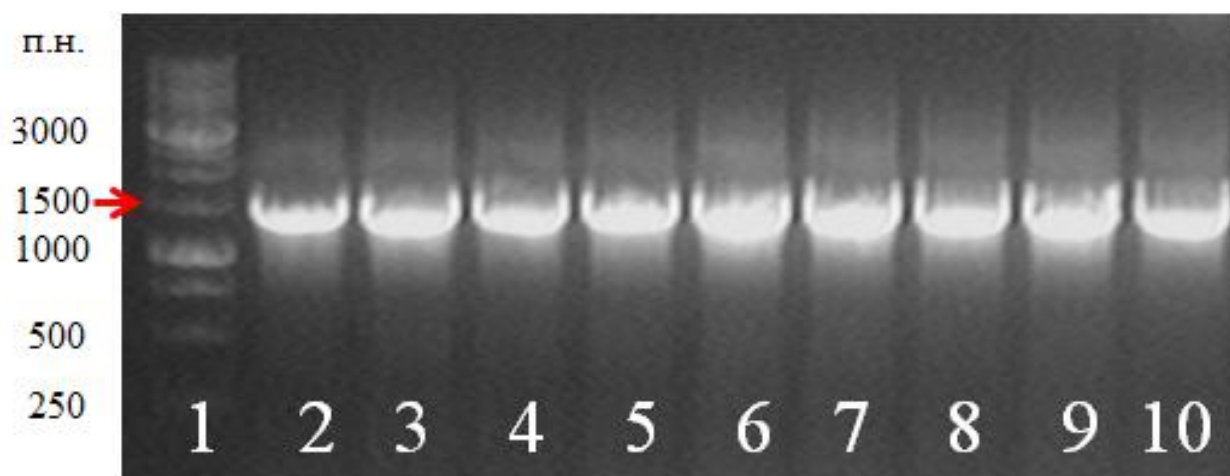


Рисунок 8. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в 1% геле агарозы. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb (13 фрагментов от 0.25 до 10 Kb), длина в п.н. показана слева. 2-10. Продукты амплификации.

ПЦР-продукт GPDM выделяли из геля агарозы (см. материалы и методы) и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *AsuNI* и *BseX3I*. Параллельно проводили ферментативный гидролиз вектора pVAKS эндонуклеазами рестрикции *AsuNI* и *PspOMI*. Продукты гидролиза очищали из геля агарозы (см. главу материалы и методы). После очистки образцы анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле. Результат ферментативного гидролиза вектора и ПЦР-продукта GPDM представлен на рисунке 9.

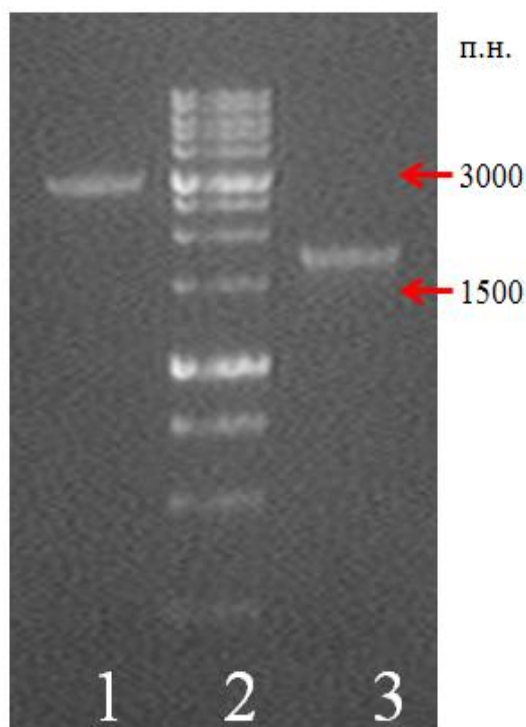


Рисунок 9. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, полученных после ферментативного гидролиза плазмид эндонуклеазами рестрикции в 1% геле агарозы. 1. Вектор pVAKS после обработки эндонуклеазами рестрикции *AsuNI* и *PspOMI*. 2. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана справа. 3. ПЦР-продукт GPDM после обработки эндонуклеазами рестрикции *AsuNI* и *BseX3I*.

Продукты гидролиза лигировали с помощью лигазы бактериофага T4 (см. главу материалы и методы). Продуктами лигирования проводили трансформацию клеток *E.coli*. Колонии, полученные после трансформации нарабатывали для рестрикционного анализа рекомбинантных плазмид. Теоретический рестрикционный анализ проводили при помощи программы SnapGene, были подобраны эндонуклеазы рестрикции для проведения ферментативного гидролиза отобранных клонов ДНК- плазмид (рисунок 10А).

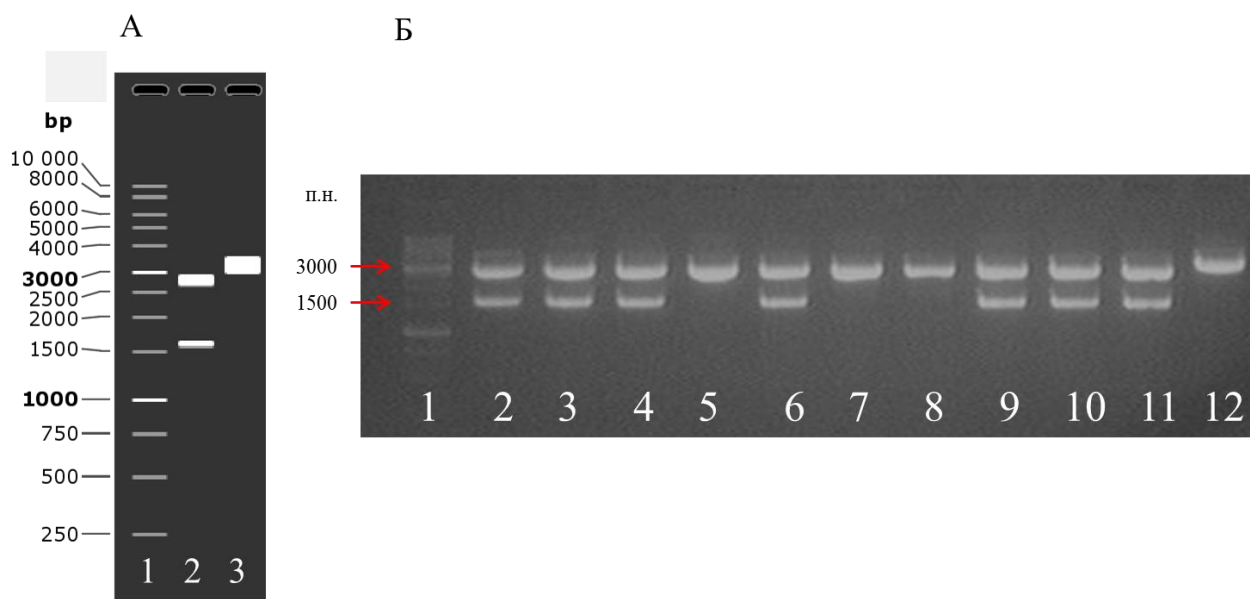


Рисунок 10. Электрофоретическое разделение продуктов рестрикционного анализа ДНК отобранных клонов в 1% геле агарозы

А. Симуляция электрофоретического разделения в 1% геле агарозы рестрикционного анализа клонов. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана слева. 2. Плазмида pVAKS, содержащая вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей GPDM MARV. 3. Плазмида pVAKS, не содержащая вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей GPDM MARV.

Б. Электрофореграмма продуктов ферментативного гидролиза в 1% геле агарозы.

1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана слева. 2-4,6,9-11. Плазмида pVAKS, содержащая вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей GPDM MARV. 5,7,8. Плазмида pVAKS, не содержащая вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей GPDM MARV. 12. Отрицательный контроль (исходная плазмида pVAKS).

Электрофоретическое разделение продуктов ферментативного гидролиза плазмидной ДНК отобранных клонов показало, что в образцах под номером 2-4, 6, 9-11 присутствует вставка гена, кодирующего GPDM MARV (рисунок 10Б). Для анализа наличия замен и делеций плазмидную ДНК отобранных клонов секвенировали по методу Сэнгера.

3.2 Дизайн и конструирование ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-2PM

Для создания ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-2PM (рисунок 11) были использованы гены, кодирующие VP40 и NP MARV, соединенные пептидом P2A (рисунок 12).

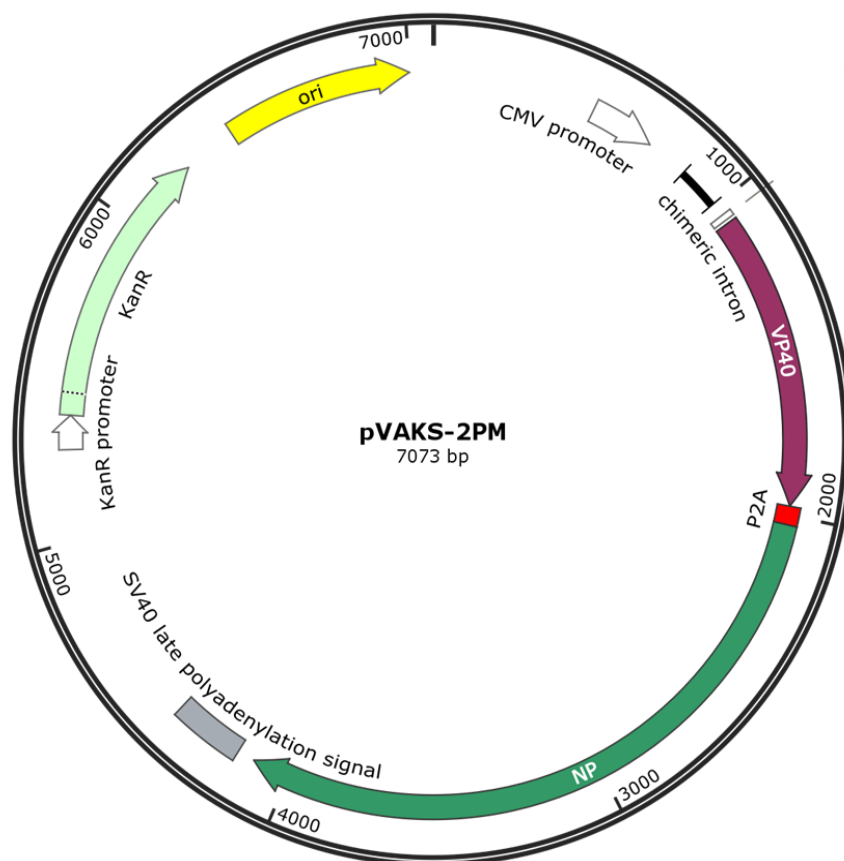


Рисунок 11. Схематическая структура ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-2PM. Ori – участок начала репликации; CMV promoter – цитомегаловирусный промотор; VP40 – ген, кодирующий матриксный белок VP40 MARV; P2A – саморасщепляемый пептид; NP – ген, кодирующий нуклеопротеин NP MARV; bGH poly(A) signal – терминатор с сигналом полиаденилирования гена гормона роста быка; KanR – ген устойчивости к канамицину.

Выбор данных генов обусловлен тем, что VP40 и NP — это внутренние белки MARV, поэтому антитела к этим белкам не обладают вируснейтрализующей активностью, в данном случае защита от заболеваний, вызванных филовиррусами, обусловлена индукцией Т-клеточного иммунитета (Natesan M., 2016). Относительно недавно было проведено исследование, в

котором было показано, что переболевшие людей имели иммунореактивность к GP, NP и VP40 MARV (Bramble M.S. et al., 2018).

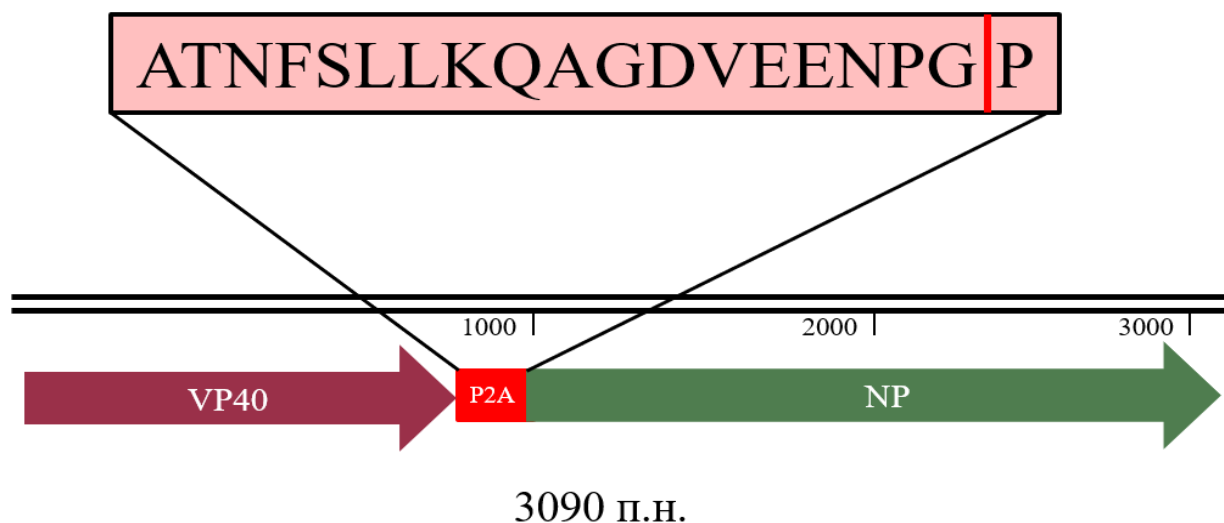


Рисунок. 12. Схематическое изображение кассеты, состоящей из двух структурных белков MARV. Малиновым цветом выделен ген, кодирующий VP40 MARV; Красным цветом выделен пептид P2A; Зеленым цветом выделен ген, кодирующий NP MARV.

Существует четыре 2А-пептиды (рисунок 13). Наиболее эффективным для получения отдельных белков из представленных на рисунке 13 является P2А-пептид, а наименее эффективным пептидом F2А-пептид. Использование P2А-пептида обеспечивает одновременный синтез двух целевых белков в единой рамке считывания (рисунок 13). Преимущества данной стратегии заключаются в независимой от типа клеток ко-экспрессии белков, соединенных P2А-пептидом. Несколько полипептидов синтезируется в равном количестве с одной мРНК под контролем общего промотора.

N-концевые аминокислотные участки 2А-пептида сильно различаются у разных представителей пикорнавирусов, однако на С-конце у всех 2А-пептидов содержится консервативный фрагмент Asn-Pro-Gly-Pro, необходимый для процессинга 2А-пептида (Donnelly M.L. et al., 2001). Данный процесс происходит котрансляционно и состоит в том, что пептидная связь между С-концевыми остатками Gly и Pro 2А-пептида рибосома не образует (Donnelly M.L. et al., 2001) (рисунок 13).

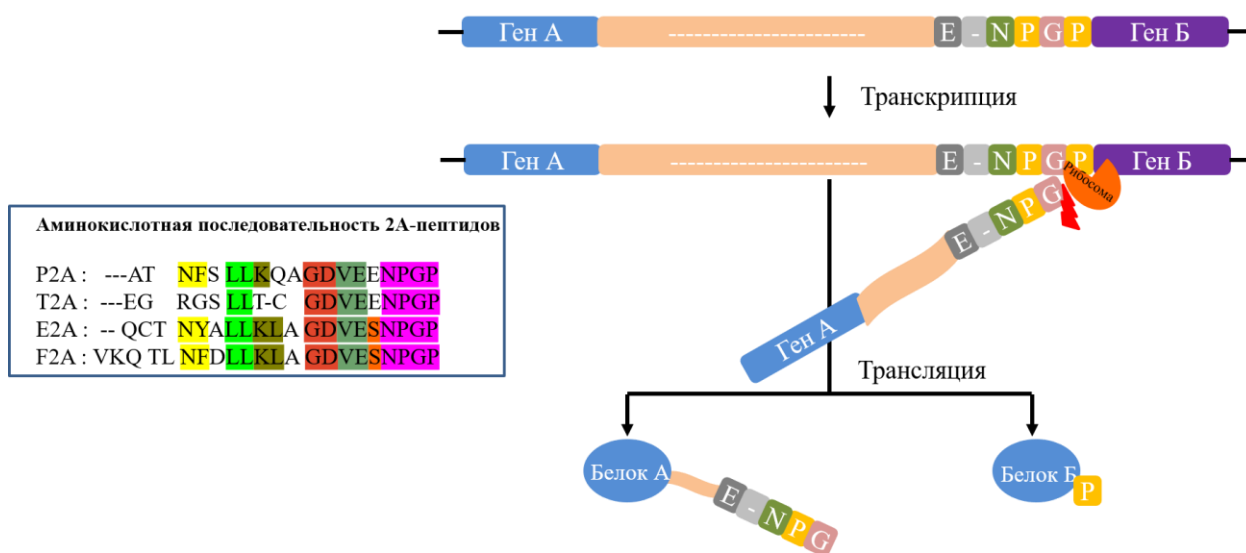


Рисунок 13. Принцип работы P2A пептида

Есть три возможных варианта события:

1. Успешный пропуск и возобновление трансляции приводит к двум «расщепленным» белкам: при этом первый белок несет около 19 дополнительных аминокислотных остатков на С-конце, а второй – остаток Pro на N-конце;
2. Успешный пропуск, но выпадение рибосомы и прекращение трансляции приводит только к образованию одного белка, расположенному выше 2А-пептида;
3. Неудачный пропуск и продолжение трансляции, приводящее к образованию слитого белка.

