

**РОССИЙСКАЯ  
АКАДЕМИЯ  
НАУК**

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (на базе Web of Science)

ЛР № 010215 от 29.04.97

**Почтовый адрес:**

115088, Москва,  
ул. Новоостاپовская, д. 5, стр. 14,  
ОАО «Издательство "Медицина"»

**Адрес редакции:** 129515,  
Москва, ул. 1-я Останкинская, д. 26  
Зав. редакцией *Т.М. Курушина*  
Тел.: +7-495-150-07-47 доб. 402  
E-mail: vopr.virusol@idm.msk.ru  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел. +7-495-150-07-47 доб. 101  
E-mail: info@idm.msk.ru  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**Ответственность за  
достоверность информации,  
содержащейся  
в рекламных материалах,  
несут рекламодатели.**

Редактор *Е.П. Мороз*  
Технический редактор  
*Л.В. Зюкина*  
Верстка *Е.М. Архипова*

Сдано в набор 20.03.2018.  
Подписано в печать 25.04.2018.  
Формат 60 × 88%.  
Печать офсетная.  
Печ. л. 6,00.  
Усл. печ. л. 5,88.  
Уч.-изд. л. 6,36.

Отпечатано в ООО "ПОЛИ ПРИНТ  
СЕРВИС", 119049, г. Москва,  
Калужская пл., д. 1, корп. 2  
ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2018.  
Т. 63. № 3. 97-144.

Все права защищены. Ни одна часть этого  
издания не может быть занесена в память  
компьютера либо воспроизведена любым  
способом без предварительного письменного  
разрешения издателя.

Свидетельство о регистрации № 1170  
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА  
«ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»**

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

**ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ**

Основан в 1956 г.

**3**

**Том 63 · 2018**

**Редакционная коллегия**

**Главный редактор: ЛЬВОВ Д.К. (д.м.н., проф., акад. РАН)**

Зам. главного редактора: **Дерябин П.Г. (д.м.н., проф.)**

Ответственный секретарь: **Гребенникова Т.В. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)**

Научный редактор: **Забережный А.Д. (д.б.н., проф.)**

**Члены редколлегии:**

Альховский С.В. (д.б.н.)

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гулюкин М.И. (д.в.н., проф., акад. РАН)

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Зверев В.В. (д.б.н., проф., акад. РАН)

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Лашкевич В.А. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Урываев Л.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН)

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Акимкин В.Г.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Алипер Т.И.** (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

**Ананьев В.Ю.** (к.м.н., рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Приморском крае"; Владивосток, Россия)

**Антонов В.А.** (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

**Баранов А.А.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Борисевич С.В.** (д.б.н., проф.; член-корр. РАН, Сергиев Посад, Россия)

**Брико Н.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Бутаев Т.М.** (д.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Сев. Осетия-Алания; Владикавказ, Россия)

**Гарбуз Ю.А.** (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Хабаровском крае"; Хабаровск, Россия)

**Глинских Н.П.** (д.м.н., проф.; Екатеринбург, Россия)

**Григорьев С.Н.** (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Магаданской обл."; Магадан, Россия)

**Заседателев А.С.** (д.ф.-м.н., проф.; Москва, Россия)

**Злобин В.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Иркутск, Россия)

**Иванов Л.И.** (рук. ФКУЗ "Хабаровская ПЧС"; Хабаровск, Россия)

**Кузин А.А.** (д.м.н.; Санкт-Петербург, Россия)

**Кутырев В.В.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Саратов, Россия)

**Леонова Г.Н.** (д.м.н., проф.; Владивосток, Россия)

**Лисицин Е.А.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Владимирской обл.; Владимир, Россия)

**Локтев В.Б.** (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

**Мальшев Н.А.** (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

**Михайлов М.И.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

**Нетесов С.В.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

**Никифоров В.В.** (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

**Покровский А.Г.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

**Покровский В.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Резник В.И.** (к.м.н.; Хабаровск, Россия)

**Романенко В.В.** (д.м.н., зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Свердловской обл."; Екатеринбург, Россия)

**Степанова Т.Ф.** (д.м.н., проф.; Тюмень, Россия)

**Тутельян А.В.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

**Чучалин А.Г.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Шестопалов А.М.** (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

**Щелканов М.Ю.** (д.б.н., проф.; Владивосток, Россия)

**Янович В.А.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Еврейской АО; Биробиджан, Россия)

**Яшкулов К.Б.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Калмыкия; Элиста, Россия)

## ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

**Виноград Н.А.** (д.м.н., проф.; Львов, Республика Украина)

**Грибкова Н.В.** (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

**Титов Л.П.** (д.м.н., проф., член-корр. НАН Беларуси, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

**Becker J.** (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)

**Berencsi G.** (PhD, MD, Prof.; Budapest, Hungary)

**Ciampor F.** (PhD, MD, DrSc; Bratislava, Slovak Republic)

**Compans R.W.** (PhD, Prof.; Atlanta, USA)

**De Paiva T.M.** (PhD; San Paulo, Brazil)

**Galabov A.S.** (Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences; Sofia, Bulgaria)

**Golovljova I.** (PhD; Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** (PhD; Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** (PhD; Hamilton, USA)

**Kawaoka Y.** (PhD, Prof.; Tokyo, Japan)

**Klenk H.-D.** (PhD, Prof.; Marburg, Germany)

**Kuhn J.H.** (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

**Mackenzie J.** (PhD, Prof.; Brisbane, Australia)

**Maneekarn N.** (PhD, D.V.M., Prof.; Chiang Mai, Thailand)

**Matrosovich M.N.** (PhD; Marburg, Germany)

**Nymadawa P.** (PhD, MD, DSc, Prof.; Ulan Bator, Mongolia)

**Oxford J.** (DSc; London, UK)

**Petrenkienė V.** (Assoc. Prof.; Kaunas, Lithuania)

**Roggendorf M.** (MD, Essen, Germany)

**Sakoda Y.** (PhD, Assoc. Prof.; Sapporo, Japan)

**Suarez D.L.** (D.V.M., PhD, A.C.V.M.; Athens, USA)

**Tashiro M.** (PhD, MD; Tokyo, Japan)

**Turan K.** (PhD, Assoc. Prof.; Istanbul, Turkey)

**Vaheri A.** (PhD, MD, Prof.; Helsinki, Finland)

**Vainionpää R.** (Docent; Turku, Finland)

**Webster R.** (PhD, DSc, Memphis, USA)

**Webby R.** (PhD, Memphis, USA)

**Yuelong Shu** (PhD, Beijing, P.R. China)

**Zeichardt H.** (PhD, DSc, Prof.; Berlin, Germany)

# VOPROSY VIROSOLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

Scientific Theoretical Journal Issued once in two months. Published since 1956

## Volume 63 • 3 • 2018

### EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief:** LVOV D.K., MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS

Assistant editors in chief: **Deryabin P.G.**, MD, PhD, DSc, Professor

Executive secretary: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor, corresponding member of RAS

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

### *Members of editorial board:*

**Al'khovskiy S.V.** – Doctor of Biological Sciences; **Barinskiy I.F.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of RAS; **Gurtsevich V.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Lashkevich V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenco G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

### Editorial council

**Akimkin V.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Aliper T.I.** – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)

**Anan'ev V.Yu.** – MD, PhD (Vladivostok, Russia)

**Antonov V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Volgograd, Russia)

**Baranov A.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Borisevich S.V.** – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Sergiev Posad, Russia)

**Briko N.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Butaev T.M.** – MD, PhD, DSc (Vladikavkaz, Russia)

**Garbuz Yu.A.** – MD (Khabarovsk, Russia)

**Glinskikh N.P.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Ekaterinburg, Russia)

**Grigor'ev S.N.** – MD (Magadan, Russia)

**Zasedatelev A.S.** – Doctor of physical, Prof. (Moscow, Russia)

**Zlobin V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Irkutsk, Russia)

**Ivanov L.I.** – MD (Khabarovsk, Russia)

**Kuzin A.A.** – MD, PhD, DSc (St. Petersburg, Russia)

**Kutyrev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saratov, Russia)

**Leonova G.N.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Vladivostok, Russia)

**Lisitsin E.A.** – MD, PhD (Vladimir, Russia)

**Loktev V.B.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)

**Malyshev N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow, Russia)

**Mikhaylov M.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow, Russia)

**Netesov S.V.** – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk, Russia)

**Nikiforov V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow, Russia)

**Pokrovskiy A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk, Russia)

**Pokrovskiy V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Reznik V.I.** – MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

**Romanenko V.V.** – MD, PhD, DSc (Ekaterinburg, Russia)

**Stepanova T.F.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen, Russia)

**Tutel'yan A.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow, Russia)

**Chuchalin A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Shestopalov A.M.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)

**Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D, Prof. (Vladivostok, Russia)

**Yanovich V.A.** – MD, PhD (Birobidzhan, Russia)

**Yashkulov K.B.** – MD, PhD (Elista, Russia)

### Advisory Board

**Vinograd N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Lvov, Ukraine)

**Gribkova N.V.** – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

**Titov L.P.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Minsk, Republic of Belarus)

**Becker J.** – PhD, DM, Prof. (Jerusalem, Israel)

**Berencsi G.** – PhD, MD, Prof. (Budapest, Hungary)

**Ciampor F.** – PhD, MD, Dr.Sc. (Bratislava, Slovak Republic)

**Compans R.W.** – PhD, Prof. (Atlanta, USA)

**De Paiva T.M.** – PhD (San Paulo, Brazil)

**Galabov A.S.** – Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences (Sofia, Bulgaria)

**Golovljova I.** – PhD (Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** – PhD (Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** – PhD (Hamilton, USA)

**Kawaoka Y.** – PhD, Prof. (Tokyo, Japan)

**Klenk H.-D.** – PhD, Prof. (Marburg, Germany)

**Kuhn J.H.** – MD, PhD, PhD, MSc (Frederick, USA)

**Mackenzie J.** – PhD, Prof. (Brisbane, Australia)

**Maneekarn N.** – PhD, D.V.M., Prof. (Chiang Mai, Thailand)

**Matrosovich M.N.** – PhD (Marburg, Germany)

**Nymadawa P.** – PhD, MD, DSc., Prof. (Ulan Bator, Mongolia)

**Oxford J.** – DSc (London, UK)

**Petrenkiene V.** – Assoc. Prof. (Kaunas, Lithuania)

**Roggendorf M.** – MD (Essen, Germany)

**Sakoda Y.** – PhD, Assoc. Prof. (Sapporo, Japan)

**Suarez D.L.** – D.V.M., PhD, A.C.V.M. (Athens, USA)

**Tashiro M.** – PhD, MD (Tokyo, Japan)

**Turan K.** – PhD, Assoc. Prof. (Istanbul, Turkey)

**Vaheri A.** – PhD, MD, Prof. (Helsinki, Finland)

**Vainionpää R.** – Docent (Turku, Finland)

**Webster R.** – PhD, DSc. (Memphis, USA)

**Webby R.** – PhD (Memphis, USA)

**Yuelong Shu** – PhD (Beijing, P.R. China)

**Zeichardt H.** – PhD, DSc, Prof. (Berlin, Germany)



## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

- Лашкевич В.А., Карганова Г.Г.** О современных подходах к созданию одноразовой вакцины против клещевого энцефалита. . . . . 101
- Андропова В.Л.** Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфагерпесвирусы (часть I) . . . . . 106

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Макаров В.В., Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Полякова И.В., Южаков А.Г.** Особенности эпизоотологического процесса и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Тверской области. . . . . 115
- Криворутченко Ю.Л., Носик Д.Н., Малыгина В.Ю., Лобач О.А., Андроновская И.Б., Кирсанова М.А., Гришковец В.И.** Цитотоксические свойства тритерпенового сапонина таурозиды Sx1 и его воздействие на ВИЧ-1 и гриппозную инфекцию у мышей . . . . . 123
- Блохина Е.А., Равин Н.В.** Конструирование мозаичных НВс-частиц, несущих консервативные участки М2-белка и гемагглютинина вируса гриппа А. . . . . 130
- Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Леонов И.К.** Кинетика инактивации вируса гепатита утят типа I (Avihepatovirus, Picornaviridae) . . . . . 135
- Куприянов В.В., Николаева Л.И., Зыкова А.А., Махновский П.И., Котляров Р.Ю., Васильев А.В., Равин Н.В.** Иммуногенные свойства рекомбинантных мозаичных белков на основе антигенов NS4A и NS4B вируса гепатита С . . . . . 138

### РЕЦЕНЗИИ

- Алексеева С.В.** Рецензия на монографию В.В. Макарова, Д.А. Лозового «Новые особо опасные инфекции, ассоциированные с рукокрылыми» . . . . . 143

## CONTENTS

### REVIEWS

- Lashkevich V.A., Karganova G.G.** On modern approaches to creation of a single-cycle vaccine against tick-borne encephalitis
- Andronova V.L.** Modern ethiotropic chemotherapy of herpesvirus infections: advances, new trends and perspectives Alphaherpesvirinae (part I)

### ORIGINAL RESEARCH

- Gulukin A.M., Shabeykin A.A., Makarov V.V., Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Zaberezhny A.D., Polyakova I.V., Yuzhakov A.G.** Features of episodic process and molecular-genetic characteristics of virus isolates of rabies in Tver region
- Krivorutchenko Yu.L., Nosik D.N., Maligina V.Yu., Lobach O.A., Andronovskaja I.B., Kirsanova M.A., Grishkovets V.I.** Cytotoxic properties of triterpene saponin taurosides Sx1 and its effect on human immunodeficiency virus and influenza virus infection in mice
- Blokhina E.A., Ravin N.V.** Construction of mosaic HBc particles presenting conservative fragments of M2 protein and hemagglutinin of influenza A virus
- Trefilov B.B., Nikitina N.V., Leonov I.K.** The kinetics of the inactivation of the hepatitis virus type I (Avihepatovirus, Picornaviridae)
- Koupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Zyкова A.A., Makhnovskiy P.I., Kotlyarov R.Y., Vasilyev A.V., Ravin N.V.** Immunogenic properties of recombinant mosaic proteins based on antigens NS4A and NS4B of hepatitis C virus

### BOOK REVIEWS

- Alekseeva S.V.** New highly infectious diseases conveyed by bats, a monograph by V.V. Makarov and D.A. Lozovoi

#### Уважаемые авторы и читатели журнала!

Обращаем Ваше внимание на то, что мы обновили сайт журнала «Вопросы вирусологии».

**Новый адрес сайта:** [www.medlit.ru/journalsview/virology](http://www.medlit.ru/journalsview/virology)

Вы можете подписаться через наш сайт на электронную версию журнала или купить отдельные статьи по издательской цене. Для этого нужно пройти регистрацию на сайте.

---

## ОБЗОРЫ

---

© ЛАШКЕВИЧ В.А., КАРГАНОВА Г.Г., 2018  
УДК 615.371:616.831=002=022:578.833.26].012.6

*Лашкевич В.А., Карганова Г.Г.*

### О СОВРЕМЕННЫХ ПОДХОДАХ К СОЗДАНИЮ ОДНОРАЗОВОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва

В России ежегодно заболевают клещевым энцефалитом (КЭ) около 2 тыс. человек. Почти все они не были вакцинированы. Для профилактики КЭ используют инактивированные вакцины против КЭ (ИВКЭ). ИВКЭ безопасны и защищают от заболевания не менее 95% вакцинированных. Недостатками ИВКЭ являются необходимость многочисленных внутримышечных введений медицинскими работниками, высокая стоимость вакцинации и отказ населения от вакцинации. Новая вакцина против КЭ не должна уступать ИВКЭ по безопасности и эффективности, должна вызывать длительный иммунитет после однократного применения и, желательнее, быть эффективной после перорального введения. В настоящее время предложены генно-инженерные методы получения флавивирусов, дефектных по репликации (одноцикловых), которые могут быть основой для создания безопасных вакцин нового типа, сходных по многим характеристикам с классическими живыми вакцинами из аттенуированных штаммов вирусов. Возможность заражения человека КЭ алиментарным путем при употреблении молока естественно инфицированных животных, а также опыт применения экспериментальных живых вакцин против КЭ являются предпосылками для создания безопасной пероральной одноразовой вакцины против этого заболевания.

*Ключевые слова:* вирус клещевого энцефалита; вакцина против клещевого энцефалита.

*Для цитирования:* Лашкевич В.А., Карганова Г.Г. О современных подходах к созданию одноразовой вакцины против клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 101-105.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-101-105>

*Lashkevich V.A., Karganova G.G.*

### ON MODERN APPROACHES TO CREATION OF A SINGLE-CYCLE VACCINE AGAINST TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819, Russian Federation

In Russia, about 2000 people get tick-borne encephalitis (TBE) every year. Almost none of them are vaccinated. For the prevention of TBE, inactivated vaccines (IVTBE) are used. IVTBE are safe and protect from TBE not less than 95% of vaccinated. The disadvantages of IVTBE are the need for numerous intramuscular injections by medical personnel, the high cost of vaccination and the vaccination refusals. A new vaccine against TBE should not be inferior to IVTBE in its safety and efficacy, should cause long-term immunity after a single application, and, preferably, be effective after oral administration. Currently, genetic engineering methods for producing replication-defective (single-cycle) flaviviruses that can serve as the basis for creating new types of safe vaccines similar in many characteristics to classic live vaccines based on attenuated strains of viruses have been proposed. The possibility of infecting humans with TBE by the use of milk of naturally infected animals, as well as the experience of using experimental live TBE vaccines, are prerequisites for the creation of a safe oral single-dose TBE vaccine.

*Key words:* review; tick-borne encephalitis; tick-borne encephalitis vaccine.

*For citation:* Lashkevich V.A., Karganova G.G. On modern approaches to creation of a single-cycle vaccine against tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3): 101-105. (In Russ.).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-101-105>

*For correspondence:* Galina G. Karganova, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of Laboratory of biology of arboviruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and- Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819, Russian Federation. E-mail: [karganova@bk.ru](mailto:karganova@bk.ru)

*Information about authors:*

Karganova G.G., <http://orcid.org/0000-0002-8901-6206>

*Acknowledgment.* This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 15-14-0004).

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

Received 10 December 2017

Accepted 12 December 2017

---

*Для корреспонденции:* Карганова Галина Григорьевна, д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией биологии арбовирусов ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва.  
E-mail: [karganova@bk.ru](mailto:karganova@bk.ru)

## Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) является эндемичным для большинства стран Евразии. По оценочным данным, в мире ежегодно заболевают КЭ более 10 тыс. человек [1, 2]. Около 2–10% из них умирают, примерно треть переболевших имеют осложнения разной степени тяжести, в том числе инвалидность.

Санация природных очагов КЭ неосуществима и нецелесообразна. Возможности неспецифической профилактики для прерывания путей передачи вируса человеку очень ограничены. Вакцинация населения качественной и удобной для применения вакциной и просвещение населения об опасности КЭ и мерах профилактики являются главными условиями успешной борьбы с этой арбовирусной инфекцией.

В настоящее время для вакцинации населения используются инактивированные концентрированные очищенные вакцины против КЭ четырёх производителей для детей и взрослых [3, 4]. Большой опыт использования доказал их безопасность и высокую эффективность [1, 2, 5–9], хотя редкие случаи заболевания регистрируются и среди вакцинированных [10–12].

Главными недостатками инактивированных вакцин являются необходимость многочисленных внутримышечных прививок, которые проводятся только медицинскими работниками в соответствующих условиях, дороговизна каждого введения вакцины и отказ населения от прививок по разным причинам.

Ранее предпринимались многочисленные попытки разработать живую аттенуированную вакцину, которая была бы лишена этих недостатков [13–23]. Живая вакцина на основе вируса Лангат, разработанная А. Дубовым и соавт. [23–25], была использована для вакцинации более 600 тыс. людей и вызвала поствакцинальные осложнения с частотой 1 на 18 500 привитых, в том числе 1 летальный случай [23, 26]. Эта неудача практически остановила работы в этом направлении.

В последние годы разрабатываются новые подходы для получения более эффективной вакцины против КЭ, получены экспериментальные штаммы-кандидаты для такой вакцины, но их пригодность для вакцинации людей не изучена.

### Заболываемость КЭ в России и вакцинация

По данным Роспотребнадзора, КЭ в 2013–2016 гг. в России заболели соответственно 2225, 1969, 2300, 2020 человек [27]. Большинство заболевших не были вакцинированы. Тем не менее редкие случаи КЭ среди привитых регистрируются в регионах, где применяются вакцины разных производителей, и циркулируют разные подтипы вируса КЭ [6–7, 10–12, 28].

Оценка эффективности вакцинного препарата для арбовирусных инфекций достаточно сложна, поскольку зависит от многих факторов, в том числе активности очага, частоты нападения клещей на человека, плотности населения, свойств вируса и т. п. Наиболее достоверные данные можно получить на основании многолетних наблюдений в очагах, где вся территория является эндемичной, уровень вакцинации превышает 50% и проводится эпидемиологический анализ всех случаев заболевания. В свете этих требований наиболее показательны данные, полученные в Австрия [5, 8], где население прививается, в основном, вакциной на основе европейского штамма вируса КЭ, и данные для Свердловской области, где используются вакцины разных производителей на

основе дальневосточных и европейских штаммов вируса КЭ, а циркулирует преимущественно сибирский подтип вируса [6, 7]. Согласно эпидемиологическим данным, полученным в этих регионах, уровень эпидемиологической защиты от инактивированных КЭ-вакцин превышает 95% [5, 7].

Низкий уровень вакцинации против КЭ объясняется несколькими объективными и субъективными причинами. Главной объективной причиной является высокая стоимость вакцинации и большая группа риска. В РФ на территории, эндемичной по КЭ, проживает около 61 млн человек [29]. Если учесть высокую подвижность населения и количество людей, которые проживают на неэндемичной территории, но посещают регионы, где есть риск заражения, это число будет ещё больше. Первичный курс вакцинации и последующие ревакцинации через каждые 3 года являются непосильным бременем для здравоохранения. В настоящее время благодаря политике местных властей и надзору за этой проблемой со стороны Роспотребнадзора практически во всех регионах уровень вакцинации повышается. Бесплатной вакцинацией охвачено детское население. Сокращение числа ревакцинаций позволило бы значительно продвигаться в решении этой проблемы.

Субъективными причинами недостаточного охвата населения вакцинацией против КЭ являются также высокая стоимость вакцины для индивидуального применения, нарушение схемы вакцинации из-за необходимости многократной иммунизации, антивакцинальные кампании и др.

### Новые подходы к созданию вакцины для защиты против КЭ

Подъем заболеваемости КЭ в Европе и России в 90-е годы прошлого века привлёк внимание исследователей и производителей профилактических препаратов к созданию более эффективной вакцины против КЭ [30].

Новая вакцина не должна уступать современным препаратам по безопасности и иммуногенности и, кроме того, должна индуцировать длительный, возможно пожизненный противовирусный иммунитет после однократного применения и, желательно, быть эффективной после перорального введения.

Большим достоинством новой вакцины была бы её способность защищать от нескольких флавивирусов, поскольку в РФ существуют сочетанные очаги, где помимо вируса КЭ циркулируют вирусы Западного Нила, Повассан, омской геморрагической лихорадки и японского энцефалита. Дополнительные трудности в создании вакцины при наличии сочетанных очагов флавивирусных инфекций связаны с характерным для флавивирусов, особенно переносимых комарами, антителозависимым повышением тяжести инфекции.

Создание новой вакцины против КЭ проводилось и проводится в разных направлениях. Данный обзор не претендует на исчерпывающее описание исследований в этой области. Ниже приведены некоторые примеры, которые, на наш взгляд, дают представление об общих тенденциях и состоянии дел на данный момент:

– рекомбинантные вакцины, представляющие вирионные белки пре-M + E [31], фрагмент поверхностного гликопротеина E, иммобилизованный на декстрансульфате в сочетании с олигонуклеотидами CpG [32], или неструктурный белок NS1 [33, 34] в виде ДНК-вакцин или в составе разных векторов;

– субвирусные частицы, несущие вирусные глико-

протеины пре-М и Е, полученные в бактериальных системах [31], дрожжах [35] и клетках млекопитающих [36, 37];

– живые аттенуированные вакцины с мутациями в разных участках генома, в первую очередь в нетранслируемых областях или с делецией в белке нуклеокапсида С [38–41], а также полученные с помощью рандомизированного кодирования кодонов в сочетании с обратной генетикой без использования бактерий [42];

– флавиовирусные химеры, в которых в геноме одного вируса гены белков пре-М и Е заменены генами от другого вируса. Для получения вакцины, защищающей от КЭ, гены белков Е и пре-М вирусов КЭ или Лангат были вставлены в геном вируса денге-4 [43, 44];

– самореплицирующаяся неинфекционная РНК-вакцина [45, 46] – синтезированная *in vitro* инфекционная РНК, с которой транскрибируется инфекционная РНК *in vivo*, дефектная по репродукции за счёт протяжённой делеции в белке нуклеокапсида;

– вирусный антиген, полученный в растениях [47];

– вирус, аттенуированный путём введения в вирусный геном сайтов для тканеспецифических микро-РНК, что обеспечивает деградацию вирусной РНК в ЦНС и клетках членистоногих [48, 49];

– сочетание химеризации и протяжённой делеции в белке нуклеокапсида С, что в результате даёт дефектный вирус, способный только на один раунд репродукции в клетках [50].

В ряде случаев предлагаемые кандидаты были тестированы на лабораторных животных и показана их иммуногенность или протективность. В нескольких исследованиях были проведены эксперименты по оценке протективной активности новых препаратов в сравнении с существующими инактивированными вакцинами. В описанных исследованиях не изучалась длительность индуцируемого иммунного ответа, что реально должно было бы показать преимущества предлагаемой вакцины. Не описаны попытки сочетания нового препарата с инактивированной вакциной.

Эффективность однократной иммунизации в экспериментах на лабораторных мышах для защиты от дальневосточного подтипа вируса КЭ была показана для ДНК вакцины, несущей гены пре-М и Е [31], а также для самореплицирующейся неинфекционной РНК [46].

Одним из наиболее интересных вариантов представляется дефектный, способный только к одному раунду репродукции вирус. В 2006 г. были предложены конструкции на основе вакцинного штамма вируса желтой лихорадки и вируса Западного Нила с делецией в белке нуклеокапсида С и, соответственно, дефектные по размножению [51]. В эти конструкции можно вставить белки пре-М и Е других флавиовирусов и не только флавиовирусов. При репродукции таких псевдоинфекционных вирусных частиц синтезируются иммуногенные не имеющие генома субвирусные частицы. Псевдоинфекционные частицы могут быть получены при репродукции в генномодифицированных клетках, экспрессирующих белок С. Вакцинный вариант для защиты от КЭ был создан, и проведены эксперименты на лабораторных мышах и обезьянах [50], результаты которых внушают надежду на получение однократной инъекционной вакцины против КЭ.

**Предпосылки для разработки пероральной вакцины против КЭ**

Человек может заразиться КЭ при употреблении не-

кипяченого молока инфицированных животных [52]. До настоящего времени публикуются новые сообщения о пероральных заражениях КЭ [53–54]. Ранее было показано, что во время клинических испытаний живых аттенуированных кандидатов в вакцины против КЭ при пероральном применении наблюдается индукция противовирусного иммунного ответа [15, 21, 23]. Эти факты, а также большие достижения в создании новых лекарственных форм являются предпосылкой для разработки пероральной вакцины против КЭ.

### Заключение

Недостатки инактивированных КЭ-вакцин не исчезнут. Разработка однократной пероральной вакцины против КЭ, дающей иммунитет на всю жизнь, является насущной задачей. Если в ходе дальнейших исследований удастся получить безопасную вакцину против КЭ, эффективную при однократном применении, это будет важным достижением современной вакцинологии.

**Финансирование.** Работа была поддержана грантом РФФИ 15-14-0004.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4, 5, 8-11, 13, 16, 17, 20, 28, 30-51, 53, 54 см. REFERENCES)

3. Воробьева М.С. Современная стратегия вакцинопрофилактики клещевого энцефалита. *Медицинская вирусология*. 2009; 26: 73-4.
6. Романенко В.В., Есюнина М.С., Килячина А.С., Пименова Т.А. Массовая иммунизация населения Свердловской области против клещевого энцефалита, ее эпидемиологическая, клиническая и иммунологическая эффективность. *Медицинская вирусология*. 2006; 23: 116-25.
7. Романенко В.В., Есюнина М.С., Килячина А.С. Опыт реализации программы массовой иммунизации против клещевого энцефалита в Свердловской области. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(6): 22-5.
12. Погодина В.В., Лучинина С.В., Степанова О.Н., Стенько Е.А., Горфинкель А.Н., Кармышева В.Я. и др. Необычный случай летального исхода клещевого энцефалита у пациента, привитого вакцинами разных генотипов (Челябинская область). *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(1): 56-64.
14. Ильенко В.И., Платонов В.Г., Прозорова И.Н., Смородинов А.А. Опыт изучения живой вакцины из малайского вируса штамма Лангат ТР-21. *Бюллетень ВОЗ*. 1968; 39(3): 425-31.
15. Аджаридзе О.Г., Степанова Л.Г. Изучение изменчивости вируса клещевого энцефалита. Сообщение 7. Реактогенные и иммуногенные свойства аттенуированного штамма И-40 Д при пероральной вакцинации добровольцев. *Вопросы вирусологии*. 1970; 15(4): 428-32.
18. Ерофеев В.С., Карпов С.П., Куликова Н.Н. Иммунобиологическая характеристика вакцины клещевого энцефалита, приготовленной из аттенуированного вируса. В кн.: *Труды Томского НИИ Вакцин и сывороток и Томского медицинского института*. 1976; 26: 229-35.
19. Левкович Е.Н., Карпович Л.Г., Засухина Г.Д. Генетика и эволюция арбовирусов. М.: Медицина; 1971.
21. Ильенко В.И., Платонов В.Г., Прозорова И.Н., Смородинов А.А. К вопросу о возможности приготовления живой вакцины против клещевого энцефалита из малайского вируса штамма Лангат ТР-21. В кн.: *Клещевой энцефалит*. СПб.: 1989: 126-32.
22. Соколова Е.Д., Камалов И.И., Коновалов Г.В., Вейгман Н.З. Нейровирулентность вариантов вируса Лангат ТР-21 в опытах на низших обезьянах разных видов. *Вопросы вирусологии*. 1994; 39(2): 116-9.