В целом, использование 2А-пептида приводит к относительно высоким уровням экспрессии белка по сравнению с другими стратегиями ко-экспрессии нескольких генов. Также преимуществом использования 2А-пептида является его небольшой размер, что снижает риск нарушения функции ко-экспрессируемых генов (Szymczak A. L. et al., 2004; Takahashi K. et al., 2007; Verrier J. D. et al. 2011; Geier M. et al., 2015; Wang Y. et al., 2015).

Как и для GPDM MARV, кодонный состав генов, кодирующих VP40 и NP MARV, был оптимизирован с помощью online-сервера Thermofisher для увеличения эффективности экспрессии.

На рисунке 14 представлена схема получения второй ДНК-вакцинной конструкции, содержащей гены, кодирующие VP40 и NP MARV, соединенных пептидом P2A.

Для амплификации генов, кодирующих VP40 и NP, были рассчитаны две пары праймеры F_VP40_XmaI и R_VP40_P2A, F_NP_P2A и R_NP_AspA2I соответственно (см. таблицу 2 в главе материалы и методы). В состав праймеров были введены сайты гидролиза XmaI и AspA2I для последующего клонирования гена в вектор. Для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих в состав конструкции была введена последовательность Козака (см. таблицу 2 в главе материалы и методы).

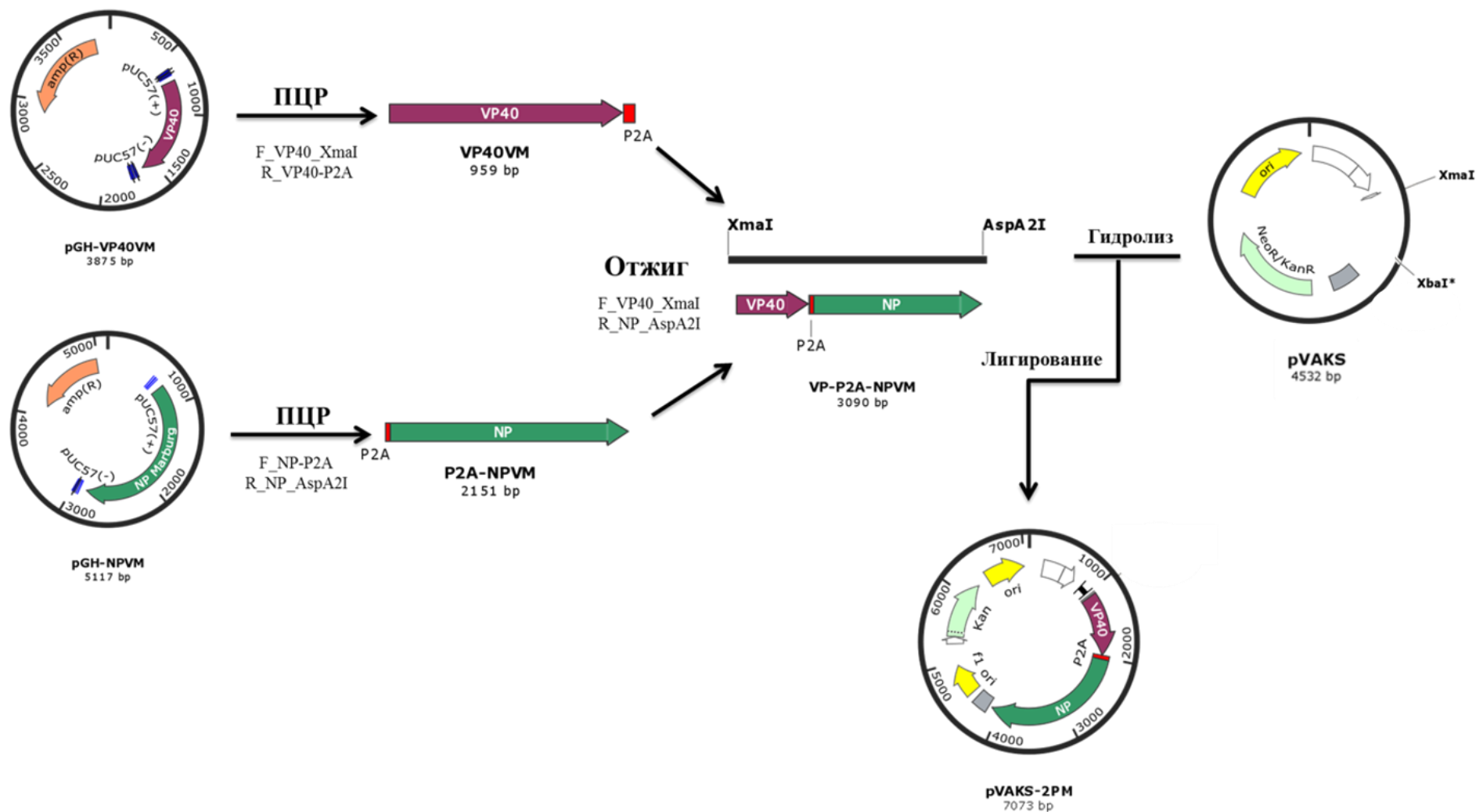


Рисунок 14. Схема получения ДНК-вакциной конструкции pVAKS-2PM. С помощью специфических пар праймеров были амплифицированы и гены, кодирующие VP40 и NP MARV. Ферментативный гидролиз кассеты, включающей два гена, кодирующих VP40 и NP MARV, и вектора pVAKS проводили с помощью пар эндонуклеаз рестрикции XmaI и AspA2I, XmaI и XbaI соответственно

В качестве ДНК-матрицы для амплификации генов, кодирующих NP и VP40 MARV использовали искусственно синтезированную плазмиду pGH-VP40VM и pGH-NPVM соответственно (рисунок 14). Анализ продуктов амплификации проводили при помощи электрофоретического разделения реакционной смеси в агарозном геле (рисунок 15). Полученный ПЦР-продукты (рисунок 15 дорожки 2 и 3) идентичны теоретически рассчитанному. В ампликонах VP40 и NP есть перекрывающаяся область, поэтому для получение продукта включающего обе последовательности проводили их отжиг с последующей ПЦР. Для объединяющего ПЦР использовали праймеры F_VP40_XmaI и R_NP_AspA2I. Ампликон VP40-P2A-NPVM представлен на рисунке 15 дорожка 4.

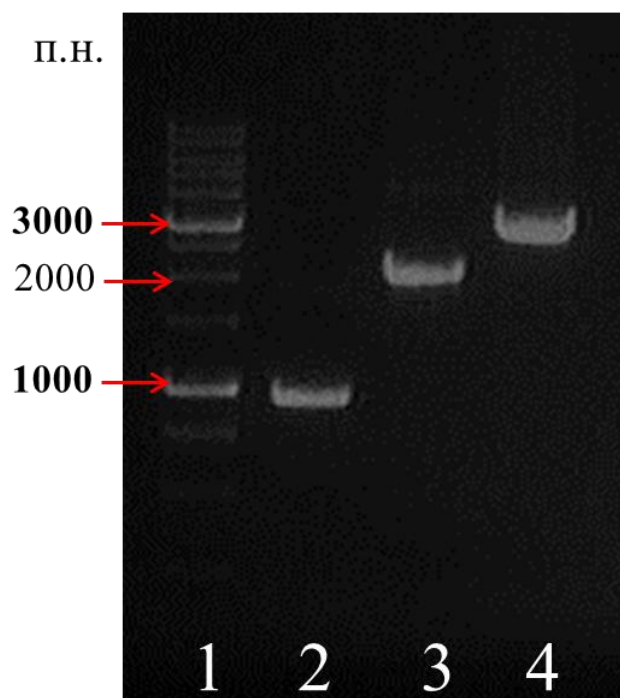


Рисунок 15. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в 1% геле агарозы. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана слева. 2. Продукт амплификации гена, кодирующего VP40. 3. Продукт амплификации гена, кодирующего NP. 4. Продукт амплификации VP40-P2A-NP.

Полученный ПЦР-продукт VP40-P2A-NPVM и вектор pVAKS обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XmaI и AspA2I. Продукты гидролиза очищали из геля агарозы (см. главу материалы и методы). После очистки образцы анализировали при помощи электрофореза в агарозном

геле. Результат ферментативного гидролиза вектора pVAKS и ПЦР-продукта VP40-P2A- NP представлен на рисунке 16.

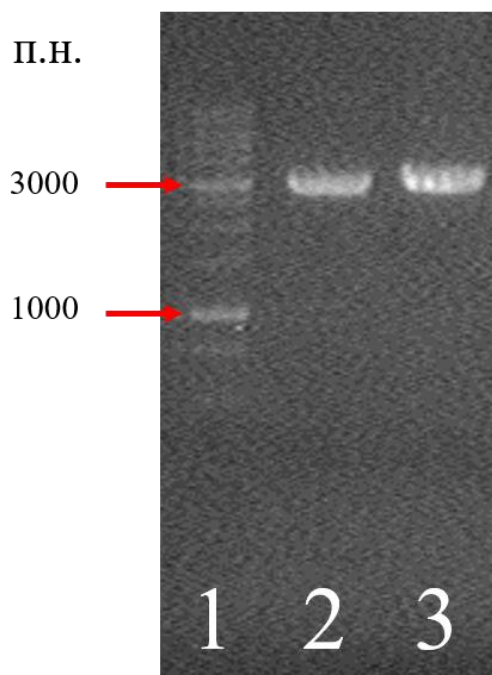


Рисунок 16. Электрофоретическое разделение в 1% геле агарозы фрагментов ДНК, полученных после ферментативного гидролиза плазмид эндонуклеазами рестрикции. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана справа. 2. ПЦР-продукт VP40-P2A-NP после обработки эндонуклеазами рестрикции XmaI и AspA2I. 3. Вектор pVAKS после обработки эндонуклеазами рестрикции XmaI и AspA2I.

Продукты гидролиза лигировали с помощью лигазы бактериофага T4 (см. главу материалы и методы). Продуктами лигирования проводили трансформации клеток *E. coli*. Колонии клеток *E. coli*, полученные после трансформации, нарабатывали для рестрикционного анализа. С помощью программного обеспечения SnapGene были подобраны эндонуклеазы рестрикции для проведения ферментативного гидролиза ДНК отобранных колоний (рисунок 17А).

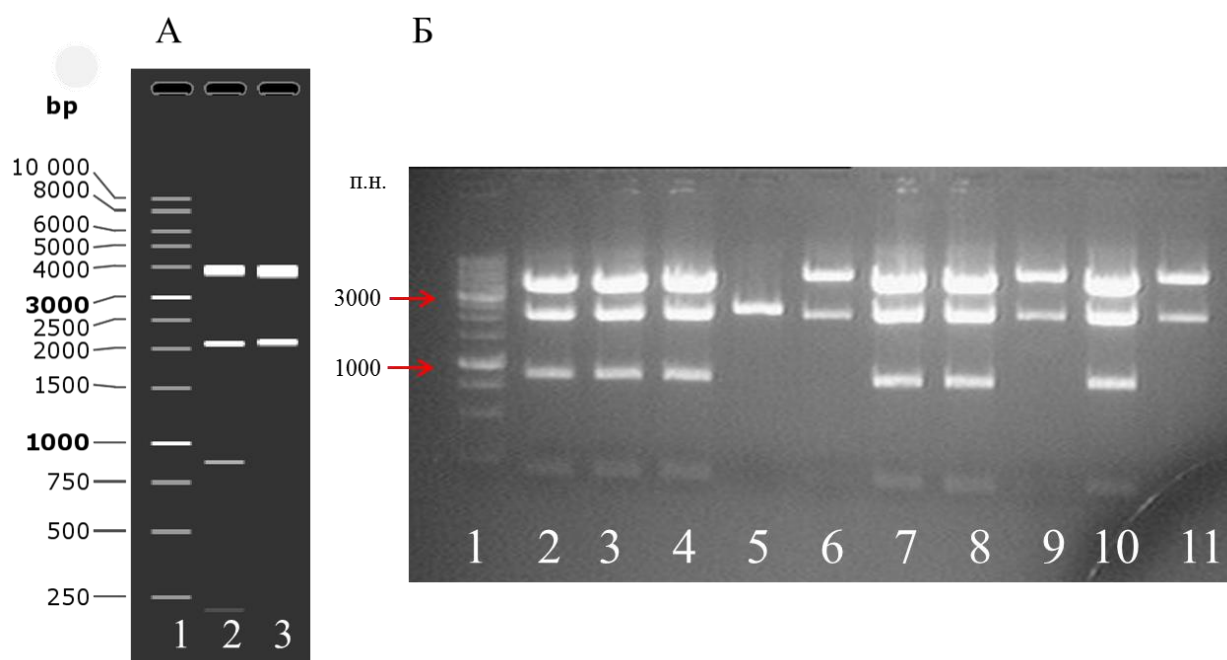


Рисунок 17. Электрофоретическое разделение в 1% геле агарозы продуктов рестрикционного анализа ДНК отобранных клонов

А. Симуляция электрофоретического разделения в 1% геле агарозы рестрикционного анализа клонов. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана слева. 2. Плазида рVAKS, содержащая вставку VP40-P2A-NPVM. 3. Плазида рVAKS, не содержащая вставку VP40-P2A-NPVM.

Б. Электрофореграмма продуктов ферментативного гидролиза в 1% геле агарозы. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана слева. 2-4, 7, 8, 9. Плазида рVAKS, содержащая вставку VP40-P2A-NPVM. 5, 6, 9. Плазида рVAKS, не содержащая вставку VP40-P2A-NPVM. 11. Отрицательный контроль (исходная плазида рVAKS).

Электрофоретическое разделение продуктов ферментативного гидролиза ДНК отобранных клонов, показывает, что в образцах под номерами 2-4, 7, 8, 9 присутствует вставка VP40-P2A-NPVM (рисунок 17Б). Плазмидную ДНК отобранных клонов секвенировали по методу Сэнгера.

3.3 Дизайн и конструирование ДНК-вакцинной конструкции рVAKS-3PM

Следующей задачей было конструирование ДНК-вакцинной конструкции рVAKS-3PM, содержащей гены трех структурных белков MARV, VP40, NP и GPDM MARV (рисунок 18).

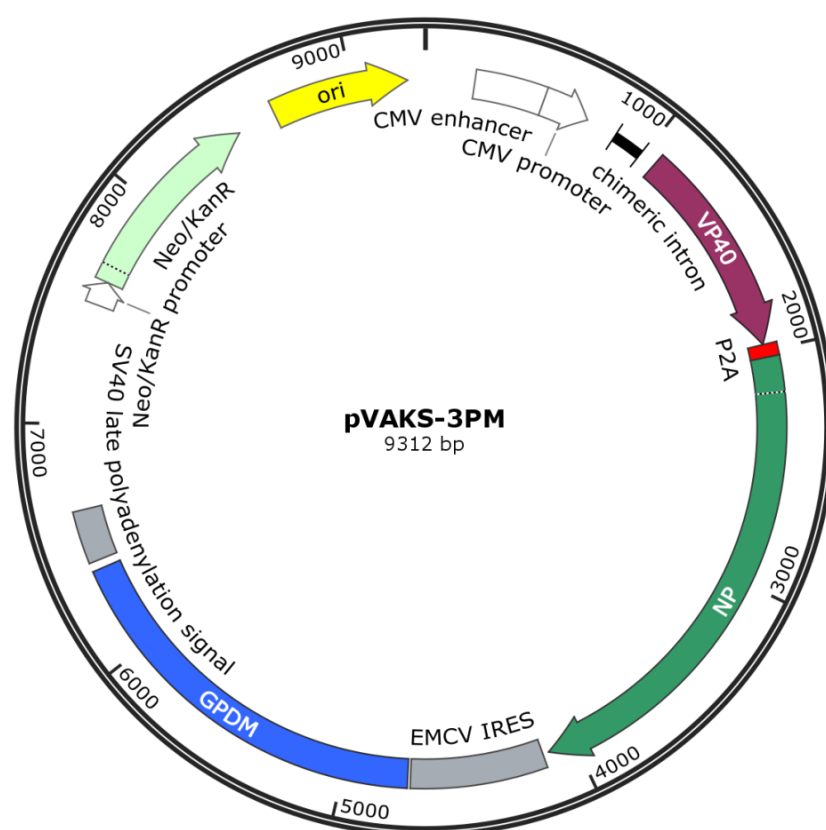


Рисунок 18. Схематическая структура ДНК-вакциной конструкции pVAKS-3PM. Ori – участок начала репликации; CMV promoter – цитомегаловирусный промотор; VP40 – ген, кодирующий матриксный белок VP40 MARV; P2A – саморасщепляемый пептид; NP – ген, кодирующий нуклеопротеин NP MARV; GPDM – ген, кодирующий GPDM MARV; bGH poly(A) signal – терминатор с сигналом полиаденилирования гена гормона роста быка; NeoR/KanR – ген устойчивости к неомицину/канамицину

Информация о подобных конструкциях отсутствует в научных источниках. Существуют исследования, в которых использовали три структурных белка MARV, но они входили в состав разных плазмид. Суть данной разработки состоит в одновременном синтезе сразу трех структурных белков MARV. Расположение генов именно в такой последовательности: VP40-P2A-NP-IRES-GPDM связана с количеством данных структурных белков в нативном вирусе. Однако ген VP40 поместили на первое место, так как VP40 является основным белком ответственным за почкование вирусных частиц.

Для того, чтобы обеспечить одновременный синтез трех целевых белков с единой матрицы в состав конструкции были введены следующие

регуляторные элементы: последовательность саморасщепляемого пептида P2A между генами, кодирующими VP40 и NP и внутренний сайт посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита (IRES EMCV) между последовательностями NP и GPDM MARV (рисунок 19).