23. Смородинцев А.А., Дубов А.В. *Клещевой энцефалит и его вакцинопрофилактика*. Ленинград: Медицина; 1986.
24. Дубов А., Горожанкина Т.С., Иванова Л.М., Молотилов Б.А., Костылев С.Г., Губина С.В. и др. Результаты испытания живой вакцины против клещевого энцефалита в расширенном эпидемиологическом опыте. В кн.: *Опыт применения живой вакцины против клещевого энцефалита*. Тюмень; 1971: 11-7.
25. Дубов А.В., Горожанкина Т.С., Смородинцев А.А. Основные биологические свойства вакцинного штамма Еланцев вируса клещевого энцефалита. Живая вакцина против клещевого энцефалита. В кн.: *Труды Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии*. 1969; (3): 16-26.
26. Шаповал А.Н., Камалов И.И., Денисова Е.Ю., Соколова Е.Д., Лузин П.М., Шамарина А.Г. и др. Изучение отдаленных последствий иммунизации людей живой вакциной против клещевого энцефалита. В кн.: *«Клещевой энцефалит»*. СПб.: 1989: 133-5.
27. Роспотребнадзор. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за 2013-2016 гг. по данным Формы № 1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях». Available at: <http://gospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/>
29. Чернохаева Л.Л., Холодилов И.С., Пакскина Н.Д. Современный ареал клещевого энцефалита в Российской Федерации. *Медицинская вирусология*. 2016; 30(1): 6-22.
52. Верета Л.А., Скоробрехова В.З., Николаева С.П., Александров В.И., Толстоногова В.И., Захарычева Т.А. и др. Заражение вирусом клещевого энцефалита через коровье молоко. *Медицинская паразитология*. 1981; 31: 54-6.
- borne encephalitis in patient vaccinated with vaccines produced from different viruses strains (the Chelyabinsk Region). *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2015; 20(1): 56-64. (in Russian)
13. Timofeev A.V., Karganova G.G. *Tick-borne Encephalitis Vaccine: From Past to Future*. Moscow; 2003.
14. П'енко В.И., Платонов В.Г., Прозорова И.Н., Смородинцев А.А. Experience in the study of a live vaccine made from the TP-21 strain of Malayan Langat virus. *Bull. World Health Organ*. 1968; 39(3): 425-31.
15. Adzhaparidze O.G., Stepanova L.G. Study of the variability of tick-borne encephalitis virus. Communication 7. Reactogenic and immunogenic properties of the attenuated strain I-40 D for oral vaccination of volunteers. *Voprosy virusologii*. 1970; 15(4): 428-32. (in Russian)
16. Mayer V., Rajcáni J. Study of the virulence of tick-borne encephalitis virus. VI. Intracerebral infection of monkeys with clones experimentally attenuated virus. *Acta Virol*. 1967; 11(4): 321-3.
17. Price W.H., Thind I.S., Teasdall R.D., O'Leary W. Vaccination of human volunteers against Russian spring-summer (RSS) virus complex with attenuated Langat E5 virus. *Bull. World Health Organ*. 1970; 42(1): 89-94.
18. Erofeev V.S., Karpov S.P., Kulikova N.N. Immunobiological characteristics of tick-borne encephalitis vaccine prepared from an attenuated virus. In: *Proceedings of the Tomsk Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and Tomsk Medical Institute [Trudy Tomskogo NII Vaksin i syvorotok i Tomskogo meditsinskogo instituta]*. 1976; 26: 229-35. (in Russian)
19. Levkovich E.N., Karpovich L.G., Zasukhina G.D. *Genetics and the Evolution of Arboviruses [Genetika i evolyutsiya arbovirusov]*. Moscow: Meditsina; 1971. (in Russian)
20. Mayer V., Pogády J., Starek M., Hrbka J. A live vaccine against tick-borne encephalitis: integrated studies. III. Response of man to a single dose of the E5 "14" clone (Langat virus). *Acta Virol*. 1975; 19(3): 229-36.
21. П'енко В.И., Платонов В.Г., Прозорова И.Н., Смородинцев А.А. Experience in studying live vaccine from Malay virus strain Langat TR-21. In: *Tick-borne Encephalitis [Kleshchevoy entsefalit]*. St. Petersburg; 1989: 126-32. (in Russian)
22. Sokolova E.D., Kamalov I.I., Konovalov G.V., Veygman N.Z. The neurovirulence of variants of the Langat TP-21 virus in experiments on different species of lower monkeys. *Voprosy virusologii*. 1994; 39(2): 116-9. (in Russian)
23. Smorodintsev A.A., Dubov A.V. *Tick-borne Encephalitis and Its Vaccine Prophylaxis [Kleshchevoy entsefalit i ego vaksinoprofilaktika]*. Leningrad: Meditsina; 1986. (in Russian)
24. Dubov A., Gorozhankina T.S., Ivanova L.M., Molotilov B.A., Kostylev S.G., Gubina S.V., et al. The results of testing live vaccine against tick-borne encephalitis in the expanded epidemiological experience. In: *The Experience of Using Live Vaccine Against Tick-borne Encephalitis [Opyt primeneniya zhivoy vaksiny protiv kleshchevogo entsefalita]*. Tyumen'; 1971: 11-7. (in Russian)
25. Dubov A.V., Gorozhankina T.S., Smorodintsev A.A. The main biological properties of the vaccine strain of Elantcev of tick-borne encephalitis virus. Live vaccine against tick-borne encephalitis. In: *Proceedings of Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology [Trudy Tyumenskogo NII kraevoy infeksionnoy patologii]*. 1969; (3): 16-26. (in Russian)
26. Shapoval A.N., Kamalov I.I., Denisova E.Yu., Sokolova E.D., Luzin P.M., Shamarina A.G., et al. Study of the long-term consequences of immunization of people with live vaccine against tick-borne encephalitis. In: *Tick-borne Encephalitis [Kleshchevoy entsefalit]*. St. Petersburg; 1989: 133-5. (in Russian)
27. Роспотребнадзор (Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare). Infectious morbidity in the Russian Federation for 2013-2016. according to Form No. 1 "Information on infectious and parasitic diseases". Available at: <http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/> (in Russian)
28. Grgič-Vitek M., Avšič-Županc T., Klavs I. Tick-borne encephalitis after vaccination: vaccine failure or misdiagnosis. *Vaccine*. 2010; 28(46): 7396-400.
29. Chernokhaeva L.L., Kholodilov I.S., Paksina N.D. Present

## REFERENCES

- World Health Organization. Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *WER*. 2011; 24(86): 241-56.
- Amicizia D., Domnich A., Panatto D., Lai P.L., Cristina M.L., Avio U., et al. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2013; 9(5): 1163-71.
- Vorob'eva M.S. Modern strategy of tick-borne encephalitis vaccinal prevention. *Meditsinskaya virusologiya*. 2009; 26: 73-4. (in Russian)
- Heinz F.X., Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 2012; 30(29): 4301-6.
- Kunz C. TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine*. 2003; 21(Suppl. 21): 50-5.
- Romanenko V.V., Esyunina M.S., Kilyachina A.S., Pimenova T.A. Mass immunization Sverdlovsk region population against tick-borne encephalitis, epidemiological, clinical and immunological effectiveness of vaccination. *Meditsinskaya virusologiya*. 2006; 23: 116-25. (in Russian)
- Romanenko V.V., Esyunina M.S., Kilyachina A.S. Experience in implementing the mass immunization program against tick-borne encephalitis in the Sverdlovsk Region. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(6): 22-5. (in Russian)
- Kunze U., Böhm G. Tick-borne encephalitis (TBE) and TBE-vaccination in Austria: Update 2014. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2015; 165(13-14): 290-5. (in German)
- Domnich A., Panatto D., Arbutova E.K., Signori A., Avio U., Gasparini R., et al. Immunogenicity against Far Eastern and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis (TBE) virus elicited by the currently available vaccines based on European subtype: Systematic review and meta-analysis. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2014; 10(10): 2818-33.
- Andersson C.R., Vene S., Insulander M., Lindquist L., Lundkvist A., Günther G. Vaccine failures after active immunization against tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2010; 28(16): 2827-31.
- Bender A., Jager G., Scheuerer W., Feddersen B., Kaiser R., Pfister H.W. Two severe cases of tick-borne encephalitis despite complete active vaccination — the significance of neutralizing antibodies. *J. Neurol*. 2004; 251(3): 353-4.
- Pogodina V.V., Luchinina S.V., Stepanova O.N., Sten'ko E.A., Gorfinkel' A.N., Karmysheva V.Ya., et al. Unusual case of lethal tick-

- distribution area of tick-borne encephalitis in the Russian Federation. *Meditsinskaya virusologiya*. 2016; 30(1): 6-22. (in Russian)
30. Pugachev K.V., Guirakhoo F., Trent D.W., Monath T.P. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int. J. Parasitol.* 2003; 33(5-6): 567-82.
  31. Omori-Urabe Y., Yoshii K., Ikawa-Yoshida A., Kariwa H., Takashima I. Needle-free jet injection of DNA and protein vaccine of the far-eastern subtype of tick-borne encephalitis virus induces protective immunity in mice. *Microbiol. Immunol.* 2011; 55(12): 893-7.
  32. Ershova A.S., Gra O.A., Lyaschuk A.M., Grunina T.M., Tkachuk A.P., Bartov M.S., et al. Recombinant domains III of Tick-Borne Encephalitis Virus envelope protein in combination with dextran and CpGs induce immune response and partial protectiveness against TBE virus infection in mice. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16(1): 544.
  33. Aleshin S.E., Timofeev A.V., Khoretonenko M.V., Zakharova L.G., Pashvykina G.V., Stephenson J.R., et al. Combined primeboost vaccination against tick-borne encephalitis (TBE) using a recombinant vaccinia virus and a bacterial plasmid both expressing TBE virus non-structural NS1 protein. *BMC Microbiol.* 2005; 5: 45.
  34. Kuzmenko Y., Starodubova E., Shevtsova A., Chernokhaeva L., Latanova A., Preobrazhenskaia O., et al. Intracellular degradation and localization of NS1 of TBEV affects its protective properties. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(1): 50-5.
  35. Yun S.M., Jeong Y.E., Wang E., Lee Y.J., Han M.G., Park C., et al. Cloning and Expression of Recombinant Tick-Borne Encephalitis Virus-like Particles in *Pichia pastoris*. *Osong. Public Health Res. Perspect.* 2014; 5(5): 274-8.
  36. Yoshii K., Hayasaka D., Goto A., Kawakami K., Kariwa H., Takashima I. Packaging the replicon RNA of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus into single-round infectious particles: development of a heterologous gene delivery system. *Vaccine.* 2005; 23(30): 3946-56.
  37. Gehrke R., Ecker M., Aberle S.W., Allison S.L., Heinz F.X., Mandl C.W. Incorporation of tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. *J. Virol.* 2003; 77(16): 8924-33.
  38. Mandl C.W., Allison S.L., Holzmann H., Meixner T., Heinz F.X. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J. Virol.* 2000; 74(20): 9601-9.
  39. Pletnev A.G. Infectious cDNA clone of attenuated Langat tick-borne flavivirus (strain E5) and a 3' deletion mutant constructed from it exhibit decreased neuroinvasiveness in immunodeficient mice. *Virology.* 2001; 282(2): 288-300.
  40. Kofler R.M., Heinz F.X., Mandl C.W. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *J. Virol.* 2002; 76(7): 3534-43.
  41. Engel A.R., Rummyantsev A.A., Maximova O.A., Speicher J.M., Heiss B., Murphy B.R., et al. The neurovirulence and neuroinvasiveness of chimeric tick-borne encephalitis/dengue virus can be attenuated by introducing defined mutations into the envelope and NS5 protein genes and the 3' non-coding region of the genome. *Virology.* 2010; 405(1): 243-52.
  42. Fabritius L., Nougairède A., Aubry F., Gould E.A., de Lamballerie X. Utilisation of ISA reverse genetics and large-scale random codon re-encoding to produce attenuated strains of tick-borne encephalitis virus within days. *PLoS ONE.* 2016; 11(8): e0159564.
  43. Pletnev A.G., Bray M., Hanley K.A., Speicher J., Elkins R. Tick-borne Langat/mosquito-borne dengue flavivirus chimera, a candidate live attenuated vaccine for protection against disease caused by members of the tick-borne encephalitis virus complex: evaluation in rhesus monkeys and in mosquitoes. *J. Virol.* 2001; 75(17): 8259-67.
  44. Rummyantsev A.A., Chanock R.M., Murphy B.R., Pletnev A.G. Comparison of live and inactivated tick-borne encephalitis virus vaccines for safety, immunogenicity and efficacy in rhesus monkeys. *Vaccine.* 2006; 24(2): 133-43.
  45. Kofler R.M., Aberle J.H., Aberle S.W., Allison S.L., Heinz F.X., Mandl C.W. Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(7): 1951-6.
  46. Aberle J.H., Aberle S.W., Kofler R.M., Mandl C.W. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 2005; 79(24): 15107-13.
  47. Martínez C.A., Giulietti A.M., Talou J.R. Research advances in plant-made flavivirus antigens. *Biotechnol. Adv.* 2012; 30(6): 1493-505.
  48. Heiss B.L., Maximova O.A., Thach D.C., Speicher J.M., Pletnev A.G. MicroRNA targeting of neurotropic flavivirus: effective control of virus escape and reversion to neurovirulent phenotype. *J. Virol.* 2012; 86(10): 5647-59.
  49. Tsetsarkin K.A., Liu G., Volkova E., Pletnev A.G. Synergistic Internal Ribosome Entry Site/MicroRNA-Based Approach for Flavivirus Attenuation and Live Vaccine Development. *MBio.* 2017; 8(2): e02326-16.
  50. Rummyantsev A.A., Goncalvez A.P., Giel-Moloney M., Catalan J., Liu Y., Gao Q., et al. Single dose-vaccine against tick-borne encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(32): 13103-8.
  51. Mason P.W., Shustov A.V., Frolov I. Production and characterization of vaccines based on flaviviruses defective in replication. *Virology.* 2006; 351(2): 432-43.
  52. Vereta L.A., Skorobrekhova V.Z., Nikolaeva S.P., Aleksandrov V.I., Tolstunogova V.I., Zakharycheva T.A., et al. Infection with tick-borne encephalitis virus through cow's milk. *Meditsinskaya parazitologiya.* 1981; 31: 54-6. (in Russian)
  53. Kriz B., Benes C., Daniel M. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 2009; 58(2): 98-103.
  54. Hudopisk N., Korva M., Janet E., Simetinger M., Grgič-Vitek M., Gubenšek J., et al. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 806-8.

Поступила 10.12.17

Принята в печать 12.12.17

Андропова В.Л.

## СОВРЕМЕННАЯ ЭТИОТРОПНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ДОСТИЖЕНИЯ, НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ. АЛЬФАГЕРПЕСВИРУСЫ (ЧАСТЬ I)

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Современная терапия инфекций, вызываемых альфагерпесвирусами, базируется на препаратах, относящихся к классу модифицированных нуклеозидов (ацикловир), и их метаболитических предшественниках (валиновый эфир ацикловира и фамцикловир (предшественник пенцикловира)). Биологическая активность этих соединений определяется сходством их структуры с природными нуклеозидами: модифицированные нуклеозиды конкурируют с природными за связывание с ДНК-полимеразой и благодаря структурным особенностям ингибируют её активность. Однако появление вариантов вирусов, резистентных к имеющимся в арсенале современной медицины противовирусным препаратам, обуславливает необходимость поиска новых соединений, способных эффективно ингибировать репродукцию вируса, безвредных для макроорганизма, удобных в применении, преодолевающих барьер лекарственной устойчивости у вирусов. Поиск литературы в международных базах данных (PubMed, MedLine, РИНЦ и других) с целью получения информации о перспективных разработках, открывающих новые возможности воздействия на герпесвирусную инфекцию, и последующий анализ собранных данных позволили не только определить основные тенденции поиска новых противовирусных агентов, но и привести информацию о соединениях, наиболее перспективных для создания лекарственных антигерпесвирусных препаратов.

Ключевые слова: обзор; вирус герпеса простого; вирус варицелла зостер; противовирусный агент; лекарственный препарат.

*Для цитирования:* Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфагерпесвирусы (часть I). *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3):106-114. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-106-114>

Andronova V.L.

### MODERN ETHIOTROPIC CHEMOTHERAPY OF HERPESVIRUS INFECTIONS: ADVANCES, NEW TRENDS AND PERSPECTIVES. ALPHAHERPESVIRINAE (PART I)

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation

Modern therapy of infections caused by alpha-herpesviruses is based on drugs belonging to the class of modified nucleosides (acyclovir) and their metabolic progenitors - valine ester of acyclovir and famciclovir (prodrug of penciclovir). The biological activity of these compounds is determined by the similarity of their structure to natural nucleosides: modified nucleosides compete with natural nucleosides for binding to DNA-polymerase and, due to their structural features, inhibit its activity. However, the emergence of variants of viruses resistant to the antiviral drugs available in the arsenal of modern medicine necessitates the search for new compounds able of effectively inhibiting the reproduction of viruses. These compounds should be harmless to the macroorganisms, convenient to use, and overcoming the drug resistance barrier in viruses.

The search for literature in international databases (PubMed, MedLine, RINC, etc.) in order to obtain information on promising developments that open new possibilities for treating herpesvirus infection and subsequent analysis of the collected data made it possible to determine not only the main trends in the search for new antiviral agents, but also to provide information on the compounds most promising for the development of anti-herpesvirus drugs.

Keywords: review; herpes simplex virus; virus varicella zoster; antiviral agent, drug.

*For citation:* Andronova V.L. Modern ethiotropic chemotherapy of herpesvirus infections: advances, new trends and perspectives. Alphaherpesvirinae (part I). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3):106-114. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-106-114>

*For correspondence:* Valeriya L. Andronova, Ph.D., Leading Researcher at the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: [andronova.vl@yandex.ru](mailto:andronova.vl@yandex.ru)

**Information about authors:**Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0282>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 01 November 2017  
Accepted 12 December 2017

*Для корреспонденции:* Андропова Валерия Львовна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: [andronova.vl@yandex.ru](mailto:andronova.vl@yandex.ru)

## Введение

Альфагерпесвирусные инфекции чрезвычайно широко распространены во всем мире. Согласно данным ВОЗ в 2012 г. инфицированность населения вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) в возрастной группе до 50 лет составила в среднем 67% (около 3,7 млрд человек), а наивысший показатель распространённости этой инфекции достиг 87% (в Африке). Инфицированность ВПГ 2-го типа (ВПГ-2) в зависимости от региона колебалась от 14,4% (в Америке) до 31,5% (в Африке). В 2012 г. серопозитивными к ВПГ-2 были примерно 417 млн человек в возрасте от 15 до 49 лет [1]. К 40 годам 96–99% населения Южной Европы имеют антитела к вирусу варицелла зостер (ВВЗ). При этом особую обеспокоенность вызывает рост инфицированности до 38–60% в возрастной группе 1–4 года [2, 3]. С возрастом число серопозитивных к ВПГ и ВВЗ лиц увеличивается, что объясняется высокой контагиозностью альфагерпесвирусов, разнообразием путей их передачи (контактным, воздушно-капельным, половым, через кровь или нестерильный медицинский инструментарий и т. д.), а также способностью устанавливать пожизненную латентную инфекцию с периодическим рецидивированием. Политропность герпесвирусов обуславливает многообразие форм клинических проявлений герпетической инфекции (ГИ). Всё вышеперечисленное определяет высокую значимость ГИ для практического здравоохранения, а оппортунистический характер ГИ приводит к возрастанию её роли по мере увеличения популяции пациентов с иммуносупрессией различной этиологии (ВИЧ-инфекция, иммуносупрессивная терапия для профилактики осложнений после трансплантации органов или лечения рака и др.) [4].

Наиболее эффективным способом лечения вирусных инфекций является применение специфических этиотропных химиотерапевтических препаратов (ЭХТП), селективно подавляющих репродукцию вируса. Большая часть ЭХТП, используемых для лечения и профилактики инфекций, вызываемых альфагерпесвирусами, относится к производным нуклеиновых оснований. Их условно подразделяют на нуклеозидные аналоги первого поколения – йоддезоксигуанидин (ЙДУ), трифтортимидин (ТФТ) и другие, второго поколения – ацикловир (АЦВ), бромвинилдезоксигуанидин (БВДУ), пенцикловир (ПЦВ), третьего поколения (предлекарства) – валацикловир (Вал-АЦВ) и фамцикловир (ФЦВ). Характеристики ЭХТП второго и третьего поколений, имеющих наибольшее клиническое значение [1], приведены в табл. 1. ЭХТП, относящиеся к классу модифицированных нуклеозидов, в том числе все препараты первого ряда, используют в качестве мишени вирусную ДНК-полимеразу (ДНК-*pol*) и блокируют репликацию вирусной ДНК. Эти соединения представляют собой аналоги природных нуклеозидов и для проявления биологической активности нуждаются в активации – трехэтапном кинировании с образованием трифосфатных форм (ТФ). ТФ модифицированных нуклеозидов избирательно ингибируют репликацию вирусной ДНК, не оказывая существенного влияния на репликацию ДНК клетки-хозяина.

Нуклеозидные аналоги первого поколения (ЙДУ, ТФТ) отличаются высокой токсичностью, оказывают мутагенное и тератогенное действие при системном введении, поэтому используются главным образом или исключительно в виде лекарственных форм для наружного при-

менения. Открытие АЦВ позволило совершить прорыв в лечении ГИ, так как впервые врачи получили препарат, избирательно активирующийся только в инфицированных вирусом клетках и не оказывающий влияния на здоровые. Если фосфорилирование ТФТ и ЙДУ с образованием монофосфатов (МФ) катализируется как вирусной, так и клеточной тимидинкиназой (ТК), что снижает селективность их действия и обуславливает высокую токсичность для макроорганизма, то АЦВ не активируется в неинфицированных клетках и обладает низкой токсичностью благодаря тому, что первый этап его кинирования катализируется вирусной ТК [5, 6]. Гертруда Элайон, разработавшая АЦВ, стала лауреатом Нобелевской премии «за открытие важных принципов лекарственной терапии», позволивших проводить направленный поиск новых молекул с определенными биологическими свойствами. На основе этих принципов был создан и внедрён в медицинскую практику целый ряд соединений класса модифицированных нуклеозидов.

Широкое применение ЭХТП в клинической практике привело к возникновению новой проблемы – развитию лекарственной резистентности у вирусов, которая ставит под угрозу эффективность профилактики и лечения ГИ. Штаммы ВПГ и ВВЗ, резистентные к традиционным ЭХТП, получены как в лабораторных условиях, так и выделены от больных. ВОЗ включила ВПГ в перечень микроорганизмов, у которых развитие лекарственной резистентности представляет серьёзную проблему для общественного здравоохранения [7]. Сходство механизмов действия базовых противогерпетических ЭХТП, прежде всего необходимость их активации (кинирования) [6], приводит к формированию лекарственной кросс-резистентности, когда одни и те же мутации в генах ТК и/или ДНК-*pol*, с которыми связан механизм действия ЭХТП, обуславливают снижение чувствительности вируса ко всем соединениям данного класса.

Развитие резистентности у герпесвирусов к АЦВ и родственным соединениям в 95% случаев связано с мутациями в гене ТК и лишь в 5% случаев – в *pol*-гене. Поэтому при неэффективности ЭХТП первого ряда в мировой практике препаратами выбора являются тринатриевая соль фосфомуравьиной кислоты (ФМК) и цидофовир (ЦДВ) (см. табл. 1). Оба эти соединения также ингибируют герпетическую ДНК-*pol*, но не нуждаются в активации ТК, поэтому эффективно супрессируют репродукцию АЦВ/ПЦВ-резистентных штаммов герпесвирусов с изменённой ТК.

Однако следует учитывать, что к ФМК и ЦДВ формируется резистентность, обусловленная мутациями в *pol*-гене, приводящими в ряде случаев к кросс-резистентности к ЭХТП первого ряда. Кроме того, и ФМК, и ЦДВ нефротоксичны, что ограничивает их применение случаями ГИ с тяжелым клиническим течением, а в РФ их использование не разрешено. Поэтому поиск и разработка новых соединений, активных в отношении герпесвирусов, в том числе резистентных к коммерческим противогерпетическим ЭХТП, является одной из актуальнейших задач, стоящих перед современной наукой.

Поиск новых противовирусных агентов (ЭХТП) ведётся в различных направлениях.

Первым направлением является модификация структуры известных соединений, обладающих противогерпесвирусной активностью. Даже незначительное изменение молекулы может привести к повышению проти-

Структура и биологическая характеристика современных противогерпетических соединений [8–17]

Соединение/формула	Активность <i>in vitro/in vivo</i>	Показания к применению	Коммерческие препараты	Дополнительная информация
<b>Ацикловир</b> , 9-[(2-гидроксиэтокси)-метил]-гуанин; 2-амино-9-(2-гидрокси-этоксиметил)-3Н-пурин-6-он; C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ; Мг: 225.21 Натриевая соль АЦВ, C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub> ; Мг: 247.19	Активен <i>in vitro</i> в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 (ИД <sub>50</sub> 0,09–4,22 и 0,13–9,8 мкМ); в отношении ВВЗ в 10 раз менее активен (3,5–22,2 мкМ). ВЭБ (ИД <sub>50</sub> 7,1–16,9 мкМ) и ВГЧ-6 умеренно чувствительны к АЦВ. Активность в отношении ЦМВ минимальна. <i>In vivo</i> активен при в/в, в/б, оральном и местном использовании. ЛД <sub>50</sub> АЦВ для мышей при оральном введении более 10 000 мг/кг, при в/б введении – 1000 мг/кг	ВПГ-инфекции: <i>внутри</i> : профилактика и лечение первичных и рецидивирующих инфекций кожи, глаз, рта, ГГ, включая лиц с иммунодефицитом; <i>в/в</i> : генерализованная инфекция, энцефалит, неонатальный герпес; <i>наружно</i> : поражения кожи и слизистых оболочек), первичный и рецидивирующий ГГ. ВВЗ-инфекции: <i>внутри</i> : ветряная оспа, опоясывающий лишай; <i>в/в</i> : генерализованная инфекция, в том числе у лиц с иммунодефицитом; острый некроз сетчатки	Зовиракс: – таблетки (200, 400 и 800 мг), – 3% глазная мазь, – 5% крем, – суспензия для приема внутрь 8% 100 мл; – лиофилизированный порошок для приготовления инфузионного раствора (125 и 250 мг) или раствора для инъекций (125, 250 и 500 мг)	Препарат первого ряда; выпускаются многочисленные дженерики. БДО – 20%
<b>Валацикловир</b> , L-валиновый эфир АЦВ; L-[(2-амино-6-оксо-3Н-пурин-9-ил)-метокси]-этил-(2S)-2-амино-3-метилбутаноат; C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ; Мг: 324.34	Так как практически полностью (99%) превращается в АЦВ и L-валиновый эфир, подобно АЦВ активен в отношении ВПГ-1, ВПГ-2, ВВЗ, ВЭБ, ВГЧ-6 и ЦМВ	См. оральный АЦВ	Валтрекс, Зелитрекс, Вацирекс, Вал-АЦВ гидрохлорид: таблетки (250, 500 и 1000 мг)	Препарат первого ряда, метаболический предшественник АЦВ. БДО – 54%
<b>Пенцикловир</b> , 9-(4-гидрокси-3-гидрокси метил- бут-1-ил)-гуанин; 2-амино-9-[4-гидрокси-3-(гидрокси-метил)-бутил]-3Н-пурин-6-он; C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ; Мг: 253.26	Активен <i>in vitro</i> в отношении ВПГ-1, ВПГ-2, ВВЗ (ИД <sub>50</sub> 0,08–11,33, 0,24–17,37 и 0,63–11,33 мкМ), ЦМВ и ВЭБ (ИД <sub>50</sub> 47–200 и 5,92–12,24 мкМ). При местном использовании, а также при подкожном и в/в введении эффективно ингибирует ВПГ-1 и ВПГ-2	<i>Местно</i> : рецидивирующий лабиальный герпес (ВПГ-1/2)	Фенистил пенцикловир, Денавир, Вектавир: крем 1%	БДО - 3–5%. Внутриклеточный Т <sub>1/2</sub> значительно больше, чем у АЦВ
<b>Фамцикловир</b> , [2-(ацетил-оксиметил)-4-(2-аминопурин-9-ил)-бутил]-ацетат; 9-(4-ацетокси-3-(ацетокси-метил)бут-1-ил)-2-аминопурин; C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ; Мг: 321.34	Показана активность ФЦВ на моделях кожной, генитальной, системной инфекции, вызванной ВПГ-1 и ВПГ-2 у мышей и морских свинок, при введении <i>per os</i>	См. оральный АЦВ	Фамвир: таблетки по 125, 250 и 500 мг	Препарат первого ряда, метаболический предшественник ПЦВ. БДО – 77%
<b>Трифтортимидин</b> , 2'-дезоксис-5-трифторметилуридин, 1-[4-гидрокси-5-(гидроксиметил)-оксолан-2-ил]-5-(трифлуорометил)-пиримидин-2,4-дион; C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ; Мг: 296.20	Активен в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 и ВОВ ВПГ-1: ИД <sub>50</sub> 0,67–33,76 мкМ (включая АЦВ-резистентные штаммы), ЛД <sub>50</sub> для мышей и крыс 4379 мг/кг и выше	<i>Местно</i> : поверхностные формы офтальмогерпеса – первичный кератоконъюнктивит, рецидивирующий эпителиальный кератит, вызванные ВПГ-1 и ВПГ-2, в том числе при клинической неэффективности ЙДУ и АЦВ из-за развития лекарственной резистентности у вируса	Вироптик, Трифлуридин: стерильный 1% офтальмологический раствор	При системном введении обладает мутагенными, канцерогенными свойствами; не тератогенен, но эмбриотоксичен
<b>Бромвинилдезоксипуридин</b> , (Е)-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксипуридин; 5-[(Е)-2-бромэтинил]-1-[(2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)-оксолан-2-ил]-пиримидин-2,4-дион; C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ; Мг: 333.14	ВВЗ: ИД <sub>50</sub> 0,005–0,1 мкМ, ВПГ-1: ИД <sub>50</sub> 0,012–0,24 мкМ, ВПГ-2: ИД <sub>50</sub> ≥ 90 мкМ, ВЭБ: ИД <sub>50</sub> 20,71 мкМ. Нетоксичен <i>in vitro</i> при использовании в концентрациях, в 5000–10 000 раз превышающих ИД <sub>50</sub> . <i>In vivo</i> активен и при местном, и при системном введении	<i>Внутри</i> : опоясывающий лишай у лиц с нормальным иммунитетом, синдром острого некроза сетчатки, вызванного ВВЗ	Бривудин, Гелпин, Вирудин, Бривиракс, Зовудекс и др.: таблетки по 125 мг	БДО – 33%
<b>Цидофовир</b> , (S)-1-[3-гидрокси-2-(фосфонилметокси)-пропил]-цитозин; [(2S)-1-(4-амино-2-оксопиримидин-1-ил)-3-гидроксипропан-2-ил]-оксиметилфосфоновая кислота; C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> P; Мг: 279.19	ВПГ-1/2: ИД <sub>50</sub> 1,43–118 мкМ, ЦМВ: ИД <sub>50</sub> 0,34–2,86 мкМ, ВВЗ: ИД <sub>50</sub> 0,79 мкМ, ВЭБ: ИД <sub>50</sub> 0,036–8,95 мкМ. <i>In vivo</i> активен при системном (в/б) и местном введении. Нетоксичен для мышей при введении 2 раза в день в течение 5 дней в дозе 200 мг/кг ( <i>per os</i> , в/б) и однократном подкожном введении в дозе 500 мг/кг	<i>В/в</i> : ЦМВ-ретиит у ВИЧ-инфицированных лиц при развитии резистентности к ГЦВ и ФМК. Есть позитивный опыт лечения ВПГ-инфекций, нечувствительных к терапии АЦВ и/или ФМК у иммунокомпромиссных лиц (ГГ и кожный герпес)	Вистид: раствор по 375 мг/5 мл	Препарат второго ряда для лечения ЦМВ-инфекции. БДО < 5%. Нефротоксичен

Продолжение табл. 1 см. на стр. 109

Продолжение табл. 1 со стр. 109.

<b>Фосфономуравьиной кислоты тринатриевая соль,</b> Карбоксифосфат, <i>Фосфоноформат</i> ; CNa <sub>3</sub> O <sub>5</sub> P; Mr: 191.95	Активен <i>in vitro</i> в отношении ВПГ-1 (ИД <sub>50</sub> 114,61–224 мкМ), ВПГ-2 (ИД <sub>50</sub> 125–312,58 мкМ), ВВЗ (ИД <sub>50</sub> 125–312,58 мкМ), ЦМВ (ИД <sub>50</sub> 156,29–468,87 мкМ), включая штаммы ВПГ и ВВЗ, резистентные к АЦВ, и штаммы ЦМВ, резистентные к ГЦВ; ВЭБ: ИД <sub>50</sub> 3,13–5,21 мкМ	В/в: ВПГ-инфекции, ВВЗ-инфекции, нечувствительные к терапии АЦВ, и ГЦВ-резистентных ЦМВ-инфекций у иммунокомпромированных лиц.	Фоскарнет: раствор 6000 мг/250 мл (24 мг/мл)	Препарат второго ряда. Нефротоксичен, может вызывать нарушения электролитного баланса
--	--	--	--	---

Примечание. ГГ – генитальный герпес; в/б – внутривенное введение; в/в – внутримышечное введение; ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; ВГЧ-6 – вирус герпеса человека 6-го типа; ЦМВ – цитомегаловирус человека; ВОВ – вирус осповакцины. ГЦВ – ганцикловир; ИД<sub>50</sub> – концентрация соединения, обеспечивающая 50% ингибирование развития вирусиндуцированного цитопатического эффекта; Здесь и в табл. 2: систематические (по ИЮПАК) наименования указаны курсивом; БДО – биодоступность при пероральном приёме.

вовирусной активности, расширению спектра действия, оптимизировать фармакокинетические параметры соединения, что в конечном счёте обеспечит более высокие стабильные концентрации ЭХТП в месте развития инфекционного процесса и соответственно не только обусловит увеличение противовирусного эффекта, но и снизит риск селекции резистентных вирусных частиц. В качестве примера можно привести пары препаратов АЦВ/ГЦВ, ИДУ/БВДУ, ИДУ/ТФТ и другие. В соответствии с этой стратегией разработаны предлекарства АЦВ и ПЦВ (Вал-АЦВ и ФЦВ).

Так как современные противовирусные ЭХТП первого и второго ряда в качестве биоматериала используют герпетическую ДНК-*pol*, цель второго направления поиска новых ЭХТП заключается в селекции соединений, подавляющих репродукцию герпесвирусов путём взаимодействия с другими вирусными белками-мишенями, а также соединений, использующих в качестве биоматериала клеточные белки, необходимые для репродукции вирусов.

В этой статье мы отметим наиболее перспективные соединения, представляющие собой модификации коммерческих противовирусных препаратов, а также новые соединения, действие которых связано с вирусной ДНК-*pol*. Соединения, проходящие стадию клинических испытаний, будут рассмотрены более подробно. Структурные формулы ряда соединений приведены в табл. 2.

### Модификации коммерческих противовирусных ЭХТП

#### Модификации АЦВ

Одним из основных недостатков АЦВ является его низкая биодоступность при приеме *per os* [18]. Стратегия создания L-валиновых эфиров АЦВ и ГЦВ позволила существенно, в 3–5 раз, повысить их оральную биодоступность благодаря эффективной абсорбции в кишечнике [19].

При оральном введении крысам соединений L-Ala-АЦВ, L-Ser-АЦВ, L-Ile-АЦВ и  $\gamma$ -Gln-АЦВ, родственных Вал-АЦВ, было установлено, что **L-Ser-АЦВ** (2-[(2-амино-6-оксо-3H-пури-9-ил)метокси]этил-(2S)-2-амино-3-гидроксипропанат) по показателям эффективности абсорбции ( $C_{max}$ ), скорости элиминации и области под кривой (AUC) превосходит не только АЦВ, но и Вал-АЦВ. Так, L-Ser-АЦВ и Вал-АЦВ показали приблизительно 7- и 5-кратное увеличение AUC относительно АЦВ.  $C_{max}$  L-Ser-АЦВ в плазме в 2 раза больше, чем у Вал-АЦВ, и в 15 раз больше, чем у АЦВ [20].

Низкая проницаемость роговицы для АЦВ, а также низкая водорастворимость не позволяют использовать его в форме глазных капель для лечения офтальмогерпеса [21].