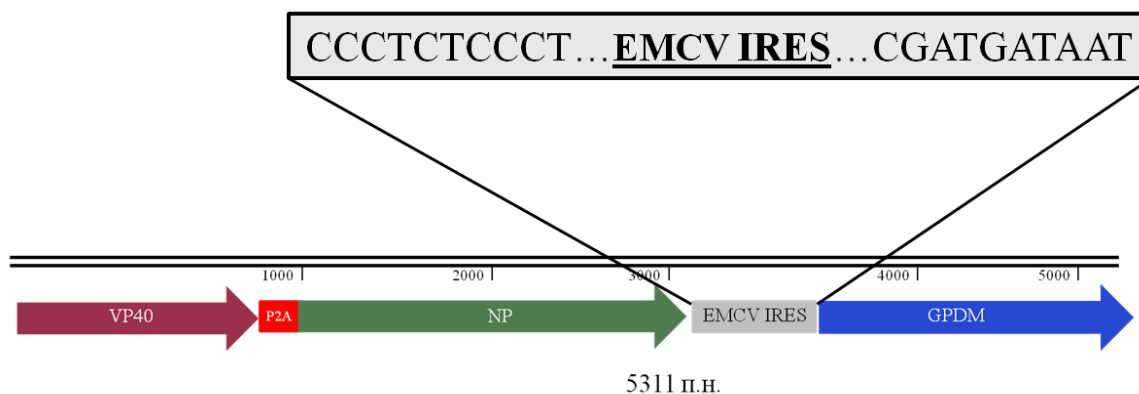


Рисунок 19. Схематическое изображение кассеты, состоящей из трех структурных белков MARV. Малиновым цветом выделен ген, кодирующий VP40 MARV; Красным цветом выделен саморасщепляемый пептид P2A; Зеленым цветом выделен ген, кодирующий NP MARV; Серым цветом выделен внутренний сайт посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита EMCV IRES; Синим цветом выделен ген, кодирующий GPDM MARV.

IRES EMCV представляет собой не кодирующий фрагмент РНК, известный своей способностью инициировать высокие уровни кэп-независимого синтеза белка в клетках млекопитающих (рисунок 20). При таком механизме инициации рибосома связывается с мРНК непосредственно в районе IRES, которые чаще всего располагаются в 5'-НТО недалеко от сайта инициации трансляции, минуя стадии узнавания кэпа и сканирования (Barrett L.W, 2013).

В настоящее время наиболее популярны IRES EMCV, так как их использование обеспечивает высокую эффективность внутренней инициации трансляции в эукариотических клетках. Данный элемент открыт давно и достаточно хорошо изучен (Jang S.K. et al., 1988).

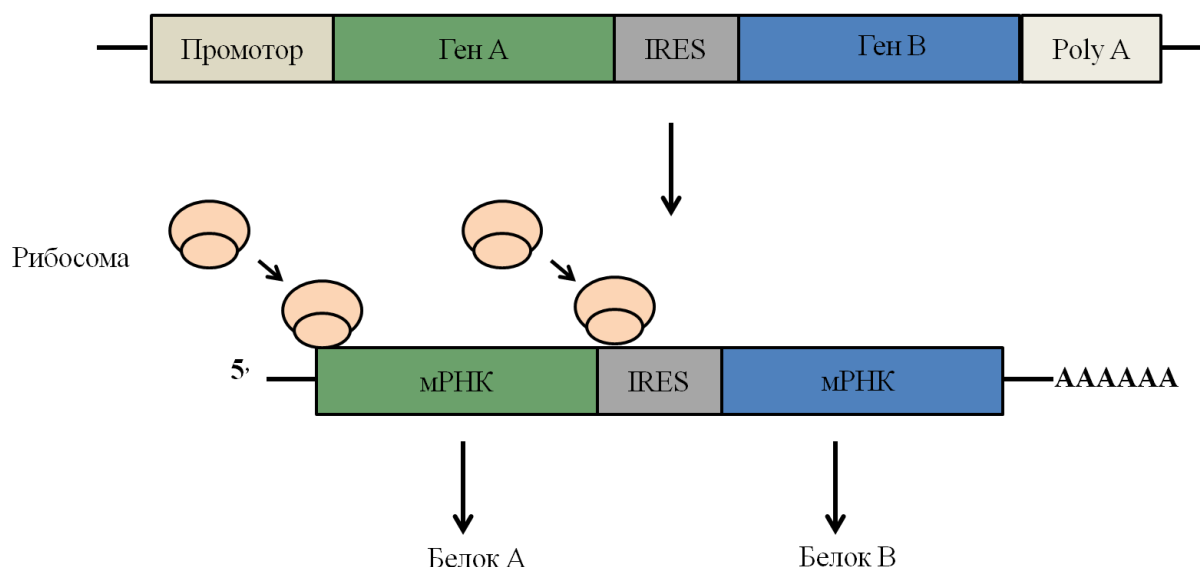


Рисунок 20. Принцип работы EMCV IRES

Конструирование вектора pVAKS-3PM проходило в несколько этапов (рисунок 21). Первой задачей было получение ПЦР-продукта, содержащего ген GPDM, кодирующий GPDM MARV, а также внутренний сайт посадки рибосомы для обеспечения трансляции гена GPDM. Для амплификации последовательностей, IRES и гена GPDM были рассчитаны две пары праймеры F_IRES_AfeI и R_IRES_GP, F_IRES_GP и R_GP_NotI соответственно (см. таблицу 2 в главе материалы и методы). В состав праймеров были введены сайты гидролиза AfeI и NotI для последующего клонирования гена в составе вектора. Для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих в состав конструкции была введена последовательность Козака (см. таблицу 2 в главе материалы и методы).

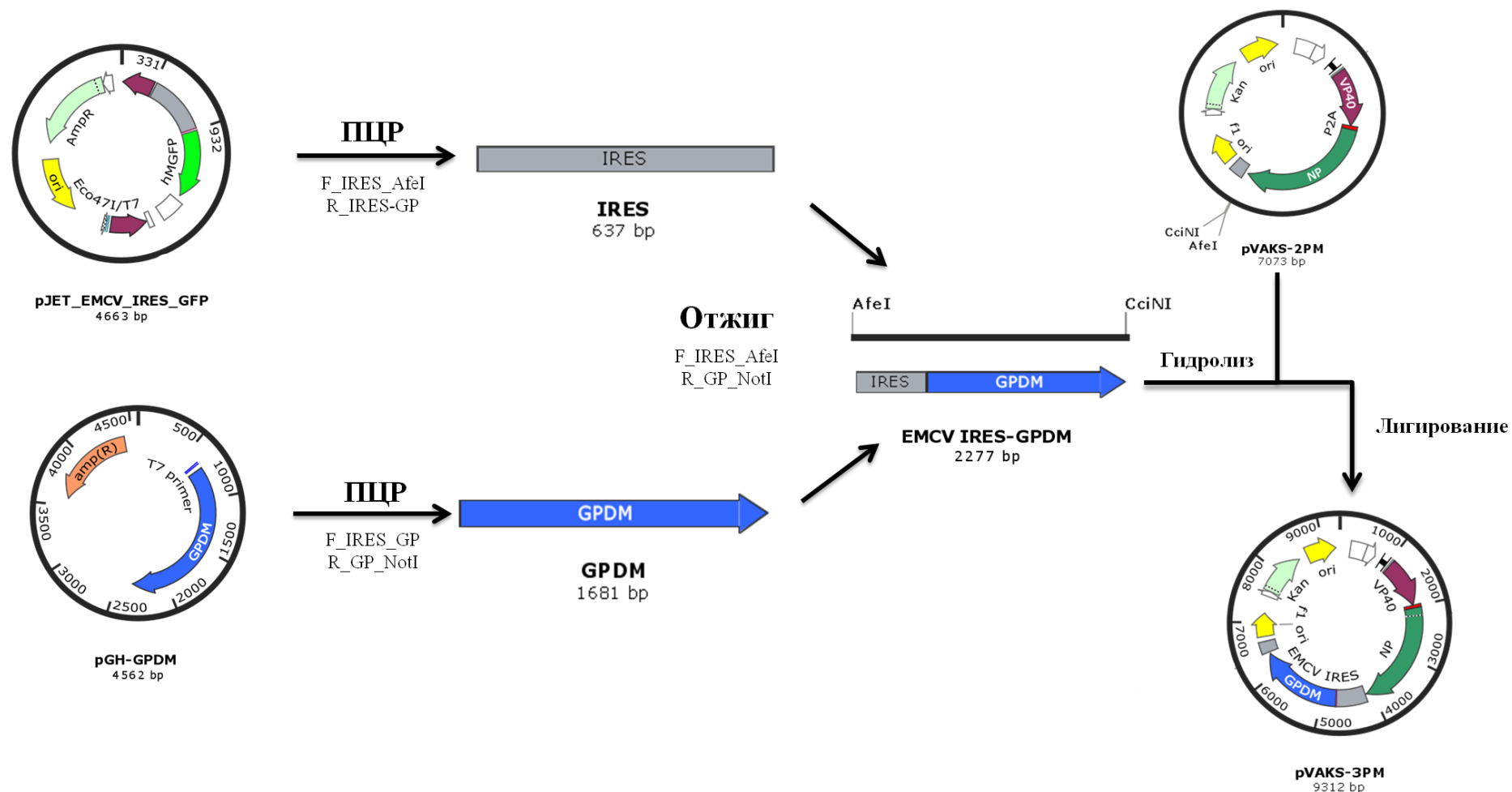


Рисунок 21. Схема получения ДНК-вакциной конструкции pVAKS-3PM. С помощью специфических пар праймеров были амплифицированы гены, кодирующие GPDM MARV и IRES. Ферментативный гидролиз кассеты IRES-GPDM и вектора pVAKS-2PM проводили с помощью пар эндонуклеаз рестрикции AfeI и CciNI

В качестве ДНК-матрицы для амплификации последовательности IRES была использована плазмида pJET_ECMV_IRES_GFP, разработанная сотрудниками отдела биоинженерии. Для амплификации гена GPDM использовали искусственно синтезированную плазмиду pGH-GPDM (рисунок 21). Анализ продуктов амплификации проводили при помощи электрофоретического разделения реакционной смеси в агарозном геле (рисунок 22). Размеры полученных ПЦР-продуктов (рисунок 22 дорожки 2 и 3) соответствуют теоретически рассчитанным. В ампликонах IRES и GPDM есть перекрывающаяся область, поэтому для получения продукта включающего обе последовательности проводили их отжиг с последующей ПЦР. Для объединяющего ПЦР использовали праймеры F_IRES_AfeI и R_GP_NotI (см. таблицу 2 в главе материалы и методы). Ампликон ECMV IRES-GPDM представлен на рисунке 22 дорожка 4.

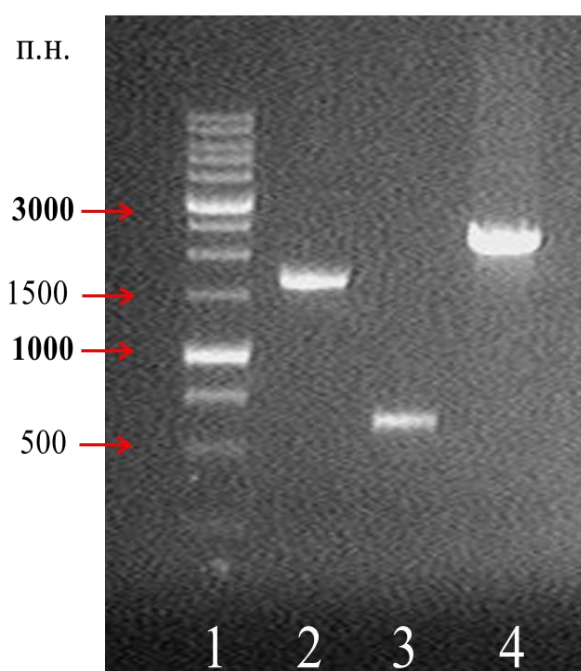


Рисунок 22. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в 1% геле агарозы. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана слева. 2. Продукт амплификации GPDM. 3. Продукт амплификации EMCV IRES. 4. Продукт амплификации EMCV IRES-GPDM.

ПЦР-продукт EMCV IRES-GPDM и вектор pVAKS-2PM обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XmaI и AspA2I. Продукты гидролиза очищали из геля агарозы (см. главу материалы и методы). После очистки образцы

анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле. Результат ферментативного гидролиза вектора и ПЦР-продукта EMCV IRES-GPDM представлен на рисунке 23.

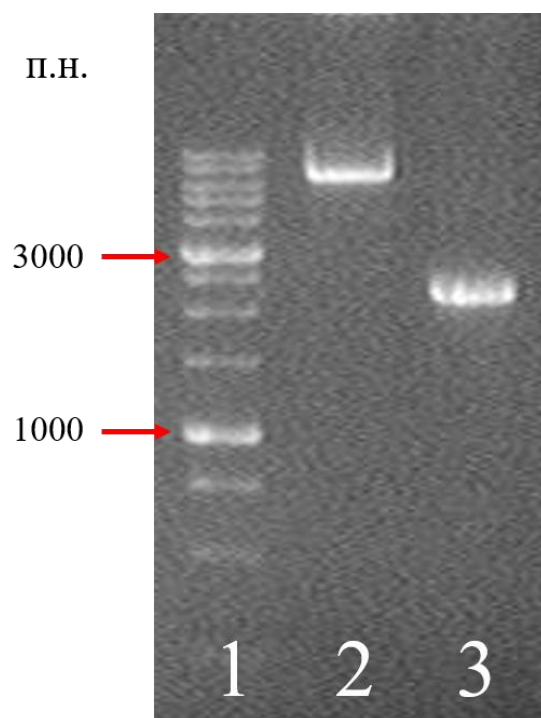


Рисунок 23. Электрофоретическое разделение в 1% геле агарозы фрагментов ДНК, полученных после ферментативного гидролиза плазмид эндонуклеазами рестрикции. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана справа. 2. Вектор pVAKS-2PM после обработки эндонуклеазами рестрикции AfeI и CsiNI. 3. ПЦР-продукт EMCV IRES-GPDM после обработки эндонуклеазами рестрикции AfeI и CsiNI.

Наличие встройки подтверждали при помощи рестрикционного анализа, который провели с использованием рестриктаз AsuNI и KpnI. (рисунок 24). Полученная электрофореграмма (рисунок 24Б) соответствует теоретической рассчитанной (рисунок 24А).

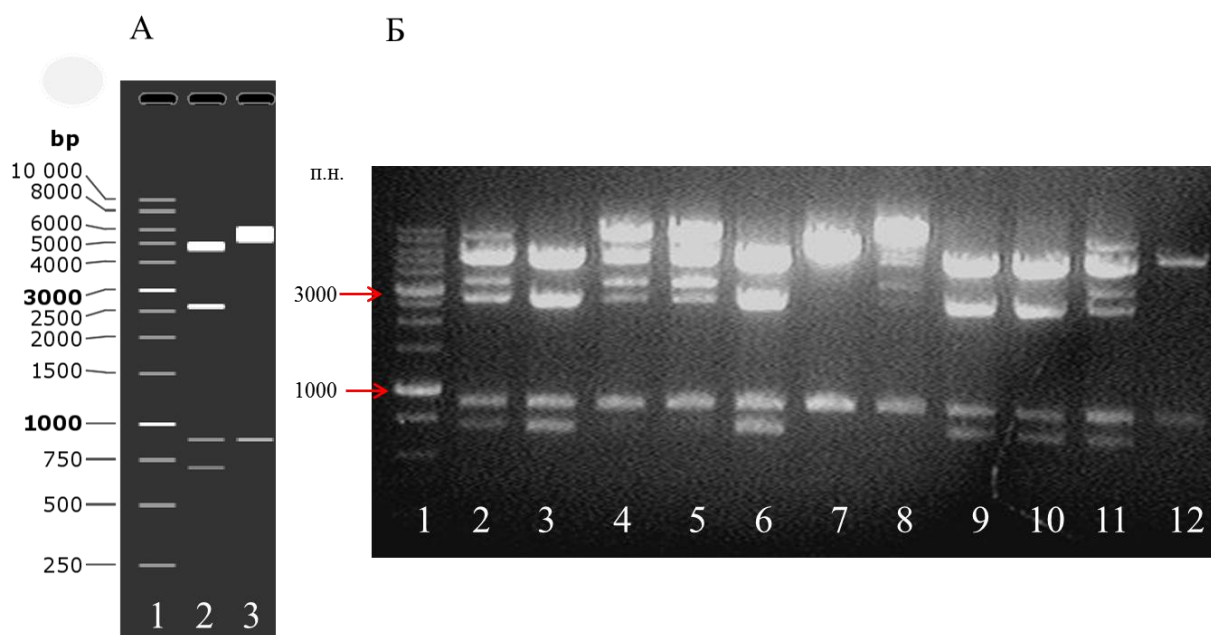


Рисунок 24. Электрофоретическое разделение в 1% геле агарозы продуктов рестрикционного анализа ДНК отобранных клонов

А. Симуляция электрофоретического разделения в 1% геле агарозы рестрикционного анализа ДНК клонов. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана слева. 2. Плазмида pVAKS, содержащая вставку 3PM. 3. Плазмида pVAKS, не содержащая вставку 3PM.

Б. Электрофореграмма продуктов ферментативного гидролиза в 1% геле агарозы. 1. Маркер длин ДНК-маркеры 1 Kb, длина в п.н. показана слева. 3, 6, 9, 10. Плазмида pVAKS, содержащая вставку 3PM. 2, 4, 5, 7, 8, 11. Плазмида pVAKS, не содержащая вставку 3PM. 12. Отрицательный контроль (исходная плазмида pVAKS).

Клоны под номерами 3, 6, 9, 10 содержащие вставку 3PM, были проверены при помощи секвенирования по методу Сэнгера на наличие замен и делеций.

Таким образом, было получено три ДНК-вакцинные конструкции pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM. В составе ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-GPDM содержится ген, кодирующий GPDM MARV, так как исследования показали, что MLD наименее важный регион для развития успешного гуморального иммунного ответа. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-2PM, содержащая в составе ген, кодирующий два структурных белка VP40 и NP MARV. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-3PM, содержащая одновременно три структурных белка MARV: GPDM, NP и VP40, соединенных различными регуляторными элементами для

одновременного синтеза с единой матрицы. Целевые гены, кодирующие структурные белки MARV, находится под контролем CMV промотора, обеспечивающего его экспрессию в клетках млекопитающих. Анализ нуклеотидной последовательности ДНК-вакцинных конструкций показал отсутствие замен и нарушения рамки считывания.

3.4 Изучение экспрессии целевых генов в клетках HEK293T, трансфицированных полученными плазмидами

Для оценки экспрессии целевых генов проводили трансфекцию клеток HEK293T рекомбинантными плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM одновременно и только плазмидой pVAKS-3PM с использованием липофектамина 3000 согласно инструкции производителя (см. главу материалы и методы). Полученные препараты анализировали при помощи электронной микроскопии и вестерн-блота.

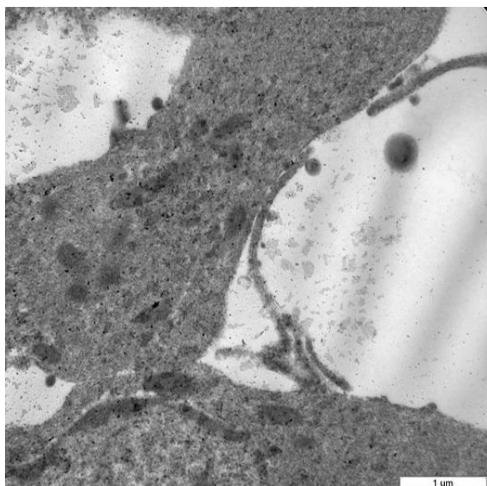
После ко-трансфекции плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM, и отдельно только плазмидой pVAKS-3PM, в клетках HEK293T происходит формирование VLPs. На вторые сутки после трансфекции наблюдалось округление клеток. Данный факт свидетельствует о синтезе GP MARV и его транспорте к цитоплазматической мембране. На третьи сутки наблюдалась массовая гибель клеток из-за почкования VLPs.

Микроскопические исследования показали формирование филоментоподобных структур в обоих вариантах (рисунок 25). Трансфекция клеток HEK293T плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM или только плазмидой pVAKS-3PM приводили к формированию филоментоподобных частиц, т.к. плазмиды содержали последовательность кодирующую белок VP40, ответственный за выход вируса из клетки, а белки GP и NP вносят вклад в эффективное высвобождение VLPs из клетки (Timmins J. et al., 2001; Wenigenrath J. et al., 2010). Подобно EBOV, коэкспрессия VP40 и GP MARV приводит к увеличению эффективности почкования VLPs (Swenson D.L. et

al., 2004). Совместная экспрессия NP с VP40 также увеличивает эффективность почкования VLPs (Licata J.M. et al., 2004).

Необходимо отметить, что в образцах клеток, трансфицированных только плазмидой pVAKS-3PM наблюдались лишь отдельные филоментоподобные структуры, формирование VLPs происходило не так интенсивно, как в случае ко-трансфекцией плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM (рисунок 25Б). Возможно, не столь интенсивное формирование VLPs связано с тем, что эффективность проникновения плазмиды pVAKS-3PM в клетки при трансфекции из-за ее большего размера, чем pVAKS-GPDM или pVAKS-2PM ниже. Меньшая доля клеток оказывается трансфицированными, и следовательно выход VLPs также оказывается ниже.

А



Б



Рисунок 25. Электронная микрофотография VLPs

А. Формирование VLPs при ко-трансфекции клеток HEK293T плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM.

Б. Формирование VLPs при ко-трансфекции клеток HEK293T плазмидой pVAKS-3PM.

Электронные микрофотографии выполнены Б. Н. Зайцевым и О. С. Тарановым, отдел микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Отдельно изучали культуральную среду, содержащую VLPs. Размер частиц найденных в супернатанте типичен для MARV диаметром 90-100 нм и длиной до 1 микрометра (рисунок 26).

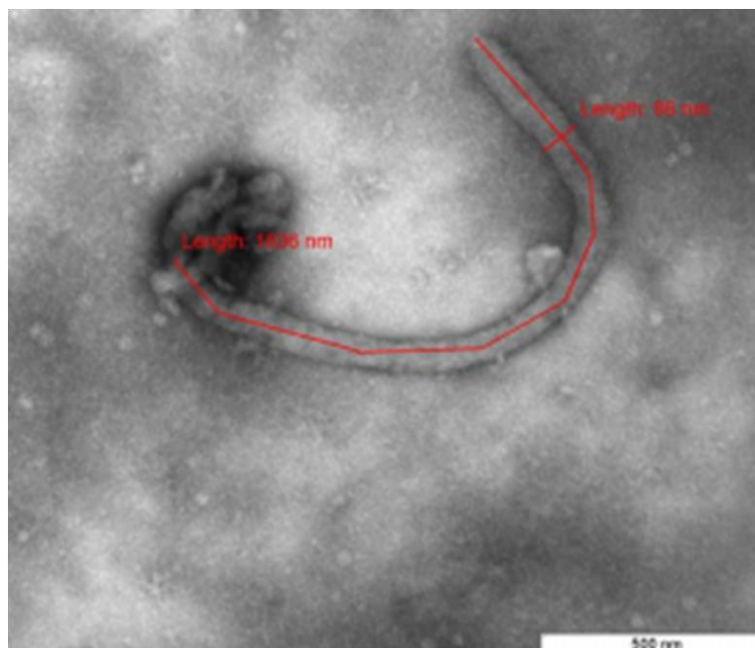


Рисунок 26. Электронная микрофотография VLPs

Характерной особенностью VLPs являлось значительное, по сравнению с типичным для нативного вируса, снижение электронной плотности внутренней части VLPs, соответствующей расположению вирусного генома. Результаты проведенного исследования показывают, что морфология VLPs в культуре клеток HEK293T принципиально не отличается от морфологии MARV. Стоит отметить, что данные результаты полученные впервые. Ранее в работах по получению VLPs были использованы несколько плазмид, в составе которых присутствовали гены, кодирующие белки MARV (Warfield K.L., 2007; Warfield K.L., 2011).

Параллельно электронной микроскопии проводился анализ лизатов трансфицированных клеток HEK293T с помощью вестерн-блота. Лизаты клеток HEK293T, ко-трансфицированных рекомбинантными плазмидами pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM, и отдельно плазмидой pVAKS-3PM разделяли в ПААГ с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Выявление специфических целевых белков осуществляли с использованием сыворотки человека переболевшего MARV (Никифоров В.В., 1994) (рисунок 27).

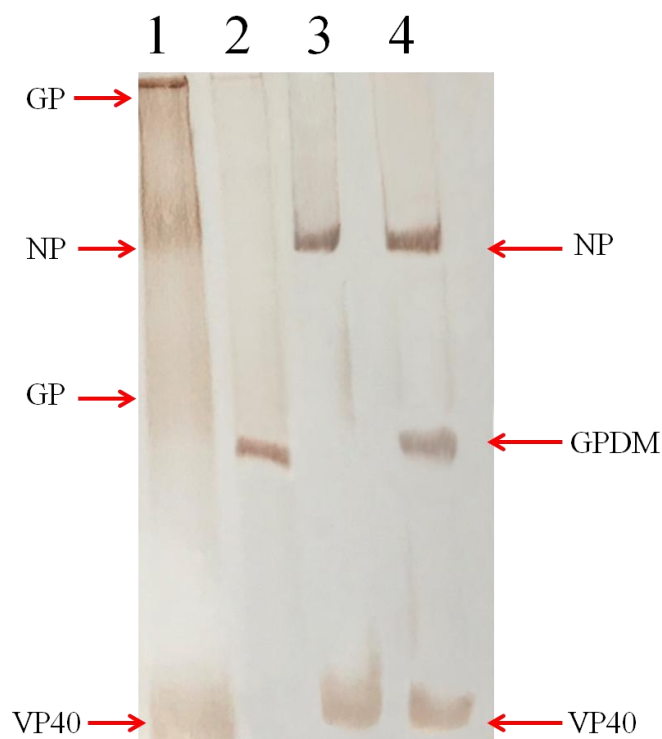


Рисунок 27. Вестерн-блот анализ продуктов экспрессии генов, кодирующих структурные белки VP40, NP и GPDM MARV. 1. Инактивированный препарат MARV. 2. Лизат клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-GPDM. 3. Лизат клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-2PM. 4. Лизат клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-3PM.

В лизате клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-GPDM (рисунок 27 дорожка 2) был выявлен GPDM. В отличие от нативного поверхностного гликопротеина GPDM не разделяется на две субъединицы, так как сайты протеолиза и гликозилирования были сконцентрированы в удаленном MLD.

В лизате клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-2PM (рисунок 27 дорожка 3) было выявлено VP40 и NP.

В лизате клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pVAKS-3PM (рисунок 27 дорожка 4) было выявлено все три структурных белка MARV.

В качестве контроля использовали инактивированный MARV (рисунок 27 дорожка 1).

Таким образом, было показано, что на дорожках, соответствующих трансфецированным плазмидами клеткам, детектируются специфичные фрагменты белков, что подтверждает их синтез в клетке, направляемый целевыми ДНК-конструкциями.

3.5 Исследование способности экспериментальных ДНК-вакцинных конструкций стимулировать гуморальный и Т-клеточный иммунные ответы у мышей линии Balb/c

3.5.1 Анализ специфических антител сывороток крови мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями

В качестве животных для исследования гуморального и Т-клеточного иммунных ответов в работе использовали мышей линии Balb/c. Общая схема иммунизации животных представлена на рисунке 28.

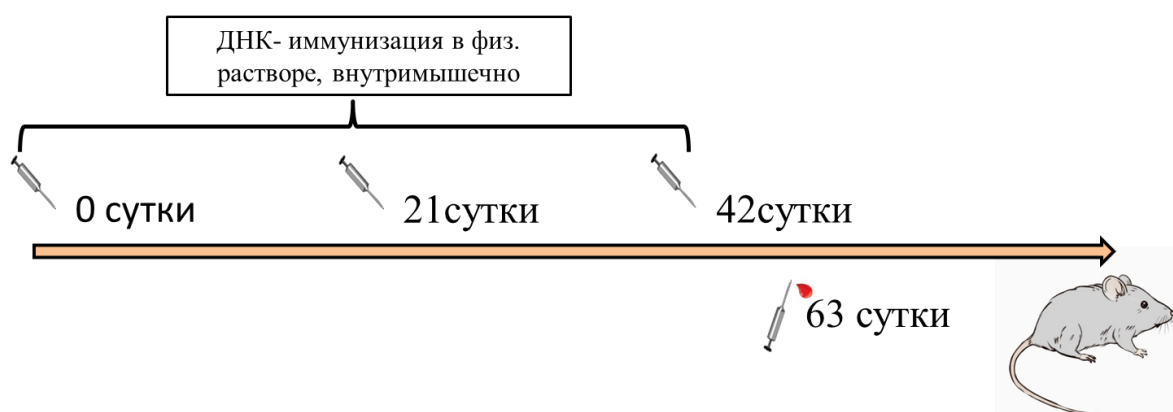


Рисунок 28. Схема иммунизации мышей линии Balb/c ДНК-вакцинными конструкциями. Иммунизацию проводили 3-хкратно с интервалом в 3 недели. Доза вакцины составила по 100 мкг/животное. Забор крови и селезенки проводили через 63 сутки начала иммунизации.

В эксперименте было сформировано четыре группы животных (Мыши линии Balb/c): 1. Иммунизированные ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-GPDM (N=10); 2. Иммунизированные ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-2PM (N=10); 3. Иммунизированные ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-3PM (N=10). В качестве отрицательного контроля для иммунизации мышей (N=6) использовали физиологический раствор.

Одним из важных этапов в создании вакцины является проверка наличия специфических антител сывороток крови иммунизированных

животных. Было доказано в ряде исследований, что у мышей, морских свинок и NHPs антитела против GP филовирусов играют важную роль в защите (Maruyama T. et al., 1999; Wilson, J. A. et al., 2000; Parren P.W. et al., 2002; Wong G. et al., 2014). Недавно были проведены исследования, в которых получены данные об эффективности GP-специфических иммунных ответов у людей, вакцинированных rVSV, экспрессирующей GP EBOV (Henaio-Restrepo A. M. et al., 2015; Henaio-Restrepo A. M. et al., 2017).

В нашей работе было тоже проверено наличие специфических антител сывороток крови у мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями: pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM. Для исследования специфической активности антител, синтезируемых в ответ на иммунизацию ДНК-вакцинными конструкциями, через 63 сутки после третьей иммунизации у мышей был отобран образец крови из ретроорбитального синуса (рисунок 25).

В качестве антигенов для анализа титров специфических антител мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM в ИФА использовали: 1. Инактивированный препарат MARV и EBOV; 2. Рекомбинантные белки: GPDM MARV, NP и VP40 MARV и EBOV полученные в прокариотической системе экспрессии *E. coli* (препараты получены совместно с к.б.н. Ивановой А.В.) (Волкова Н.В., 2020); 3. VLPs MARV и EBOV на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита в эукариотической системе на культуре клеток HEK293T (препарат предоставлен стажером-исследователем отдела биоинженерии Зыбкиной А.В.). Результаты ИФА представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты исследования наличия антиген-специфических антител с помощью ИФА в сыворотках крови мышей линии Balb/c, трехкратно иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями

№ п/п	ДНК-вакцинная конструкция	Обратные титры антител						
		Инакт. MARV	Рек. GPDM	Рек. NP	Рек. VP40	VLPs (полнораз. GP-MARV)	VLPs (GP DM MARV)	Контроль антиген (-)
1	pVAKS- GPDM	463±97,12	519±80,88	89±3,81	89±3,81	426±91,65	463±78,10	60±4,37
2	pVAKS– 2PM	599±94,28	86±4,08	319±26,66	626±61,09	87±4,16	62±6,71	60±3,81
3	pVAKS– 3PM	486±53,79	486±42,54	279±16,33	499±33,33	506±32,66	466±42,16	60±3,81
4	pVAKS	61±3,84	61±4,08	60±3,81	60±4,37	63±4,08	56±6,23	60±3,81

Примечания: **инакт. MARV** - сконцентрированный и очищенный из суспензии инфицированной культуры клеток *Vero*, инактивированный кипячением в течение 2 мин в растворе, содержащем 5 % β-меркаптоэтанола и 1 % додецилсульфата натрия (SDS) с дальнейшим прогреванием при 60⁰С в течение 1 часа; **рек.** – рекомбинантный белок; **VLPs** – вирусоподобные частицы на основе вируса везикулярного стоматита, экспонирующие белок GP MARV; **GP MD MARV** - белок GP без муциноподобного домена. **Контроль антиген (-)** – вирусоподобные частицы на основе вируса везикулярного стоматита, экспонирующие белок GP EBOV, рекомбинантные белки GP, NP и VP40 EBOV. Антигены (инакт. MARV и рек. белки) использованы в концентрации 1мкг/мл (100 нг/лунка). VLPs (в разведении 1/100 из очищенного препарата с физическим титром 10⁶). Для подавления неспецифического сигнала связывания антител с рекомбинантными белками, сыворотки крови иммунизированных животных истощали лизатом *E.coli*. Титр антител определяли при средней арифметической значения ОП (при трехкратном повторе титрования) с учетом фона системы значение ОП = 0,15; положительным считали значение ОП в два раза и более выше ОП фона системы.

Показано, что сыворотки крови мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакциной конструкцией pVAKS-GPDM, содержат антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV, очищенного рекомбинантного белка GPDM MARV, а также VLPs MARV. Сыворотки животных из этой группы взаимодействовали с очищенными рекомбинантными белками VP40 и NP MARV на уровне фонового значения в титре от 1/100.

Сыворотки крови мышей, иммунизированных ДНК-вакциной конструкцией pVAKS-2PM, содержат антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV, очищенных рекомбинантных белков VP40 и NP MARV. Сыворотки животных из этой группы взаимодействовали с очищенным рекомбинантным белком GPDM и VLPs MARV на уровне фонового значения в титре от 1/100. В то же время у группы мышей после иммунизации ДНК-вакциной конструкцией pVAKS-3PM, были найдены антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV, очищенных рекомбинантных белков GPDM, VP40 и NP MARV, а также VLPs MARV. Порядок титров антител сопоставим с опубликованными ранее данными (Grant-Klein R.J. et al., 2012). Наибольшие титры специфических антител вырабатывается у мышей линии Balb/c иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM. Поэтому для исследования Т-клеточного иммунного ответа использовали ДНК-вакцинные конструкции pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM.