Вал-АЦВ, L-Ala-АЦВ, L-Ser-АЦВ, L-Ile-АЦВ и  $\gamma$ -Gln-АЦВ хорошо растворимы и стабильны в воде, малотоксичны, высокоактивны *in vitro* в отношении ВПГ-1 и ВВЗ, что сделало возможным их введение в форме глазных капель. АЦВ в виде эфиров аминокислот посредством транспортных систем роговичного эпителия для пептидов и аминокислот проникает через роговицу и обнаруживается во внутриглазной жидкости в терапевтических концентрациях уже через 20 мин [22]. По показателю AUC L-Ser-АЦВ и Вал-АЦВ в 2 раза превосходят АЦВ, но L-Ser-АЦВ оказался более стабильным во внутриглазной жидкости ( $t_{1/2} > 96$  ч) [23] и благодаря улучшенным фармакокинетическим показателям по сравнению с АЦВ и Вал-АЦВ является наиболее интересным кандидатом для использования в виде глазных капель для лечения не только эпителиального, но и стромального кератита, и создания ЭХТП для орального введения.

На модели эпителиального и стромального кератита кроликов, вызванного ВПГ-1, провели сравнительное изучение противовирусной активности дипептидного производного АЦВ (**Val-Val-АЦВ**, см. табл. 2) в виде глазных капель с коммерческим препаратом ТФТ, признанным «золотым стандартом» в лечении поверхностных форм офтальмогерпеса. Установлено, что 1% растворы Val-Val-АЦВ и ТФТ одинаково эффективны, но цитотоксичность Val-Val-АЦВ по результатам оценки клеточной пролиферации значительно ниже, чем у ТФТ [24], что позволяет рассматривать Val-Val-АЦВ в качестве соединения, перспективного для создания глазных капель – предлекарства АЦВ.

Фосфонатный аналог АЦВ (**Ф-АЦВ**, см. табл. 2) подавляет репродукцию ВПГ-1 в культуре клеток и защищает заражённых животных от гибели при в/б и пероральном введении (на модели генерализованной ГИ мышей); активен при использовании в виде мазевой лекарственной формы [25]. Как отмечалось выше, формирование резистентности вируса к АЦВ в подавляющем большинстве случаев связано с потерей или значительным снижением активности вирусной ТК, что, как правило, обуславливает перекрёстную резистентность вируса ко всем препаратам первого ряда. Ф-АЦВ эффективно супрессирует репродукцию АЦВ-резистентного варианта ВПГ-1, ТК которого полностью потеряла ферментативную активность. Как показано *in vitro*, Ф-АЦВ проникает в клетки Vero в неизменённом виде и превращается в АЦВ-МФ (скорее всего за счёт окисления фосфитной группы) [26]. Возможно, в конверсии Ф-АЦВ в АЦВ-МФ задействован C-концевой участок ТК (aa 281–376), а не нуклеозид- или АТФ-связывающие центры (участвующие в кинировании АЦВ и родственных соединений), так как формирование

резистентности к Ф-АЦВ связано с точечной мутацией в ТК-гене, приводящей к синтезу укороченного на 96 аминокислотных остатков фермента. При этом ТК сохраняет способность фосфорилировать тимидин, но не фосфорилирует БВДУ. Важно также, что резистентность к Ф-АЦВ развивается медленнее, чем к АЦВ [27].

#### Модификации ЦДВ

ЦДВ проявляет антивирусную активность на моделях всех герпесвирусов человека, но лицензирован только для лечения ЦМВ-ретинитов у иммунокомпромированных пациентов.

Одна из предложенных модификаций ЦДВ – его циклическая форма **HDP-cCDV** (см. табл. 2), характеризующаяся высокой противовирусной активностью, но его нефротоксичность и низкая оральная биодоступность близки таковым ЦДВ. Тем не менее малорастворимые эфиры HDP-cCDV в виде суспензии со средним размером микрокристаллов 4,4 мкм могут быть использованы для создания ЭХТП пролонгированного действия для внутриглазного введения. Если ЦДВ при интраокулярном введении вызывает снижение внутриглазного давления [28], HDP-cCDV при введении в максимальной нетоксичной дозе 100 мкг/глаз в стекловидное тело глаза кроликам не вызывает этого эффекта. Его  $t_{1/2}$  составила 6,3 дня. На модели ретинита у кроликов, вызванного ВПГ-1, показано, что единственная интравитреальная инъекция HDP-cCDV, сделанная за 68 дней до инфицирования животных, предотвращает развитие ретинита, а противовирусная активность препарата сохраняется в течение 100 дней [29].

#### Ингибиторы герпетической ДНК-полимеразы

**Валомацикловир**, L-валиновый эфир ациклического производного гуанозина – H2G (см. табл. 2), является его метаболитическим предшественником. Механизм действия H2G подобен действию АЦВ. Он активен в отношении ВПГ-1, ВПГ-2, ВВЗ, ВЭБ и неэффективен против ВГЧ-6, ВГЧ-7, ВГЧ-8 и ЦМВ человека [30]. H2G является мощным ингибитором репродукции ВВЗ *in vitro*: ИД<sub>50</sub> лежит в диапазоне 0,4–0,7 мкМ, что сопоставимо с активностью БВДУ на этой модели (ИД<sub>50</sub> 0,6–0,9 мкМ), и в 16–28 раз выше, чем активность АЦВ (ИД<sub>50</sub> 6,5–20 мкМ) [31]. Фосфорилируется до МФ вирусными ТК. Мутации в гене ТК, обуславливающие резистентность к АЦВ, также приводят к резистентности к H2G [32]. H2G-ТФ является ингибитором герпетической ДНК-*pol*, супрессирует также активность клеточной  $\alpha$ -ДНК-*pol*, но в значительно меньшей степени [30]. Однако H2G имеет умеренную биодоступность при пероральном приеме (17%). Его использование в виде L-валинового эфира (Валомацикловира) обеспечивает значительное увеличение биодоступности (более 70%).

Завершены I и II фазы клинических испытаний Валомацикловира для оценки безопасности и эффективности при лечении острой инфекции опоясывающего лишая, вызванного ВВЗ, у 373 иммунокомпетентных взрослых пациентов (NCT00831103) [33]. Препарат вводили через 72 ч после появления сыпи 1 раз в день *per os* в дозе 1000, 2000 или 3000 мг в течение 7 дней. В качестве позитивного контроля использовали Валтрекс (Вал-АЦВ), который вводили 3 раза в день в течение 7 дней в дозе 1000 мг *per os*. При использовании Валомацикловира в дозе 3000 мг значительно быстрее прекращались болевые ощущения и сокращалось время заживления герпетических поражений по сравнению с Вал-АЦВ, а в дозах 1000 и 2000 мг/день Валомацикловир проявлял лечебный эффект, аналогичный таковому Вал-АЦВ. Валомацикловир в целом хорошо переносится, хотя у ряда

пациентов наблюдалась тошнота, головная боль и рвота. На основании этих результатов было принято решение о проведении III фазы клинических испытаний.

Завершена II фаза клинических двойных слепых одноклеточных плацебоконтролируемых испытаний Валомацикловира при пероральном введении по 2000 мг 2 раза в день в течение 21 дня для лечения инфекционного мононуклеоза, вызванного ВЭБ (NCT00575185).

Препарат разработан в биотехнологической компании «Medivir AB» (Швеция). «Eriphany Biosciences, Inc.» (США) приобрела лицензию на Валомацикловир.

**FV-100** (см. табл. 2) относится к новому классу соединений – бициклическим нуклеозидным аналогам, представляет собой гидрохлорид 5'-валинового эфира прототипного соединения **Cf-1743** (3-(2-дезоксидеокси- $\beta$ -D-рибофуранозил)-6-(пентилфенил)-2,3-дигидрофурано[2,3-d]-пиримидин-2-она) и является его метаболитическим предшественником. Cf-1743 обладает беспрецедентно высокой селективной противовирусной активностью в отношении ВВЗ (ИД<sub>50</sub> 0,9–3,3 нМ, ХТИ > 1 000 000), в 1000 раз превышающую активность АЦВ и в 10 раз – активность БВДУ, не проявляя значительной активности на других моделях РНК- и ДНК-содержащих вирусов, включая ВПГ-1 и ВПГ-2 [34, 35].

Точный механизм действия Cf-1743 не установлен. ТК ВВЗ играет ключевую роль, так как ТК-негативные мутанты ВВЗ резистентны к FV-100 *in vitro* [34]. Cf-1743 фосфорилируется до МФ ТК ВВЗ и далее до дифосфата тимидилаткиназой ВВЗ.

В отличие от АЦВ и других нуклеозидных аналогов Cf-1743 не обнаруживается в клетках в форме ТФ, поэтому остается неясным, ингибирует ли он ДНК-*pol* ВВЗ или действует по другому механизму [36].

Плохая водорастворимость Cf-1743 обуславливает его низкую биодоступность при пероральном введении (менее 14%). Несмотря на то, что FV-100 примерно в 3 раза менее активен *in vitro*, чем Cf-1743, предложенная модификация позволяет не только увеличить растворимость соединения в воде, но и существенно улучшает его фармакокинетические характеристики: показатели АUC и C<sub>max</sub> в плазме крови при пероральном введении мышам увеличены примерно в 10 раз по сравнению с Cf-1743. Показано, что FV-100 быстро (в течение 2 мин) проникает в клетки путём пенетрации и значительно увеличивает биодоступность Cf-1743 [35].

При проведении I и II фаз клинических испытаний были установлены хорошая переносимость, безопасность и высокая эффективность FV-100 при пероральном введении по сравнению с Валтрексом (Вал-АЦВ) при лечении опоясывающего лишая (NCT02322957, NCT00900783). Установлены фармакокинетические параметры FV-100: C<sub>max</sub> Cf-1743 в плазме крови колеблется от 54,6 пг/мл при разовой дозе 100 мг *per os* до 508,1 пг/мл при увеличении разовой дозы до 800 мг; T<sub>max</sub> = 1,8 ч, t<sub>1/2</sub> = 3,2 ч. Низкая концентрация Cf-1743 в моче указывает на то, что ренальный путь выведения не является для него основным. Важнейшее преимущество FV-100 состоит в том, что в отличие от АЦВ, Вал-АЦВ и ФЦВ нет необходимости корректировать дозу препарата при почечной недостаточности, а также то, что частота жалоб на постгерпетическую невралгию в группах пациентов, получавших FV-100 по 200 и 400 мг 1 раз в день в течение 7 дней, была снижена на 8–10% [37]. В настоящее время проводится набор участников для проведения фазы III клинических испытаний (NCT 02412917) с целью установления способности

Таблица 2

## Соединения, специфически нарушающие функционирование ДНК-полимеразы герпесвирусов: модифицированные производные современных противовирусных ЭХТП, а также соединения с альтернативной структурой

Название соединения	Дополнительная информация
<i>Ингибиторы герпетической ДНК-полимеразы</i>	
<b>Val-Val-АЦВ</b> , SCHEMBL12618101; 2-[(2-амино-6-оксо-3Н-пурин-9-ил)метокси]этил-2-[(2-амино-3-метилбутаноил)-амино]-3-метилбутаноат; C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> ; Mr: 423.47	Активен на модели герпетического эпителиального и стромального кератита кроликов, вызванного ВПГ-1
<b>Ф-АЦВ</b> , фосфит ацикловира, Н-фосфонат 9-[(2- гидроксизетокси)-метил] гуанина; 2-[(амино-6-оксо-3Н- пурин- 9ил)метокси]этил-дигидрокси-фосфит; C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> P; Mr: 289.19	ЦД <sub>50</sub> > 3450 мкМ; ИД <sub>50</sub> 26,97–53,95 мкМ; ХТИ > 64. Активен на моделях генерализованной ГИ у мышей и кожного герпеса у кроликов, вызванных ВПГ-1
<b>HDP- cCDV</b> , гексадецилоксипропил-циклический цидофовир; AC1LA8G6; SCHEMBL138629; СТК6Е0131; SCHEMBL1650054; 4-амино-1-[[5S]-2-(3-гексадекоксипропокси)-2-оксо-1,4,2S]I <sup>γ</sup> 5]-диокафосфинан-5-ил]метил] пиримидин-2-он; C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> P; Mr: 543.69	Показана эффективность на модели ретинита кроликов, вызванного ВПГ-1
<b>Валомацикловир</b> , EPB-348; UNII-F094Y61748; F094Y61748; предлекарство H2G, L-валиновый эфир R-9[4-гидрокси-2(гидроксиметил)бутил]-гуанина; [(3R)-3-[(2-амино-6-оксо-3Н-пурин-9-ил)метил]-4-гидроксибутил] (2S)-2-амино-3-метилбутаноат; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ; Mr: 352.39	Метаболический предшественник ациклического производного гуанина H2G. БДО > 70%. Одобрено проведение III фазы клинических испытаний лечения опоясывающего лишая. Завершена II фаза клинических испытаний лечения инфекционного мононуклеоза, вызванного ВЭБ
<b>Лобукавир</b> , BMS-180194; (R)-ВНCG; Цигаловир; SQ 33054; SQ 34514; А 69992; карбоциклический оксетаноцин G; C-OXT-G; 9-(2,3-бис(гидроксиметил)-1-циклобутил)гуанин; 2-амино-9-[(1R,2R,3S)-2,3-бис(гидроксиметил)циклобутил]-3Н-пурин-6-он; C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ; Mr: 265.27	ИД <sub>50</sub> для ВПГ-1 4–80 нМ, для ВПГ-2 8–20 нМ и ЦМВ 2–4 мкМ, ЦД <sub>50</sub> > 10 мкМ. Фосфорилируется до трифосфатной формы и ингибирует вирусную ДНК-pol и репликацию ДНК. Разработка препарата прекращена
<b>FV-100</b> , валнивудин гидрохлорид, (UNII-L4N5F436FO; 956483-03-7; L4N5F436FO; DTXSID40241910 [(2R,3S,5R)-3-гидрокси-5-[2-оксо-6-(4-пентилфенил)фууро-[2,3-d]пиримидин-3-ил]оксолан-2-ил]метил-(2S)- 2-амино-3-метилбутаноат; гидрохлорид; C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Cl; Mr: 534.05	Метаболический предшественник Cf-1743 (L-валиновый эфир). ИД <sub>50</sub> на модели ВВЗ 2,6 нМ, ЦД <sub>50</sub> > 10 мкМ, ХТИ > 3800. БДО > 50%. Завершена II фаза клинических испытаний лечения опоясывающего лишая. Инициирована III фаза клинических испытаний
<b>Соривудин</b> , BVaraU; Bravavir; Brovavir; Usevir; BVAU, YN-72, SQ32,756; 1-β-D-арабинофурано-зил-5-[(1E)-2-бромозетенил]-2,4(1H,3H)-пиримидин-дион; E-5-(2-бромвинил)-1-13-D-арабинофуранозилурацил; 5-[(E)-2-бromo-этенил]-1-[(2R,3S, 4S, 5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)-оксолан-2-ил]пиримидин-2,4-дион; C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ; Mr: 349.14	ИД <sub>50</sub> для ВПГ-1 11–86 нМ, для ВПГ-2 20,91–75,33 мкМ, для ВВЗ 0,23–1,8 нМ. ЦД <sub>50</sub> > 1000 мкМ. <i>In vivo</i> активен при оральном и в/б введении (на модели летальной инфекции мышей). БДО > 60%. Проведена III фаза клинических испытаний. Принято решение о прекращении дальнейшей разработки препарата
<b>PNU-183792</b> , SCHEMBL194433; AC1LAOUP; SXLQSQMKOYVAAW-UHFFFAOYSA-N; SCHEMBL6699690; BDBM50172526; N-[(4-хлорфенил)-метил]-1-метил-6-(морфолин-4-илметил)-4-оксохиолин-3-карбоксамид; C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ; Mr: 425,91	ЦД <sub>50</sub> > 100 мкМ. ИД <sub>50</sub> для ВПГ-1, ВПГ-2 и ВГЧ-8 3,1–3,5 мкМ, для ЦМВ человека 0,94 мкМ, для ВВЗ 0,34 мкМ, для ВЭБ 0,17 мкМ. Показана активность <i>in vivo</i> (при оральном введении на модели летальной инфекции ЦМВ у мышей)
<b>PNU-182171</b> , AC1O57HM; SCHEMBL6697923; YRJPSPHBIUBSBT-IHWYPQMZSA-N; 8-фтор-1,4-дигидро-1-метил-6-[(Z)-3-гидрокси-1-пропенил]-N-(4-хлорбензил)-4-оксохиолин-3-карбоксамид; N-[(4-хлорфенил)метил]-8-флуоро-6-[(Z)-3-гидрокситроп-1-енил]-1-метил-4-оксохиолин-3-карбоксамид; C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ; Mr: 400,83	Спектр активности аналогичен таковому PNU-183792
<i>Ингибиторы ассоциации каталитической и процессивной субъединиц ДНК-полимеразы</i>	
<b>BP5</b> , ZINC00754640; AC1LLKZW; N-(2,1,3-бензотиодазол-4-ил)-5-бромо-2-[(4-хлорофенил)сульфониламино]-бензамид; C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> BrClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ; Mr: 523.80	Показана активность <i>in vitro</i> на модели ВПГ-1 (ИД <sub>50</sub> 2 мкМ, ЦД <sub>50</sub> 50 мкМ)
<b>Ралтеgravир</b> , Исентресс; МК-0518; 518048-05-0; UNII-22VKV8053U; N-(2-(4-(4-фторбензилкарбамоил)-5-гидрокси-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-2-ил)-пропан-2-ил)-5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-карбоксамид, N-[2-[4-[(4-флуорофенил)метилкарбамоил]-5-гидрокси-1-метил-6-оксопиримидин-2-ил]пропан-2-ил]-5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-карбоксамид, C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ; Mr 444,42	Показана активность <i>in vitro</i> в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ человека (ИД <sub>50</sub> для ВПГ-1 - 68 мкМ, для ВПГ-2 - 86 мкМ и ЦМВ человека - 20 мкМ). ЦД <sub>50</sub> около 800 мкМ.
Примечание. ИД <sub>50</sub> – минимальная активная концентрация соединения; ЦД <sub>50</sub> – концентрация соединения, вызывающая гибель 50% клеток; ХТИ вычисляется как отношение ЦД <sub>50</sub> к ИД <sub>50</sub> .	

FV-100 (400 мг 1 или 2 раза в день в течение 7 дней) предотвращать постгерпетическую невралгию. В качестве позитивного контроля будет использоваться Валтрекс (1000 мг 3 раза в день в течение 7 дней).

В 2012 г. «Synergy Pharmaceuticals» (США) приобрела права на FV-100 у «Bristol-Myers Squibb» (США) и в 2013 г. передала их вновь образованной дочерней компании «ContraVir Pharmaceuticals, Inc.» (США), которая и спонсирует в настоящее время клинические исследования FV-100.

**Соривудин (СРВ)** близок по структуре БВДУ (см. табл. 2), подобно АЦВ и БВДУ фосфорилируется вирусной ТК до МФ. Кроме того, его дифосфорилирование также зависит от вирусной ТК. СРВ-ТФ не инкорпорируется в элонгирующуюся вирусную ДНК, но блокирует репликацию путём ингибирования вирусной ДНК-pol [38]. Активность СРВ *in vitro* в отношении ВПГ-1 превышает активность АЦВ, но существенно уступает ему на моделях ВПГ-2 и ЦМВ. Показатели ИД<sub>50</sub> СРВ для ВВЗ в 3000–5000 раз ниже, чем ИД<sub>50</sub> АЦВ, и в 30–50 раз ниже ИД<sub>50</sub> БВДУ [39].

СРВ обладает высокой биодоступностью при пероральном введении и хорошо переносится. Клинические исследования показали, что СРВ при пероральном приеме (40 мг 1 раз в день в течение 5 дней) высокоэффективен в лечении ветряной оспы и опоясывающего лишая у ВИЧ-инфицированных лиц [40]. Однако при проведении в Японии клинических испытаний погибло 18 пациентов, получавших одновременно СРВ (50 мг 3 раза в день) и противораковый препарат – предшественник 5-флуороурацила (5-ФУ). Причиной смерти стала необратимая инактивация клеточного фермента дигидропиримидиндегидрогеназы метаболитом СРВ (5-(2-бромовинил)урацилом) и вследствие этого подавление катаболизма высокоокисного 5-ФУ и значительное повышение его уровня в плазме крови [41]. Поэтому разработка и продвижение на мировом фармацевтическом рынке коммерческих препаратов СРВ Usevir («Nippon Shoji», Япония) и Brovavir («Bristol-Myers Squibb», США) были прекращены.

**Лобукавир** (ЛБВ), аналог дезоксигуанозина (см. табл. 2), активен в отношении ВПГ-1, ВПГ-2, ВВЗ, ЦМВ, вируса гепатита В и ВИЧ [42–44]. Концентрации ЛБВ, эффективные в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ *in vitro* [42], ниже аналогичных величин для АЦВ. В клетке ЛБВ кинируется до активной трифосфатной формы, являющейся субстратом для герпетической ДНК-*pol*. Вследствие встраивания ЛБВ-ТФ в цепь ДНК её синтез прерывается. Однако подобно АЦВ ЛБВ нуждается в активности вирусной ТК для осуществления первого этапа фосфорилирования с образованием ЛБВ-МФ [43, 45]. Поэтому ТК- и ТК<sup>deficient</sup>-штаммы вируса кросс-резистентны к АЦВ и ЛБВ. *In vivo* ЛБВ активен при пероральном введении мышам, инфицированным ВПГ-1 или ВПГ-2, и при местном использовании (крем 5%, 2 раза в сутки в течение 5 дней) для лечения кожного герпеса у морских свинок.

Биодоступность ЛБВ при пероральном приеме составляет 40–60% [46], период полувыведения ЛБВ из клетки ( $T_{1/2}$ ) – 10 ч. При проведении клинических испытаний ЛБВ (при пероральном введении) для лечения ЦМВ-инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов (NCT00002352) показано его позитивное влияние на течение инфекции. Хорошая растворимость ЛБВ в воде позволяет использовать его в виде глазных капель. Установлена клиническая эффективность препарата для лечения офтальмогерпеса, вызванного ВПГ-1: введение 0,1% раствора ЛБВ по 1 капле 5 раз в день обеспечивало заживление язв в среднем в течение 5 дней [47]. ЛБВ находился в фазе III клинических испытаний для лечения герпетического стоматита и ГГ, опоясывающего герпеса, а также вирусного гепатита В. Однако развитие неоплазии у мышей, длительно (в течение 104 нед) получавших ЛБВ *per os*, послужило основанием для приостановки в 1999 г. клинических испытаний препарата фирмой-разработчиком «Bristol-Myers Squibb» (США).

**PNU-182171** и **PNU-183792** (производные 4-гидроксихинолин-3-карбоксиамида (4-НҚС; см. табл. 2) – новый класс высокоселективных ненуклеозидных ингибиторов ДНК-*pol* герпесвирусов. Активность PNU-183792 *in vitro* в отношении ЦМВ человека хорошо сопоставима с активностью ГЦВ, проявляет эффективность на модели ВВЗ, ВПГ-1, ВПГ-2, ВГЧ-8 и ВЭБ. PNU-183792 неактивен в отношении ВГЧ-6 в концентрации до 100 мкМ. Соединения этого класса неактивны в отношении неродственных ДНК- и РНК-содержащих вирусов. PNU-183792 не ингибирует ДНК-*pol* человека  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$  даже при использовании

высоких концентраций, в 60 и более раз превосходящих концентрации, необходимые для ингибирования вирусных ДНК-*pol*, что указывает на специфичность взаимодействия соединения с ДНК-*pol* герпесвирусов [48–50].

PNU-182171 и PNU-183792 сохраняют высокую анти-вирусную активность в отношении АЦВ-устойчивых штаммов ВПГ-1, ВПГ-2 и ГЦВ-устойчивых штаммов ЦМВ благодаря тому, что механизмы действия производных 4-НҚС и модифицированных нуклеозидов различны. Резистентность к PNU-182171 связана с единственной заменой V823A в пределах консервативного домена III ДНК-*pol*. V823 консервативен у ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ, ВВЗ, ВЭБ и ВГЧ-8. Примечательно, что ДНК-*pol* ВГЧ-6 и ВГЧ-7 содержат аланин в положении 823 и не ингибируются соединениями этого класса. Однако ВГЧ-6 с заменой A823V в ДНК-*pol* становится чувствительным к PNU-183792. Очевидно, производные 4-НҚС могут связываться с V823 вирусной ДНК-*pol* и нарушать её взаимодействие с праймером матричной ДНК или сдвигать матрицу из активного сайта ДНК-*pol*, нарушая таким образом связывание и/или включение поступающего в репликативный комплекс дезоксиинуклеозид-ТФ с ДНК-*pol*. Высокая противовирусная активность производных 4-НҚС показана не только в культуре клеток, но и *in vivo*. PNU-183792 эффективен при пероральном введении на модели летальной инфекции ЦМВ у мышей [50].

Сведения о дальнейших исследованиях производных 4-НҚС в доступной литературе отсутствуют.

#### **Ингибиторы ассоциации каталитической и процессивной субъединиц ДНК-полимеразы**

Гетеродимерный комплекс ДНК-*pol* ВПГ состоит из каталитической субъединицы (продукта гена *UL30*) и ассоциированной с ней процессивной субъединицы, кодируемой геном *UL42*. Специфическое взаимодействие *pUL30-pUL42* в составе репликативного комплекса необходимо для функционирования ДНК-*pol*.

Субъединица *pUL42* связывается непосредственно с ДНК и обеспечивает увеличение процессивности путём повышения сродства каталитической субъединицы ДНК-*pol* *pUL30* к 3'-концам праймеров матрицы и предотвращения диссоциации ДНК-*pol* от матрицы после каждого каталитического цикла [51]. Нарушение взаимодействия *pUL30-pUL42* фатально для репликации герпетической ДНК.

*In vitro* показано, что пептиды длиной 36, 27 и 18 аминокислот, комплементарные С-концу каталитической субъединицы ДНК-*pol* ВПГ-1, ингибируют образование комплекса *pUL30-pUL42* и соответственно репликацию ДНК ВПГ, но не влияют на активность клеточной ДНК-*pol* [52]. Очевидно, 27 С-концевых аа (аа 1209–1235) *pUL30* необходимы для взаимодействия с *pUL42*. Идентифицированы специфические водородные связи, крайне важные для связывания *pUL30-pUL42* [52, 53], в частности водородные связи между R1229 ДНК-*pol* и Q171 *pUL42*, связанного в свою очередь с F1211 ДНК-*pol* [54]. Таким образом, пептиды, комплементарные 18–27 С-концевым аа-остаткам ДНК-*pol* ВПГ, представляют класс специфических ингибиторов, блокирующих образование репликативного комплекса, а, следовательно, и синтеза вирусной ДНК.

С использованием высокоэффективного скрининга были селекционированы непептидные соединения, специфически препятствующие взаимодействию каталитической и процессивной субъединиц ДНК-*pol* ВПГ-1. Одно из них, **BP5** (см. табл. 2), хотя и более ток-

сично, чем АЦВ, но ингибирует репликацию ВПГ-1 *in vitro* также эффективно, как АЦВ, в нетоксичных для клеток Vero концентрациях [55]. Механизм ингибирования белок-белкового взаимодействия небольшой молекулой ВР5 до конца неясен. Результаты изучения ВР5-резистентного мутанта ВПГ, содержащего одиночную замену Q171A в *pUL42*, позволяя предположить, что действие ВР5 является вирусспецифическим [54]. В настоящее время разрабатываются более селективные соединения, относящиеся к этой группе ингибиторов.

**Ралтегравир** (РТВ; см. табл. 2; «Merck Sharp & Dohme», США) – известный коммерческий антиретровирусный препарат, ингибитор интегразы ВИЧ-1, супрессирует также репродукцию ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ человека [56]. Установлено, что мутация, приводящая к резистентности ВПГ-1 к РТВ, локализована в гене *UL42* [57]. Однако средняя максимальная концентрация РТВ в крови ( $C_{\max}$  2,34 мкМ), достигаемая при приеме РТВ в терапевтических дозах (400 мг 2 раза в день) [58], существенно ниже концентраций, обеспечивающих эффективное ингибирование репродукции герпесвирусов. Поэтому у ВИЧ-инфицированных лиц на фоне приема РТВ в ряде случаев отмечено развитие рецидивов ГИ (простой герпес, ГГ, опоясывающий лишай). Тем не менее, если учесть, что около 95% пациентов с ВИЧ/СПИД-инфекцией серопозитивны к ВПГ-1 и/или ВПГ-2, и в последние годы не только наблюдается подъем заболеваемости ВИЧ-инфекцией, но и увеличение доли больных в поздних стадиях (4Б, 4В, 5), в связи с чем возрастает риск развития тяжелых форм ГИ [4], поиск структурных аналогов РТВ, которые потенциально могут оказаться способными воздействовать одновременно и на герпесвирусы, и на ВИЧ, представляет несомненный практический интерес.

### Заключение

Современная антигерпесвирусная этиотропная химиотерапия базируется главным образом на соединениях, относящихся к классу модифицированных нуклеозидов, биологическая активность которых определяется их способностью селективно ингибировать активность вирусной ДНК-*pol*. Продолжающиеся в этом направлении разработки позволили выявить новые соединения, имеющие более благоприятные фармакокинетические параметры, характеризующиеся высокой антивирусной активностью в отношении альфагерпесвирусов. Валомацикловир и FV-100 успешно прошли II фазу клинических испытаний; одобрено проведение III фазы клинических испытаний этих препаратов.

Определены новые пути нарушения функциональной активности фермента ДНК-*pol* альфа-вирусов путём использования соединений ненуклеозидной природы, а также как результат нарушения ассоциации субъединиц, формирующих ферментативный комплекс. Важно подчеркнуть, что открытие новых путей ингибирования ДНК-*pol* – фермента, активность которого необходима для воспроизведения вирусного генома, а, следовательно, и для репродукции вируса, не только расширяет возможности воздействия на ГИ, но и позволяет эффективно преодолевать барьер лекарственной устойчивости ко всем используемым в настоящее время в клинической практике ЭХТП, включая препараты первого и второго ряда.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 5, 6, 8-24, 26-58 см. REFERENCES)

1. Вирус простого герпеса. Информационный бюллетень ВОЗ. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/ru/>
4. ВИЧ/СПИД. Информационный бюллетень ВОЗ. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/ru/>
7. Значимость устойчивости к противомикробным препаратам для общественного здравоохранения. Available at: [http://www.who.int/drugresistance/AMR\\_Importance/ru/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/ru/)
25. Андропова В.Л., Ясько М.В., Куханова М.К., Галегов Г.А., Скоблов Ю.С., Кочетков С.Н. Антигерпесвирусная эффективность фосфата ациклогуанозина, преодолевающего барьер лекарственной устойчивости. *Acta Naturae*, 2016; 8(1): 74-81.

### REFERENCES

1. Herpes Simplex Virus. Fast sheet of WHO. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/ru/> (in Russian)
2. De Donno A., Kuhdari P., Guido M., Rota M.C., Bella A., Brignole G., et al. Has VZV epidemiology changed in Italy? Results of a seroprevalence study. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(2): 385-90.
3. Perez-Farinos N., Garcia-Comas L., Ramirez-Fernandez R., Sanz J.C., Barranco D., Garcia-Fernandez C., et al. Seroprevalence of antibodies to varicella-zoster virus in Madrid (Spain) in the absence of vaccination. *Cent. Eur. J. Public. Health.* 2008; 16(1): 41-4.
4. HIV/AIDS. Fast sheet of WHO № 360. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/ru/> (in Russian)
5. Elion G.B. Acyclovir discovery, mechanism of action and selectivity. *J. Med. Virol.* 1993; (Suppl. 1): 2-6.
6. Gilbert C., Bestman-Smith J., Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 2002; 5(2): 88-114.
7. Public Health importance of antimicrobial resistance. Available at: [http://www.who.int/drugresistance/AMR\\_Importance/ru/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/ru/) (in Russian)
8. Leary J.J., Wittrock R., Sarisky R.T., Weinberg A., Levin M.J. Susceptibilities of herpes simplex viruses to penciclovir and acyclovir in eight cell lines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002; 46(3): 762-8.
9. Morfin F., Thouvenot D., De Turenne-Tessier M., Lina B., Aymard M., Ooka T. Phenotypic and genetic characterization of thymidine kinase from clinical strains of varicella-zoster virus resistant to acyclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999; 43(10): 2412-6.
10. Coen N., Duraffour S., Haraguchi K., Balzarini J., van den Oord J.J., Snoeck R., et al. Antiherpesvirus activities of two novel 4'-thiothymidine derivatives, KAY-2-41 and KAH-39-149, are dependent on viral and cellular thymidine kinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4328-40.
11. Neyts J., Andrei G., De Clercq E. The novel immunosuppressive agent mycophenolate mofetil markedly potentiates the antiherpesvirus activities of acyclovir, ganciclovir, and penciclovir in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(2): 216-22.
12. Weinberg A., Bate B.J., Masters H.B., Schneider S.A., Clark J.C., Wren C.G., et al. In vitro activities of penciclovir and acyclovir against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36(9): 2037-8.
13. Birch C.J., Tyssen D.P., Tachedjian G., Doherty R., Hayes K., Mijch A., et al. Clinical effects and in vitro studies of trifluorothymidine combined with interferon-alpha for treatment of drug-resistant and -sensitive herpes simplex virus infections. *J. Infect. Dis.* 1992; 166(1): 108-12.
14. Costin D., Dogaru M., Popa A., Cijevschi I. Trifluridine therapy in herpetic keratitis. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 2004; 108(2): 409-12.
15. Turner L.D., Beckingsale P. Acyclovir-resistant herpetic keratitis in a solid-organ transplant recipient on systemic immunosuppression. *Clin. Ophthalmol.* 2013; 7: 229-32.
16. De Clercq E. Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 68(12): 2301-15.
17. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rosenberg I., et al. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antiviral Res.* 1987; 8(5-6): 261-72.
18. Steingrimsdottir H., Gruber A., Palm C., Grimfors G., Kalin M., Eksborg S. Bioavailability of aciclovir after oral administration of aciclovir and its prodrug valaciclovir to patients with leukopenia after chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44(1): 207-9.
19. Purifoy D.J., Beauchamp L.M., de Miranda P., Ertl P., Lacey S., Roberts G., et al. Review of research leading to new anti-herpesvirus agents in clinical development: Valaciclovir hydrochloride (256U, the L-valyl ester of acyclovir) and 882C, a specific agent for varicella zoster virus. *J. Med. Virol.* 1993; (Suppl. 1): 139-45.

20. Katragadda S., Jain R., Kwatra D., Hariharan S., Mitra A.K. Pharmacokinetics of amino acid ester prodrugs of acyclovir after oral administration: interaction with the transporters on Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.* 2008; 362(1-2): 93-101.
21. Hughes P.M., Mitra A.K. Effect of acylation on the ocular disposition of acyclovir. II: Corneal permeability and anti-HSV 1 activity of 2'-esters in rabbit epithelial keratitis. *J. Ocul. Pharmacol.* 1993; 9(4): 299-309.
22. Hatanaka T., Haramura M., Fei Y.J., Miyauchi S., Bridges C.C., Ganapathy P.S., et al. Transport of amino acid-based prodrugs by the Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-coupled amino acid transporter ATB0<sup>+</sup> and expression of the transporter in tissues amenable for drug delivery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 308(3): 1138-47.
23. Katragadda S., Gunda S., Hariharan S., Mitra A.K. Ocular pharmacokinetics of acyclovir amino acid ester prodrugs in the anterior chamber: evaluation of their utility in treating ocular HSV infections. *Int. J. Pharm.* 2008; 359(1-2): 15-24.
24. Anand B.S., Hill J.M., Dey S., Maruyama K., Bhattacharjee P.S., Myles M.E., et al. In vivo antiviral efficacy of a dipeptide acyclovir prodrug, val-val-acyclovir, against HSV-1 epithelial and stromal keratitis in the rabbit eye model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(6): 2529-34.
25. Andronova V.L., Yas'ko M.V., Kukhanova M.K., Galegov G.A., Skoblov Yu.S., Kochetkov S.N. Study of antiherpetic efficiency of phosphate of acycloguanosine able to overcome the barrier of resistance to acyclovir. *Acta Naturae*, 2016; 8(1): 74-81. (in Russian)
26. Skoblov Y.S., Karpenko I.L., Jasko M.V., Kukhanova M.K., Andronova V.L., Galegov G.A., et al. Cell metabolism of acyclovir phosphonate derivatives and antiherpesvirus activity of their combinations with alpha2-interferon. *Chem. Biol. Drug Des.* 2007; 69(6): 429-34.
27. Gus'kova A.A., Skoblov M.Y., Korovina A.N., Karpenko I.L., Kukhanova M.K., Andronova V.L., et al. Antiherpetic properties of acyclovir 5'-hydrogenphosphonate and the mutation analysis of herpes virus resistant strains. *Chem. Biol. Drug Des.* 2009; 74(4): 382-9.
28. Banker A.S., De Clercq E., Taskintuna I., Keefe K.S., Bergeron-Lynn G., Freeman W.R. Influence of intravitreal injections of HPMPC and related nucleoside analogs on intra-ocular pressure in guinea pig eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998; 39(7): 1233-42.
29. Cheng L., Hostetler K.Y., Lee J., Koh H.J., Beadle J.R., Bessho K., et al. Characterization of a Novel Intraocular Drug-Delivery System Using Crystalline Lipid Antiviral Prodrugs of Ganciclovir and Cyclic Cidofovir. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45(11): 4138-44.
30. Lowe D.M., Alderton W.K., Ellis M.R., Parmar V., Miller W.H., Roberts G.B., et al. Mode of action of (R)-9-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl]guanine against herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(8): 1802-8.
31. Abele G., Karlström A., Harmenberg J., Shigeta S., Larsson A., Lindborg B., et al. Inhibiting effect of (RS)-9-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl]guanine on varicella-zoster virus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987; 31(1): 76-80.
32. Ng T.I., Shi Y., Huffaker H.J., Kati W., Liu Y., Chen C.M., et al. Selection and characterization of varicella-zoster virus variants resistant to (R)-9-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl]guanine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45(6): 1629-36.
33. Tyring S.K., Plunkett S., Scribner A.R., Broker R.E., Herrod J.N., Handke L.T., et al. Valomaclovir versus valacyclovir for the treatment of acute herpes zoster in immunocompetent adults: a randomized, double-blind, active-controlled trial. *J. Med. Virol.* 2012; 84(8): 1224-32.
34. McGuigan C., Barucki H., Carangio A., Blewett S., Andrei G., Snoeck R., et al. Highly potent and selective inhibition of varicella-zoster virus by bicyclic furoprymidine nucleosides bearing an aryl side chain. *J. Med. Chem.* 2000; 43(26): 4993-7.
35. McGuigan C., Pathirana R.N., Migliore M., Adak R., Luoni G., Jones A.T., et al. Preclinical development of bicyclic nucleoside analogues as potent and selective inhibitors of varicella zoster virus. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 60(6): 1316-30.
36. Sienaert R., Naesens L., Brancalle A., De Clercq E., McGuigan C., Balzarini J. Specific recognition of the bicyclic pyrimidine nucleoside analogs, a new class of highly potent and selective inhibitors of varicella-zoster virus (VZV), by the VZV-encoded thymidine kinase. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61(2): 249-54.
37. Pentikis H.S., Matson M., Atiee G., Boehlecke B., Hutchins J.T., Patti J.M., et al. Pharmacokinetics and safety of FV-100, a novel oral anti-herpes zoster nucleoside analogue, administered in single and multiple doses to healthy young adult and elderly adult volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(6): 2847-54.
38. Descamps J., Sehgal R.K., De Clercq E., Allaudeen H.S. Inhibitory effect of E-5-(2-bromovinyl)-1-beta-D-arabinofuranosyluracil on herpes simplex virus replication and DNA synthesis. *J. Virol.* 1982; 43(1): 332-6.
38. Machida H., Nishitani M., Suzutani T., Hayashi K. Different antiviral potencies of BV-araU and related nucleoside analogues against herpes simplex virus type 1 in human cell lines and Vero cells. *Microbiol. Immunol.* 1991; 35(11): 963-73.
39. Wallace M.R., Chamberlin C.J., Sawyer M.H., Arvin A.M., Harkins J., LaRocco A., et al. Treatment of adult varicella with sorivudine: a randomized, placebo-controlled trial. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(2): 249-55.
40. Okuda H., Ogura K., Kato A., Takubo H., Watabe T. A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 287(2): 791-9.
41. Braitman A., Swerdel M.R., Olsen S.J., Tuomari A.V., Lynch J.S., Blue B., et al. Evaluation of SQ 34,514: pharmacokinetics and efficacy in experimental herpesvirus infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35(7): 1464-8.
42. Koyano S., Suzulani T., Yoshida I., Azuma M. Analysis of phosphorylation pathways of antiherpesvirus nucleosides by varicella-zoster virus-specific enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40(4): 920-3.
43. Ying C., De Clercq E., Neyts J. Lamivudine, adefovir and tenofovir exhibit long-lasting anti-hepatitis B virus activity in cell culture. *J. Viral Hepat.* 2000; 7(1): 79-83.
44. Tenney D.J., Yamanaka G., Voss S.M., Cianci C.W., Tuomari A.V., Sheaffer A.K., et al. Lobucavir is phosphorylated in human cytomegalovirus-infected and uninfected cells and inhibits the viral DNA polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41(12): 2680-5.
45. Petty B.G., Saito H., Summerill R.S., Burgee H., McDowell J., Stewart M.B. Pharmacokinetics and bioavailability of cygalovir (BMS-180194) in asymptomatic HIV- and CMV-seropositive volunteers. *Antiviral Res.* 1994; 23 (Suppl. 1): 44.
46. Shiota H., Nitta K., Naito T., Mimura Y., Maruyama T. Clinical evaluation of carbocyclic oxetanocin G eyedrops in the treatment of herpes simplex corneal ulcers. *Br. J. Ophthalmol.* 1996; 80(5): 413-5.
47. Brideau R.J., Knechtel M.L., Huang A., Vaillancourt V.A., Vera E.E., Oien N.L., et al. Broad-spectrum antiviral activity of PNU-183792, a 4-oxo-dihydroquinoline, against human and animal herpesviruses. *Antiviral Res.* 2002; 54(1): 19-28.
48. Schnute M.E., Cudahy M.M., Brideau R.J., Homa F.L., Hopkins T.A., Knechtel M.L., et al. 4-Oxo-4,7-dihydrothieno[2,3-b]pyridine-sanson-nucleoside inhibitors of human cytomegalovirus and related herpesvirus polymerases. *J. Med. Chem.* 2005; 48(18): 5794-804.
49. Thomsen D.R., Oien N.L., Hopkins T.A., Knechtel M.L., Brideau R.J., Wathen M.W., et al. Amino acid changes within conserved region III of the herpes simplex virus and human cytomegalovirus DNA polymerases confer resistance to 4-oxo-dihydroquinolines, a novel class of herpesvirus antiviral agents. *J. Virol.* 2003; 77(3): 1868-76.
50. Gottlieb J., Challberg M.D. Interaction of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase and the UL42 accessory protein with a model primer template. *J. Virol.* 1994; 68(8): 4937-45.
51. Loregian A., Papini E., Satin B., Marsden H.S., Hirst T.R., Palù G. Intracellular delivery of an antiviral peptide mediated by the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(9): 5221-6.
52. Zuccola H.J., Filman D.J., Coen D.M., Hogle J.M. The crystal structure of an unusual processivity factor, herpes simplex virus UL42, bound to the C terminus of its cognate polymerase. *Mol. Cell.* 2000; 5(2): 267-78.
53. Bridges K.G., Chow C.S., Coen D.M. Identification of crucial hydrogen-bonding residues for the interaction of herpes simplex virus DNA polymerase subunits via peptide display, mutational, and calorimetric approaches. *J. Virol.* 2001; 75(11): 4990-8.
54. Pilger B.D., Cui C., Coen D.M. Identification of a small molecule that inhibits herpes simplex virus DNA Polymerase subunit interactions and viral replication. *Chem. Biol.* 2004; 11(5): 647-54.
55. Zhou B., Yang K., Wills E., Tang L., Baines J.D. A mutation in the DNA polymerase accessory factor of herpes simplex virus 1 restores viral DNA replication in the presence of raltegravir. *J. Virol.* 2014; 88(19): 11121-9.
56. Smith R.A., Raugi D.N., Kiviati N.B., Hawes S.E., Mullins J.I., Sow P.S., et al. Phenotypic susceptibility of HIV-2 to raltegravir: integrase mutations Q148R and N155H confer raltegravir resistance. *AIDS.* 2011; 25(18): 2235-41.
57. Wohl D.A., Dumond J.B., Blevins S., Pittard D., Ragan D., Wang R., et al. Raltegravir pharmacokinetics in treatment-naive patients is not influenced by race: results from the raltegravir early therapy in African-Americans living with HIV (REAL) study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(2): 784-8.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.824.11:578.5:577.21.083(470.331)

Гулюкин А.М.<sup>1</sup>, Шабейкин А.А.<sup>1</sup>, Макаров В.В.<sup>1,2</sup>, Зайкова О.Н.<sup>1,3</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1,3</sup>, Забережный А.Д.<sup>1</sup>,  
Полякова И.В.<sup>1</sup>, Южаков А.Г.<sup>1,3</sup>

## ОСОБЕННОСТИ ЭПИЗОТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ТВЕРСКОЙ ОБЛАСТИ

<sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва;<sup>2</sup>ФГАОУ «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва;<sup>3</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Рассмотрена современная эпизоотическая ситуация по бешенству в Тверской области. Проанализирован видовой и количественный состав животных с лабораторно подтвержденным заболеванием. Установлено, что особенности течения эпизоотий на территории Тверской области соответствуют закономерностям, характерным для бешенства природно-очагового типа. В результате секвенирования гена N вируса бешенства и филогенетического анализа исследуемые изоляты были отнесены к Центральной филогенетической группе. При помощи геоинформационной системы были получены нозологические карты Тверской области и проведено исследование пространственно-временных особенностей течения эпизоотического процесса рабической инфекции.

Ключевые слова: бешенство; эпизоотология; геоинформационная система; картография; секвенирование генома; филогенетический анализ.

**Для цитирования:** Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Макаров В.В., Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Полякова И.В., Южаков А.Г. Особенности эпизоотического процесса и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Тверской области. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 115-123. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-115-123>

**Gulukin A.M.<sup>1</sup>, Shabeykin A.A.<sup>1</sup>, Makarov V.V.<sup>1,2</sup>, Zaykova O.N.<sup>1,3</sup>, Grebennikova T.V.<sup>1,3</sup>, Zaberezhny A.D.<sup>1</sup>, Polyakova I.V.<sup>1</sup>, Yuzhakov A.G.<sup>1,3</sup>**

### FEATURES OF EPISOTIC PROCESS AND MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF VIRUS ISOLATES OF RABIES IN TVER REGION

<sup>1</sup>All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary named after Ya. R. Kovalenko, Moscow, 109428, Russian Federation;<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation;<sup>3</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Rabies epidemic situation in the Tver Region has been studied. Animals of different species that had confirmed clinical rabies were statistically analyzed. It was established that the features of the course of epizootics in the Tver region correspond to the regularities characteristic of rabies of the natural-focal type. As a result of sequencing of the rabies virus N gene and phylogenetic analysis, the isolates studied were assigned to the central phylogenetic group. With the help of the geoinformatic system, nosological maps of the Tver region were obtained and the spatial-temporal features of the course of the epizootic process of rabies infection were studied.

Key words: rabies; epidemiology; geography information system; cartography; genome sequencing; phylogenetic analysis.

**For citation:** Gulukin A.M., Shabeykin A.A., Makarov V.V., Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Zaberezhny A.D., Polyakova I.V., Yuzhakov A.G. Features of episodic process and molecular-genetic characteristics of virus isolates of rabies in Tver region. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3): 115-123. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-115-123>

**For correspondence:** Aleksey M. Gulukin, Candidate of Biological Sciences, leading researcher in laboratory of epizootology, deputy director of All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, 109428, Russian Federation. E-mail: [plych@mail.ru](mailto:plych@mail.ru)

#### Information about authors:

Gulyukin A.M., <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>;Makarov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8464-6380>;Zaberezhny A.D., <https://orcid.org/0000-0001-7635-2596>;Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-0426-9678>Shabeykin A.A., <https://orcid.org/0000-0003-3413-8131>;Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>;Polyakova I.V., <https://orcid.org/0000-0002-7392-0364>;

**Для корреспонденции:** Гулюкин Алексей Михайлович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории эпизоотологии, заместитель директора по инновационной работе ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва. E-mail: [plych@mail.ru](mailto:plych@mail.ru)

**Acknowledgments.** The authors are grateful to the members of FGBI «Federal Centre for Animal Health» M. I. Shul'pin and S. A. Chupin.

This work was supported by the RF state budget.

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

Received 10 December 2017

Accepted 12 December 2017

## Введение

Бешенство – это острая вирусная инфекция, поражающая центральную нервную систему. Возбудитель – РНК-содержащий вирус рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Восприимчивы теплокровные млекопитающие большинства видов, в том числе человек [1–10].

Для Российской Федерации проблема бешенства не теряет актуальности. По данным Центра ветеринарии, за период после 2000 г. в среднем регистрируется около 3,5 тыс. неблагополучных пунктов за год и, как видно на рис. 1, в целом за этот период линия тренда находится в равновесном положении, что указывает на отсутствие каких-либо существенных изменений [1, 2, 9, 11–25].

Наибольшее число неблагополучных пунктов традиционно приходится на Центральный и Приволжский федеральные округа. Территория Тверской области входит в состав обширного ареала бешенства, покрывающего большую часть ЦФО и, согласно архиву лаборатории эпизоотологии ВИЭВ, регулярно демонстрирует вспышки болезни на протяжении последних 25 лет [8, 12, 13, 21, 22, 24, 26–29].

Рассматривая ситуацию в Тверской области за последние 4 года, можно отметить волнообразный характер эпизоотического процесса, что объясняется цикличностью бешенства природного типа и совпадает с периодами подъёмов и спадов на всей европейской части РФ. Так, в 2013 г. было выявлено 93 случая бешенства, в 2014 г. – 56, в 2015 г. – 115, в 2016 г. – 104, а с января по май 2017 г. выявлено 39 случаев бешенства среди животных. Бешенство регистрировалось практически во всех районах Тверской области.

Всего за 2013–2016 гг. зарегистрировано 368 случаев бешенства, из которых более 90% представлены случаями среди диких и домашних плотоядных животных. Такая видовая структура заболевания характерна для бешенства природного типа, когда болезнь распространяют дикие плотоядные, и объяснима их высокой восприимчивостью к возбудителю инфекции, строением ротового аппарата, позволяющего легко наносить укусы, агрессивностью, склонностью к миграции, способностью к быстрому восстановлению численности популяции.

Домашние плотоядные в силу поведенческих особенностей представляют собой наибольшую группу риска заражения при эпизоотиях природного типа, но, в условиях относительно холодного климата центральной части России, собаки и кошки сильно привязаны к жилью человека, что ведёт к территориальному сегментированию популяции на изолированные микрокластеры и препятствует длительной циркуляции вируса среди животных этих групп из-за их малочисленности и низкой вирулентности природно-очагового вируса лисьего экотипа. При этом проводимая программа вакцинопрофилактики не полностью охватывает популяцию мелких домашних животных, и при одновременном наличии большого числа безнадзорных животных это приводит к нередким заражениям бешенством собак и кошек. Учи-

тая близость мелких домашних животных к человеку, случаи их заболевания представляют огромную эпидемиологическую опасность [2, 4, 8, 9, 13, 30–32].

Основным методом борьбы с природным бешенством общепризнанно считается оральная вакцинация диких плотоядных, которая должна проводиться под контролем её эффективности (поедаемость вакцинных приманок по тетрациклиновому маркеру, наличие вируснейтрализующих антител в протективных титрах) и с постоянным эпизоотологическим мониторингом. Важным элементом в понимании особенностей и механизмов территориального продвижения эпизоотий являются методы *молекулярной эпизоотологии*, объединяющие молекулярно-генетические исследования и методы нозогеографии [17, 22, 28].

Статья написана в рамках выполнения Государственного задания по программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук по теме «Получить новые знания о генетической структуре вируса классического бешенства, распространённого на территории России» (№ 0578-2015-0003).

Целью работы было исследование современных особенностей эпизоотического процесса рабической инфекции на территории Тверской области с использованием геоинформационных систем и молекулярных филогенетических исследований.

## Материал и методы

### *Эпизоотологическое исследование*

Использованы дескриптивные методы сравнительно-исторического и сравнительно-географического исследования, а при эпизоотологическом анализе – методы аналитической и экспериментальной эпизоотологии.

Работа выполнена в лаборатории эпизоотологии ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко. Были проанализированы статистически обработанные данные ежегодной первичной отчетности ветеринарных служб Тверской области.

**Разработка ГИС-проекта.** В разработанном в лаборатории эпизоотологии ВИЭВ тематическом проекте географической информационной системы (ГИС) были построены цифровые нозологические карты Тверского региона и европейской части РФ. На цифровых картах отражено эпизоотологическое районирование территорий и с использованием «тепловых» карт определены зоны напряжённости эпизоотологической ситуации за различные периоды времени. В ходе работы была использована программная платформа ArcGIS компании «ESRI» [7, 21–23, 25, 27, 33–35].

### *Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ*

Материалом для исследования послужили 5 очищенных ПЦР-продуктов, содержащих ген *N* вируса бешенства (см. таблицу). Для сравнительного анализа были использованы нуклеотидные последовательности гена *N* штаммов вируса бешенства, содержащиеся в базе данных NCBI.

Для секвенирования ампликонов использовали те

**Естественная история изолятов, использованных для молекулярно-генетического анализа**

Изолят	Вид животного	Регион
Tver_8_2014	Енотовидная собака	Тверская область, Кесовогорский район, 600 м от дер. Столбово
Tver_13_2014	Собака	Тверская область, Кесовогорский район, дер. Федцово
Tver_647_2014	Енотовидная собака	Тверская область, Пеновский район, урочище Михайловщина
Tver_127_2015	То же	Тверская область, Осташковский район
Tver_125_2015	« «	То же

же праймеры, что и в ПЦР. В работе применяли набор BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) и капиллярный ДНК-секвенатор ABI Prism 3100 («Applied Biosystems», США). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и проведения филогенетического анализа применяли пакет программ DNASTAR v 3.12 («Lasergene Inc.», США) и BioEdit 7.0.1. Для оценки достоверности топологии филогенетической дендрограммы был проведен bootstrap-анализ с привлечением 1000 псевдореплик.

**Результаты**

**Эпизоотологическое исследование бешенства на территории Тверской области в период с 2013 г. по май 2017 г.**

С 2013 по 2016 г. в Тверской области выявлено 368 случаев бешенства животных, а с января по май 2017 г. – 39 случаев. Основную часть заболевших животных составили лисы, енотовидные собаки и домашние плотоядные. На рис. 2 показано процентное распределение случаев бешенства среди разных групп животных за период с 2013 по май 2017 г.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что наибольшее число случаев бешенства в регионе регистрировалось среди диких животных, а именно енотовидных собак и лис (51 и 28% соответственно). Доля домашних плотоядных (собаки и кошки) составила в целом 17%. Среди других групп животных, как диких, так и домашних, регистрировались единичные случаи бешенства.

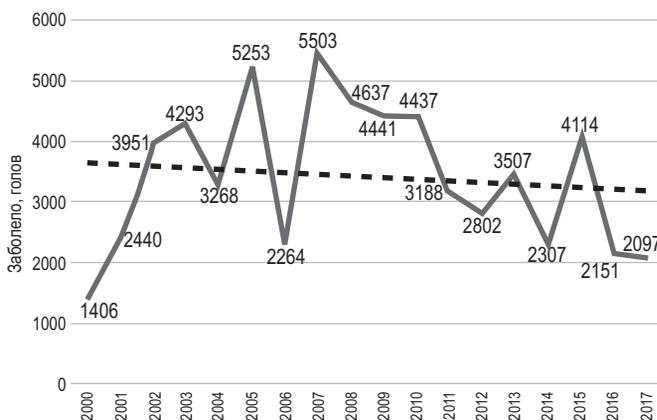


Рис. 1. Динамика случаев заболевания бешенством животных в Российской Федерации за 2000 – 2016 гг.

Как видно на рис. 3, циклы сезонных подъёмов заболеваемости енотовидной собаки почти полностью совпадают с циклами сезонности у лисицы, что указывает на существующую между ними связь.

Для исследования особенностей пространственного продвижения волны эпизоотии бешенства по территории Тверской области в ГИС-проекте «Бешенство в Российской Федерации», разрабатываемом в лаборатории эпизоотологии ВИЭВ, были сформированы серии последовательных нозокарт.

В правой части рис. 4 приведена последовательность «тепловых» карт европейской части страны, на которых отображена интенсивность эпизоотического процесса через градиентную заливку, где жёлтым цветом показаны районы с низкой плотностью регистрации вспышек бешенства и красным цветом показаны районы, где плотность расположения вспышек болезни максимальная. В левой части рисунка синхронно приведены эпизоотологические карты Тверской области, где число вспышек в каждом районе показано кружками пропорционального размера.

Как видно из карт на рис. 4, за этот период бешенство регистрировалось в большинстве районов Тверской области, в большей степени затрагивая центр и восток, значительно реже демонстрируя активность на западе. С января 2013 г. по май 2017 г. наибольшее число случаев бешенства приходилось на районы, граничащие с Московской областью: Калининский (53), Калязинский (31), Zubовский (22).

Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Тверской области

Определена первичная структура гена N вируса бешенства для 5 изолятов из Тверской области. На основании полученных нуклеотидных последовательностей и материалов, опубликованных в базе данных GenBank, была построена филогенетическая дендрограмма и проведен филогенетический анализ (рис. 5).

Для филогенетического анализа использовали вакцинные и референсные штаммы вируса бешенства ERA, SAD B19, SAG 2, RV-97, Moscow 3253, CVS, SRV9, изо-

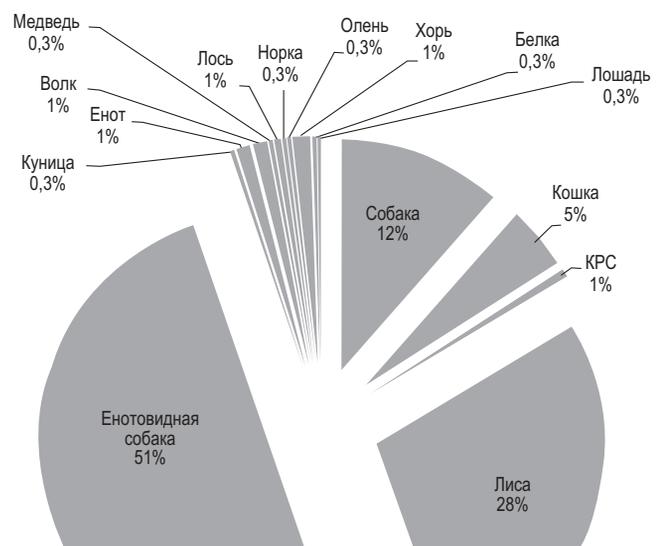


Рис. 2. Процентное распределение случаев бешенства среди разных групп животных в Тверской области за 2013 – май 2017 г.

КРС – крупный рогатый скот.

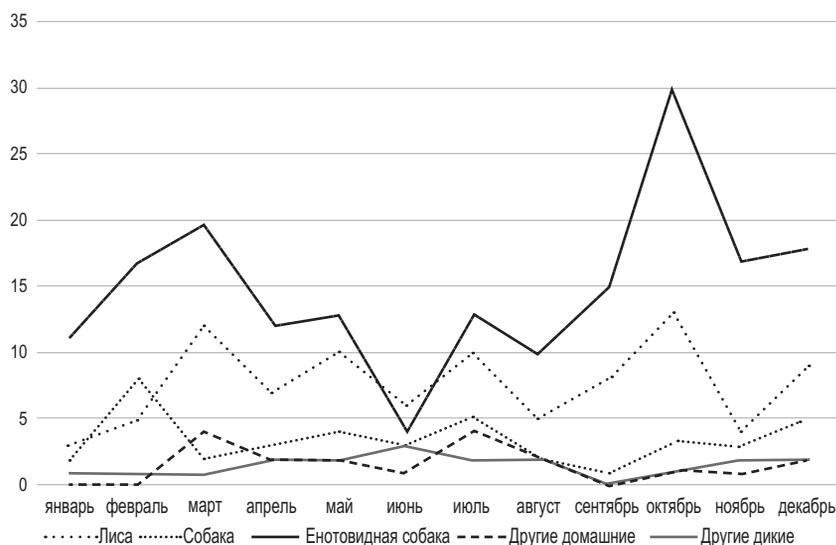


Рис. 3. Сезонное распределение случаев бешенства среди разных групп животных в Тверской области за январь 2013 г. – май 2017 г.

ляты RV299 и RV1154, а также первичные структуры гена *N* изолятов, выделенных ранее на территории Тверской области.

Размер исследуемого фрагмента составил 1110 нуклеотидных остатков (н. о.), кодирующих 370 аминокислот. На рис. 6 показаны предсказанные последовательности аминокислот всех исследуемых изолятов в сравнении с некоторыми ранее охарактеризованными и референсными штаммами вируса бешенства.

При анализе предсказанных аминокислотных последовательностей было установлено, что в позиции 94 изолят Tver\_125\_2015 содержит аминокислоту валин вместо изолейцина, а в позиции 95 все исследуемые изоляты наряду с ранее изученными и изолятом RV299 (выделен в Туле) содержат триптофан вместо валина, пролина и лейцина.

В положении 106 у всех изолятов из Тверской области содержится глицин вместо аспарагиновой кислоты. В позиции 135 изоляты Tver\_8\_2014 и Tver\_13\_2014 содержат серин вместо пролина вместе со штаммом CVS и изолятами Tver\_7574f\_2008 и Tver\_7575f\_2008.

Все изоляты из Тверской области в позиции 217 содержат остаток валина вместо изолейцина вместе с изолятом RV299. В позиции 332 изоляты Tver\_125\_2015, Tver\_127\_2015 и Tver\_647\_2014 содержат треонин вместо аланина, а в положении 379 у всех исследуемых изолятов и изолятов Tver\_7576rd\_2008, Tver\_7577f\_2008, Tver\_75796f\_2008 наблюдали аланин вместо валина или метионина.

По предсказанным аминокислотным последовательностям исследуемые изоляты отличаются от референсных штаммов и других изолятов на 3–4%. Между собой исследуемые изоляты различаются на 0,3–0,8%, а от других изолятов из Тверской области отличаются на 0,5–1,4%.

### Обсуждение

Эпизоотологическое исследование бешенства на территории Тверской области в период с 2013 по май 2017 г.

Как следует из данных эпизоотологической статистики, наибольшее число случаев бешенства в Тверской области регистрировалось среди диких животных, а

именно енотовидных собак и лис (51 и 28% соответственно). При этом ситуация по енотовидной собаке в Тверской области в значительной степени отличается от наблюдаемых процессов на всех других территориях страны и является важной эпизоотологической особенностью. Широкое распространение бешенство енотовидных собак получило в целом ряде регионов европейской части страны, и дополнительно к Тверской области такие случаи часто регистрируются в Ярославской, Московской областях, в несколько меньшей степени – в Брянской, Смоленской, Кировской областях. Однако только в Тверской области инцидентность среди енотовидных собак почти в 2 раза превышает таковую лисьего бешенства. В данном случае возникает очень важный вопрос: является ли енотовидная собака резервуаром природного бешенства или выступает в качестве очень активного амплификатора вируса лисьего экотипа

без возможности длительного сохранения его в своей популяции? Енотовидная собака в условиях холодной зимы нередко впадает в спячку, что может служить сильным препятствием для непрерывной циркуляции вируса в зоне природного очага или, наоборот, обеспечивать длительное сохранение хронизированной инфекции в течение неблагоприятного периода (так называемое «перезимовывание» инфекции). Однако по данным ветеринарной отчетности, за весь исследуемый период случаи бешенства у енотовидной собаки выявлялись круглый год, причём в зимние месяцы показатель инцидентности был значительно выше регистрируемой заболеваемости в летний период.

Анализ полученных данных показывает, что в условиях Тверской области енотовидная собака выступает в роли вида-индикатора, активно отражая циркуляцию вируса бешенства в дикой природе. Поэтому пока нельзя точно определить, произошла ли сукцессия природного очага с заменой вида-резерванта, и не исключено, что лисица остаётся истинным стимулятором эпизоотических волн в этом регионе, а енотовидная собака только обеспечивает их индикацию. В целом независимо от роли енотовидной собаки в эпизоотической цепи любое планирование и проведение профилактических вакцинаций в дикой природе должны проводиться с обязательным учётом ее биологии и поведенческих особенностей. Одновременно для Тверской и Ярославской областей успешность борьбы с бешенством будет напрямую зависеть от интенсивности проведения программ по регулированию численности популяций диких псовых обоих видов.

Как видно из графика сезонности (см. рис. 3), наиболее благоприятным периодом года являются июнь – август, что связано с наименьшей мобильностью диких плотоядных в это время. В связи с этим началом эпизоотологического цикла бешенства условно можно считать начало лета, и более рациональным, по мнению авторов данной статьи, будет построение графиков и нозологических карт, затрагивающих периоды с июня по май.

Кроме сезонных подъёмов, эпизоотиям природного бешенства присущи периоды циклических подъёмов

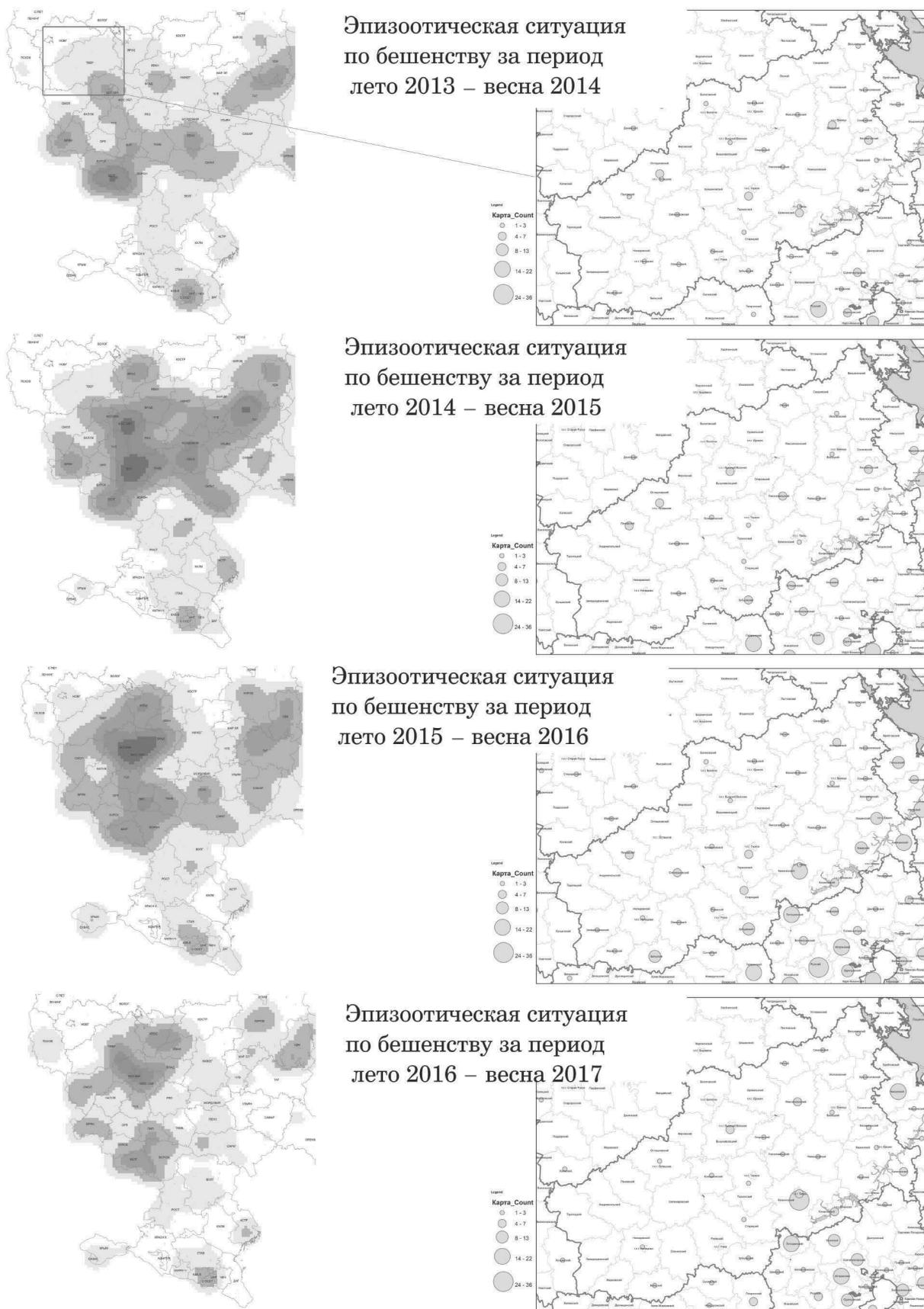


Рис. 4. Карты распределения вспышек бешенства животных по районам Тверской области в сравнении с картами плотности вспышек бешенства на европейской части Российской Федерации за период с июня 2013 г. по май 2017 г. (ГИС-проект ВИЭВ).