3.5.2 Выбор антигенных пептидов для проведения Т-клеточного ответа

Определение количества CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN γ , была изучена с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов после *in vitro* стимуляции спленоцитов, выделенных у иммунизированных животных, смесью синтетических пептидов, соответствующих эпитопам MARV: LLLRVTTEERTFSLINRHAI, TTEERTFS LINRHAIIDFLL, TQHLVYFRKKRSILWREGDM, AAGLSWIPFFGPGIEGLYT

A, GPGIEGLYTAGLIKNQNNLV, GLIKNQNNLVCRLRR, NNLVARLRRLAN QTA, NAPIDFDPVPNTK, LRIWSVQED, WGVLTNLGILLLLLSIAVLIA.

Пептиды рассчитаны д.б.н зав. теоретического отдела Бажаном С.И.

Последовательности пептидов являются точными копиями последовательностей эпитопов, входящих в состав целевых иммуногенов.

Выбор антигенных пептидов осуществляли следующим образом. В составе первичной структуры белков MARV с помощью программ TEpredict и ProPred проводили предсказание потенциальных Т-хелперных эпитопов. В составе белков определяли фрагменты длиной по 25-35 а.к.о., содержащие наибольшее количество потенциальных эпитопов, рестриктированных наиболее широким репертуаром алломорф молекул МНС II класса. Затем выбирали фрагменты, содержащие известные Т- или В-клеточные эпитопы (по данным IEDB, от 02.04.2020).

3.5.3 Сравнительное исследование иммуногенности ДНК-конструкций и выбор перспективного вакцинного кандидата, который индуцирует наиболее высокие уровни MARV-специфических ответов CD4+ и CD8+

Недавние исследования показали, что Т-клеточный ответ коррелирует с выживаемостью при заболевании, вызванным филовиром. В работе McElroy A.K. et al. продемонстрировали, что выжившие после EF пациенты имели устойчиво высокие уровни CD4+ и CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN γ и TNF α (McElroy A.K. et al., 2015).

В аналогичном исследовании показано, что у выживших после лихорадки Марбург повышались популяции CD4+ Т-клеток (Stonier S.W. et al., 2017). Также было проведено исследование, в котором было показано, что отсутствие у мышей рецепторов IFN α/β и γ приводит к их гибели (Comer J. E. et al., 2019).

Результаты исследования показывают, что препарат IFN γ , одобренный FDA, может служить новым и эффективным вариантом профилактики или лечения заболеваний, вызванных филовиром (Bethany A. et al., 2015).

Используя адаптированный к мышам EBOV, исследователи обнаружили, что мышинный IFN γ , введенный за 24 часа до или после заражения, надежно защищает мышей от летального исхода. Уже через шесть часов после инфицирования EBOV уровни РНК в макрофагах, обработанных IFN γ , были ниже, чем в инфицированных, необработанных клетках.

IFN γ активирует макрофаги и делает их более способными создавать эффективный иммунный ответ, такой как усиленный процессинг и презентация антигена за счет активации МНС класса II, увеличения продукции активных форм кислорода (ROS) и синтазы оксида азота (NOS), и увеличения секреции провоспалительных цитокинов. Кроме того, он может активировать NK, увеличивать их противоопухолевую активность, а также регулировать выработку антител для модуляции ответов В-клеток. IFN γ также способствует росту и созреванию других типов клеток и миграции лейкоцитов. Повышенная иммунная активация, в конечном счете, приводит к эффективному удалению патогенов за счет усиленного фагоцитоза, провоспалительных реакций и рекрутирования лимфоцитов (Kak G. et al., 2018).

Также было проведено исследование, в котором показано, что мультивалентные вакцины индуцировали GP-специфические гуморальные ответы и IFN γ -опосредуемые клеточные ответы на каждый GP, экспрессируемый в составе мультивалентной вакцины (Callendret B. et al., 2018).

Исходя из вышеперечисленных фактов о важности IFN γ , как одного из параметров успешной вакцины против заболеваний, вызванных филовиром, в нашем исследовании интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN γ .

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN γ с помощью метода IFN γ ELISpot и внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS).

Результаты исследования Т-клеточного ответа у мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, с помощью метода IFN γ ELISpot представлены на рисунке 29.

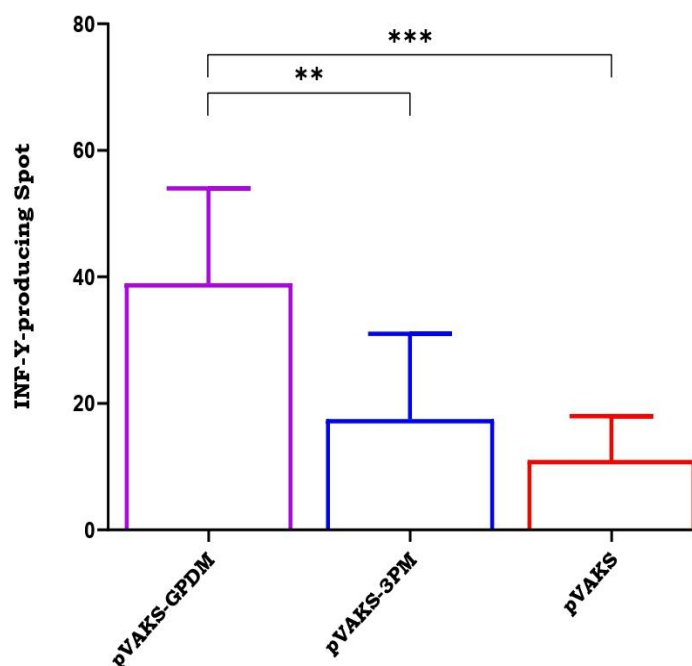


Рисунок 29. Результаты исследования количества IFN γ -продуцирующих клеток в реакции IFN γ -ELISpot у мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1. Данные обработаны статистически и представлены как медиана с диапазоном вариации.

Достоверность рассчитывалась с использованием непараметрического критерия сравнения выборок U-критерия Манна-Уитни. Для подтверждения различия провели односторонний дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса.

Статистически значимые различия ($p < 0.01$) найдены при сравнении групп «pVAKS-GPDM» и «Контроль», «pVAKS-GPDM» и «pVAKS-3PM».

Иммунизация животных ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-GPDM индуцировала наиболее высокий специфический Т-клеточный ответ, по сравнению с группой мышей, иммунизированных исходным вектором pVAKS и pVAKS-3PM.

Способность CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеток экспрессировать IFN γ была также протестирована с помощью ICS после стимуляции спленоцитов *in vitro*,

собранных у иммунизированных мышей. Мы наблюдали, что все группы мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, развивали MARV-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы. В группе мышей, иммунизированных рекомбинантной плазмидой pVAKS-GPDM уровни Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ , были значительно выше, чем в контрольной группе, которым вводили pVAKS и pVAKS-3PM (рисунок 30 и 31).

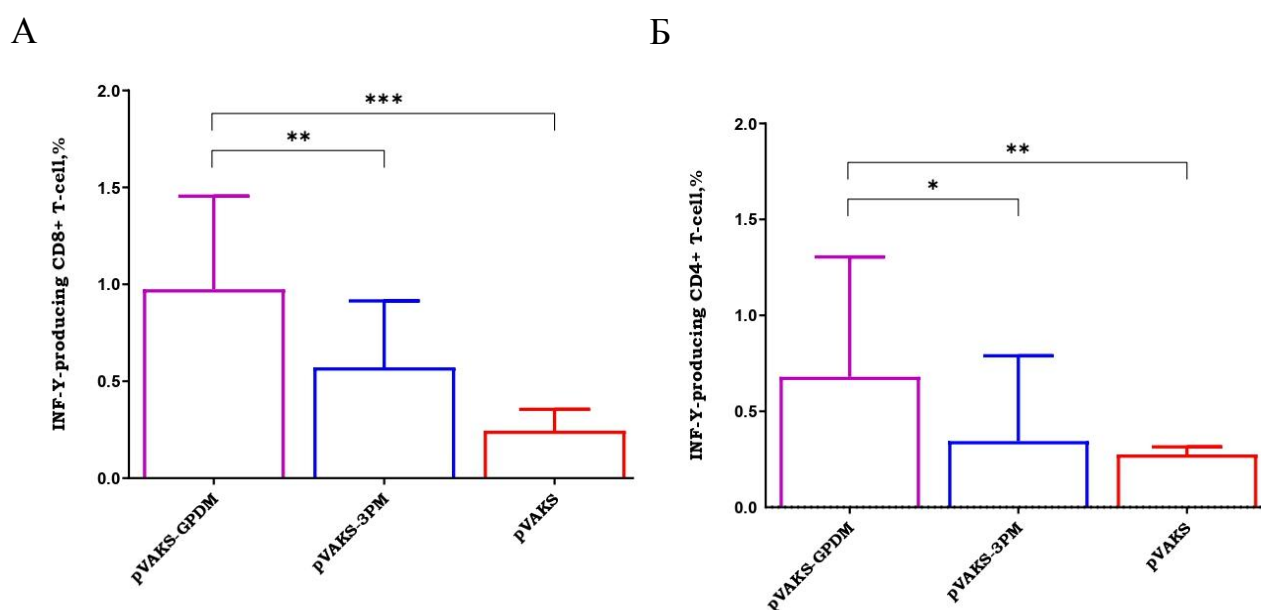


Рисунок 30. Продукция IFN γ

А. CD8⁺ Т-лимфоцитами. % IFN γ продуцирующих CD8⁺ Т-лимфоцитов (от общего числа CD8⁺ Т-клеток) показан на оси Y. Название групп иммунизированных животных отображены на оси X.

Б. CD4⁺ Т-лимфоцитами. % IFN γ продуцирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов (от общего числа CD4⁺ Т-клеток) показан на оси Y. Название групп иммунизированных животных отображены на оси X.

Таким образом, показано, что ДНК-вакцинные конструкции, содержащие в своем составе структурные белки MARV, индуцировали CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы после иммунизации мышей Balb/c. Также полученные данные позволяют говорить о том, что экспрессируемые в составе ДНК-вакцинных конструкций иммуногены проходят правильный

процессинг в АПК и обеспечивают презентацию освободившихся в результате процессинга эпитопов Т-лимфоцитам.

В рамках работы проведено сравнительное исследование иммуногенности сконструированных ДНК-вакцинных конструкций и показано, что наиболее высокие титры вирус-специфических антител и ответы $IFN\gamma$ -продуцирующих $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов наблюдаются в группе животных, иммунизированных ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-GPDM. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-3PM показала наименьший ответ $IFN\gamma$ -продуцирующих $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов по сравнению с ДНК-вакцинной конструкцией pVAKS-GPDM. Возможно, данный факт связан с тем, что внутренняя инициация трансляции при помощи IRES происходит менее эффективно, чем кэп-зависимая инициация, что приводит к разному уровню синтеза белков (Mizuguchi H. et al., 2000). Поэтому исследование протективных свойств вакцины проводилось с использованием плазмиды pVAKS-GPDM.

3.6 Исследование способности ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-GPDM защищать морских свинок от инфекции, вызванной MARV

3.6.1 Анализ титров специфических антител сывороток морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM

В качестве животных для исследования протективности и иммуногенности pVAKS-GPDM использовали морских свинок породы Агути. Для иммунизации животных был наработан препарат ДНК-вакцины pVAKS-GPDM в количестве 10 мг с помощью коммерческого набора Qiagen EndoFree Plasmid GigaKit. Препарат был проверен на наличие эндотоксинов (LAL тест) и примесей РНК. Значения 260/280 находились в пределах нормы (1,8-2,0).

В эксперименте по оценке эффективности ДНК-вакцины pVAKS-GPDM были иммунизированы 30 морских свинок: экспериментальная группа, иммунизированная ДНК-вакциной pVAKS-GPDM (N=15) и

контрольная группа, иммунизированная вектором pVAKS (N=15). Морские свинки были иммунизированы 3-хкратно с интервалом в 3 недели, дозой 600 мкг на 1 животное, внутримышечно (рисунок 31).

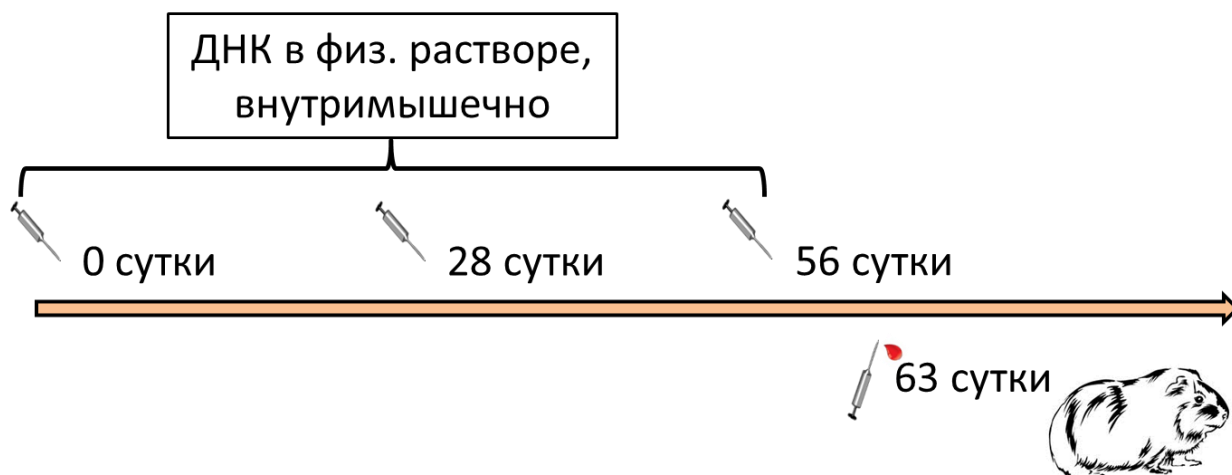


Рисунок 31. Схема иммунизации морских свинок экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM. Иммунизацию проводили 3-хкратно с интервалом в 3 недели. Доза на 1 животное для экспериментальной (pVAKS-GPDM) и контрольной групп (pVAKS) составила по 100 мкг. Забор крови проводили пункцией из сердца через 63 сутки после третьей иммунизации.

Для исследования специфической активности антител, синтезируемых в ответ на иммунизацию экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM, через 63 сутки у 8 из 15 морских свинок был отобран образец крови пункцией сердца (см. главу материалы и методы).

На морских свинках, как и на мышах, показана индукция гуморального иммунного ответа после введения экспериментальной ДНК-вакцины. В работе Vanderzanden L. et al., иммуногенность ДНК-вакцины, экспрессирующие гены GP и NP EBOV, исследовали на взрослых иммунокомпетентных мышах. Обе вакцины вызывали наработку специфических антител к белкам GP и NP EBOV (Vanderzanden L. et al., 1998).

Иммунизация трансхромосомных коров (TcBs) ДНК-вакцинами, содержащими гены GP EBOV и SUDV, обеспечило индукцию полностью человеческих поликлональных антител (pAb), демонстрирующих высокую нейтрализующую активность. После двух вакцинаций наблюдали

устойчивый гуморальный иммунный ответ (титры $>1/1000$) против заболевания, вызванного EBOV или SUDV и рекомбинантных антигенов EBOV-GP или SUDV-GP (Bounds C.E. et al., 2015).

В качестве антигенов для анализа титров специфических антител морских свинок, иммунизированных ДНК-иммуногеном pVAKS-GPDM для проведения ИФА брали антигены, использованные ранее для анализа специфических антител у иммунизированных мышей (см. главу «Анализ титров специфических антител сывороток крови мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-иммуногенами»).

Для оценки индукции антител кровь забирали у 8 из 15 морских свинок. Показано, что сыворотки крови морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной, содержат антитела, реактивные в отношении инаktivированного MARV (в титрах от 1/200 до 1600), очищенного рекомбинантного белка GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/6400), VLPs MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200) и VLPs GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200) (рисунок 32). В качестве отрицательного контроля были использованы нативный инаktivированный EBOV, рекомбинантный аналог GP EBOV, а также VLPs EBOV. Сыворотки крови морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной, взаимодействовали с отрицательным контролем на уровне титра 1/100.

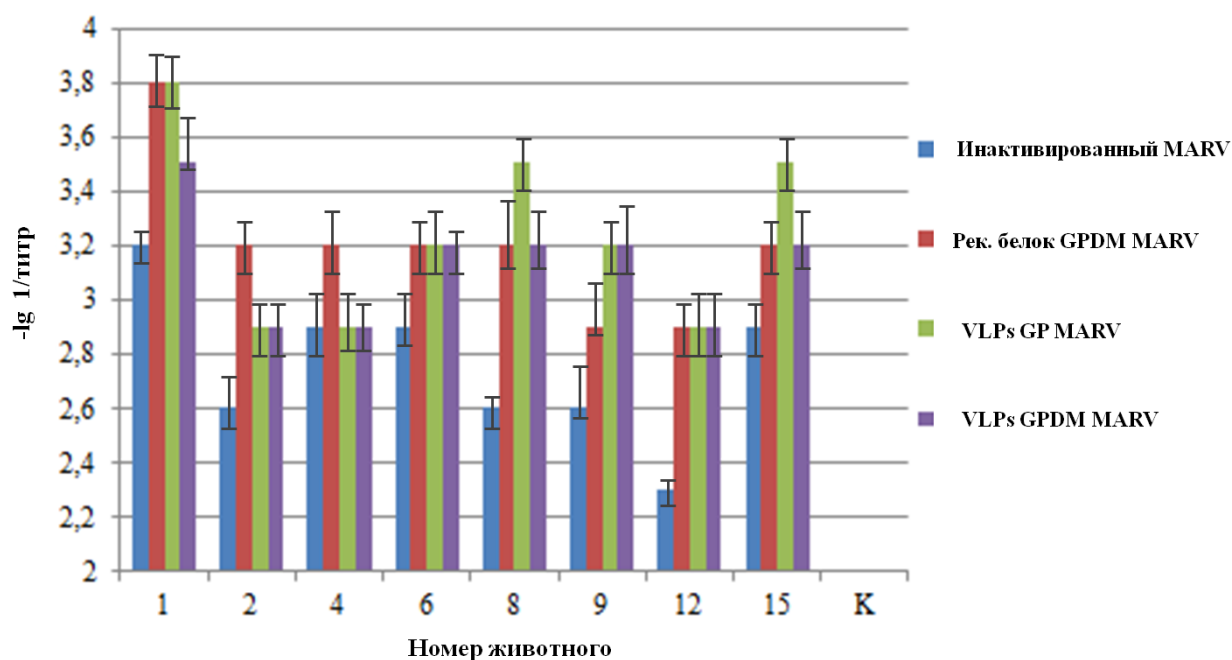


Рисунок 32. Результаты исследования наличия специфических антител сывороток крови морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM с помощью ИФА. Представлены результаты трёх независимых экспериментов.