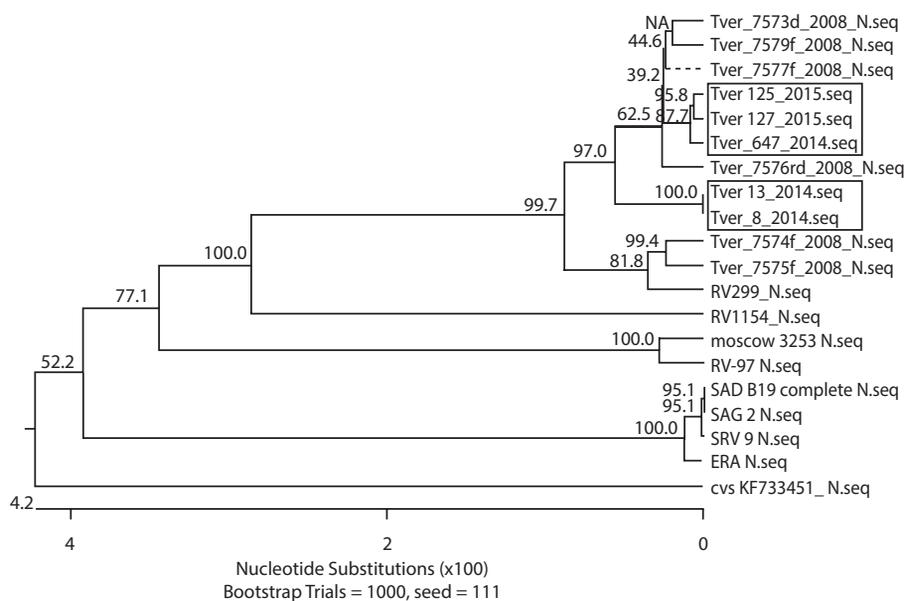


Рис. 5. Филогенетическая дендрограмма, полученная на основании данных о первичной структуре гена *N* вируса бешенства.

и спадов, затрагивающих несколько лет (см. рис. 1). В рассматриваемом временном отрезке январь 2013 г. – май 2017 г. Тверская область была вовлечена в сильный эпизоотический подъём бешенства 2014 – 2015 гг. на европейской части страны.

Анализ в ГИС особенностей распределения бешенства на европейской части позволяет выделить несколько территориальных кластеров со своими ядрами, почти сливающимися в годы максимального подъёма и более отчётливо определяющимися в периоды относительного улучшения эпизоотической ситуации. Наличие кластеризации ареала бешенства подтверждается ранее проводимыми исследованиями антигенного и генетического разнообразия полевых изолятов вируса, полученных из разных регионов страны [4, 7, 11, 14–16, 20, 24].

Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Тверской области

Было проведено молекулярно-генетическое исследование 5 образцов (очищенных ПЦР-продуктов), содержащих нуклеопротеин вируса бешенства. Благодаря применению моноклональных антител с 70-х годов XX века стали возможными изучение разнообразия антигенной структуры лиссавирусов, идентификация серотипов и антигенных вариантов вируса бешенства. В результате многих исследований штаммы и изоляты вируса бешенства, выделенные на территории России и ближнего зарубежья, были разделены на несколько групп: Евразийскую, Кавказскую, Северо-Европейскую (Северо-Восточно-Европейскую), Центральную и Арктическую. В соответствии с данными литературы характерной особенностью Центральной группы является наличие в позиции 217 нуклеопротеина остатка валина, в то время как у всех представителей других филогенетических групп из России в этой позиции имеется остаток изолейцина [4, 7, 11, 14–16, 20, 24].

Было установлено по аминокислотному составу, что на заданном участке генома исследуемые изоляты отличаются от референсных штаммов и других изолятов на 3–4%, а между собой – на 0,3–0,8%, от других

изолятов из Тверской области – на 0,5–1,4%. Так, изоляты Tver\_8\_2014 и Tver\_13\_2014 на заданном участке генома практически идентичны по отношению друг к другу, как и изоляты Tver\_127\_2015 и Tver\_647\_2014. Существенные различия наблюдаются при сравнении с вакцинными штаммами. Изолят RV 299, выделенный в Туле, филогенетически близок к изолятам из Тверской области, образуя вместе с ними отдельный кластер на дендрограмме и имея в позиции 217 характерную для Центральной группы замену изолейцина на валин.

В ходе предыдущих исследований было неоднократно показано, что изоляты вируса бешенства, выделенные на одной территории или близлежащих территориях, генетически наиболее близки и имеют характерные молекулярные отличия. Были выявлены «маркерные» замены в последовательностях аминокислот нуклеопротеина, позволяющие предположить принадлежность изолята к той или иной группе вируса бешенства [14, 20, 27].

## Выводы

Анализ эпизоотологических особенностей распространения бешенства в Тверской области позволяет сделать ряд выводов.

Бешенство животных в области регулярно регистрировалось на протяжении последних 25 лет, что на основании данных о видовом составе заболевших, характерной сезонности и цикличности позволяет говорить о наличии в регионе непрерывной эпизоотии природно-очагового типа.

К уникальной особенности течения эпизоотии бешенства в Тверской области можно отнести превалирование случаев болезни среди енотовидных собак, что в обязательном порядке необходимо учитывать при планировании и проведении противоэпизоотических мероприятий.

Пространственный анализ распространённости бешенства на европейской территории РФ в ГИС позволяет провести кластеризацию ареала болезни, которая объединяет Тверскую область с соседними регионами в одну территориальную группу.

Проведённый филогенетический анализ полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Тверской области, позволяет сделать заключение об их значительном родстве и отнести к Центральной филогенетической группе. Это подтверждает предположение о продвижении эпизоотических волн на ограниченной территории – внутри одного территориального кластера.

Выделение в Тульской области изолята, филогенетически близкого к изолятам Тверской области, указывает на возможность вирусного обмена между Тверской, Московской и Тульской областями, входящими в один территориальный кластер. Косвенно на межрегиональное влияние указывает смещение фокуса неблагополучия на пограничные районы Тверской и Московской областей.

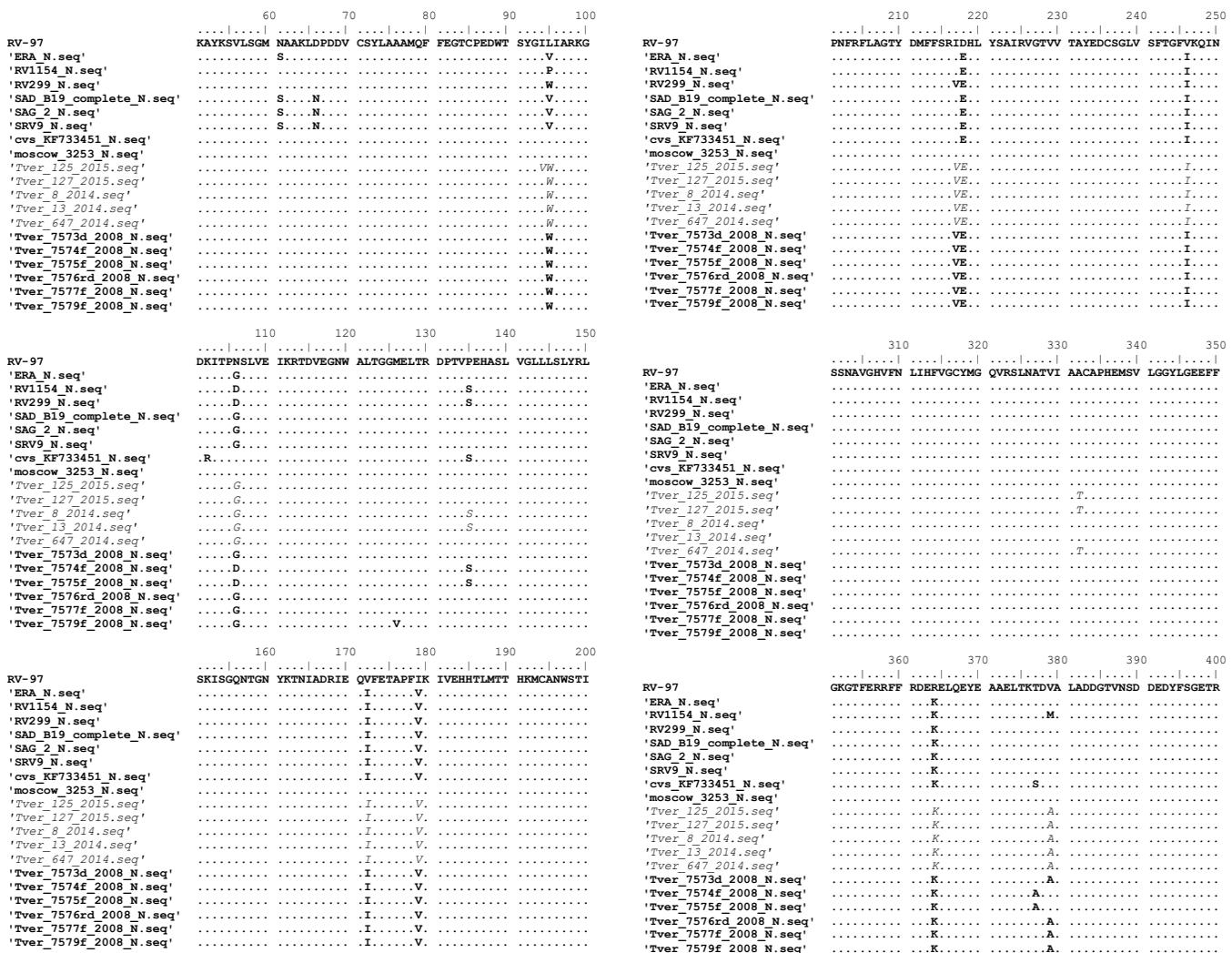


Рис. 6. Предсказанные последовательности аминокислот исследуемых изолятов в сравнении с некоторыми ранее охарактеризованными и референсными штаммами вируса бешенства.

Данные сопряжённого геоинформационного и филогенетического анализа позволили выявить признаки топо- и типологического единства эпизоотического процесса в реальных границах неблагополучного территориального кластера. На основании этого можно сделать предположение, что территориальный кластер в Тверской и сопредельных областях является самостоятельным природным очагом бешенства в соответствии с канонами учения о природной очаговости инфекций [12, 15].

Исходя из вышесказанного можно рекомендовать планирование и проведение всех противоэпизоотических мероприятий исключительно на основе межрегиональной координации с учётом структуры территориальных кластеров ареала болезни. Отсутствие чёткой координации в настоящий момент с большой вероятностью является одной из причин слабых успехов проводимой оральной иммунизации диких плотоядных.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотрудникам Всероссийского НИИ защиты животных М.И. Шульпину и С.А. Чупину.

**Финансирование.** Поддержка исследования осуществлялась с помощью государственного бюджета.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 8, 9, 24, 25, 29, 34, 35 см. REFERENCES)**

1. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. *Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень*. Омск; 2013.
2. Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(3): 5-10.
3. Кучерук В.В., Росицкий Б.К. Природная очаговость инфекций – основные термины и понятия. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1984; 2: 7-16.
4. Макаров В.В., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. Бешенство: естественная история на рубеже столетий. М.: ЗооВетКнига; 2015.
5. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Иванов А.В., Сабирова В.В., Южаков А.Г. и др. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постморальная лабораторная диагностика. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2):18-24.
6. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Шуралев Э.А., Хаертынов К.С., Чернов А.Н., Филимонова М.Н. и др. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невринуы гассерова узла крысы (НГУК-1). *Гены и клетки*. 2014; 9(3): 276-80.

7. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В., Южаков А.Г., Зайкова О.Н. Анализ текущей эпизоотической ситуации по бешенству на территории Российской Федерации. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2015; (4): 5-7.
10. Esri: Программное обеспечение для ГИС-картографии, платформа для позиционирования и аналитики пространственных данных. Available at: <http://www.esri.com>
11. Ботвинкин А.Д., Кузьмин И.В., Хисматуллина Н.А. Итоги изучения антигенного разнообразия вируса бешенства на территории бывшего СССР. *Ветеринарная патология*. 2004; (3): 117-27.
12. Ведерников В.А., Шабейкин А.А., Харкевич А.А., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации бешенства в РФ в 2000 и прогноз на 2001 год. *Ветеринарная патология*. 2002; (1): 52-8.
13. Ведерников В.А., Гулюкин А.М., Седов В.А., Землянова В.Е., Пыталев П.Н., Коломыцев С.А. Особенности современного этапа эволюции эпизоотического процесса бешенства. В кн.: *Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИИВиМ*. Покров; 1998: 153-6.
14. Девяткин А.А., Лукашев А.Н., Полещук Е.М., Ткачев С.Е., Дедков В.Г., Сидоров Г.Н. и др. Молекулярная эпидемиология вируса бешенства на территории Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(1): 39-42.
15. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф. и др. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 186-92.
16. Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М. Эпизоотологический и иммунологический надзор за бешенством. *Ветеринарный врач*. 2010; (4): 3-6.
17. Макаров В.В., Сухарев О.И., Гулюкин А.М., Боев Б.В. Бешенство в Восточной Европе: актуальный вектор развития эпизоотического процесса. *Вестник Россельхозакадемии*. 2008; (4): 58-60.
18. Макаров В.В., Сухарев О.И., Гулюкин А.М., Соколов М.Н., Литвинов О.Б. Бешенство енотовидных собак: статистический анализ заболеваемости. *Ветеринария*. 2009; (6): 20-5.
19. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Кулакова С.Р., Амирова И.В. Совершенствование мер борьбы с бешенством в Смоленской области. *Ветеринария*. 2011; (4): 24-7.
20. Чупин С.А., Чернышова Е.В., Метлин А.Е. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008–2011 гг. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(4): 44-9.
21. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Паршикова А.В. Анализ закономерностей эпизоотического процесса бешенства на территории европейской части Российской Федерации. *Ветеринария и кормление*. 2015; (1): 29-34.
22. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; (4): 4-6.
23. Nerwijn R.V., Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Хисматуллина В.А., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В. Обзор эпизоотической ситуации бешенства, сложившейся в Российской Федерации в 2014 году. *Ветеринария и кормление*. 2015; (2): 19-23.
26. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Полякова И.В., Метлин А.Е. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 101-8.
27. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Паршикова А.В., Южаков А.Г. Использование ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотологическом исследовании. В кн.: *«Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия». Сборник трудов X Международной практической конференции*. Новосибирск; 2015: 50-4.
28. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А. Опыт использования ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотологическом исследовании. В кн.: *Труды V Международного ветеринарного конгресса*. М.; 2015: 250-2.
30. Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Петрова Т.П., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Каримов М.М. и др. Эпизоотическая ситуация и борьба с бешенством в Калининградской области. *Ветеринария*. 2015; (4): 9-13.
31. Макаров В.В., Сухарев О.И., Гулюкин А.М., Литвинов А.Б. Тенденции распространения бешенства в Восточной Европе. *Ветеринария*. 2008; (8): 20-2.
32. Хисматуллина Н.А., Петрова Т.П., Гулюкин А.М., Сабирова В.В., Гафарова А.З., Насыров Ш.М. и др. Контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства дикой фауны на территории Калининградской области РФ. *Ветеринарный врач*. 2012; (6): 8-11.
33. Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Белименко В.В. Эпизоотологические геоинформационные системы. Возможности и перспективы. *Ветеринария*. 2016; (7): 21-4.

## REFERENCES

1. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Berezina E.S. Rabies in the Russian Federation. *Informatsionno-analiticheskiy byulleten'*. Omsk; 2013. (in Russian)
2. Gulyukin A.M. The importance of modern methods of laboratory diagnosis and identification of a rabies pathogen for immunological monitoring of this zoonosis. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(3): 5-10. (in Russian)
3. Kucheruk V.V., Rositskiy B.K. Natural focality of infections - the main terms and concepts. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 1984; 2: 7-16. (in Russian)
4. Makarov V.V., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I. Rabies: A Natural History at the Turn of the Century [Beshenstvo: estestvennaya istoriya na rubezhe stoletiy]. Moscow: ZooVetKniga; 2015. (in Russian)
5. Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I., Ivanov A.V., Sabirova V.V., Yuzhakov A.G., et al. Two cases of hydrophobia in the Republic of Tatarstan: intravital and postmortem laboratory diagnostics. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(2): 18-24. (in Russian)
6. Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Shuralev E.A., Khaertynov K.S., Chernov A.N., Filimonova M.N., et al. Accelerated method of diagnosing rabies in the culture of neuroinoma cells of the Gasser node of the rat (NGUK-1). *Geny i kletki*. 2014; 9(3): 276-80. (in Russian)
7. Shabaykin A.A., Gulyukin A.M., Tsaregradskiy P.Yu., Parshikova A.V., Yuzhakov A.G., Zaykova O.N. Analysis of the current epizootic situation of rabies in the territory of the Russian Federation. *Russian Veterinary Journal. Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennye zhivotnye*. 2015; (4): 5-7. (in Russian)
8. Vedernikov V.A., Sedov V.A., Pitalev P.N., Semljanova V.E., Gulyukin A.M. Rabies in individual countries (Russia, European part only). *Rabies Bulletin Europe*. 1998; 22(4): 9-10.
9. Vedernikov V.A., Sedov V.A., Baldina I.V., Gulyukin A.M., Troizkaya E.G., Cherkassky B.L., et al. Summary of Rabies in the Russian Federation. Particularities of the Present Situation. *Rabies Bulletin Europe*. 1999; 23(4): 13-5.
10. Esri: GIS Mapping Software, Spatial Data Analytics & Location Platform. Available at: <http://www.esri.com>
11. Botvinkin A.D., Kuz'min I.V., Khismatullina N.A. Results of the study of the antigenic diversity of the rabies virus in the territory of the former USSR. *Veterinarnaya patologiya*. 2004; (3): 117-27. (in Russian)
12. Vedernikov V.A., Shabaykin A.A., Kharkevich A.A., Gulyukin A.M. Overview of the epizootic situation of rabies in Russia in 2000 and the forecast for 2001. *Veterinarnaya patologiya*. 2002; (1): 52-8. (in Russian)
13. Vedernikov V.A., Gulyukin A.M., Sedov V.A., Zemlyanova V.E., Pytalev P.N., Kolomytsev S.A. Features of the modern stage of the evolution of the epizootic process of rabies. In: *Diagnosis, Prevention and Control Measures for Especially Dangerous and Exotic Animal Diseases. Materials of the International Scientific and Practical Conference, Dedicated to the 40th Anniversary of VNIIViM [Diagnostika, profilaktika i mery bor'by s osobo opasnymi i ekzoticheskimi boleznyami zhivotnykh. Materialy Mezhduнародной nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 40-letiyu VNIIViM]*. Pokrov; 1998: 153-6. (in Russian)
14. Devyatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., Tkachev S.E., Dedkov V.G., Sidorov G.N., et al. Molecular epidemiology of the rabies virus in the territory of the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2017; 16(1): 39-42. (in Russian)
15. Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Elakov A.L., Kochergin-Nikitskiy K.S., Aliper T.I., Chuchalin S.F., et al. Molecular genetic characteristics of genomes of field isolates of the rabies virus circulating in the Kirov region. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 186-92. (in Russian)
16. Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Gulyukin A.M. Epizootological and immunological surveillance of rabies. *Veterinarnyy vrach*. 2010; (4): 3-6. (in Russian)
17. Makarov V.V., Sukharev O.I., Gulyukin A.M., Boev B.V. Rabies in Eastern Europe: an actual vector of the development of the epizootic process. *Vestnik Rossel'khozakademii*. 2008; (4): 58-60. (in Russian)
18. Makarov V.V., Sukharev O.I., Gulyukin A.M., Sokolov M.N., Litvinov O.B. Rabies of raccoon dogs: statistical analysis of morbidity. *Veterinariya*. 2009; (6): 20-5. (in Russian)

19. Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Kulakova S.R., Amirova I.V. Improvement of measures to combat rabies in the Smolensk region. *Veterinariya*. 2011; (4): 24-7. (in Russian)
20. Chupin S.A., Chernyshova E.V., Metlin A.E. Genetic characteristics of field isolates of the rabies virus, detected on the territory of the Russian Federation in the period 2008-2011. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(4): 44-9. (in Russian)
21. Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Parshikova A.V. Analysis of patterns of epizootic rabies in the European part of the Russian Federation. *Veterinariya i kormlenie*. 2015; (1): 29-34. (in Russian)
22. Shabeykin A.A., Zaykova O.N., Gulyukin A.M. Overview of the epizootic situation of rabies in the Russian Federation for the period from 1991 to 2015. *Veterinariya Kubani*. 2016; (4): 4-6. (in Russian)
23. Herwijnen R.V., Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Khismatullina V.A., Tsaregradskiy P.Yu., Parshikova A.V. Overview of the epizootic situation of rabies that has developed in the Russian Federation in 2014. *Veterinariya i kormlenie*. 2015; (2): 19-23. (in Russian)
24. Shabeykin A.A., Gulyukin A.M. Overview of the epizootic situation on rabies for 2015 in the Russian Federation. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016; 56(8): 57-66.
25. Svochina M.A., Absatirov G.G., Shalmenov M.Sh., Sidorchuk A.A., Gulyukin A.M. Epizootiological characteristics of animal rabies in the West Kazakhstan region. *Biology and Medicine*. 2015; 7(5): 152.
26. Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Polyakova I.V., Metlin A.E. Molecular-genetic characteristics of field isolates of the rabies virus, found in the Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(3): 101-8. (in Russian)
27. Shabeykin A.A., Zaykova O.N., Parshikova A.V., Yuzhakov A.G. Ispol'zovanie GIS-tekhnologii pri otsenke riskov v epizootologicheskom issledovanii. In: «Scientific Perspectives of the XXI Century. Achievements and Prospects of the New Century». *Proceedings of the X International Practical Conference [«Nauchnye perspektivy XXI veka. Dostizheniya i perspektivy novogo stoletiya»]*. Sbornik trudov X Mezhduнародной prakticheskoy konferentsii]. Novosibirsk; 2015: 50-4. (in Russian)
28. Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Khismatullina N.A. Experience in the use of GIS technologies in risk assessment in an epizootic study. In: *Proceedings of the V International Veterinary Congress [Trudy V Mezhduнародного veterinarnogo kongressa]*. Moscow; 2015: 250-2. (in Russian)
29. Gulyukin A.M., Smolyaninov Y.I., Shabeykin A.A. The economic damage caused by Rabies of agricultural animals in Russia. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016; 56(8): 34-8.
30. Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Petrova T.P., Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Karimov M.M., et al. The epizootic situation and the fight against rabies in the Kaliningrad region. *Veterinariya*. 2015; (4): 9-13. (in Russian)
31. Makarov V.V., Sukharev O.I., Gulyukin A.M., Litvinov A.B. Trends in the spread of rabies in Eastern Europe. *Veterinariya*. 2008; (8): 20-2. (in Russian)
32. Khismatullina N.A., Petrova T.P., Gulyukin A.M., Sabirova V.V., Gafarova A.Z., Nasyrov Sh.M., et al. Control of the effectiveness of vaccine prophylaxis for rabies in wild fauna in the Kaliningrad region of the Russian Federation. *Veterinarnyy vrach*. 2012; (6): 8-11. (in Russian)
33. Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Belimenko V.V. Epizootological geoinformation systems. Opportunities and prospects. *Veterinariya*. 2016; (7): 21-4. (in Russian)
34. Belimenko V.V., Gulyukin A.M. Prospects for the use of Geographic Information Systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016; 56(8): 22-5.
35. Belimenko V.V., Gulyukin A.M., Novosad E.V., Shabeikin A.A. Prospects of application of geoinformational systems for veterinary geology. In: *Conference Materials of 7th International Conference on Medical Geology — Medgeo*. Moscow; 2017: 61-2.

Поступила 10.12.17

Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.31:547.918].03:616.921.5+616.98:578.828.6]=092:612.017.1.064

**Криворутченко Ю.Л.<sup>1</sup>, Носик Д.Н.<sup>2</sup>, Малыгина В.Ю.<sup>1</sup>, Лобач О.А.<sup>2</sup>, Андроновская И.Б.<sup>1</sup>, Курсанова М.А.<sup>1</sup>, Гришковиц В.И.<sup>1</sup>**

## ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРИТЕРПЕНОВОГО САПОНИНА ТАУРОЗИДА Sx1 И ЕГО ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ВИЧ-1 И ГРИППОЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ У МЫШЕЙ

<sup>1</sup> Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» Минобрнауки России, 295051, г. Симферополь, Крым;

<sup>2</sup> Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Тритерпеновый сапонин таурозид Sx1, полученный из листьев плюща крымского *Hedera taurica* Carr. (семейство Araliaceae), был исследован в плане его цитотоксической активности в отношении линий лимфобластоидных клеток MT-4, Jurkat-tat, U937 и моноцитов периферической крови человека. Также была проведена оценка способности сапонина влиять на репликацию ВИЧ-1 *in vitro*. Кроме того, была изучена способность таурозид Sx1 увеличивать выживаемость мышей, зараженных вирусом гриппа A/WSN/1/33(H1N1), и усиливать иммунный ответ животных, иммунизированных коммерческой гриппозной вакциной Гриппол®. Показано, что таурозид Sx1 наполовину подавляет жизнедеятельность клеток линии MT-4 в концентрации 25 мкг/мл, ИК<sub>50</sub> 33,3 микроМоль/л (50% ингибирующая концентрация, метилтетразолиевый тест). В концентрации 5 мкг/мл он не проявлял токсических свойств по отношению ко всем исследованным линиям клеток и умеренно ингибировал продукцию р24 ВИЧ в клетках линии Jurkat-tat. В меньших концентрациях таурозид Sx1 также не стимулировал продукцию р24 ВИЧ. Было установлено, что пероральное введение 200 мкг таурозид Sx1 мышам, инфицированным вирусом гриппа, вызывает 1,5-кратное увеличение их выживаемости по сравнению с выживаемостью зараженных мышей в контроле. Пероральное введение сапонина усиливало иммунопотенцирующее действие субъединичной гриппозной вакцины, вводимой внутримышечно. Продукция антител была значительно выше у животных, получавших таурозид Sx1 перорально после первичной или повторной иммунизации. У вакцинированных

**Для корреспонденции:** Лобач Ольга Александровна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусов иммунодефицита Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, г. Москва. E-mail: victoriola@yandex.ru

мышей, получавших после каждой иммунизации сапонин в дозе 200 мкг в сутки, через 1–3 нед после каждой иммунизации наблюдалось 2–10-кратное усиление выработки вирусспецифических антител к Н1, Н3 и гемагглютинину вируса гриппа типа В. Таким образом, таурозид Sx1 можно рассматривать как малотоксичное иммунопотенцирующее средство, не усиливающее репликацию ВИЧ-1.

**Ключевые слова:** сапонин; цитотоксичность; вирус гриппа; ВИЧ-1; противовирусный эффект; вакцина; иммунопотенцирование.

**Для цитирования:** Криворутченко Ю.Л., Носик Д.Н., Малыгина В.Ю., Лобач О.А., Андроновская И.Б., Кирсанова М.А., Гришковец В.И. Цитотоксические свойства тритерпенового сапонина таурозид Sx1 и его воздействие на ВИЧ-1 и гриппозную инфекцию у мышей. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 123-129.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-123-129>

**Krivorutchenko Yu.L.<sup>1</sup>, Nosik D.N.<sup>2</sup>, Maligna V.Yu.<sup>1</sup>, Lobach O.A.<sup>2</sup>, Andronovskaja I.B.<sup>1</sup>, Kirsanova M.A.<sup>1</sup>, Grishkovets V.I.<sup>1</sup>**

### CYTOTOXIC PROPERTIES OF TRITERPENE SAPONIN TAUROSID Sx1 AND ITS EFFECT ON HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND INFLUENZA VIRUS INFECTION IN MICE

<sup>1</sup>Medical Academy named after S.I. Georgievsky, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «V. I. Vernadsky Crimean Federal University», Simferopol, 295051, Republic of Crimea, Russian Federation;

<sup>2</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Triterpene saponin Taurosid Sx1 purified from leaves of the plant Crimean Ivy *Hedera taurica* Carr. (Araliaceae) was evaluated for its cytotoxic activity against lymphoblastoid cell lines MT-4, Jurkat-tat, U937, and human peripheral blood monocytes. The ability of saponin to influence HIV-1 replication was studied as well. In addition, the ability of Taurosid Sx1 to increase survival of mice infected with influenza virus A/WSN/1/33(H1N1) and its capacity for strengthening the immune responses in mice immunized with the influenza vaccine Grippol® have been studied. Taurosid Sx1 has been shown to inhibit MT-4 cell line at 25 µg ml<sup>-1</sup> concentration, IC50 33,3 µmol l<sup>-1</sup> (MTT assay). The saponin concentration of 5 µg ml<sup>-1</sup> was non-toxic for all the cell lines studied and demonstrated a moderate inhibitory effect on HIV p24 production in Jurkat-tat cells. In the lower concentrations Taurosid Sx1 did not stimulate HIV p24 production. It was shown that oral administration of 200 µg Taurosid Sx1 to the influenza virus infected mice caused 1.5–fold increase in their survival. Taurosid Sx1 given orally amplified immunopotentiating ability of an intramuscularly administered subunit influenza vaccine. Antibody production was significantly higher in animals fed Taurosid Sx1 after primary or secondary immunization. In mice given 2 doses of vaccine, from 1 to 3 weeks apart, feeding 200 µg saponin resulted in 2 to 10-fold enhancement in production of anti-H1, anti-H3, and anti-influenza type B hemagglutinin antibodies. Thus, Taurosid Sx1 can be considered as low-toxic promising immunopotentiating agent incapable of enhancing HIV-1 replication.

**Key words:** saponin; cytotoxicity; influenza virus; HIV-1; antiviral effect; vaccine; immunopotential.

**For citation:** Krivorutchenko Yu.L., Nosik D.N., Maligna V.Yu., Lobach O.A., Andronovskaja I.B., Kirsanova M.A., Grishkovets V.I. Cytotoxic properties of triterpene saponin taurosid Sx1 and its effect on human immunodeficiency virus and influenza virus infection in mice. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3): 123-129. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-123-129>

**For correspondence:** Olga A. Lobach, Cand. Sci. Biol., senior researcher of the laboratory of immunodeficiency viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, FGBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: [victoriola@yandex.ru](mailto:victoriola@yandex.ru)

#### Information about authors:

Krivorutchenko Yu.L., <http://orcid.org/0000-0003-1380-983X>; Nosik D.N., <http://orcid.org/0000-0001-5757-5671>;  
Lobach O.A., <http://orcid.org/0000-0001-9351-6433>; Andronovskaja I.B., <http://orcid.org/0000-0001-9053-1785>;  
Kirsanova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-5559-0050>; Grishkovets V.I., <http://orcid.org/0000-0003-2815-2893>

**Acknowledgments.** We are grateful to Britta Wahren and Jorma Hincula from the Swedish Research Institute for Infectious Disease Control, Stockholm, for their help in conducting and interpreting results of the studies of the saponin Tauroside Sx-1 influence on HIV-1 infection in cell cultures.

The research was partially supported by the Research Development Program of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «V. I. Vernadsky Crimean Federal University» of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation for 2015-2024, Project “Applicable Academic Mobility Support of the Institution Researchers”.

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

Received 31 October 2017  
Accepted 12 December 2017

Инфекции, вызываемые вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ) и гриппа, являются глобальной угрозой человечеству из-за проблем вакцинопрофилактики и распространения резистентности возбудителей к противовирусным препаратам. У 10–15% пациентов с впервые выявленной ВИЧ-1-инфекцией обнаруживаются мутации вирусного генома, связанные с устойчивостью к ингибиторам обратной транскриптазы и протеазы [1]. В 2003–2009 гг. началось всемирное распространение амантадинустойчивых вирусов гриппа А(H3N2) и А(H1N1), а с 2007 г. – распространение ви-

русов А(H1N1), резистентных к ингибитору нейраминидазы озельтамиву [2]. Высокая антигенная изменчивость вируса и непротективный характер иммунитета, возникающего при ВИЧ-инфекции, явились основными препятствиями при конструировании анти-ВИЧ-вакцин [3]. Вакцинопрофилактика гриппа, напротив, применяется широко. Однако почти ежегодное возникновение иммунологически изменённых вариантов вирусов и необходимость предсказания структуры новых протективных антигенных детерминант создают трудности при производстве гриппозных вакцин. В итоге за последние

20 лет существенно изменились способы получения антигенов и состав адьювантов для гриппозных вакцин. Были лицензированы новые адьюванты, такие как вирусомы – везикулы с антигенами вирусов, покрытыми фосфолипидной бислоидной мембраной, и адьюванты на основе сквалена, ненасыщенного углеводородного производного витамина А. К последним относятся термообратимая система масло-в-воде, адьюванты MF59 и AS03, состоящие из витамина Е, сквалена и сурфактанта полисорбата 80 [4]. В этот же период в России была разработана конъюгированная гриппозная вакцина Гриппол, содержащая в качестве адьюванта линейный синтетический полиэлектролит полиоксидоний [5].

Проблемы вакцинопрофилактики и устойчивости вирусов к химиопрепаратам стимулировали поиск новых веществ, обладающих противовирусной и иммуномодулирующей активностью. В отношении биологически активных веществ природного происхождения традиционными источниками получения антимикробных и иммуномодулирующих средств являются высшие растения. Экстракты некоторых растений имеют антибактериальные и противовирусные свойства. Так, было показано, что экстракты африканского растения *Combretum adenogonium Steud.* Ex A. Rich (семейство Combretaceae) могут подавлять рост бактерий при минимальной ингибирующей концентрации 0,3–5,0 мг/мл и снижать активность протеазы ВИЧ-1 при 50% ингибирующей концентрации (ИК<sub>50</sub>) 24,7–26,5 мкг/мл. Эти экстракты содержали флавоноиды, терпеноиды, алкалоиды, танины и сапонины [6]. Сапонины являются амфифильными гликозидами, которые могут создавать комплексы с холестерином и изменять свойства углеводов клеточных мембран. Некоторые сапонины лизируют эритроциты и опухолевые клетки. Их цитотоксичность и антипролиферативное действие изучаются в плане использования для лечения онкологических заболеваний [7]. Сапонины имеют противовоспалительные, антифунгальные и другие свойства, делающие их перспективными объектами для создания лекарств. Отдельные сапонины подавляют репродукцию вирусов. Например, сапонин глицирризин из *Glycyrrhiza glabra* L. подавляет репликацию ВИЧ-1 путём частичного блокирования адсорбции вируса на CD4<sup>+</sup>-клетки [8]. Некоторые сапонины усиливают иммунный ответ на микробные антигены. Так, на основе тритерпеновых сапонинов из мыльного дерева *Quillaja saponaria* Molina созданы иммуностимулирующие комплексы ISCOMs (смесь целевых антигенов, сапонинов, холестерина, фосфолипидов) и ISCOMATRIX, не включающие антигенов. В качестве адьювантов они увеличивают выработку антиген-специфических антител и усиливают Th1-, Th2- и CD8-T-клеточные иммунные ответы. Активным компонентом *Quillaja*-сапонинов является гликозид QS-21. Этот сапонин токсичен, что ограничивает его использование в вакцинах. Однако адьюванты на основе *Quillaja*-сапонинов интенсивно изучаются в процессе клинических испытаний вакцин против гриппа, гепатита С, папилломавирусной и других инфекций [9].

Ранее нами были исследованы некоторые сапонины таурозиды из крымского плюща *Hedera taurica* Carag. Было показано, что таурозиды H<sub>2</sub>, St-K и I усиливают образование у мышей антител, специфичных к gp160 и gp120 ВИЧ-1. Вместе с тем таурозиды H<sub>2</sub> и St-K стимулировали репродукцию ВИЧ-1, а таурозид I – её снижал [10]. Другой сапонин таурозид Sx1 подавлял рост грибов рода *Candida* и усиливал устойчивость мышей к кандидозной

инфекции [11]. Это позволило рассматривать таурозид Sx1 как потенциальное антифунгальное средство, однако стимуляция репродукции ВИЧ-1 другими таурозидами поставила вопрос о безвредности таурозида Sx1 при его введении ВИЧ-инфицированным пациентам.

Целью настоящей работы явилось изучение цитотоксических свойств таурозида Sx1, его воздействия на репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток, течение экспериментальной гриппозной инфекции и развитие иммунного ответа при вакцинации мышей вакциной Гриппол.

### Материал и методы

**Сапонин.** Тритерпеновый сапонин таурозид Sx1 с формулой 3-O-a-L рамнопиранозил(1->2)-a-L-арабинопиранозид хедерагина был выделен из крымского плюща *Hedera taurica* Carag. (Araliaceae), как описано ранее [12].

**Вакцина Гриппол.** Использовали субъединичную вакцину Гриппол (ФДУП НВО «Микроген», Москва), включающую гемагглютинины вируса гриппа A/VR-116 (H1N1), подобного вирусу A/New Caledonia/20/99, и NYMC X-157 (A/New York/55/2004), подобного вирусу A/California/7/2004 (H3N2), а также штамма B/Jiangsu/10/2003, подобного вирусу B/Shanghai/361/2002.

**Вирусы.** Использовали ВИЧ-1-LAI, полученный в Шведском институте по контролю инфекционных заболеваний (Стокгольм) с исходной инфицирующей дозой 20 ТЦД<sub>50</sub>. Вирус гриппа A/WSN/1/33 (H1N1), адаптированный к мышам путём серийных пассажей, представлял собой аллантоисную жидкость с концентрацией вируса 200 ЛД<sub>50</sub> [13].

**Клетки.** Использовали лимфобластные клетки линии МТ-4, Jurkat-tat, моноцитарную линию U937 и лимфоциты периферической крови человека (ЛПК). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки коров, 2 мкМ L-глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 МЕ/мл стрептомицина и 10 Е/мл интерлейкина-2 в присутствии сапонина или без него при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

**Изучение цитотоксического действия таурозида Sx1 на клетках линии МТ-4.** Токсичность сапонина определяли с помощью метилтетразолиевого теста (МТТ-тест). Он позволяет количественно оценить способность оксидоредуктаз митохондрий живых клеток восстанавливать жёлтый 3-[4,5 диметил-2-тиазолил]-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ, «Sigma», США) до пурпурного формазана [14]. В лунки 96-луночных планшетов («Costar», США) вносили по 2,5×10<sup>4</sup> клеток и добавляли таурозид Sx1 в разных концентрациях. Планшеты инкубировали 3 дня при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем в лунки добавляли по 25 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в фосфатном буферном растворе) и инкубировали еще 3–4 ч. Далее образовавшийся формазан растворяли детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН, «Panreac», Испания): 20% раствор ДСН вносили по 50 мкл в лунки и оставляли на 15–17 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Окрашивание раствора определяли по оптической плотности при длине волны 570 нм на планшетном спектрофотометре Мультискан. Токсичность разных концентраций сапонина выражали в процентах к принятому за 100% контролю интактных клеток.

**Определение выживаемости клеток.** Выживаемость определяли путём окрашивания клеток красителем трипановым синим. В лунки 96-луночных планшетов вносили по 10<sup>5</sup> клеток исследуемых линий и добавляли по 50 мкл раствора таурозида Sx1 до конечных концентраций 0,5, 1 и 5 мкг/мл. Клетки инкубировали 3, 7 и 11 дней при

37°C и 5% CO<sub>2</sub>, после чего учитывали их выживаемость. Для этого к клеткам добавляли раствор трипанового синего и с помощью камеры Горяева подсчитывали количество живых (неокрашенных) и мёртвых (окрашенных) клеток.

*Изучение действия сапонина на ВИЧ-1 в культуре клеток Jurkat-tat.* Исследование проводили, как описано ранее [10]. Клетки Jurkat-tat заражали вирусом ВИЧ-1-LAI в дозе 20 ТЦД<sub>50</sub>/мл. Аликвоты вируса и растворов сапонина по 50 мкл, а также 100 мкл суспензии, содержащей 10<sup>5</sup> клеток, вносили в лунки одновременно. Сапонин добавляли до конечной концентрации 0,5, 1 и 5 мкг/мл. На 3-й и 7-й дни культивирования жидкость из лунок отбирали для определения концентрации р24 ВИЧ-1 с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). После отбора жидкости на 3-й день в лунки добавляли сапонин для поддержания его постоянной концентрации.

*Твердофазный ИФА для определения р24 ВИЧ-1.* ИФА проводили, как описано ранее [10]. 96-луночные планшеты сенсibilizировали поликлональными кроличьими анти-р24 ВИЧ-1-антителами. В качестве стандарта белка р24 использовали разведения лизата вируса, откалиброванные по стандартному антигену для ИФА фирмы «DuPont». Пробы вносили в планшеты и инкубировали в течение ночи, затем добавляли моноклональные антитела к р24, меченные пероксидазой хрена. Далее анализ выполняли по стандартной схеме.

*Изучение действия таурозидов Sx1 на развитие гриппозной инфекции у мышей.* Использовали самцов мышей линии BALB/c 10–12-недельного возраста массой 16–18 г. Их заражали вирусом гриппа А/WSN/1/33 (H1N1) интраназально под эфирным наркозом, как описано ранее [13]. В носовые ходы вводили по 50 мкл разведённой аллантоисной жидкости с содержанием вируса 10 ЛД<sub>50</sub>. Таурозид Sx1 вводили перорально по терапевтической схеме. Мышей поили водными растворами сапонина дважды в день по 20 мкл/введение в течение 72 ч после заражения. Животные получали сапонин в дозах 20, 200 или 2000 мкг/мышь/сут. Мышам контрольных групп (контроль вируса) после заражения вводили дистиллированную воду. Результаты учитывали в течение 14 дней после заражения по количеству выживших животных.

*Изучение влияния таурозидов Sx1 на формирование иммунитета у мышей при вакцинации вакциной Гриппол.* Мышей линии BALB/c массой 25–30 г иммунизировали однократно внутримышечным введением 0,1 мл вакцины, разведённой 1:10 изотоническим раствором хлорида натрия. Таурозид Sx1 вводили перорально дважды в день в течение 3 дней после иммунизации по 20 мкл раствора с концентрацией 5 мг/мл сапонина (200 мкг/мышь/день). Животным контрольной группы перорально вводили дистиллированную воду. Для определения титров антигемагглютининовых антител на 4, 14 и 21-й день у мышей брали кровь из хвостовой вены. Через 4 мес (120-й день после иммунизации) кровь снова забирала для выявления остаточных титров антител и проводили ревакцинацию. Через 5 дней кровь забирала для определения вторичного иммунного ответа. Титры антител определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с формализированными эритроцитами кур, используя следующие диагностические для РТГА: А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Нью-Йорк/55/04 (H3N2), В/Хабаровск/14/05 (Институт им. Пастера, Санкт-Петербург).

*Статистическая обработка.* Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью *t*-теста Стьюдента для непарных выборок, используя программу Microsoft Office Excel 2007. Определяли средние значения и ошибку средних ( $M \pm m$ ). Достоверными считали различия при значениях  $p < 0,05$ .

## Результаты

Цитотоксичность таурозидов Sx1 изучали на клетках линий МТ-4, Jurkat-tat, U937 и ЛПК человека. Действие на клетки МТ-4 сапонина в концентрациях 0,078–50,0 мкг/мл оценивали с помощью МТТ-теста. Клетки в присутствии сапонина культивировали в течение 3 дней. Результаты изучения действия таурозидов Sx1 на клетки МТ-4 представлены на рис. 1.

Анализ жизнеспособности клеток МТ-4 по оценке активности митохондриальных оксидоредуктаз показал, что в концентрации 6,25 мкг/мл (8,3 мкМ) и менее сапонин нетоксичен. Токсический эффект был выражен при концентрации таурозидов Sx1 25 мкг/мл (33,3 микроМоль/л). Число клеток, сохранивших жизнеспособность в присутствии 25 мкг/мл таурозидов Sx1 (43,0 ± 0,9%), было достоверно ниже числа клеток, выживших при промежуточной концентрации сапонина 12,5 мкг/мл (73,6 ± 2,7%;  $p < 0,01$ ). Поскольку добавление 25 мкг/мл таурозидов Sx1 приводило к подавлению жизнеспособности 57% клеток, было решено считать, что ИК<sub>50</sub> таурозидов Sx1 для клеток МТ-4 составляет 33,3 микроМоль/л. Отсутствие токсичности у таурозидов Sx1 в концентрациях ниже 6 мкг/мл было подтверждено при определении выживаемости клеток линий Jurkat-tat и U937, а также ЛПК с помощью окрашивания трипановым синим. При добавлении к этим клеткам сапонина в концентрациях 0,5, 1 и 5 мкг/мл количества выживших клеток в опыте и контроле не различались. Результаты оценки жизнеспособности клеток разных типов при инкубации в присутствии 5 мкг/мл таурозидов Sx1 приведены в табл. 1.

С помощью ИФА было изучено влияние таурозидов Sx1 в концентрациях 0,5–5,0 мкг/мл на продукцию заражёнными клетками Jurkat-tat белка р24 ВИЧ-1. На 3-й день наблюдения изменений в продукции р24 ВИЧ-1 не происходило, однако, к 7-му дню добавление к клеткам 5 мкг/мл таурозидов Sx1 снижало выработку р24 ВИЧ-1 на 35% ( $p < 0,01$ ). В меньших концентрациях сапонин такого эффекта не давал (табл. 2).

Итак, в нецитотоксической концентрации 5 мкг/мл таурозид Sx1 снижал выработку вирусного белка, но не мог блокировать репликацию ВИЧ-1 полностью.

Влияние таурозидов Sx1 на вирусную инфекцию на изменённом уровне изучали на модели гриппа. Мышей BALB/c интраназально заражали вирусом А/WSN/1/33 (H1N1). Затем в течение 3 сут перорально вводили са-

Таблица 1

**Влияние таурозидов Sx1 в концентрации 5 мкг/мл на выживаемость ЛПК, клеток линий Jurkat-tat и U937**

Тип клеток	Концентрация жизнеспособных клеток, млн/мл					
	3-й день		7-й день		11-й день	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Jurkat-tat	0,50	0,54	1,3	1,8	1,27	1,39
U937	0,28	0,21	0,38	0,41	0,42	0,49
ЛПК	0,18	0,15	0,83	0,63	1,29	1,25

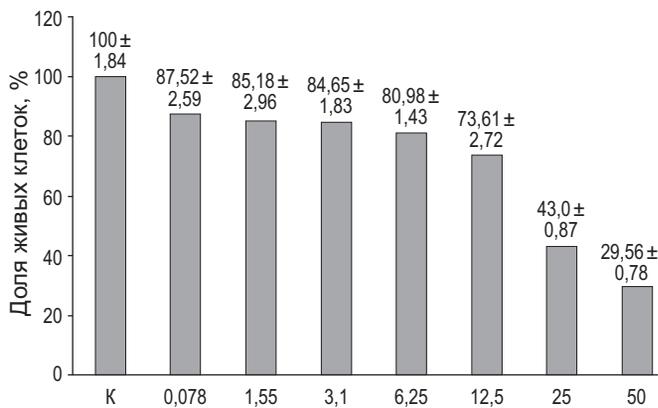


Рис. 1. Влияние сапонина таурозида Sx1 на жизнеспособность клеток линии МТ-4, определяемую по активности дегидрогеназ митохондрий (МТТ-тест). Различия уровней жизнеспособности клеток при концентрациях сапонина 12,5 и 25,0 мкг/мл достоверны ( $p < 0,01$ ).

По оси ординат – выживаемость клеток (в %) по отношению к контролю (К).

понин по 20–2000 мкг/сут. Результаты оценивали по выживаемости животных в течение 14 сут (рис. 2).

Как показано на рис. 2, к 7-му дню наблюдений введение таурозида Sx1 не приводило к значимым изменениям выживаемости животных по сравнению с контролем. Однако к 14-му дню в дозе 200 мкг/мышь/сут таурозид Sx1 проявлял протективный эффект – в 1,5 раза снижал долю погибших мышей ( $55,0 \pm 7,6\%$ ) по сравнению с контролем ( $84,2 \pm 6,5\%$ ;  $p = 0,031$ ). В дозе 2000 мкг/мышь/сут сапонин такого действия не оказывал (на рис. 2 не показано).

Наличие у таурозида Sx1 протективного эффекта при экспериментальном гриппе явилось основанием для изучения его влияния на формирование иммунного ответа у мышей при иммунизации субъединичной вакциной Гриппол. Для оценки этого влияния одновременно с внутримышечной инъекцией вакцины мышам перорально вводили сапонин в дозе 200 мкг/день. Сапонин вводили в течение 3 дней после иммунизации. Ревакцинацию проводили на 120-й день эксперимента. Динамика изменений титров антигемагглютининовых антител, специфически реагирующих в РТГА с входящими в состав вакцины гликопротеинами вирусов гриппа, приведена на рис. 3.

Введение таурозида Sx1 к 21-му дню иммунизации приводило к достоверному 4–7-кратному увеличению выработки антител, специфичных ко всем типам гемагглютининов, 10-кратное повышение титров анти-

Н1-антител наблюдалось на 14-й день ( $p < 0,05$ ) и 2,5-кратное повышение титров антител к гемагглютинуину вируса типа В – на 4-й день после первичной иммунизации ( $p < 0,05$ ). К 120-му дню после вакцинации уровни антител в опытных и контрольных группах мышей сравнялись. Введение сапонина на 120-й день при ревакцинации приводило к существенному усилению накопления анти-Н1- и анти-Н3-антител на 5-й день после ревакцинации соответственно в 3,2 и 2,8 раза по сравнению с контролем. Стимуляции вторичного иммунного ответа к гемагглютинуину вируса гриппа В не наблюдалось.

## Обсуждение

Для оценки цитотоксических свойств растительных экстрактов и сапонинов широко используется МТТ-тест [7]. С его помощью было определено, что для лимфобластоидных клеток МТ-4 ИК<sub>50</sub> таурозида Sx1 является концентрация 25 мкг/мл, или 33,3 микроМоль/л. В дозах 6,25 мкг/мл (8,3 микроМоль/л) и менее этот сапонин токсического действия не оказывал. Изучение выживаемости клеток с помощью окрашивания трипановым синим показало, что таурозид Sx1 в концентрациях 5 мкг/мл и ниже также нетоксичен для клеток линий Jurkat-tat, U937 и ЛПК человека. Оказалось, что цитотоксические концентрации таурозида Sx1 из *Hedera taurica* Cav. (Araliaceae) близки соответствующим концентрациям тритерпеновых сапонинов из таких растений, как *Albizia procera* (Fabaceae/Mimosoideae), *Albizia julibrissin* Durazz. (Fabaceae/Mimosoideae) и *Lysimachia thyriflora* L. (Myrsinaceae/Primulaceae). Сапонины из этих растений проявляли цитотоксические и антипролиферативные свойства в отношении трансформированных и нормальных клеток в концентрациях 9,13 мкг/мл (50% снижение выживаемости фарингеальных раковых клеток линии HEPG2), 10 мкг/мл (ингибирование 80,8% фарингеальных раковых клеток линии Bel-7402) и 25 мкг/мл (подавление выживаемости 50,1% клеток меланомы линии НТВ-140 и 68,3% клеток нормальных фибробластов линии HSF) соответственно [15, 16].

Ранее было показано, что другие тритерпеновые сапонины из крымского плюща по-разному влияют на репродукцию ВИЧ-1 в культурах клеток: таурозид Н<sub>1</sub> и таурозид St-K стимулировали продукцию белков ВИЧ-1, а таурозид I – её снижал [10]. В настоящем исследовании установлено, что таурозид Sx1 в концентрации 5 мкг/мл на 1/3 снижает выработку р24 ВИЧ-1, а в меньших концентрациях не влияет на продукцию вирусного белка. Это позволяет отнести таурозид Sx1 к сапонинам, не стимулирующим репродукцию ВИЧ-1. Было продемонстрировано, что таурозид Sx1 оказывает выраженное фунгицидное действие на грибы рода *Candida*, вызывающие микозы у больных СПИДом [11]. Полученные в настоящей работе результаты указывают на то, что введение таурозида Sx1 в качестве антифунгального средства не представляет угрозы для ВИЧ-инфицированных пациентов. Неспособность таурозида Sx1 активировать ВИЧ-1 представляет интерес в плане безопасности его возможного введения как в терапевтических, так и в профилактических целях. Это тем более важно, что некоторые вещества, способные усиливать иммунный ответ и рассматриваемые сегодня как потенциальные адъюванты для вакцин, стимулируют репликацию ВИЧ-1. К ним, в частности, относятся не только определённые сапонины, но также мурамилдипептид (МДП) и многие химические производные МДП [17].

Таблица 2.

### Производство белка р24 ВИЧ в культуре инфицированных клеток Jurkat-tat в присутствии сапонина таурозида Sx1

Концентрация сапонина, мкг/мл	Концентрация белка р24 ВИЧ-1, нг/мл	
	3-й день наблюдений	7-й день наблюдений
Контроль	3,17 ± 0,25	14,76 ± 0,37
5,0	3,49 ± 0,11	9,54 ± 0,95*
1,0	3,29 ± 0,19	10,28 ± 1,84
0,5	3,35 ± 0,32	12,57 ± 0,42

Примечание. \* - разница между контролем и опытом достоверна ( $p < 0,01$ ).

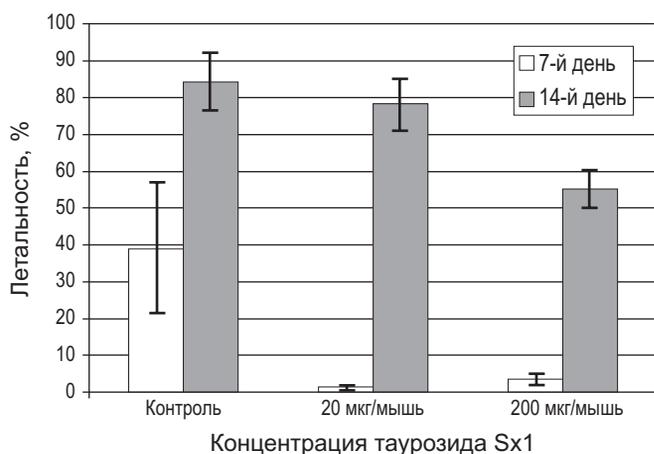


Рис. 2. Влияние перорального терапевтического введения таурозид Sx1 на динамику гибели мышей, инфицированных вирусом гриппа А/WSN/1/33 (H1N1).

У животных, получавших сапонин в дозе 200 мкг/мышь, на 14-й день летальность была достоверно ниже ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе заражённых мышей (сапонин не вводили). По оси абсцисс – дозы таурозид Sx1, вводившегося заражённым животным в опытных группах; в контроле сапонин мышам не вводили.

В работе показано, что таурозид Sx1 усиливает резистентность мышей BALB/c к инфекции, вызванной вирусом гриппа А(H1N1). Пероральное терапевтическое введение таурозид Sx1 в дозе 200 мкг/мышь/сут в 1,5 раза увеличивало выживаемость заражённых животных. Протективный эффект таурозид Sx1 был подобен иммунопотенцирующему действию сапонина из *Quillaja saponaria*. Так, сообщалось, что пероральное введение мышам 10 мг *Quillaja*-сапонина в комбинации с внутрибрюшинным введением антирабической вакцины увеличивало выживаемость заражённых вирусом бешенства животных до 90–100% по сравнению с мышами, которых иммунизировали вакциной без сапонина (выживаемость 25%) или вовсе не иммунизировали (выживаемость 0%). Авторы связывали эффект комбинированного введения сапонина и вакцины с усилением выработки антивирусных антител [18].

Ранее было установлено, что введение мышам тритерпеновых сапонинов таурозидов I и St-K при иммунизации животных экспериментальной вакциной на основе gpr160 ВИЧ-1 усиливает выработку антител, специфичных к gpr120 и gpr160 [10]. Наличие у таурозид Sx1 протективного действия при экспериментальном гриппе, адъювантных свойств у таурозидов I и St-K и данные об иммунопотенцирующем действии *Quillaja*-сапонина при бешенстве у вакцинированных мышей явились основанием для изучения в рамках данной работы влияния таурозид Sx1 на формирование иммунного ответа у мышей, иммунизированных вакциной Гриппол. Было установлено, что пероральное введение таурозид Sx1 в дозе 200 мкг/мышь/день после внутримышечной иммунизации и реиммунизации вакциной Гриппол стимулирует продукцию антител, специфичных ко всем типам гемагглютининов вирусом гриппа, представленных в вакцине. Наиболее сильно эффект проявлялся усилением выработки анти-H1-антител (10-кратное повышение титров на 14-й день, 4-кратное на 21-й день после первичной иммунизации и 3,2-кратное повышение титров после реиммунизации). Наименее выраженным было

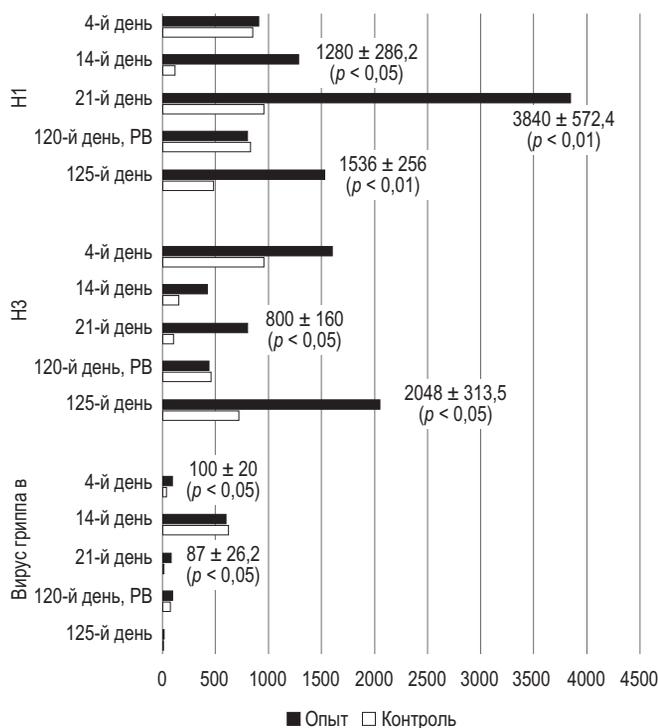


Рис. 3. Влияние таурозид Sx1 на динамику изменений титров антител, специфичных к гемагглютинином вирусом гриппа H1, H3 и вируса типа В, у мышей, внутримышечно иммунизированных вакциной Гриппол, при пероральном введении сапонина в дозе 200 мкг/день (опыт) после вакцинации и ревакцинации (РВ).

По оси ординат – типы вирусных гемагглютининов, к которым были специфичны исследуемые антитела, и сроки наблюдения. По оси абсцисс – обратные титры антигемагглютининовых антител; цифрами у столбцов обозначены обратные титры антител в опытной группе, достоверно превышающие ( $p < 0,05$ ) значения титров в контроле (сапонин не вводили).

усиление выработки антител к гемагглютинуину вируса типа В (2-кратное повышение титров на 4-й день и 4,4-кратное на 21-й день после первичной иммунизации, отсутствие эффекта после реиммунизации). Таким образом, таурозид Sx1 можно рассматривать как потенциальный иммуномодулятор, усиливающий протективный иммунный ответ как в условиях гриппозной инфекции, так и при иммунизации гриппозной вакциной.

### Выводы

1. Цитотоксической концентрацией тритерпенового сапонина таурозид Sx1 из *Hedera taurica* Carr. (Araliaceae), подавляющей жизнеспособность клеток лимфобластной линии МТ-4 на 57% (ИК<sub>50</sub>), является концентрация 25 мкг/мл (33,3 мкМ). В концентрации 5 мкг/мл и менее сапонин нетоксичен для трансформированных клеток линий МТ-4, Jurkat-tat, U937 и ЛПК человека.

2. Таурозид Sx1 в концентрации 5 мкг/мл на 35% снижает продукцию белка р24 ВИЧ-1 в клетках Jurkat-tat и не стимулирует репродукцию вируса в меньших дозах, что свидетельствует о потенциальной безопасности введения сапонина таурозид Sx1 ВИЧ-инфицированным лицам.

3. Пероральное введение таурозид Sx1 в дозе 200 мкг/день в 1,5 раза увеличивает выживаемость заражённых гриппом мышей и усиливает иммунный ответ на вну-

тримышечное введение вакцины Гриппол, увеличивая выработку антигемагглютининовых антител различной специфичности в 2–10 раз.

**Благодарность.** Авторы благодарят Бритту Вахрен и Йорму Хинкула, сотрудников Шведского института по контролю за инфекционными заболеваниями, за помощь в проведении и интерпретации результатов исследования действия сапонина таурозиды Sx1 на инфекцию ВИЧ-1 в культуре клеток.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Программы развития ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» на 2015–2024 гг. по проекту «Поддержка академической мобильности работников университета на заявительной основе».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-4, 6-10, 14-16, 18 см. REFERENCES)

- Салтыкова Т.С., Романенко В.В., Минаев О.В. Эпидемиологическая и экономическая эффективность иммунизации взрослого работоспособного населения вакциной «Гриппол® плюс». *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2015; (5): 65-71.
- Криворутченко Ю.Л., Кирсанова М.А., Андроновская И.Б. Антифунгальное действие тритерпенового сапонина таурозиды Sx1 из *Hedera taurica* Carr. в отношении клинических изолятов *Candida* spp. *Проблемы медицинской микологии.* 2015; 17(3): 42-5.
- Гришковец В.И., Толкачёва Н.В., Шашкова А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды из *Hedera taurica*. 10. Структура соединений F4, I и J из листьев крымского плюща. *Химия природных соединений.* 1992; (6): 683-6.
- Малыгина В.Ю., Андроновская И.Б., Криворутченко Ю.Л., Гришковец В.И. Зависимость протективного действия таурозиды Sx1 от доз, способа и схем введения сапонина при экспериментальном гриппе у мышей. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2012; 2(1-2): 98-102.
- Криворутченко Ю.Л., Андроновская И.Б., Чирва В.Я., Пертель С.С., Гришковец В.И., Земляков А.Е. и др. Влияние сапонинов из *Hedera taurica* Carr. и модифицированных мурамилпептидов на репродукцию вируса иммунодефицита человека *in vitro*. *Вопросы вирусологии.* 1997; 42(1): 34-6.
- Pingen M., Nijhuis M., de Bruijn J.A., Boucher C.A., Wensing A.M. Evolutionary pathways of transmitted drug-resistant HIV-1. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66(7): 1467-80.
- Hayden F.G., de Jong M.D. Emerging influenza antiviral resistance threats. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(1): 6-10.
- Cohen Y.Z., Dolin R. Novel HIV vaccine strategies: overview and perspective. *Ther. Adv. Vaccines.* 2013; 1(3): 99-112.
- Di Pasquale A., Preiss S., Da Silva F.T., Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel).* 2015; 3(2): 320-43.
- Saltykova T.S., Romanenko V.V., Minaev O.V. Epidemiological and economic efficiencies of immunization with the commercial influenza vaccine Grippol® plus in the able-bodied adult population. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2015; (5): 65-71. (in Russian)
- Mushi N.V., Mbwambo Z.H., Innocent E., Tewtrakul S. Antibacterial, anti-HIV-1 protease and cytotoxic activities of aqueous ethanolic extracts from *Combretum adenogonium* Steud. Ex A. Rich (Combretaceae). *BMC Complement. Altern. Med.* 2012; 12(1): 163.
- Podolak I., Galanty A., Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem. Rev.* 2010; 9(3): 425-74.
- Huang L., Chen C.H. Molecular targets of anti-HIV-1 triterpenes. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2002; 2(1): 33-6.
- Lee S., Nguyen M.T. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw.* 2015; 15(2): 51-7.
- Krivorutchenko Y.L., Andronovskaya I.B., Hinkula J., Krivoshein Y.S., Ljungdahl-Stahle E., Pertel S.S., et al. Study of the adjuvant activity of new MDP derivatives and purified saponins and their influence on HIV-1 replication *in vitro*. *Vaccine.* 1997; 15(12-13): 1479-86.
- Krivorutchenko Yu.L., Kirsanova M.A., Andronovskaya I.B. Antifungal action of triterpenoid saponin Sx1 from *Hedera taurica* Carr. against clinical isolates of *Candida* spp. *Problemy meditsinskoy mikologii.* 2015; 17(3): 42-5. (in Russian)
- Grishkovets V.I., Tolkacheva N.V., Shashkova A.S., Chirva V.Ya. Triterpene glycosides of *Hedera taurica*. X. The structure of the compounds F4, I and J from Crimean Ivy leaves. *Khimiya prirodnikh soedineniy.* 1992; (6): 683-6. (in Russian)
- Malygina V.Yu., Andronovskaya I.B., Krivorutchenko Yu.L., Grishkovets V.I. Dependence of taurosides Sx1 protective activity on the doses, ways and schemes of the saponin administration in experimental influenza virus infection of mice. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny.* 2012; 2(1-2): 98-102. (in Russian)
- Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods.* 1990; 130(1): 149-51.
- Melek F.R., Miyase T., Ghaly N.S., Nabil M. Triterpenoid saponins with N-acetyl sugar from bark of *Albizia procera*. *Phytochemistry.* 2007; 68(9): 1261-6.
- Galanty A., Michalik M., Sedek L., Podolak I. The influence of LTS-4, a saponoside from *Lysimachia thyriflora* L., on human skin fibroblasts and human melanoma cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2008; 13(4): 585-98.
- Krivorutchenko Yu.L., Andronovskaya I.B., Chirva V.Ya., Pertel' S.S., Grishkovets V.I., Zemlyakov A.E., et al. Effects of saponins derived from *Hedera taurica* Carr. and modified muramylpeptides on the *in vitro* reproduction of human immunodeficiency virus. *Voprosy virusologii.* 1997; 42(1): 34-6. (in Russian)
- Chavali S.R., Barton L.D., Campbell J.B. Immunopotentiality by orally-administered *Quillaja* saponins: effects in mice vaccinated intraperitoneally against rabies. *J. Clin. Exp. Immunol.* 1988; 74(3): 339-43.