Кровь для анализа была взята у 8 из 15 животных. Обозначения: К-контроль: инактивированный препарат EBOV, рекомбинантный аналог GP EBOV, а также VLPs GP EBOV.

Несмотря на разницу в уровне взаимодействия антител сывороток крови иммунизированных животных с антигенами, полученные значения лежат в одном диапазоне. Наиболее высокий уровень антител был выявлен у животного №1 1/6400 при использовании в качестве антигена рекомбинантного белок GPDM и VLPs GP MARV. Наиболее низкий уровень антител был выявлен у животного №12 1/800 при взаимодействии с антигенами: рекомбинантный белок GP, VLPs GPDM MARV и VLPs GP MARV.

3.6.2 Определение вируснейтрализующей активности антител в сыворотках крови животных, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM

В настоящее время общепринятым считается, что успешная вакцина должна вызывать наработку NAbs (Plotkin S. A., 2008; Plotkin S. A., 2010;

Plotkin S. A., 2010; Burton D. R. et al., 2012; Klasse P. J., 2012; Koff W. C. et al., 2013; Krause P. R. et al., 2013; Plotkin S. A., 2013). Они являются маркерами иммунитета против повторного заражения после того, как острая инфекция была устранена. Такой иммунитет может быть пожизненным (Slifka M. K. et al., 1998; Hammarlund E. et al., 2003; Amanna I. J. et al., 2007). NAbs играют важную роль в элиминации вируса, они являются ключевым иммунным фактором для защиты от вирусных заболеваний. Вирус-специфические NAbs, которые появляются либо в результате естественной инфекции, либо вакцинации, обладают способностью блокировать вирусную инфекцию. Для людей, у которых в ходе перенесенной болезни выработались вируснейтрализующие антитела, наблюдается защита в случае повторного контакта с вирусом. Анализ уровня NAbs в крови считается золотым стандартом для оценки эффективности вакцин.

Распространенным методом анализа NAbs, возникающих в ответ на иммунизацию, является использование псевдовиральных систем (Bounds C.E. et al., 2015). Данный подход является альтернативой работе с живым высоко патогенным вирусом. В работе Bounds et. al., для анализа Nabs, возникающих после иммунизации трансхромосомных коров успешно использовали псевдовиральную систему на основе VSV (Bounds C.E. et al., 2015).

Полученные после иммунизации экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM сыворотки животных (морских свинок) были проверены на способность нейтрализовать псевдовirusy rVSVΔG-GPM. Титры NAbs (IC50), выявленные при помощи псевдовиральной системы, находились в пределах от 1/32 до 1/256 (рисунок 33).

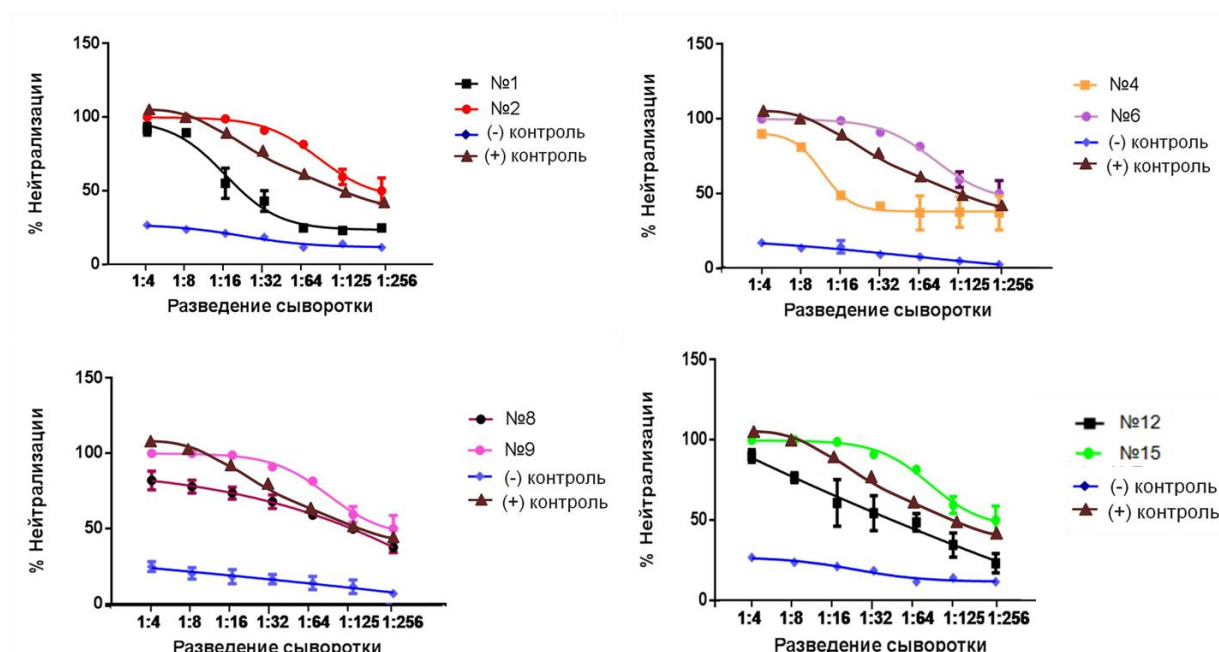


Рисунок 33. Титры NAb (IC₅₀) выявленные при помощи псевдовиральной системы. Кровь для анализа была взята у 8 из 15 животных. В качестве отрицательного контроля была взята сыворотка крови неиммунизированной морской свинки. В качестве положительного контроля была взята гипериммунная сыворотка крови морской свинки.

Наиболее высокий титр NAb (IC₅₀) выявлен у животных №2, №8, №9 и №15 в разведении 1:256, а наиболее низкий титр NAb (IC₅₀) выявлен у животных №1, 4 в разведении 1:16 (рисунок 33).

Анализируя данные по наличию специфических антител сывороток морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM и их нейтрализующей активности на псевдовиральной системе можно отметить, что наличие специфических антител не всегда говорит о том, что данные антитела являются нейтрализующими. Так, например сыворотка животного №1 показала достаточно высокий уровень специфических антител к различным антигенам (рисунок 32), однако в реакции нейтрализации данная сыворотка показала наименьший титр NAb.

3.6.3 Оценка протективной эффективности экспериментальной ДНК-вакцины pVAKS-GPDM

Финальным этапом нашей работы стало исследование протективной эффективности экспериментальной ДНК-вакцины pVAKS-GPDM. Наиболее распространенными исследовательскими моделями для начальных исследований вакцины против заболевания, вызванного MARV, являются мелкие инбредные животные, такие как мыши, золотистые сирийские хомяки, морские свинки (Волкова и др., 2018; Shifflett K. и Marzi A., 2019).

В качестве животных для исследования иммуногенности pVAKS-GPDM использовали морских свинок породы Агути. При заражении у этих животных отсутствует сыпь, но развиваются дефекты коагуляции, включающие снижение количества тромбоцитов и увеличение времени коагуляции (Nakayama E. и Saijo M., 2013).

На 28-е сутки после третьей иммунизации морские свинки подвергались внутрибрюшинному заражению с предварительно определенной летальной дозой MARV для морских свинок. На протяжении эксперимента у животных из контрольной группы наблюдались следующие симптомы: на 5-7 сутки после заражения потеря аппетита и веса, выпадение шерсти, кровотечение, на 6-8 сутки после заражения повышение температуры. На 8-11 сутки после заражения все животные из контрольной группы погибли. Морские свинки, иммунизированные экспериментальной ДНК-вакциной, выжили при их внутрибрюшинном инфицировании дозой вируса (рисунок 34).

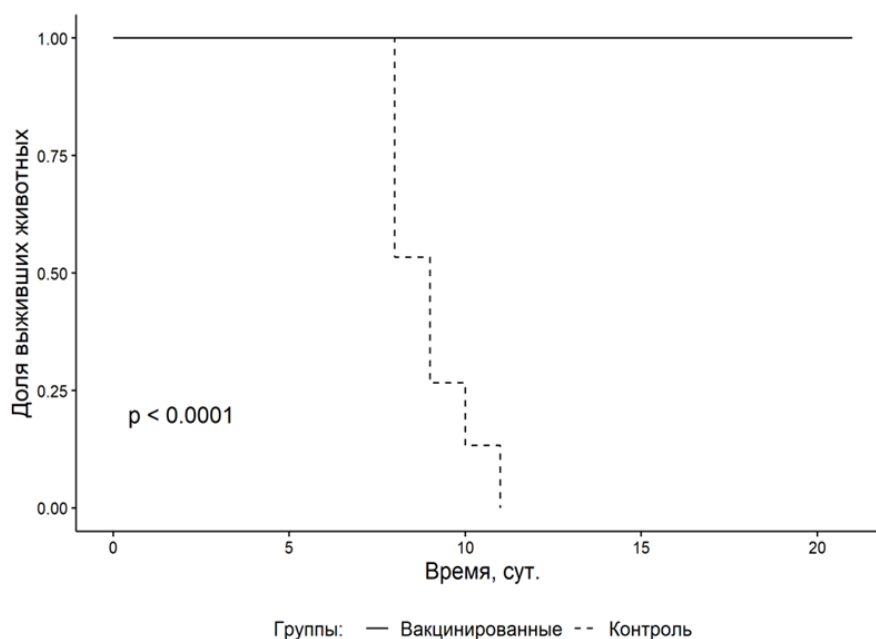


Рисунок 34. Выживаемость морских свинок, трехкратно иммунизированных внутримышечно экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM против заболевания, вызванного MARV. В качестве контрольных животных были использованы морские свинки, трехкратно иммунизированные вектором pVAKS внутримышечно.

При вскрытии животных контрольной группы наблюдали увеличение лимфатических узлов, геморрагии во внутренних органах, органы увеличены. В экспериментальной группе не наблюдались симптомы геморрагической лихорадки Марбург на протяжении всего эксперимента. По окончании эксперимента выживаемость животных в экспериментальной группе составила 100%. Разработанная нами ДНК-вакцина против заболевания, вызванного MARV, защищает от летальной инфекции MARV, вызывает наработку Nabs у иммунизированных животных (морских свинок).

Ранее было проведено исследование, в котором была показана защита морских свинок от летальной дозы вируса MARV (Riemenschneider J. et al., 2003). Мишенью в нашем исследовании и исследовании Riemenschneider является GP MARV. Различие исследований является доза, способ введения препарата и количество иммунизаций: в нашем исследовании 100 мкг на животное, внутримышечно и трехкратная иммунизация, в исследовании Riemenschneider J. 10 мкг на животное, введение подкожно и четырехкратная иммунизация.

По окончании эксперимента, на 21 сутки, был проведен забор крови с помощью пункции сердца у выживших животных для анализа уровня вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации с использованием штамма MARV, которым заражали животных. Анализ сывороток крови морских свинок показал, что их активность находится в пределах от 1/20 до 1/40 (таблица 4).

Таблица 4. Результаты анализа нейтрализующей активности сывороток иммунизированных животных

№ животного	Титры антител (антиген инактивированный MARV)	Титры антител (антиген рекомбинантный аналог гликопротеина MARV)	Результаты нейтрализации MARV на культуре клеток (разведение сыворотки) *
1	1:1600	1:6400	1/40
2	1:400	1:1600	1/40
4	1:800	1:1600	1/40
6	1:800	1:1600	1/40
8	1:400	1:1600	1/20
9	1:400	1:800	1/40
12	1:200	1:800	1/20
15	1:800	1:1600	1/20
Контроль	<100	<100	0

* разведение сыворотки, при котором количество БОЕ не менее чем в два раза меньше, чем в контроле

Таким образом, на основе полученных данных можно сделать вывод, экспериментальная ДНК-вакцина pVAKS-GPDM, при внутримышечной иммунизации способен индуцировать выработку антител специфичных в отношении GP MARV, обладающих нейтрализующей активностью в отношении к нативному MARV.

Заключение

В 1967 году в Германии и бывшей Югославии произошла первая вспышка филовиральной геморрагической лихорадки. MARV, который был идентифицирован во время этой вспышки, является одним из самых смертоносных патогенов человека. Данный вирус вызывающий геморрагическую лихорадку со смертностью до 90%, представляет угрозу глобального масштаба. Вспышки филовиральных инфекций, регистрируемые в последние десятилетия говорят о необходимости усилий направленных на превентивную разработки мер противодействия, в первую очередь разработку профилактических вакцин.

В настоящее время не существует одобренных вакцин против заболевания, вызываемого MARV, однако, проводится множество доклинических и клинических испытаний. Ведутся работы по получению профилактических препаратов против заболевания, вызванного MARV, на основе репликонов вируса венесуэльского энцефалита лошадей, рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, модифицированного вируса осповакцины, аденовирусных векторов, вирусоподобных частиц и ДНК-конструкций (Волкова Н.В. и др., 2018). Одной из перспективных платформ для создания вакцины против заболевания, вызванного MARV, являются ДНК-вакцины. Достоинства ДНК-вакцины в том, что они индуцируют как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ с образованием большого пула клеток иммунологической памяти. В отличие от вакцин, созданных на основе вирусных векторов, при использовании ДНК-вакцины отсутствует риск реверсии вирулентности. В качестве основных мишеней при разработке вакцины против данного заболевания используют структурные белки GP, VP40 и NP MARV.

Поэтому целью данной работы стало конструирование и исследование специфической активности ДНК-вакцинных конструкций против заболевания, вызванного MARV, включающих гены структурных белков GP, NP и VP40.

Для достижения этой цели на первом этапе работы провели теоретический дизайн трех ДНК-вакцинных конструкций, включающих гены структурных белков VP40, NP и GP MARV. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM содержит в составе ген, кодирующий GPDM MARV без муциноподобного домена. ДНК-вакцинные конструкции pVAKS-2PM и pVAKS-3PM содержат в составе гены, кодирующие два структурных белка VP40 и NP MARV, соединенных P2A пептидом и три структурных белка MARV: GPDM, NP и VP40, соединенные различными регуляторными элементами для одновременного синтеза с единой матрицы соответственно.

Для того, чтобы оценить способность полученных плазмид обеспечивать синтез целевых белков в клетках, проводили трансфекцию культуры клеток HEK293T. Затем полученные препараты анализировали при помощи электронной микроскопии и вестерн-блота. Микроскопические исследования показали формирование VLPs. Полученные частицы морфологически соответствуют филовиральным частицам. Размер частиц типичен для MARV диаметром 90-100 нм и длиной до 1 микрометра. Исследование клеточного супернатанта выявило сходную картину.

Оценку антигенных свойств полученных VLPs проводили при помощи вестерн-блота. Было показано, что на дорожках, соответствующих препаратам клеток после трансфекции разработанными плазмидами, детектируются характерные полосы, что подтверждает синтез вирусных белков в клетке.

Следующим этапом работы было исследование способности полученных ДНК-вакцинных конструкций стимулировать В- и Т-клеточные ответы. Сначала была проведена оценка В-клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных. В качестве антигенов для анализа титров специфических антител мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями использовали: 1. Инактивированный препарат MARV и EBOV; 2. Рекомбинантные белки: поверхностные гликопротеины GPDM MARV и EBOV, нуклеопротеин NP MARV и матриксный белок VP40

MARV, полученные в прокариотической системе экспрессии *E. coli*; 3. VLPs MARV и EBOV на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, содержащего на своей поверхности GP MARV и EBOV. Наибольшие титры специфических антител (от 1/200 до 1/400) вырабатываются у мышей линии Balb/c иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM. Поэтому для исследования Т-клеточного иммунного ответа использовали ДНК-вакцинные конструкции pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM.

Было выявлено, что наиболее высокие уровни MARV-специфических CD4⁺ и CD8⁺ у мышей линии Balb/c индуцирует ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM. Поэтому в исследовании протективности на морских свинках, наиболее чувствительных животных для исследования патогенеза MARV, использовали ДНК-вакцинную конструкцию pVAKS-GPDM.

В эксперименте по оценки протективности ДНК-вакцины pVAKS-GPDM были иммунизированы 30 морских свинок: экспериментальная группа, иммунизированная ДНК-вакциной pVAKS-GPDM и контрольная группа, иммунизированная вектором pVAKS. Морские свинки были иммунизированы трехкратно с интервалом в 3 недели, дозой 600 мкг на 1 животное, внутримышечно. После третьей иммунизации, у животных была взята кровь для анализа наличия специфических и нейтрализующих антител против заболевания, вызванного MARV. Показано, что сыворотки крови морских свинок, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной, содержат антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV (в титрах от 1/200 до 1/1600), очищенного рекомбинантного белка GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/6400), VLPs MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200) и VLPs GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200).

ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM при внутримышечной иммунизации морских свинок способна индуцировать наработку GP-специфичных антител, нейтрализующие титры которых при использовании

псевдовиральной системы находятся в пределах от 1/32 до 1/256, а при использовании нативного MARV – в пределах от 1/20 до 1/40.

На 28-е сутки после третьей иммунизации морские свинки подвергались внутрибрюшинному заражению с предварительно определенной летальной дозой MARV для морских свинок. Было показано, что при внутримышечной иммунизации ДНК-вакциной конструкция pVAKS-GPDM защищает морских свинок от летальных доз MARV. Экспериментальная ДНК-вакциная конструкция pVAKS-GPDM индуцирует выработку антител специфичных в отношении GP MARV, и способных нейтрализовать нативный MARV.

Выводы

1. Получены ДНК-вакцинные конструкции pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM, кодирующие структурные белки GPDM, VP40 и NP MARV. Показано, что трансфекция клеток плазмидой pVAKS-2PM за счет использования P2A-пептида обеспечивает синтез двух белков VP40 и NP, а плазмидой pVAKS-3PM за счет использования P2A-пептида и EMCV IRES обеспечивает синтез трех белков VP40, NP и GPDM.
2. Исследование иммуногенности полученных ДНК-вакцинных конструкций на мышах Balb/c показало, что все ДНК-конструкции индуцируют вирус-специфические ответы как антител, так и Т-лимфоцитов. Наиболее высокие уровни MARV-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов индуцирует ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM.
3. Показано, что сыворотки крови морских свинок, иммунизированных ДНК-вакциной pVAKS-GPDM, содержат антитела, реактивные в отношении нативного инактивированного MARV (в титрах от 1/200 до 1/1600) и очищенного рекомбинантного белка GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/6400), VLPs GP MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200) и VLPs GPDM MARV (в титрах от 1/800 до 1/3200).
4. Показано, что ДНК-вакцина pVAKS-GPDM при внутримышечной иммунизации морских свинок способна индуцировать выработку антител, обладающих вируснейтрализующей активностью. Титры нейтрализующих вирус антител, выявленные при помощи псевдовиральной системы, содержащей GP MARV, находились в пределах от 1/32 до 1/256, а при использовании нативного MARV вирус нейтрализующая активность находится в пределах от 1/20 до 1/40.
5. Показано, что ДНК-вакцина pVAKS-GPDM, содержащая ген, кодирующий GPDM MARV, обеспечивает защиту морских свинок от летальной инфекции, вызванной MARV.

Список литературы

1. Волкова Н.В., Казачинская Е.И., Щербаков Д.Н. Экспериментальные вакцины для профилактики геморрагической лихорадки Марбург и биомодели для изучения ее патогенеза // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – Т. 4. – № 3. – С. 8-15.
2. Волкова Н.В., Иванова А.В., Исаева А.А., Полежаева О.А., Зайковская А.В., Щербаков Д.Н., Казачинская Е.И. Получение рекомбинантных антигенов для проведения серологической диагностики лихорадки Марбург // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – Т. 4. – С. 47-52.
3. Зверев В.Н. Вакцины: от Дженнера и Пастера до наших дней // Наука и жизнь. – 2006. – №3. – С.5-13.
4. Игнатъев Г.М. Агафонов А.П., Стрельцова М.А. Сравнительное изучение некоторых иммунологических показателей при введении инактивированного вируса Марбург морским свинкам // Вопросы вирусологии. – 1991. – № 2. – С. 421-423.
5. Канашкова Т.А. Специфическая иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний // Минск: БГМУ. – 2009. – С. 84.
6. Максютлов Р.А. Экспериментальная ДНК-вакцина против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека. Автореф. Дис. канд. биол. наук. Кольцово. – 2010. – С. 52.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир. – 1984. – С. 480.
8. Медуницын Н.В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2005. – С. 512.
9. Никифоров В.В., Туровской Ю.И., Калинин П.П. Случай лабораторного заражения лихорадкой Марбург. / Микробиология. – 1994. – №3. – С. 104-110.
10. Онлайн-сервер Thermofisher [Электронный ресурс]. – <https://www.thermofisher.com/order/geneartgenes/projectmgmt> – Режим доступа: <https://www.snapgene.com/> (дата обращения: 17.03.21).

- 11.Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., МЦНМО. – 2002. – С. 248.
- 12.Попов Ю.А. Микшис Н.И. Генетические (ДНК) вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – № 105. – С. 20-24.
- 13.Программное обеспечение Snapgene [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.snapgene.com/> (дата обращения: 17.12.20).
- 14.Соколова А.С., Баранова Д.В., Яровая О.И., Баев Д.С. Синтез производных (1S)-(+)-камфора-10-сульфоокислоты и изучение их противовирусной активности в качестве ингибиторов филовиральных инфекций in vitro и in silico // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2019. – Т. 68. – № 5. – С. 1041-1046.
- 15.Чумаков М.П., Беляева А.П., Мартынова Л.И. Выделение и изучение штаммов возбудителя зоонозной церкопитековой геморрагической лихорадки. XV научная сессия Института полиомиелита и вирусных энцефалитов; 21-25 октября, 1968. Москва.
- 16.Щелканов М.Ю., Магассуба Н.Ф., Дедков В.Г. и др. Природный резервуар филовиральных и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки // Вестник РАМН. – 2017. – Вып. 72. – №2. С. 112-119.
- 17.Aleksandrowicz P., Marzi A., Biedenkopf N., et al. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis // J. Infect. Dis. – 2011. – V. 204. – P. 957.
- 18.Amanna I. J., Carlson N.E., Slifka M.K. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens // New England Journal of Medicine. – 2007. – V. 357. – № 19. – P. 1903-1915.
- 19.Amman B.R., Nyakarahuka L., McElroy A.K., et al. Marburgvirus resurgence in Kitaka mine bat population after extermination attempts, Uganda. Emerg // Infect. Dis. – 2014. – V. 20. – P. 1761.

20. Ascenzi P., Bocedi A., Heptonstall J., et al. Ebolavirus and Marburgvirus: insight the Filoviridae family // *Molecular aspects of medicine*. – 2008. – V. 29. – №. 3. – P. 151-185.
21. Becker S., Rinne C., Hofsäss U., et al. Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins // *Virology*. – 1998. – V. 249. – P. 406.
22. Bethany A. et al. Interferon- γ Inhibits Ebola Virus Infection // *PLoS Pathog.* – 2015. V. 11. – № 11. – P. e1005263.
23. Bonin O. The Cercopithecus monkey disease in Marburg and Frankfurt (Main), 1967 // *Acta Zool Pathol Antverp.* – 1969. V. 48. – P. 319-331.
24. Bornholdt Z.A., Turner H.L., Murin C.D., et al. Isolation of potent neutralizing antibodies from a survivor of the 2014 Ebola virus outbreak // *Science*. – 2016. – V. 351. – № 6277. – P. 1078-1083.
25. Bounds C.E., Kwilas S.A., Kuehne A.I., et al. Human Polyclonal Antibodies Produced through DNA Vaccination of Transchromosomal Cattle Provide Mice with Post-Exposure Protection against Lethal Zaire and Sudan Ebolaviruses // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – № 9. – P. e0137786.
26. Bramble M.S., Hoff N., Gilchuk P., et al., Pan-Filovirus Serum Neutralizing Antibodies in a Subset of Congolese Ebolavirus Infection Survivors // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2018. – V. 218. – P. 1929-1936.
27. Burton D. R., Poignard P., Stanfield R.L., et al. Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses // *Science*. – 2012. – V. 337. – № 6091. – P. 183-186.
28. Callendret B., Vellinga J., Wunderlich K., et al. Correction: A prophylactic multivalent vaccine against different filovirus species is immunogenic and provides protection from lethal infections with Ebolavirus and Marburgvirus species in non-human primates // *PLOS ONE*. – 2018. – V. 13. – № 4. – P. e0196546.
29. Carette J.E., Raaben M., Wong A.C., et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1 // *Nature*. – 2011. – V. 477. – P. 340-343.

- 30.Casares, F., Bender W., Merriam J., et al. Interactions of *Drosophila* Ultrabithorax regulatory regions with native and foreign promoters // *Genetics*. – 1997. – V. 145. – № 1. – P. 123-137.
- 31.Chandran K., Sullivan N.J., Felbor U., et al. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection // *Science*. – 2005. – V.308. – P. 1643-1645.
- 32.Chang G.J., Hunt A.R., Holmes D.A., et al. Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus // *Virology*. – 2003. – V. 306. – № 1. –P. 170-180.
- 33.Cheng L., Ziegelhoffer P.R., Yang N.S. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – V. 90. – № 10. – P. 4455-4459.
- 34.Clarke D.K.,Cooper.D., Egan M.A., et al. Recombinant vesicular stomatitis virus as an HIV-1 vaccine vector // *Springer Semin Immun*. – 2006. – V. 28. – № 3. – P. 239–253.
- 35.Comer J. E., Escaffre O., Neef N., et al. Filovirus Virulence in Interferon α/β and γ Double Knockout Mice, and Treatment with Favipiravir // *Viruses*. – 2019. – V. 11. – № 2. – P. 137.
- 36.Conzelmann K.K. Reverse genetics of mononegavirales // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2004. – V. 283. – P. 1-41.
- 37.Cote M., Misasi J., Ren T., et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection // *Nature*. – 2011. – V.477. – P. 344-348.
- 38.Daddario S.M., Feldmann H., Ströher U., et al. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med*. – 2005. – V. 11. – № 7. – P. 786-790.

- 39.Daddario-DiCaprio K. M., Geisbert T.W., Geisbert J.B., et al. Cross-protection against Marburg virus strains using a live, attenuated recombinant vaccine // J Virol. – 2006. – V. 80. – P. 9659-9666.
- 40.Donnelly J.J. Ulmer J.B. DNA vaccines for viral diseases // Braz. J. Med. Biol. Res. – 1999. – № 32. – P. 215-222.
- 41.Donnelly M.L., Hughes L.E., Luke G., et al. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences // J. Gen. Virol. – 2001. – V. 82. – P. 1027-1041.
- 42.Doria-Rose N. A. Haigwood N. L. DNA Vaccine Strategies: Candidates for Immune Modulation and Immunization Regimens // Methods. – 2003. – V. 31. – № 3. – P. 207-216.
- 43.Dye J.M., Warfield K.L., Wells J.B., et al. Virus-Like Particle Vaccination Protects Nonhuman Primates from Lethal Aerosol Exposure with Marburgvirus (VLP Vaccination Protects Macaques against Aerosol Challenges) // Viruses. – 2016. – V. 8. – № 4. – P. 94.
- 44.Emanuel J., Marzi A., Feldmann H. Filoviruses: Ecology, Molecular Biology, and Evolution // Adv Virus Res. – 2018. – V. 100. – P. 189-221.
- 45.Feldmann H., Mühlberger E., Randolph A., et al. Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle // Virus Res. – 1992. – V. 24. – №1. – P.1-19.
- 46.Feldmann H. Klenk H.D. Marburg and Ebola viruses // Adv. Viruses Res. – 1996. – V. 47. – P.1-52.
- 47.Feldmann H., Kiley M. P Classification, structure, and replication of filoviruses // Curr.Top. Microbiol.Immunol. – 1999. – V. 235. – P. 1-21.
- 48.Feldmann H., Jones S.M., Daddario-DiCaprio K.M., et al. Effective post-exposure treatment of Ebola infection // PLoS Pathog. – 2007. – V. 3. – № 1. – P. e2.
- 49.Fernandes-Alnemri T., Yu J.W., Juliana C., et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis // Nature immunology. – 2010. – V. 11. – № 5. – P. 385-393.

50. Friedrich B.M., Trefry J.C., Biggins J.E., et al. Potential vaccines and post-exposure treatments for filovirus infections // *Viruses*. – 2012. – V. 4. – № 9. – P. 1619-1650.
51. Gao P., Wu Y., Barchet W., et al. Cyclic [G (2',5') pA (3',5') p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase // *Cell*. – 2013. – V. 153. – № 5. – P. 1094-1107.
52. Garbutt M., Liebscher R., Wahl-Jensen V., et al. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses // *J Virol*. – 2004. – V. 78. – №10. – P. 5458-5465.
53. Geier M., Fauland P., Vogl T., Glieder A. Compact multi-enzyme pathways in *P. pastoris* // *Chem Commun*. – 2015. – V. 51. – P. 1643-1646.
54. Geisbert T.W., Jahrling P.B. Differentiation of filoviruses by electron microscopy // *Virus Res*. – 1995. – V. 39. – № 2. – P. 129-150.
55. Geisbert T.W., Geisbert J.B., Marzi A., et al. Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses // *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – P 6894-6900.
56. Geisbert T.W., Daddario-DiCaprio K.M., Williams K.J., et al. Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates. *J Virol*. – 2008. – V. 82. – № 11. – P. 5664-5668.
57. Geisbert T.W., Geisbert J.B., Leung A., et al. Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of ebola virus // *J Virol*. – 2009. – V. 83. – № 14. – P. 7296-7304.
58. Geisbert T.W., Hensley L.E., Geisbert J.B., et al. Postexposure treatment of Marburg virus infection. *Emerg Infect Dis*. – 2010. – V. 16. – № 7. – P. 1119-1122.
59. Geisbert T.W., Bailey M., Geisbert J.B., et al. Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates // *J Virol*. – 2010. – № 84. – P. 10386-10394.

60. Grant-Klein R.J., Van Deusen N.M., Badger C.V., et al. A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge // *Hum Vaccin Immunother.* – 2012. – V. 8. – № 11. – P. 1703-1706.
61. Groseth A., Charton J.E., Sauerborn M., et al. The Ebola virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30–L interaction identified // *Virus Res.* – 2009. – V. 140. – № 1. – P. 8-14.
62. Hammarlund E., Lewis M.W., Hansen S.G., et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination // *Nature Medicine.* – 2003. – V. 9. – № 9. – P. 1131-1137.
63. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA // *Nature.* – 2000. – V. 408. – № 6813. – P. 740-745.
64. Henao-Restrepo A.M., Longini I.M., Egger M., et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial // *Lancet.* – 2015. – V. 386. – № 9996. – P. 857-866.
65. Henao-Restrepo A.M., Camacho A., Longini I.M., et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ca Suffit!) // *Lancet.* – 2017. – V. 389. – № 10068. – P. 505-518.
66. Hensley L.E., Jones S.M., Feldmann H., et al. Ebola and Marburg viruses: pathogenesis and development of countermeasures // *Curr. Mol. Med.* – 2005. – V. 5. – № 8. – P. 761-762.
67. Hevey M., Negley D., Geisbert J., et al. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants // *Virology.* – 1997. – V. 239. – № 1. – P. 206-16.
68. Hevey M., Negley D., Pushko P., et al. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates // *Virology.* – 1998. – V. 251. – № 1. – P. 28-37.

69. Hevey M., Negley D., VanderZanden L., et al. Marburg virus vaccines: comparing classical and new approaches // *Vaccine*. – 2001. – V.20. – № 3. – P. 586-593.
70. Humphreys I. Sebastian S. Novel viral vectors in infectious diseases // *Immunology*. – 2018. – V. 153. – № 1. – P. 1-9.
71. Hunt C.L., Lennemann N.J., Maury W. Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world // *Viruses*. – 2012. – V. 4. – P 258.
72. 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. – V. 44. – № 1–3. – P. 111-118.
73. Jang S.K., Kräusslich H.G., Nicklin M.J., et al. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation // *J. Virol*. – 1988. – V. 62. – P. 2636-2643.
74. Kak G., Raza M., Tiwari B.K. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases // *Biomolecular Concepts*. – 2018. – V. 9. – № 1. – P. 64-79.
75. Kalina W.V., Warfield K.L., Olinger G.G., Bavari S. Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model // *Virology*. – 2009. – V. 6. – P. 132.
76. Kassambara A., Kosinski M. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.4. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer> и survival] и survminer (v.0.4.4).
77. Kibuuka H., Berkowitz N.M., Millard M., et al. Safety and immunogenicity of Ebola virus and Marburg virus glycoprotein DNA vaccines assessed separately and concomitantly in healthy Ugandan adults: a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial // *Lancet*. – 2015. – V. 385. – № 9977. – P. 1545-1554.

- 78.Klasse P.J., Moore J.P. Good CoP, bad CoP? Interrogating the immune responses to primate lentiviral vaccines // *Retrovirology*. – 2012. – V. 9. – P. 80
- 79.Klenerman P., Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus // *Nat Rev Immunol*. – 2016. – V. 16. – № 6. – P. 367-377.
- 80.Klinman D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., et al. CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete IL-6, IL-12 and IFN γ // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1996. – № 93. – P. 2879-2883.
- 81.Kobinger G.P., Feldmann H., Zhi Y., et al. Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology*. – 2006. – V. 346. – № 2. – P. 394-401.
- 82.Koff W.C. Burton D.R., Johnson P.R., et al. Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention // *Science*. – 2013. – V. 340. – № 6136. – P. 1232910
- 83.Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in position +5 and +6. // *EMBO J*. – 1997. – V. 16. – P. 2482-2492.
- 84.Krause P.R., Bialek S.R., Boppana S.B., et al. Priorities for CMV vaccine development // *Vaccine*. – 2013. – V. 32. – № 1. – P. 4-10.
- 85.Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation // *Nature*. – 1995. – № 374. – P. 546-548.
- 86.Li L., Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity // *Expert Rev Vaccines*. – 2016. – V. 15. – № 3. – P. 313-329.
- 87.Licata J., Johnson R.F., Han Z., Harty R.N. Contribution of Ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles // *J Virol*. – 2004. – V.78. – № 14. – P. 7344-7351.
- 88.Lipford G.B., Bauer M., Blank C., et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. // *Eur. J. Immunol*. – 1997. – V. 27. – P. 2340-2344.