Поступила 31.10.17

Принята в печать 12.12.17

Блохина Е.А., Равин Н.В.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ МОЗАИЧНЫХ НВс-ЧАСТИЦ, НЕСУЩИХ КОНСЕРВАТИВНЫЕ УЧАСТКИ М2-БЕЛКА И ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А

Институт биоинженерии ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, г. Москва

Вирусоподобные НВс-частицы, образуемые в результате самосборки ядерного антигена вируса гепатита В, могут быть использованы в качестве высокоиммуногенного носителя для презентации чужеродных эпитопов при создании рекомбинантных вакцин. Мы используем этот носитель для разработки противогриппозных вакцин, основанных на консервативных антигенах вируса гриппа, – внеклеточном домене трансмембранного белка М2 (М2е) и фрагменте второй субъединицы гемагглютинина (НА2). Представление на поверхности НВс-частиц должно повысить иммуногенность этих пептидов. С использованием методов генетической инженерии мы получили гибридный белок, в котором последовательность НА2 присоединена на N-конец НВс-антигена, а М2е-пептид включён в район иммунодоминантной петли, экспонируемой на поверхности НВс- частиц. Гибридный белок, выделенный из штамма-продуцента *Escherichia coli* в денатурирующих условиях, образовывал вирусоподобные НВс-частицы после рефолдинга *in vitro*. Рефолдинг этого белка в присутствии предварительно денатурированного НВс-антигена, не содержащего чужеродных вставок, позволил получить мозаичные вирусоподобные частицы. Разработанный нами метод позволит создавать мозаичные НВс-частицы, несущие различные целевые эпитопы вируса гриппа за счёт комбинации соответствующих модифицированных НВс-белков, что открывает возможность создания противогриппозных вакцин с более широким спектром защиты.

Ключевые слова: вирусоподобная частица; НВс-антиген; грипп; рекомбинантная вакцина; М2-белок; гемагглютинин.

Для цитирования: Блохина Е.А. Равин Н.В. Конструирование мозаичных НВс-частиц, несущих консервативные участки М2-белка и гемагглютинина вируса гриппа А. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 130-135.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-130-135>

Blokhina E.A., Ravin N.V.

## CONSTRUCTION OF MOSAIC HBc PARTICLES PRESENTING CONSERVATIVE FRAGMENTS OF M2 PROTEIN AND HEMAGGLUTININ OF INFLUENZA A VIRUS

Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, 119071, Russian Federation

Virus-like HBc particles formed as a result of the self-assembly of the nuclear antigen of the hepatitis B virus can be used as a highly immunogenic carrier for the presentation of foreign epitopes when creating recombinant vaccines. We use this vehicle to create influenza vaccines based on the conservative antigens of the influenza virus, the extracellular domain of the transmembrane protein M2 (M2e) and the fragment of the second subunit of hemagglutinin (HA2). Presentation on the surface of HBc particles should improve the immunogenicity of these peptides. Using genetic engineering techniques, we obtained a fusion protein in which the HA2 sequence is attached to the N-terminus of the HBc antigen, and the M2e peptide is included in the immunodominant loop region exposed on the surface of HBc particle. The hybrid protein expressed in *Escherichia coli* and purified under denaturing conditions formed virus-like HBc particles after refolding *in vitro*. Refolding of this protein in the presence of a previously denatured HBc antigen carrying no inserts resulted in formation of mosaic virus-like particles. The developed method will allow construction of mosaic HBc particles carrying different target epitopes of the influenza virus by combining the corresponding modified HBc proteins, which opens the possibility of creating vaccines with a wider spectrum of protection.

Key words: virus-like particle; HBc antigen; influenza; recombinant vaccine; M2 protein; hemagglutinin.

For citation: Blokhina E.A., Ravin N.V. Construction of mosaic HBc particles presenting conservative fragments of M2 protein and hemagglutinin of influenza A virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3): 130-135. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-130-135>

For correspondence: Elena A. Blokhina, PhD, research scientist of the Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, 119071, Russian Federation. E-mail: [blokhina-lena87@mail.ru](mailto:blokhina-lena87@mail.ru)

### Information about authors:

Blokhina E.A., <https://orcid.org/0000-0002-6038-3715>

Ravin N.V., <http://orcid.org/0000-0002-1456-1832>

**Acknowledgment.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 16-34-00976).

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

Received 20 November 2017

Accepted 12 December 2017

Для корреспонденции: Блохина Елена Александровна, канд. биол. наук, научный сотрудник, Институт биоинженерии ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, г. Москва. E-mail: [blokhina-lena87@mail.ru](mailto:blokhina-lena87@mail.ru)

## Введение

Рекомбинантные вирусоподобные частицы (ВПЧ), образующиеся в результате самосборки капсидных белков вирусов, могут быть использованы в качестве носителей чужеродных антигенов для разработки вакцин и диагностических средств. К числу наиболее широко используемых относятся ВПЧ, образуемые ядерным антигеном вируса гепатита В (НВс-частицы), поскольку они обладают высокой иммуногенностью, стабильностью, могут быть получены в различных системах гетерологической экспрессии и модифицированы методами генетической и белковой инженерии [1, 2].

НВс-частицы существуют в двух формах, состоящих из 180 или 240 копий субъединиц, которые в форме димеров собираются в симметричные икосаэдрические структуры, диаметр которых составляет 30 или 34 нм [3]. Вставки чужеродных пептидов могут быть осуществлены на генетическом уровне на N- или C-концы НВс-антигена либо между аминокислотами Asp78 и Pro79 в районе выступающей на поверхности НВс-частицы «иммунодоминантной» петли [4, 5]. Включения в этот участок наиболее перспективны для создания вакцин, поскольку иммунный ответ при вакцинации такими рекомбинантными НВс-частицами будет направлен в основном против включённого эпитопа [2]. В районе иммунодоминантной петли без нарушения сборки ВПЧ могут быть включены достаточно большие пептиды. Так, включение в этот район последовательности зелёного флуоресцентного белка (238 аминокислотных остатков – а.о.) не нарушало не только формирование ВПЧ, но и его способность флуоресцировать [6]. Однако структура включённого пептида должна соответствовать конформации акцепторного сайта, поэтому во многих случаях включение чужеродных пептидов приводило к образованию нерастворимого продукта и/или нарушало сборку химерных НВс-частиц [7].

Одним из путей решения этой проблемы может быть разграничение последовательности НВс-антигена и вставки специальными линкерами. Для этого часто используют гидрофильные богатые глицином последовательности, обеспечивающие гибкость всей структуры рекомбинантного белка [8]. Другим способом получить НВс-частицы, несущие такие «сложные» антигены, является получение мозаичных ВПЧ в результате совместной экспрессии немодифицированного НВс-антигена и НВс-антигена с чужеродной вставкой [9, 10]. Такие частицы будут нести меньшее количество эпитопов на своей поверхности, но обладать большей стабильностью за счёт немодифицированных молекул НВс. Поскольку НВс-частицы могут собираться из мономеров как *in vivo*, так и *in vitro*, для регулирования доли молекул НВс-антигена со вставкой в мозаичных частицах можно использовать метод совместного рефолдинга НВс-белков со вставкой и без неё. Кроме того, рефолдинг и сборка *in vitro* НВс-частиц после предварительной очистки белка в денатурирующих условиях позволяют получить ВПЧ с более высокой степенью чистоты, поскольку сформированные *in vivo* частицы могут при сборке включать компоненты клетки-продуцента [11].

НВс-частицы могут быть использованы в качестве носителя консервативных антигенов вируса гриппа А для разработки рекомбинантных противогриппозных вакцин [12]. В отличие от традиционных сезонных противогриппозных вакцин, которых обеспечивают иммунный ответ против вариабельных поверхностных антигенов вируса, гемагглютинина и нейраминидазы, использование консервативных антигенов даёт перспективу получения «универсальной» противогриппозной вакцины, защищающей от широкого спектра штаммов вируса гриппа А [13]. Наиболее перспективным кандидатом является внеклеточный домен трансмембранного белка М2 (М2е-пептид). Этот небольшой пептид (24 а.о., включая

N-концевой метионин) отличается высокой консервативностью у штаммов вируса гриппа А человека различных субтипов [12, 14]. Однако М2е-пептид обладает низкой иммуногенностью [15] и для индукции эффективного иммунного ответа должен быть присоединён к высокоиммуногенному адьюванту или носителю [13]. Ранее нами была показана возможность встраивания до 4 копий М2е-пептида в район иммунодоминантной петли НВс [16]. Такие ВПЧ обладали высокой иммуногенностью и обеспечивали защиту иммунизированных животных от заражения различными штаммами вируса гриппа А [17].

Однако основным антигеном вируса гриппа и наиболее важным компонентом вакцины, вызывающим (в отличие от М2е) образование вируснейтрализующих антител, является гемагглютинин. Вторая субъединица гемагглютинина (НА2) образует «стебель» молекулы гемагглютинина и менее подвержена мутационным изменениям, что позволило получить на основе соответствующего пептида препарат, обеспечивающий защиту от различных штаммов вируса гриппа [18]. Сочетание М2е- и НА2-пептидов в вакцинном препарате может обеспечить более разнообразный спектр антител у иммунизированных животных и повысить эффективность «универсальной» вакцины [19, 20].

Целью нашей работы было конструирование НВс-частиц, несущих одновременно консервативные пептиды М2е и НА2 вируса гриппа.

## Материал и методы

### *Пептиды вируса гриппа и богатые глицином линкеры*

В ходе работы были использованы последовательности М2е-пептида вируса гриппа штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (SLLTEVETPTRNEWESRSDSSD, М2еk), а также консенсусная последовательность консервативного участка второй субъединицы гемагглютинина НА2 потенциально пандемического штамма A/H2N2 от 35 до 107 а. о. (AADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLENLNKKNMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERT [20]). Оптимизированную для экспрессии в *Escherichia coli* по составу кодонов нуклеотидную последовательность, кодирующую этот белок, синтезировали *in vitro*. В качестве богатых глицином линкеров использовали последовательности Gly19 (GTSGSSGSGSGSGSGGGG) и Gly10 (GGGGSGGGG). Нуклеотидная последовательность, кодирующая Gly10, была получена в виде синтетического гена.

### *Конструирование экспрессионных векторов*

Для экспрессии белка НВс без вставок чужеродных пептидов использовали плазмиду pQE60-НВс, содержащую укороченную последовательность гена НВс, кодирующую НВс-антиген с 4 по 149 а.о., за которыми следует C-концевой цистеин [21].

Для встраивания последовательности НА2 на N-конец НВс-антигена использовали экспрессионный вектор pQE60-НВс/М2еk [16], кодирующий белок НВс/М2еk, содержащий одну копию М2е-пептида в районе иммунодоминантной петли НВс. Последовательность М2е-пептида в этом белке фланкирована последовательностями линкера Gly19. С помощью ПЦР на 5'-конец гена НВс/М2еk ввели дополнительные рестрикционные сайты NruI и EheI, по которым в дальнейшем проводили последовательное введение синтетических последовательностей двух копий богатого глицином линкера Gly10 и НА2.

Таким образом была получена плазида pQE60-НА2-НВс/М2еk, содержащая ген гибридного белка НА2-НВс/М2еk, включающего последовательность НВс-антигена, слитого с пептидом НА2 на N-конце молекулы, и включающего М2е-пептид в иммунодоминантной петле. Ген НА2-НВс/М2еk вырезали из этой плазмиды и клонировали по сайтам NcoI и HindIII в вектор p-ETM-10 (EBML), в результате чего был получен экспрессионный вектор pETM-10 НА2-НВс/М2еk.

### Создание штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, выделение целевых белков

Экспрессионные векторы pQE60-НВс и рЕТМ-10 HA2-НВс/М2ек вводили с помощью трансформации в штаммы *Escherichia coli* JM109 и BL21(DE3) соответственно. Для экспрессии целевых белков штаммы-продуценты выращивали в среде LB при 37°C на шейкере до середины логарифмической фазы роста ( $OD_{600} \sim 0,5-0,7$ ), затем вносили изопропил- $\beta$ -D-1-тио-галактопиранозид (ИПТГ) до 1 мМ и продолжали выращивать в тех же условиях в течение 12–16 ч. После индукции клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в буфере для лизиса (15 мМ фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,2; лизоцим 1 мг/мл) и инкубировали в течение 40 мин при 4°C. Разрушение клеток проводили посредством 6-кратной обработки ультразвуком по 30 с с интервалом 1 мин (Diagenode Bioprotor UCD 200). Клеточный лизат центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге Mikro 20 («Hettich», Германия). Для очистки белка HA2-НВс/М2ек отбирали осадок, для очистки НВс-частиц использовали супернатант.

Очистку белка HA2-НВс/М2ек проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-сорбенте в денатурирующих условиях. Для полной денатурации белка осадок после центрифугирования клеточного лизата суспендировали в денатурирующем буфере (15 мМ ФСБ pH 7,4; 6 М мочевины; 0,5 М NaCl) и инкубировали в течение 12–16 ч при 10°C. Нерастворимую фракцию удаляли путем центрифугирования (13 000 об/мин – 10 мин). К супернатанту добавляли имидазол до 10 мМ и выполняли сорбцию на HisLink Protein Purification Resin («Promega», США). Отмывку несвязавшихся белков проводили денатурирующим буфером с содержанием 20 мМ имидазола. Элюцию проводили в денатурирующих условиях (15 мМ ФСБ pH 7,4; 6 М мочевины; 0,5 М NaCl; 0,3 М имидазол).

Концентрацию белков в растворе определяли методом Бредфорда.

#### Очистка НВс-частиц

Очистку не содержащих вставку НВс-частиц выполняли с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности цезий хлористый – сахарозы. В поликарбонатные пробирки настилали последовательно начиная со дна пробирки растворы: 1,5 г/л хлористого цезия – 2 мл и 1,2 г/л хлористого цезия – 3 мл; 30% (w/v) сахарозы – 3 мл, 20% (w/v) сахарозы – 3 мл. Затем настилали до верха пробирки 1–1,5 мл содержащего НВс-частицы лизата из штамма JM109/pQE60-НВс. Пробирки центрифугировали 22 ч при 15°C в роторе SW40 Ti на ультрацентрифуге Optima L-90K («Beckman Coulter», США) при 36 000 об/мин. После центрифугирования отбирали опалесцирующую фракцию, содержащую НВс-частицы.

#### Рефолдинг белков HA2-НВс/М2ек и НВс in vitro

Для получения ВПЧ использовали препараты очищенного белка HA2-НВс/М2ек и НВс-частиц или их смеси в различных соотношениях. Концентрация белка при рефолдинге составляла 0,1 мг/мл. Для полной денатурации белков и восстановления дисульфидных связей проводили диализ против буфера, содержащего 50 мМ Tris HCl (pH 7,4), 6 М мочевины и 20 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола ( $\beta$ -МЕ), в течение 12–16 ч при 10°C. Следующий этап диализа выполняли в таком же буфере, но с концентрацией мочевины 4 М и без  $\beta$ -меркаптоэтанола. На третьем этапе (этап непосредственного рефолдинга) диализ проводили против буфера, содержащего глутатионовую редокс-систему: 50 мМ Tris HCl (pH 7,4), 2 М мочевины, 0,2 мМ oxidized glutathione (#2232C108, «Amresco», США) и 2 мМ reduced glutathione (#0251C491, «Amresco», США). Далее выполняли 2 стадии рефолдирующего диализа со ступенчатым понижением концентрации мочевины до 1 М и 0,5 М. На завершающем этапе проводили диализ против буфера, содержащего только 50 мМ Tris HCl (pH 7,4).

#### Атомно-силовая микроскопия

Структуру ВПЧ анализировали методом атомно-силовой

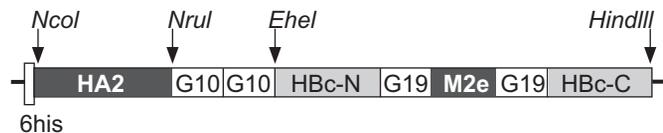


Рис. 1. Структура гена гибридного белка HA2-НВс/М2ек.

НВс-Н и НВс-С – участки НВс-антигена до и после точки включения М2е в иммунодоминантную петлю; 6 his – последовательность, кодирующая N-концевой 6-гистидиновый таг.

микроскопии с использованием микроскопа ИНТЕГРА Прима (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме.

## Результаты

### Дизайн и получение препаратов рекомбинантных белков

Консервативные антигены вируса гриппа, такие как М2е-пептид и стеблевой участок гемагглютинина, могут быть основой рекомбинантных противогриппозных вакцин широкого спектра действия. Поскольку включение в состав вакцины нескольких антигенов должно повысить её эффективность, мы получили гибридный белок HA2-НВс/М2ек, в котором к N-концу молекулы НВс-антигена была присоединена последовательность консервативного фрагмента второй субъединицы гемагглютинина HA2 [20], а в район иммунодоминантной петли включен М2е-пептид (рис. 1). Для обеспечения подвижности отдельных частей молекулы HA2-НВс/М2ек между фрагментом HA2 и НВс-антигеном были введены богатые глицином линкеры общей длиной 20 а.о., а М2е-пептид был фланкирован линкерами длиной 19 а.о. Чтобы избежать неконтролируемого

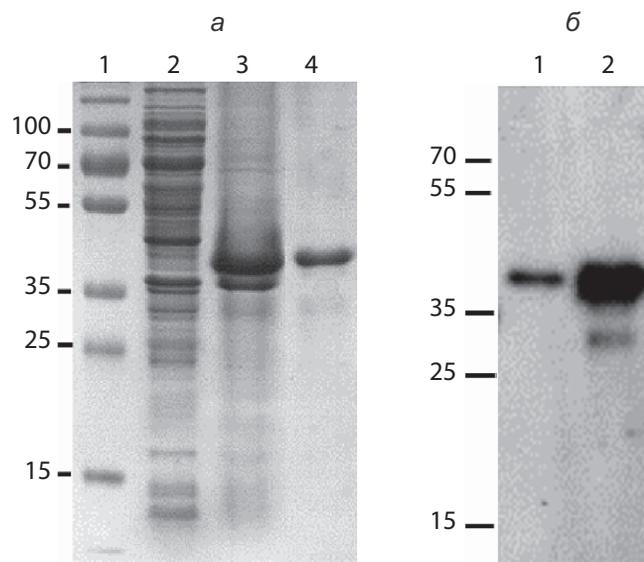


Рис. 2. Получение и очистка рекомбинантного белка HA2-НВс/М2ек.

а – результаты анализа белковых препаратов с помощью SDS-PAGE: 1 – маркер молекулярной массы (в кДа); 2 – белковый препарат из штамма-продуцента после индукции экспрессии HA2-НВс/М2ек, фракция растворимых белков клеточного лизата; 3 – то же, но фракция нерастворимых белков клеточного лизата; 4 – очищенный в денатурирующих условиях препарат рекомбинантного белка HA2-НВс/М2ек; б – вестерн-блот-анализ белковых препаратов: 1 – белковый препарат из штамма-продуцента после индукции экспрессии HA2-НВс/М2ек, фракция растворимых белков клеточного лизата; 2 – то же, но фракция нерастворимых белков клеточного лизата. Положения маркеров молекулярной массы (в кДа) указаны слева.

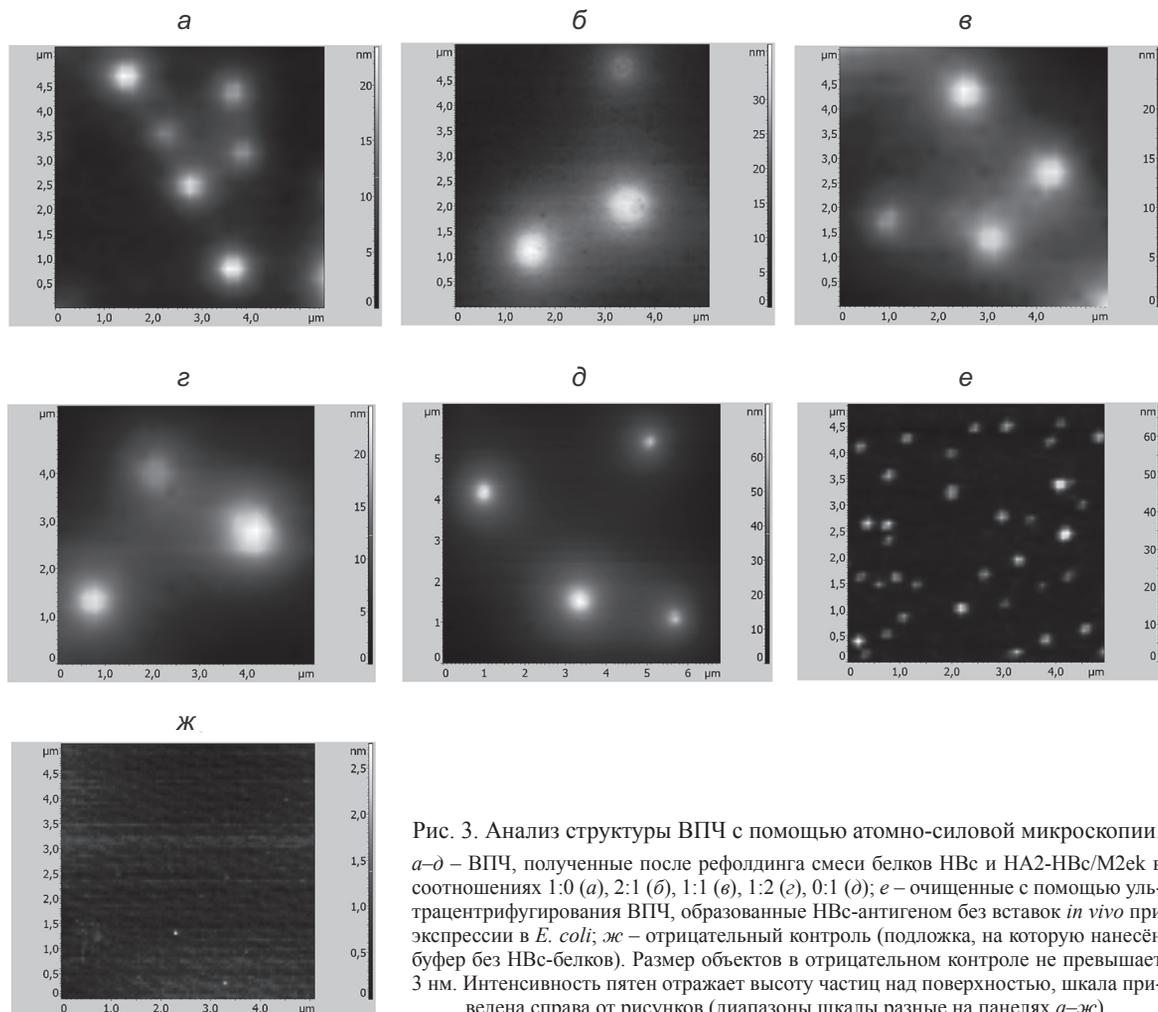


Рис. 3. Анализ структуры ВПЧ с помощью атомно-силовой микроскопии. *a-d* – ВПЧ, полученные после рефолдинга смеси белков НВс и НА2-НВс/М2ек в соотношениях 1:0 (*a*), 2:1 (*б*), 1:1 (*в*), 1:2 (*г*), 0:1 (*д*); *e* – очищенные с помощью ультрацентрифугирования ВПЧ, образованные НВс-антигеном без вставок *in vivo* при экспрессии в *E. coli*; *ж* – отрицательный контроль (подложка, на которую нанесён буфер без НВс-белков). Размер объектов в отрицательном контроле не превышает 3 нм. Интенсивность пятен отражает высоту частиц над поверхностью, шкала приведена справа от рисунков (диапазоны шкалы разные на панелях *a-ж*).

образования дисульфидных связей и как следствие агрегации рекомбинантного белка, в последовательности М2ек-пептида 2 цистеина в позициях 17 и 19 (считая от первого метионина в нативном М2) были заменены аминокислотными остатками серина. Такие замены не должны приводить к существенным изменениям иммунологических свойств М2е-пептида [22]. Кроме того, для предотвращения включения в полученные *in vivo* в *E. coli* НВс-частицы клеточной РНК, мы использовали укороченную последовательность НВс-антигена. Последовательность С-концевого фрагмента (после Val149), отвечающего за связывание с нуклеиновыми кислотами при сборке вириона, была удалена и заменена на цистеин, включение которого повышает стабильность НВс-частиц [23].

Полученный ген клонировали в векторе рЕТМ-10 под контролем промотора, узнаваемого Т7 РНК-полимеразой, при этом экспрессируемый рекомбинантный белок содержал полигистидиновый таг на N-конце. Этот белок был экспрессирован в штамме BL21(DE3) на высоком уровне, до 25–30% общего белка (рис. 2, *a*), и выявлялся антителами к М2е в вестерн-блоттинге (рис. 2, *б*). Однако анализ клеточных фракций показал, что практически весь белок НА2-НВс/М2ек находится в нерастворимой фракции. Изменение условий экспрессии (температура, концентрация ИППГ, время индукции) не позволило получить растворимый белок. Поэтому очистку рекомбинантного белка проводили в денатурирующих условиях с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-сорбенте (см. рис. 2, *a*).

Для получения НВс-антигена без вставок использовали век-

тор рQE60-НВс, обеспечивающий экспрессию укороченного НВс (с 4 по 149 а. о. и С-концевой цистеин), который образует ВПЧ *in vivo* в клетках штамма-продуцента [21]. Вирусоподобные НВс-частицы были очищены с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности цезий хлористый – сахароза. В дальнейшем их использовали как источник «немодифицированного» НВс.

*Получение мозаичных вирусоподобных НВ-частиц в результате рефолдинга in vitro*

Поскольку экспрессированный в *E. coli* белок НА2-НВс/М2ек оказался нерастворимым и его удалось выделить лишь в денатурирующих условиях, для получения ВПЧ проводили его рефолдинг через ступенчатый диализ совместно с белком НВс без чужеродных вставок. Изменение соотношения НВс и НА2-НВс/М2ек должно было обеспечить получение вирусоподобных НВс-частиц с различным числом представленных на них гриппозных эпитопов. С одной стороны, увеличение доли НВс без вставок должно облегчить формирование ВПЧ. С другой стороны, увеличение доли НА2-НВс/М2ек повышает вероятность встраивания этих молекул в формируемые ВПЧ и увеличивает число гриппозных эпитопов, представленных на их поверхности.

В связи с этим выполняли рефолдинг смеси очищенных и предварительно денатурированных препаратов НВс и НА2-НВс/М2ек в молярных соотношениях 1:0, 2:1, 1:1, 1:2 и 0:1. Рефолдинг белков проводили при общей концентрации целевого белка 0,1 мг/мл. После нескольких этапов диализа рефолдированные белки были переведены в 50 мМ Tris буфер

с рН 7,4, при этом все белковые препараты оставались растворимыми.

Наличие в полученных препаратах ВПЧ и их свойства исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии. В качестве контроля использовали препарат немодифицированных НВс-частиц, полученных *in vivo* и очищенных путём ультрацентрифугирования. Результаты атомно-силовой микроскопии показывают, что для всех препаратов наблюдаются округлые частицы размером от 25 до 50 нм. Наличие ВПЧ детектировали как в препаратах, содержащих НА2-НВс/М2ек совместно с немодифицированным НВс-антигеном (мозаичные частицы), так и в препаратах, содержащих только белки НА2-НВс/М2ек (рис. 3). Наблюдаемые размеры собранных *in vitro* НВс-частиц во всех случаях были несколько больше, чем у полученных *in vivo* в *E. coli*.

В дальнейшем на лабораторных животных будет исследована иммуногенность полученных таким образом ВПЧ – носителей М2е- и НА2-пептидов, а также протективное действие при заражении различными штаммами вируса гриппа А.

### Обсуждение

Целью данной работы было получение вирусоподобных НВс-частиц, несущих одновременно консервативные пептиды М2е и НА2 вируса гриппа. Хотя НВс-антиген широко используется как носитель чужеродных эпитопов [2], во многих случаях, в частности при включении гидрофобных или слишком длинных пептидов, белок оказывался нерастворимым и/или неспособным образовывать ВПЧ [2]. Включения в район иммунодоминантной петли НВс-антигена особенно чувствительны к вставке, поскольку в этом случае важна конформация включённого пептида, а именно возможность пространственного сближения N- и C-концов вставки. Частично эта проблема может быть решена за счёт фланкирования вставки гибкими богатыми глицином линкерами, что позволяет включить в этот участок даже несколько копий М2е-пептида [16]. Поскольку используемый нами в качестве антигена фрагмент НА2 содержит гидрофобный участок с 83 по 97 аминокислотами (FLDVWTY-NAELLVLM), последовательность НА2 включили на N-конец НВс-антигена, отделив его от последовательности НВс гибким линкером, а М2е-пептид включили в иммунодоминантную петлю. Соответствующий гибридный белок НА2-НВс/М2ек, хорошо экспрессировался в *E. coli*, но оказался нерастворимым, что не позволило получить ВПЧ. Поскольку аналогичный белок без НА2 растворим и образует ВПЧ при экспрессии в *E. coli* [16], вероятно, именно гидрофобный участок в НА2 нарушает растворимость гибридного белка.

Поэтому для получения ВПЧ из НА2-НВс/М2ек был использован метод рефолдинга *in vitro* совместно со способным образовывать ВПЧ немодифицированным НВс-антигеном. Чем больше доля немодифицированного НВс, тем легче должны образовываться мозаичные частицы. Несмотря на нерастворимость НА2-НВс/М2ек при экспрессии в *E. coli*, после рефолдинга он оказался растворимым и способным образовывать ВПЧ даже в отсутствие немодифицированного НВс-антигена. По-видимому, ступенчатый рефолдинг первоначально полностью денатурированного белка обеспечил его правильный фолдинг и сборку частиц.

Метод рефолдинга *in vitro* более сложен по сравнению с выделением ВПЧ, полученных в результате самосборки *in vivo* в *E. coli*, но он имеет и ряд преимуществ. Во-первых, полученные в *E. coli* частицы включают бактериальные компоненты, в частности клеточную РНК [11]. Во-вторых, сборка *in vitro* позволит создавать мозаичные частицы, несущие различные целевые эпитопы за счёт использования сочетания соответствующих модифицированных НВс-белков. Это может оказаться особенно полезным при создании противогриппозных вакцин на основе М2е, поскольку последовательность этого пептида практически неизменна у абсолютного большинства вирусов гриппа А человека, но отличается у вирусов гриппа

птиц и пандемического штамма А(Н1N1)2009, причём эти отличия важны для специфичности вакцин [24, 25]. Включение различных комбинаций иммунодоминантных эпитопов вируса гриппа, присоединённых к НВс-антигену, в состав мозаичной ВПЧ откроет возможность создания вакцин с более широким спектром защиты.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-00976).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ulrich R., Nassal M., Meisel H., Krüger D. H. Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv. Virus Res.* 1998; 50: 141-82.
- Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology.* 2001; 44(2-3): 98-114.
- Crowther R.A., Kiselev N.A., Bottcher B., Berriman J.A., Borisova G.P., Ose V., et al. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell.* 1994; 77(6): 943-50.
- Bottcher B., Wynne S.A., Crowther R.A. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature.* 1997; 386(6620): 88-91.
- Wynne S.A., Crowther R.A., Leslie A.G. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell.* 1999; 3(6): 771-80.
- Kratz P.A., Bottcher B., Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(5): 1915-20.
- Vogel M., Diez M., Eisfeld J., Nassal M. In vitro assembly of mosaic hepatitis B virus capsid-like particles (CLPs): rescue into CLPs of assembly-deficient core protein fusions and FRET-suited CLPs. *FEBS Lett.* 2005; 579(23): 5211-6.
- Robinson C.R., Sauer R.T. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(11): 5929-34.
- Kazaks A., Borisova G., Cvetkova S., Kovalevska L., Ose V., Sominskaya I., et al. Mosaic hepatitis B virus core particles presenting the complete preS sequence of the viral envelope on their surface. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 9): 2665-70.
- Koletzki D., Zankl A., Gelderblom H.R., Meisel H., Dislers A., Borisova G., et al. Mosaic hepatitis B virus core particles allow insertion of extended foreign protein segments. *J. Gen. Virol.* 1997; 78 (Pt. 8): 2049-53.
- Hatton T., Zhou S., Standing D.N. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J. Virol.* 1992; 66(9): 5232-41.
- Neirynek S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.* 1999; 5(10): 1157-63.
- Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine.* 2009; 27(45): 6280-3.
- Ito T., Gorman O.T., Kawaoka Y., Bean W.J., Webster R.G. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J. Virol.* 1991; 65(10): 5491-8.
- Feng J., Zhang M., Mozdanzowska K., Zharikova D., Hoff H., Wunner W., et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *J. Virol.* 2006; 3: 102.
- Ravin N.V., Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Shaldjan A.A., Kovaleva A.A., et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant loop region of hepatitis B core antigen: Insertion of multiple copies of M2e increases immunogenicity and protective efficiency. *Vaccine.* 2015; 33(29): 3392-7.
- Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kuprianov V.V., Blokhina E.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. *Vaccine.* 2015; 33(29): 3398-406.
- Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(44): 18979-84.
- Zhang H., Wang L., Compans R.W., Wang B.Z. Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses.* 2014; 6(5): 1974-91.
- Stepanova L.A., Sergeeva M.V., Shuklina M.A., Shaldzhyan A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., et al. A fusion protein based on the second

- subunit of hemagglutinin of influenza A/H2N2 viruses provides cross immunity. *Acta Naturae*. 2016; 8(2): 116-26.
21. Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of HBc-virus-like particles. *Virology*. 2013; 435(2): 293-300.
  22. De Filette M., Min Jou W., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., et al. Uni-versal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*. 2005; 337(1): 149-61.
  23. Riedl P., Stober D., Oehninger C., Melber K., Reimann J., Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace-amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J. Immunol.* 2002; 168(10): 4951-9.
  24. Kotlyarov R.Y., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., et al. Development of Recombinant Vaccine Against A(H1N1) 2009 Influenza Based on Virus-like Nanoparticles Carrying the Extracellular Domain of M2 Protein. *Acta Naturae*. 2010; 2(2): 71-7.
  25. De Filette M., Fiers W., Martens W., Birkett A., Ramne A., Löwenadler B., et al. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine*. 2006; 24(44-46): 6597-601.