- 89.Lupton H.W., Lambert R.D., Bumgardner D.L., et al. Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model // *Lancet*. – 1980. – V. 2. – № 8207. – P. 1294-1295.
- 90.Malherbe, D.C., Domi A., Hauser M.J., et al. Modified vaccinia Ankara vaccine expressing Marburg virus-like particles protects guinea pigs from lethal Marburg virus infection // *Vaccines*. – 2020. – V. 5. – P.78.
- 91.Manthorpe M., Cornefert-Jensen F., Hartikka J., et al. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Human gene therapy*. – 1993. – V. 4. – № 4. – P. 419-431.
- 92.Martini G. Marburg agent disease: in man // *Trans R Soc Trop Med Hyg*. – 1969. – V. 63. – № 3. – P. 295-302.
- 93.Maruyama T., Parren P.W., Sanchez A., et al. Recombinant human monoclonal antibodies to Ebola virus // *J Infect Dis*. – 1999. – V. 179. – P. 235-239.
- 94.Marzi A., Banadyga L., Haddock E., et al. A hamster model for Marburg virus infection accurately recapitulates Marburg hemorrhagic fever // *Scientific Reports*. – 2016. – № 6. – P.39214.
- 95.Marzi A., Murphy A.A., Feldmann F., et al. Cytomegalovirus-based vaccine expressing Ebola virus glycoprotein protects nonhuman primates from Ebola virus infection // *Sci Rep*. – 2016. – V 6. – P. 21674.
- 96.Matassov D., Mire C.E., Latham T., et al. Single-Dose Trivalent Vesiculovax Vaccine Protects Macaques from Lethal Ebolavirus and Marburgvirus Challenge // *J Virol*. – 2017. – № 15. – P. 19.
- 97.McElroy A.K., Akondy R.S., Davis C.W., et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2015. – V. 112. – № 15. – P. 4719-24.
- 98.Milligan I.D. et al. Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26- and Modified Vaccinia Ankara-Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial // *JAMA*. – 2016. – V.315. – № 15. – P. 1610-1623.
- 99.Mire C.E. et al. Durability of a vesicular stomatitis virus-based Marburg virus vaccine in nonhuman primates // *PLoS One*. – 2014. – V.9. – № 4. – P. e94355.

100. Mittler E. A. et al. Fluorescently Labeled Marburg Virus glycoprotein as a New Tool to Study Viral Transport and Assembly // *J Infect Dis.* – 2018. – V. 218. – № 5. – P. 318-326.
101. Mizuguchi H., Ohashi K., Patijn G.A., et al. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression in vivo but not in vitro // *Mol. Ther.* – 2000. – V. 1. – P. 376-382.
102. Moreno Y., Gros P.P., Tam M., et al. Proteomic analysis of excretory-secretory products of *Heligmosomoides polygyrus* assessed with next-generation sequencing transcriptomic information // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2011. – V. 5. – № 10. – P. e1275.
103. Muhlberger E., Lötfering B., Klenk H.D., et al. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – P. 8756.
104. Muhlberger E. Filovirus replication and transcription // *Future Virol.* – 2007. – V. 2. – P. 205-215.
105. Natesan M., Jensen S.M., Keasey S.L., et al. Human Survivors of Disease Outbreaks Caused by Ebola or Marburg Virus Exhibit Cross-Reactive and Long-Lived Antibody Responses // *Clinical and Vaccine Immunology.* – 2016. – V. 23. – № 8. – P. 717-724.
106. Noda T., Sagara H., Suzuki E., et al. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP // *Virology Journal.* – 2002. – V. 76. – № 10. – P. 4855-4865.
107. Nanbo A., Imai M., Watanabe S., et al. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner // *PLoS Pathog.* – 2010. – V. 6. – P. e1001121.
108. Nanbo A., Watanabe S., Halfmann P., et al. The spatio-temporal distribution dynamics of Ebola virus proteins and RNA in infected cells // *Sci. Rep.* – 2013. – V. 3. – P. 1206.

109. Nakayama E. Saijo M. Animal models for Ebola and Marburg virus infections. // *Front Microbiol.* – 2013. – V. 5. – № 4. – P. 267.
110. Olinger G.G., Bailey M.A., Dye J.M., et al. Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins // *J Virol.* – 2005. – V. 79. – № 22. – P. 14189-14196.
111. Parren P.W., Geisbert T.W., Maruyama T., Jahrling P.B., Burton D.R. Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody // *J Virol.* – 2002. – V. 76. – № 12. – P. 6408-6412.
112. Plotkin S. A. Correlates of vaccine-induced immunity // *Clinical Infectious Diseases.* – 2008. – V. 47. – № 3. – P. 401-409.
113. Plotkin S. A. Immunologic correlates of protection induced by vaccination // *Pediatric Infectious Disease Journal.* – 2010. – V. 20. – № 1. – P. 63-75.
114. Plotkin S. A. Correlates of protection induced by vaccination // *Clinical and Vaccine Immunology.* – 2010. – V. 17. – № 7. – P. 1055-1065.
115. Plotkin S. A. Complex correlates of protection after vaccination // *Clinical Infectious Diseases.* – 2013. – V. 56. – № 10. – P. 1458-1465.
116. Pourrut X., Souris M., Towner J.S., et al. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus* // *BMC Infect. Dis.* – 2009. – V.9. – P. 159.
117. Qiu X., Wong G., Audet J., et al. Establishment and characterization of a lethal mouse model for the Angola strain of Marburg virus // *Journal of Virology.* – 2014. – V. 88. – № 21. – P. 12703-12714.
118. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: The R Foundation for Statistical Computing. – 2016. – Режим доступа: <https://www.r-project.org>.
119. Regules J.A., Beigel J.H., Paolino K.M., et al. A recombinant vesicular stomatitis virus Ebola vaccine // *N Engl J Med.* – 2017. – V. 376. – № 4. – P. 330-341.

120. Riemenschneider J., Garrison A., Geisbert J., et al. Comparison of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus // *Vaccine*. – 2003. – № 21. – P. 4071-4080.
121. Rizvanov A.A., van Geelen A.G., Morzunov S., et al. Generation of a recombinant cytomegalovirus for expression of a hantavirus glycoprotein // *J Virol*. – 2003. – V. 77. – № 22. – P. 12203-12210.
122. Rose N.F., Roberts A., Buonocore L., Rose J.K. Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 // *J Virol*. – 2000. – V. 74. – № 23. – P. 10903-10910.
123. Rose N.F., Marx P.A., Luckay A., et al. An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants // *Cell*. – 2001. – V. 106. – № 5. – P. 539-549.
124. Rottembourg D., Filippi C.M., Bresson D., et al. Essential role for TLR9 in prime but not prime-boost plasmid DNA vaccination to activate dendritic cells and protect from lethal viral infection // *J Immunol*. – 2010. – V. 184. – № 12. – P. 7100-7107.
125. Saeed, M.F., Kolokoltsov A.A., Albrecht T., Davey R.A. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes // *PLoS Pathog*. – 2010. – V. 6. – P. e1001110.
126. Saijo M., Niikura M., Ikegami T., et al. Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins // *Clin. Vaccine Immunol*. – 2006. – V. 4. – P. 444-451.
127. Sakurai Y., Kolokoltsov A.A., Chen C.C., et al. Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment // *Science*. – 2015. – V. 347. – P. 995-998.

128. Sanchez A. Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity // J. Infect. Dis. – 2007. – V. 196. – P. 251.
129. Sarwar U.N., Costner P., Enama M.E., et al. Safety and immunogenicity of DNA vaccines encoding Ebolavirus and Marburgvirus wild-type glycoproteins in a phase I clinical trial // J Infect Dis. – 2015. – V. 211. – № 4. – P. 549-557.
130. Siegert R., Shu H.L., Slenczka W., et al. On the etiology of an unknown human infection originating from monkeys // Deutsche Medizinische Wochenschrift. – 1967. – V.92. – № 51. – P. 2341-2343.
131. Schnell M.J., Buonocore L., Kretzschmar E., et al. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles // Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. – V. 93. – № 21. – P.11359-11365.
132. Schroder K., Muruve D.A., Tschopp J. Innate immunity: cytoplasmic DNA sensing by the AIM2 inflammasome // Current biology. – 2009. – V. 19. – № 6. – P. 262-265.
133. Schuh A.J., Amman B.R., Jones M.E., et al. Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats // Nature Communications. – 2017. – V. 8. – P. 1-10.
134. Shifflett K., Marzi A. Marburg virus pathogenesis – differences and similarities in humans and animal models // Virology. – 2019. – V. 16. – P. 165.
135. Slifka M.K., Antia R., Whitmire J.K., Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells // Immunity. – 1998. – V. 8. – № 3. – P. 363-372.
136. Sparwasser T., Koch E.S., Vabulas R.M., et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells // Eur J Immunol. – 1998. – V. 28. – № 6. – P. 2045-2054.
137. Stonier S.W., Herbert A.S., Kuehne A.I., et al. Marburg virus survivor immune responses are Th1 skewed with limited neutralizing antibody responses // J Exp Med. – 2017. – V. 214. – № 9. – P. 2563-2572.

138. Sugimoto N., Mitoma H., Kim T., et al. Helicase proteins DHX29 and RIG-I cosense cytosolic nucleic acids in the human airway system // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – V. 111. – № 21. – P. 7747-7752.
139. Sun L., Wu J., Du F., et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway // *Science*. – 2013. – V. 339. – № 6121. – P. 786-791.
140. Suschak J.J., Wang S., Fitzgerald K.A., Lu S. Identification of Aim2 as a sensor for DNA vaccines // *J Immunol*. – 2015. – V. 194. – № 2. – P. 630-636.
141. Suschak J., Schmaljohn C.S. Vaccines against Ebola virus and Marburg virus: recent advances and promising candidates // *Human Vaccines Immunotherapeutics*. – 2019. – V.15. – № 10. – P. 2359-2377.
142. Swenson D.L., Warfield K.L., Kuehl K., et al. Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein // *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. – 2004. – V. 40. – P. 27-31.
143. Swenson D.L., Warfield K.L., Larsen T., et al. Monovalent virus-like particle vaccine protects guinea pigs and nonhuman primates against infection with multiple Marburg viruses // *Expert Rev Vaccines*. – 2008. – V. 7. – № 4. – P. 417-429.
144. Swenson D.L., Wang D., Luo M., et al. Vaccine to confer complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections // *Clin Vaccine Immunol*. – 2008. – V. 15. – P. 460-467.
145. Szymczak, A. L., Workman C.J., Wang Y., et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single ‘self-cleaving’ 2A peptide-based retroviral vector // *Nature biotechnology*. – 2004. – V. 22. – P. 589-594.
146. Tang D., DeVit M., Johnston S. et al. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response // *Nature*. – 1992. – V. 356. – V. P. 152–4.

147. Takada A., Watanabe S., Okazaki K., et al. Infectivity-Enhancing Antibodies to Ebola Virus Glycoprotein Infectivity-Enhancing Antibodies to Ebola Virus Glycoprotein // J Virol. – 2001. – V. 75. – № 5. – P. 2324-2330.
148. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. – 2007. – V. 131. – P. 861-872.
149. Takaoka A., Wang Z., Choi M.K., et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response // Nature. – 2007. – V. 448. – № 7152. – P. 501-505.
150. Takeshita S., Takeshita F., Haddad D.E., et al. CpG oligodeoxynucleotides induce murine macrophages to up-regulate chemokine mRNA expression. // Cell. Immunol. – 2000. – V. 206. – P. 101-106.
151. Terry M., Grambsch P.M. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. – 2000. – P. 101.
152. Therneau T.A. Package for Survival Analysis in S. version 2.44-1.11 URL: [Электронный ресурс]. – 2000. – Режим доступа <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
153. Timmins J., Scianimanico S., Schoehn G., Weissenhorn W. Vesicular release of Ebola virus matrix protein VP40 // Virology. – 2001. – V. 283. – P. 1-6.
154. Towner J.S., Amman B.R., Sealy T.K., et al. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats // PLoS Pathog. – 2009. – V. 5. – P. e1000536.
155. Tsuda Y., Parkins C.J., Caposio P., et al. A cytomegalovirus-based vaccine provides long-lasting protection against lethal Ebola virus challenge after a single dose // Vaccine. – 2015. – V. 33. – № 19. – P. 2261-2266.
156. Tudor D., Dubuquoy C., Gaboriau V., et al. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines // Vaccine. – 2005. – V. 23. – № 10. – P. 1258-1264.

157. Ulmer J.B., Valley U., Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions // *Nature Biotechnology*. – 2006. – V. 24. № 11 – P. 1377-1383.
158. Vanderzanden L., Bray M., Fuller D., et al. DNA Vaccines Expressing either the GP or NP Genes of Ebola Virus Protect Mice from Lethal Challenge // *Virology*. – 1998. – V. 246. – P. 134-144.
159. Verrier, J. D., Madorsky I., Coggin W.E., et al. Bicistronic lentiviruses containing a viral 2A cleavage sequence reliably co-express two proteins and restore vision to an animal model of LCA1 // *PloS one*. – 2011. – V. 6. – P. e20553.
160. Vicente T., Roldao A., Peixoto C., et al. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2011. – V. 107. – P. 42-48.
161. Volkova N.V., Pyankov O.V., Ivanova A.V., et al. Prototype of a DNA Vaccine against Marburg Virus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – V. 10. – P. 487-491.
162. Wang Y., Wang F., Wang R., et al. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori* // *Scientific reports*. – 2015. – V. 5. – P. 16273.
163. Warfield K.L., Swenson D.L., Negley D.L., et al. Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection // *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – №25. – P. 3495-3502.
164. Warfield K.L., Swenson D.L., Olinger G.G., et al. Ebola virus inactivation with preservation of antigenic and structural integrity by a photoinducible alkylating agent // *J Infect Dis*. – 2007. – V. 196. – P. 276-283.
165. Warfield K.L., Posten N. A., Swenson D. L., et al. Filovirus-Like Particles Produced in Insect Cells: Immunogenicity and Protection in Rodents // *The Journal of Infectious Diseases* . – 2007. – V. 196. – P. 421–429.
166. Warfield K. L., Aman J.M Advances in Virus-Like Particle Vaccines for Filoviruses // *J Infect Dis*. – 2011. – V. 204. – P. 1053–1059.

167. Wenigenrath J., Kolesnikova L., Hoenen T., et al. Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus. // J. Gen. Virol. – 2010. – V. 91. – P. 1325-1334.
168. Whelan S., Barr J.N., Wertz G.W. et al. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses // Curr Top Microbiol Immunol. – 2004. – V. 283. – P. 61-119.
169. WHO, Ebola Situation Report– 2 March. World Health Organisation, Geneva, Switzerland. 2016.
170. Wilson J.A, Hevey M., Bakken R., et al. Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus // Science. – 2000. – V. 287. – № 5458. – P. 1664-1666.
171. Wong G., Kobinger G.P., Qiu X. Characterization of host immune responses in Ebola virus infections // Expert Rev Clin Immunol. – 2014. – V. 10. – № 6. – P. 781-790.
172. Yang Y., Li Q., Ertl H.C., Wilson J.M. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. J Virol. – 1995. – V. 69. – P. 2004-2015.
173. Yang Y., Greenough K., Wilson J.M. Transient immune blockade prevents formation of neutralizing antibody to recombinant adenovirus and allows repeated gene transfer to mouse liver // Gene Ther. – 1996. – V. 3. – P. 412-420.
174. Zhang Y., Yeruva L., Marinov A., et al. The DNA sensor, cyclic GMP-AMP synthase, is essential for induction of IFN-beta during Chlamydia trachomatis infection // J Immunol. – 2014. – V. 193. – № 5. – P. 2394-2404.

Благодарности

Автор работы выражает особую благодарность научным руководителям Щербакову Д.Н. и Казачинской Е.И. Автор искренне благодарен сотрудникам отдела биоинженерии: зав. отделом Ильичеву А.А., с.н.с. Ивановой А.В., м.н.с. Арипову В.С., м.н.с. Исаевой А.А., стажеру-исследователю Зыбкиной А.В., м.н.с. Старостиной Е.В., зав. лабораторией Карпенко Л.И., м.н.с. Боргояковой М.Б., лаборанту Слесаренко Л.В., лаборанту Ануфриковой О.А., м.н.с. Беленькой С.В., м.н.с. Шапровой О.Н., стажеру-исследователю Кисакову Д.Н. сотрудникам теоретического отдела д.б.н зав. отделом Бажану С.И., к.б.н. Антонцу Д.В.; д.б.н., ведущему научному сотруднику отдела экспериментального моделирования ФБНУ «Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины» Чепурнову А.А., сотрудникам отдела микроскопических исследований Зайцеву Б.Н., Таранову О.С., сотрудникам отдела «Коллекции микроорганизмов» с.н.с. Зайковской А.В. и зав. отделом Пьянкову О.В., зав. лабораторией д.б.н. Кочневой Г.В., к.б.н., зав. лабораторией синтетической биологии ИХБФМ СО РАН Шевелеву Г.Ю. и к.б.н., сотруднику ИХБФМ СОРАН Бондарю А.А.