Поступила 20.11.17

Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.891.083.2

*Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Леонов И.К.*

## КИНЕТИКА ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА УТЯТ ТИПА I (AVIHEPATOVIRU, PICORNAVIRIDAE)

Вероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства – филиал ФГБНУ Федерального научного центра «Вероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, 198412, г. Санкт-Петербург – Ломоносов

**Представлены экспериментальные данные кинетики инактивации вакцинного штамма вируса гепатита утят типа I повышенной температурой и аминоэтилэтиленимином (АЭЭИ). Показано, что вакцинный штамм 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I оказался сравнительно термостабильным при 56°C и чувствительным к действию АЭЭИ, время полной инактивации вируса составляет 24 ч в конечной концентрации 0,1% при 37 °C. Полученные результаты позволяют утверждать, что АЭЭИ можно использовать в качестве инактиватора при изготовлении инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I.**

**Ключевые слова:** кинетика инактивации; вирус гепатита утят; температура; формальдегид.

**Для цитирования:** Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Леонов И.К. Кинетика инактивации вируса гепатита утят типа I (Avihepatovirus, Picornaviridae). *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 135-138. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-135-138>

*Trefilov B.B., Nikitina N.V., Leonov I.K.*

## THE KINETICS OF THE INACTIVATION OF THE HEPATITIS VIRUS TYPE I (AVIHEPATOVIRUS, PICORNAVIRIDAE)

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science, Branch of the Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute", St. Petersburg - Lomonosov, 198412, Russian Federation

**Experimental data on the kinetics of the inactivation of the vaccine strain of the duckling hepatitis virus of the type I with increased temperature and aminoethyl ethylenimine are presented. It was shown that the vaccine strain 3M-UNIP of the hepatitis virus of ducklings of type I was comparatively thermostable at 56°C and sensitive to the action of aminoethyl ethylenimine; the time of complete inactivation of the virus at a final concentration of 0.1% at 37°C was 24 h. The obtained results suggest that aminoethyl ethylenimine can be used as an inactivator in manufacturing inactivated vaccine against viral hepatitis of ducklings of type I.**

**Key words:** kinetics of inactivation; hepatitis virus of ducklings; temperature; formaldehyde.

**For citation:** Trefilov B.B., Nikitina N.V., Leonov I.K. The kinetics of the inactivation of the hepatitis virus type I (Avihepatovirus, Picornaviridae). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3): 135-138. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-135-138>

**For correspondence:** Boris B. Trefilov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Chief Researcher of the Department of Virology and Tumor Bird Diseases named after R.N. Korovin, All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science, Branch of the Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute", St. Petersburg - Lomonosov, 198412, Russian Federation. E-mail: [boris.trefilov@yandex.ru](mailto:boris.trefilov@yandex.ru)

### **Information about authors:**

Trefilov B.B., <http://orcid.org/0000-0002-4721-6955>

Nikitina N.V., <http://orcid.org/0000-0002-7500-3172>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 24 October 2017

Accepted 12 December 2017

**Для корреспонденции:** Борис Борисович Трефилов, д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц им. Р.Н. Коровина ВНИВИП, 198412, г. Санкт-Петербург – Ломоносов. E-mail: [boris.trefilov@yandex.ru](mailto:boris.trefilov@yandex.ru)

**Введение**

В утководческих хозяйствах промышленного типа возникает опасность развития эпизоотии вирусного гепатита утят типа I, особенно среди вновь завозимого поголовья. Широкое распространение болезни обусловлено высокой устойчивостью вируса к физико-химическим факторам, его длительным персистенцированием в организме переболевшей птицы, генетической вариабельностью и стационарной неблагополучностью хозяйств [1]. Вирус гепатита утят типа I классифицирован как Avihepatovirus семейства Picornaviridae главным образом на основании морфологии и физико-химических свойств вириона, идентификации последовательностей, организации и видов генома [2]. Авторы различают 3 генотипа: DHAV-1, DHAV-2, DHAV-3 [3 – 6]. Вирус сравнительно стабилен при температуре, не превышающей 40–45°C, но инактивируется при более высоких температурах [7, 8]. Он устойчив к тепловой инаktivации при 50°C в молярных растворах NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> и MgSO<sub>4</sub> и стабилен при pH 3,0 в течение 9 ч [9]. Вирус теряет инфекционную активность после воздействия на него формальдегида в конечной концентрации 0,2% при 37°C в течение 8–9 ч [10].

Определение чувствительности вируса гепатита к физико-химическим факторам имеет практическое значение в производстве и контроле инаktivированных вакцинных препаратов. В связи с этим целью данной работы было изучение кинетики инаktivации штамма вируса гепатита утят при воздействии на него физико-химических факторов.

**Материал и методы**

В исследованиях использовали вакцинный штамм 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I 10-го пассажа, культивируемый в культуре утиных фибробластов. Клеточную культуру готовили из кожно-мышечной ткани 14–15-суточных утиных эмбрионов по общепринятой методике [11]. В качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла MEM и 199 в соотношении 2:1 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков: бензилпенициллина 100 ЕД/см<sup>3</sup> и стрептомицина сульфата 100 мкг/см<sup>3</sup>.

При определении устойчивости вируса к действию повышенной температуры применяли вирусосодержащую культуральную жидкость, а к действию аминоксилотиленимина (АЭЭИ) – хорионаллантоисную жидкость заражённых утиных эмбрионов после однократного замораживания и центрифугирования при 1000 г в течение 20 мин.

Для изучения терморезистентности вирусосодержащую жидкость разливали в пробирки по 1,0 см<sup>3</sup>, затем помещали в водяную баню при 56°C и выдерживали в течение 15, 30, 40 и 60 мин. По истечении времени пробирки немедленно охлаждали в тающем льду.

Действие АЭЭИ испытывали в его конечных концентрациях 0,02, 0,05 и 0,1 при 37,0 ± 0,5°C в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Через каждые 6 ч отбирали пробы материала одновременно с контролем для определения инфекционного титра вируса. По окончании инаktivации проводили нейтрализацию остаточного количества АЭЭИ путем добавления 2 М раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации 0,03 М/дм<sup>3</sup> и охлаждали суспензию до 4–8°C. Титр вируса определяли по Риду и Менчу по общепринятой методике [11]. Снижение титра вируса в процессе инаktivации выражали отношением lg V<sub>t</sub>/V<sub>0</sub>, где V<sub>0</sub> – титр вируса до обработки, V<sub>t</sub> – титр вируса после обработки в течение определенного времени. Константу скорости инаktivации вычисляли по формуле:

$$K = 2,3 \cdot P_1 / P_0 \cdot t,$$

где 2,3 – основание натуральных логарифмов; P<sub>0</sub> – исходный титр вируса; P<sub>1</sub> – титр обработанного вируса ко времени; t – время обработки вируса.

Полученные данные подвергали статистическому анализу с использованием критерия Стьюдента, считая их достоверными при p < 0,05 [12].

**Результаты**

**Тепловая инаktivация.** Результаты исследований термоинаktivации, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что вирус гепатита утят теряет инфекционную активность при нагревании до 56°C в течение 60 мин. Снижение титра через 30 мин экспозиции составило 0,37 lg/мин, а константа скорости инаktivации равнялась 2,8 · 10<sup>-2</sup> lg.

Полученные данные указывают на то, что кривая инаktivации (рис. 1) оказалась двухкомпонентной: в течение 30 мин экспозиции снижение титра равнялось 63,2% исходной величины инфекционности, а в последующие 30 мин скорость инаktivации существенно замедлилась и составила 36,8%.

Следовательно, в результате проведенных исследований установлено, что вакцинный штамм 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I оказался сравнительно термостабильным при 56°C.

**Инаktivация АЭЭИ.** Полученные данные показали, что АЭЭИ в концентрациях 0,02 и 0,05% инаktivировал инфекционную активность вируса в течение 24 ч на 53,1 и 75% соответственно с кинетической скоростью 6,5 · 10<sup>-2</sup> и 3,4 · 10<sup>-2</sup> lg/ч. Под действием инаktivанта в концентрации 0,1% вирус гепатита полностью потерял инфекционную активность в течение 24 ч (табл. 2).

Таблица 1

**Термодинамические параметры вируса гепатита при 56°C**

Штамм вируса	Температура инаktivации, °C	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /0,2 см <sup>3</sup> , при:				Константа скорости инаktivации через 30 мин, lg K <sub>мин</sub>	p
		времени обработки, мин					
		15	30	45	60		

3М-УНИИП 56 3,23 ± 0,15 1,75 ± 0,3 1,75 ± 0,3 0 2, 8·10<sup>-2</sup> < 0,05

Примечание. Исходный титр вируса (V<sub>0</sub>) равен 4,75 lg ТЦД<sub>50</sub>/0,2 см<sup>3</sup>.

Таблица 2

**Чувствительность вакцинного штамма вируса к действию АЭЭИ**

Штамм вируса	Концентрация АЭЭИ, %	Инфекционный титр вируса, lg ЭЛД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> , при:				Константа скорости инаktivации через 24 ч, lg K <sub>мин</sub>	p
		экспозиции инаktivации, ч					
		6	12	18	24		

3М -УНИИП 0,02 7,5 ± 0,1 6,75 ± 0,1 5,75 ± 0,2 3,75 ± 0,1 6,5 · 10<sup>-2</sup> < 0,05

0,05 6,9 ± 0,2 6,3 ± 0,3 5,2 ± 0,3 2,0 ± 0,3 3,4 · 10<sup>-2</sup> < 0,05

0,1 5,75 ± 0,3 4,5 ± 0,25 2,0 ± 0,1 0 < 0,05

Исходный титр вируса (V<sub>0</sub>) 8,0 lg 7,5 6,75 5,85 5,5

Данные кинетики инаktivации (рис. 2) свидетельствуют о том, что вирус гепатита утят чувствителен к действию АЭЭИ, снижение титра вируса следовало простой экспоненциальной кривой.

Установлено, что скорость инаktivации вируса была пропорциональна концентрации препарата в вирусосодержащей жидкости и времени его воздействия. При обработке вируса АЭЭИ в концентрации 0,1% константа его скорости инаktivации через 24 ч равнялась нулю

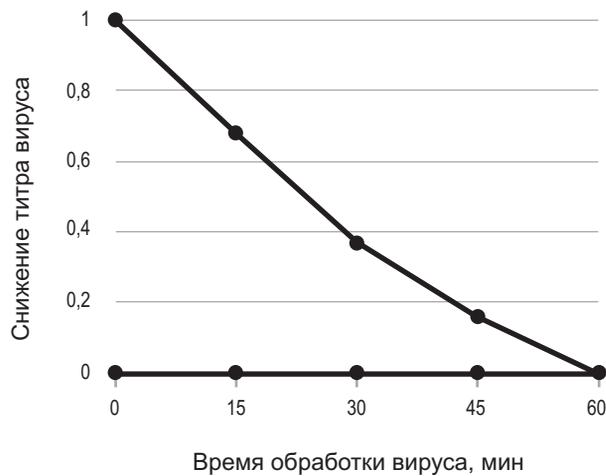


Рис. 1. Кинетика инактивации вируса гепатита утят при 56°C.

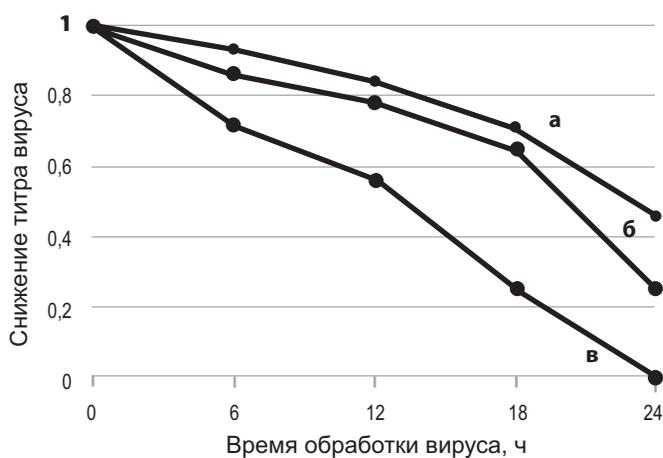


Рис. 2. Кинетика инактивации вируса гепатита в конечной концентрации АЭЭИ 0,02% (а), 0,05% (б) и 0,1% (в).

( $\lg K_{\text{ин}} = 0$ ), что подтверждало полную потерю инфекционной активности вируса. Антигенные свойства вируса, инактивированного температурой и АЭЭИ, и исходного вируса определяли на 2-суточных утятах при подкожной инокуляции. Полученные данные показали, что исходный и инактивированный АЭЭИ антиген индуцировал выработку специфических антител в титре  $8,0-9,0 \log_2$ , в то время как термоинактивированный антиген –  $4,0-5,0 \log_2$  в иммуноферментном анализе.

### Обсуждение

Полученные результаты исследования направлены на разработку инактивированной вакцины против вирусного гепатита утят типа I. Ключевым этапом в изготовлении инактивированных вакцин является выбор метода инактивации вируса, т. е. способа устранения его инфекционной активности, что в полной мере определяет иммуногенные свойства вакцины. Главными критериями эффективности избранного метода являются полнота инактивации и необратимость вирулентных свойств вируса с максимальным сохранением антигенных структур вирионов, обеспечивающих специфический иммунный ответ у привитого организма [13].

Эксперименты по изучению скорости инактивации вируса гепатита под влиянием нагревания и производного азиридинового ряда (АЭЭИ) показали, что высокая температура вызывала денатурирующее действие поверхностных белков вириона, снижая тем самым антигенную специфичность вируса,

в то время как данные оценки остаточной инфекционности вируса под действием АЭЭИ, установленные через определенные интервалы времени после воздействия, демонстрировали распределения, близкие логарифмически линейным, что позволяло достаточно надежно контролировать процесс инактивации вируса. При обработке вируса АЭЭИ в конечной концентрации 0,1% константа его скорости инактивации через 24 ч равнялась нулю ( $\lg K_{\text{ин}} = 0$ ), что подтверждает потерю инфекционной активности вируса с сохранением его антигенных свойств. Установленная прямая зависимость процесса инактивации вируса гепатита от концентрации АЭЭИ в вирусосодержащем материале совпадает с ранее полученными данными относительно чувствительности вирусов к химическим агентам, применяемым в качестве инактиваторов [14–16].

### Заключение

На основании результатов проведенных исследований можно заключить, что повышенная температура и АЭЭИ способны инактивировать инфекционную активность вакцинного штамма 3М-УНИИП вируса гепатита утят типа I, при этом штамм вируса оказался сравнительно термостабильным при 56°C и чувствительным к действию АЭЭИ, время полной инактивации вируса – 24 ч в конечной концентрации 0,1% при 37°C. Этот факт соответствует характеристике таксономического положения вируса в семействе Picornaviridae.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2-6, 9 см. REFERENCES)

1. Паникар И.И. *Вирусный гепатит утят и его профилактика*. М.: Россельхозиздат; 1987.
2. Виноходов О.В., Виноходов В.О., Виноходов Д.О. Энтеровирусный гепатит уток типа I. В кн.: Соринсон С.Н., ред. *Вирусные гепатиты птиц*. СПб.: Теза; 1998: 68-91.
3. Бубашко О.А. Маркерные свойства штамма вирусного гепатита утят КМИЭВ-16. *Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария*. 2005; (1): 46-9.
4. Князев В.П. Вирусный гепатит утят (уток). В кн.: Князев В.П. *Болезни водоплавающих птиц*. Владимир; 2010: 70-87.
5. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. *Ветеринарная вирусология*. М.: Агропромиздат; 1991.
6. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. *Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов*. Ленинград; 1975.
7. Лезова Т.А., Михалишин В.В. Вирулицидная активность координационных соединений этиленмина в отношении вирусов. В кн.: *Материалы Международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ»*. Владимир; 2003: 483-7.
8. Улупов Н.А., Михалишин В.В., Гусев А.А., Лезова Т.А. Аминоэтиленмин - средство инактивации инфекционности вируса ящура. В кн.: *Материалы научной конференции, посвященной 40-летию ФГУ «ВНИИЗЖ»*. Владимир; 1998: 53-62.
9. Борисова И.А. Антигенная активность экспериментальной инактивированной эмульсионной вакцины против ньюкаслской болезни и пневмовирусной инфекции птиц. *Ветеринарная патология*. 2006; (4): 144-6.
10. Глейзер Д.А., Фролов С.В., Борисов А.В., Кулаков В.Ю. Получение инактивированного вируса инфекционного бронхита кур (штамм «Калужский»). *Ветеринарная патология*. 2008; (4): 75-9.

### REFERENCES

1. Panikar I.I. *Viral Hepatitis Ducklings and its Prevention [Virusnyy gepatit utyat i ego profilaktika]*. Moscow: Rosselkhozizdat; 1987. (in Russian)
2. Stanway G., Brown F., Christian P. Family Picornaviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005: 757-78.
3. Kim M.C., Kwon J.K., Joh S.J., Lindberg A.M., Kwon J.H., et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to genus Parechovirus in the family Picornaviridae. *J. General Virology*. 2006; 87(Pt. 11): 3307-16.

4. Kim M.C., Kwon J.K., Joh S.J., Kwon J.H., Kim J.H., Kim S.J. Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1. *Avian Disease*. 2007; 51(2): 540-5.
5. Tseng C.H., Knowles N.J., Tsai H.J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Res*. 2007; 123(2): 190-203.
6. Wang L., Pan M., Fu Y., Zhang D. Classification duck hepatitis virus in to three genotypes bases on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes*. 2008; 37(1): 52-9.
7. Vinokhodov O.V., Vinokhodov V.O., Vinokhodov D.O. Enterovirus hepatitis of ducks of I type. In: Sorinson S.N., ed. *Viral Hepatitis of Birds [Virusnye gepatity ptits]*. St. Petersburg; 1998; 68-91. (in Russian)
8. Bubashko O.A. Marker properties of the strain of viral hepatitis of ducklings KMIEV-16. *Epizootologiya, immunologiya, farmakologiya i sanitariya*. 2005; (1): 46-9. (in Russian)
9. Davis D. Temperature and pH stability of duck hepatitis virus. *Avian Pathol*. 1987; 16(1): 21-30.
10. Knyazev V.P. Viral hepatitis of ducks (ducks). In: Knyazev V.P. *Diseases of Waterfowl [Bolezni vodoplavayushchikh ptits]*. Vladimir; 2010; 70-87. (in Russian)
11. Syurin V.N., Belousova R.V., Fomina N.V. *Veterinary Virology [Veterinarnaya virusologiya]*. Moscow: Agropromizdat; 1991. (in Russian)
12. Ashmarin I.P., Vasil'ev N.N., Ambrosova V.A. *Fast Methods of Statistical Processing and Experiment Planning [Bystrye metody statisticheskoy obrabotki i planirovaniya eksperimentov]*. Leningrad; 1975. (in Russian)
13. Lezova T.A., Mikhailishin V.V. Virulicidal activity of ethylenimine coordination compounds against viruses. In: *Materials of the International Scientific Conference, Dedicated to the 45th Anniversary of the FGI «VNIIZH» [Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 45-letiyu FGU «VNIIZH»]*. Vladimir; 2003; 483-7. (in Russian)
14. Ulupov N.A., Mikhailishin V.V., Gusev A.A., Lezova T.A. Aminoethyl-ethylenimine is a means of inactivating the infectivity of the foot and mouth disease virus. In: *Materials of the International Scientific Conference, Dedicated to the 45th Anniversary of the FGI «VNIIZH» [Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 45-letiyu FGU «VNIIZH»]*. Vladimir; 1998; 53-62. (in Russian)
15. Borisova I.A. Antigenic activity of experimental inactivated emulsion vaccine against Newcastle disease and pneumovirus infection of birds. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; (4): 144-6. (in Russian)
16. Gleyzer D.A., Frolov S.V., Borisov A.V., Kulakov V.Yu. Obtaining an inactivated virus of chicken infectious bronchitis (strain "Kaluzhsky"). *Veterinarnaya patologiya*. 2008; (4): 75-9. (in Russian)

Поступила 24.10.17  
Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.891:578.51.083.33

Куприянов В.В.<sup>1</sup>, Николаева Л.И.<sup>2</sup>, Зыкова А.А.<sup>1</sup>, Махновский П.И.<sup>2</sup>, Котляров Р.Ю.<sup>1</sup>, Васильев А.В.<sup>2</sup>, Равин Н.В.<sup>1</sup>

## ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ МОЗАИЧНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ АНТИГЕНОВ NS4A И NS4B ВИРУСА ГЕПАТИТА С

<sup>1</sup>ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, г. Москва;

<sup>2</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Цель исследования – изучить иммуногенные свойства мозаичных рекомбинантных белков, сконструированных на основе антигенов NS4A и NS4B вируса гепатита С (ВГС). Методами генной инженерии в системе *E. coli* были получены 4 мозаичных рекомбинантных белка, содержащих Т- и В-эпитопы антигенов NS4A и NS4B. Для усиления иммунного ответа они были соединены в различных вариантах с нуклеотидной последовательностью мышиного интерлейкина-2 (IL-2), липопептида *Neisseria meningitidis* и Т-хелперного эпитопа нуклеокапсидного белка ВГС. Иммуногенные свойства этих рекомбинантных белков были изучены методами иммуноблоттинга, иммуноферментного анализа и ELISpot с использованием сывороток иммунизированных мышей и инфицированных ВГС людей. Рекомбинантные белки специфически реагировали в иммуноблоттинге с сыворотками иммунизированных мышей и инфицированных пациентов. По данным иммуноферментного анализа, наблюдалось преимущественное образование антител к NS4B при иммунизации мышей рекомбинантным белком, содержащим оба антигена. Анализ продукции гамма-интерферона Т-лимфоцитами при контакте с активированными дендритными клетками в ELISpot показал, что максимальная продукция этого цитокина отмечалась при расположении адьювантных компонентов на N- и C-концах рекомбинантного белка. Наивысший уровень продукции гамма-интерферона при стимуляции этим препаратом был выявлен в лимфоцитах из костного мозга и лимфатических узлов. Среди проанализированных четырех препаратов наибольшее иммуностимулирующее действие оказывал рекомбинантный мозаичный белок, содержащий Т- и В-эпитопы NS4A и NS4B, мышинный IL-2 и липопептид *Neisseria meningitidis*. Этот рекомбинантный белок образовывал наночастицы размером 100–120 нм.

Ключевые слова: антигены вируса гепатита С; рекомбинантные мозаичные белки; адьювантные компоненты.

**Для цитирования:** Куприянов В.В., Николаева Л.И., Зыкова А.А., Махновский П.И., Котляров Р.Ю., Васильев А.В., Равин Н.В. Иммуногенные свойства рекомбинантных мозаичных белков на основе антигенов NS4A и NS4B вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 138-143

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-138-143>

## Koupriyanov V.V.<sup>1</sup>, Nikolaeva L.I.<sup>2</sup>, Zyikova A.A.<sup>1</sup>, Makhnovskiy P.I.<sup>2</sup>, Kotlyarov R.Y.<sup>1</sup>, Vasilyev A.V.<sup>2</sup>, Ravin N.V.<sup>1</sup> IMMUNOGENIC PROPERTIES OF RECOMBINANT MOZAIC PROTEINS BASED ON ANTIGENS NS4A AND NS4B OF HEPATITIS C VIRUS

<sup>1</sup>Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, 119071, Russian Federation;

<sup>2</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

**Для корреспонденции:** Куприянов Виктор Васильевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории систем молекулярного клонирования Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии», 119071, г. Москва.  
E-mail: vkoop@biengi.ac.ru

The aim of the study was to investigate immunogenic properties of mosaic recombinant proteins constructed on the data of hepatitis C virus NS4A and NS4B antigens. Four mosaic recombinant proteins, containing the T and B epitopes of the NS4A and NS4B antigens, were created by genetic engineering methods in the *E. coli* system. To enhance the immune response they were linked in different variations to the nucleotide sequences of murine interleukin-2 (IL-2), the *Neisseria meningitidis* lipopeptide, and the T helper epitope of the core protein of hepatitis C virus. The immunogenic properties of these recombinant proteins were analyzed by immunoblotting, ELISA and ELISpot using sera from immunized mice and patients infected with hepatitis C virus. Recombinant proteins specifically reacted with the sera of immunized mice and infected patients in immunoblotting. According to the ELISA data, the predominant formation of antibodies to NS4B was observed when mice were immunized with the recombinant proteins containing both antigens. Analysis of gamma-interferon production by T-lymphocytes upon contact with activated dendritic cells showed in ELISpot that the maximum production of this cytokine was detected when adjuvant components were located at the N- and C-ends of the recombinant protein. The highest level of gamma-interferon production during stimulation with this drug was detected in lymphocytes from the bone marrow and lymph nodes. The recombinant protein containing the T and B epitopes of NS4A and NS4B, murine IL-2 and the lipopeptide *Neisseria meningitidis* had the greatest immunostimulate effect among the four constructions. This recombinant protein formed nanoparticles of 100-120 nm in size.

**Key words:** hepatitis C virus antigens; recombinant mosaic proteins; adjuvant components.

**For citation:** Koupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Zykova A.A., Makhnovskiy P.I., Kotlyarov R.Y., Vasilyev A.V., Ravin N.V. Immunogenic properties of recombinant mosaic proteins based on antigens NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Voprosy Virologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3): 138-143. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-138-143>

**For correspondence:** Victor V. Koupriyanov, PhD in biology, senior researcher of laboratory of system of molecular cloning of Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, 119071, Russian Federation. E-mail: [vkooop@biengi.ac.ru](mailto:vkooop@biengi.ac.ru)

#### Information about authors:

Koupriyanov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-8602-1974>;

Zykova A.A., <http://orcid.org/0000-0001-9577-4815>;

Kotlyarov R.Y., <http://orcid.org/0000-0002-4387-2592>;

Ravin N.V., <http://orcid.org/0000-0002-1456-1832>

Nikolaeva L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1323-5568>;

Makhnovskiy P.I., <http://orcid.org/0000-0002-5859-0360>;

Vasilyev A.V., <http://orcid.org/0000-0001-7641-9906>;

**Acknowledgment.** This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 16-04-00450).

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

Received 10 November 2017  
Accepted 12 December 2017

## Введение

Вирусный гепатит С – распространённое инфекционное заболевание, для которого характерно частое развитие хронической формы инфекции с постепенным поражением печени и развитием у части больных цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. С конца прошлого века во многих странах проводятся исследования с целью создания профилактических и терапевтических вакцин против гепатита С. Зарегистрированных вакцин пока нет, кандидатные вакцинные препараты проходят испытания [1].

Процесс формирования иммунного ответа на антигены вируса состоит из цепи событий: дендритные клетки захватывают антигены и расщепляют их на пептидные эпитопы, которые связываются с белками главного комплекса гистосовместимости и презентуются на поверхности дендритных клеток. Такие дендритные клетки, взаимодействуя с Т-лимфоцитами, активируют их, последние становятся Т-хелперными клетками (Th-клетками). Th-клетки помогают дендритным клеткам более эффективно активировать наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, вызывая образование цитотоксических Т-лимфоцитов и стимулируя В-клетки к образованию специфических антител [2].

Очевидно, искусственный мозаичный белок, претендующий на роль вакцинного препарата, должен включать Т- и В-эпитопные пептиды и прилегающие к их концам 2–8 аминокислотных остатков, выполняющих роль участков, чувствительных к протеолизу в дендритных клетках. Их наличие существенно для образования иммуногенных пептидов [3]. Для улучшения иммунного ответа такой белок должен содержать также Th-эпитопы и адъювантные компоненты, что усиливает его иммуногенность.

Источником иммуногенных пептидов в настоящем исследовании были антигены вируса гепатита С (ВГС) NS4A и NS4B. Неструктурный полипептид NS4A, частично погружённый

в мембрану эндоплазматической сети, выполняет функцию кофактора сериновой протеазы NS3, участвующей в нарезании вирусного полипротеина на отдельные вирусные белки. Он, как и протеаза NS3, играет ключевую роль в репродукции вируса. Анализ иммунореактивных свойств пептидов, синтезированных на основе аминокислотной последовательности NS4A, показал, что С-концевая часть молекулы содержит генотипспецифичные последовательности, что свидетельствует о вариабельности ряда аминокислотных позиций [4]. Остальные части молекулы NS4A – N-концевая, погружённая в мембрану, и срединная, контактирующая с сериновой протеазой, – представлены более консервативными последовательностями. В срединной части (аминокислотные позиции 21–32) молекулы NS4A возможны аминокислотные замены, которые влияют на активность сериновой протеазы, особенно если они локализованы в позициях 30–32 [5]. Установлено, что интенсивный гуморальный ответ на NS4A перед началом комбинированной интерферонотерапии ассоциирован с достижением устойчивого вирусологического ответа [6, 7]. Комплекс NS3/4A обладает способностью расщеплять клеточные сигнальные белки MAVS и TRIF, влияющие на продукцию интерферонов I типа, снижая, таким образом, эффективность защиты системы врожденного иммунитета [8, 9].

Другим белком, иммуногенные фрагменты которого были использованы для конструирования рекомбинантного мозаичного белка, является NS4B. В структуре этого белка выделяют 4 трансмембранных участка и экспонированные зоны. Основная функция NS4B – создание платформы (web), на которой происходит сборка репликативного комплекса ВГС. Экспериментально показано, что данный белок взаимодействует с клеточным адапторным белком STING, что приводит к остановке интерферонового звена защиты инфицированной клетки; может вызывать её трансформацию и, вероятно, вовлечен в развитие фиброза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [10, 11].

Ранее в белке NS4B выявлены и локализованы В-клеточные, Т-киллерные и Т-хелперные эпитопы [12–14].

На основании изложенных сведений и информации баз данных были сконструированы 4 рекомбинантных мозаичных белка, содержащих Т- и В-эпитопы антигенов NS4A и NS4B, и компоненты, усиливающие их иммуногенность: мышинный IL-2, Th-эпитоп из нуклеокапсидного (core) белка и липопептид *Neisseria meningitidis* [15–21].

Цель данного исследования – изучить иммуногенные свойства рекомбинантных мозаичных белков, сконструированных на основе эпитопов антигенов NS4A и NS4B, слитых с адьювантными компонентами в единый белок.

### Материал и методы

**Бактерии и плазмиды.** Для клонирования были использованы бактерии *E. coli* DLT1270 и *E. coli* DH5a. Для экспрессии использовали *E. coli* DLT1270, трансформированные плазмидой pQE30, содержащей последовательность целевого белка. Плазмида pQE30 была модифицирована вставкой глицинового шарнира по сайтам BamH1-SacI (pQE30mod) для улучшения взаимодействия гексагистидинового участка с Ni-сорбентом при очистке. Нуклеотидные последовательности, оптимизированные для *E. coli*, кодирующие рекомбинантные белки NS4a-IL2 и IL-2 (мышинный интерлейкин-2) были синтезированы («Евроген», РФ) и лигированы в плазмиду pQE30mod по сайтам рестрикции SacI и KpnI. Синтетическая нуклеотидная последовательность LTNb («Евроген», РФ) была лигирована в pQE30mod по сайту I и Hinc2. В работе использовали ферменты и буферные системы от «СибЭнзим» (РФ) и «Fermentas» (Латвия).

**Аминокислотная последовательность** рекомбинантного мозаичного белка на основе NS4B (субтипа 1b), названного LTNb (от liporeptide-Th-epitope-NS4b), соответствовала: MRGS (стартовый участок) – НННННН (гистидиновый tag) – GSGTSGSSGSGSGGGSGGGG (глициновый линкер) – EL (сайт рестрикции SacI) – MKKLLIAAMMAAALAACSQEAKQEVREAVQAVESDVKDTA (липопептид) – VD (сайт рестрикции SalI) – KLGKGGK (глицин-лизиновый линкер) – FPGGGQIVGGVYLLPRRGPRL (Th-эпитоп из core) – KK (лизиновый линкер) – HM (сайт рестрикции NdeI) – WNFISG (Т-эпитоп из NS4B) – VQYLAGL[STLPGNPAI]ASL (Th-эпитоп + В-эпитоп из NS4B) – MAFTA[SITSPLTT] (Т-эпитоп из NS4B + В-эпитоп) – QYTLLFNILGGWV (Т-эпитоп из NS4B) – KK (лизиновый линкер) – ILAGYAGV (Т-эпитоп из NS4B) – KK (лизиновый линкер) – VDLAEAAAKEAAAK EAAAKEAAAKEAAAKAAADI (альфа-спиральный линкер). В квадратных скобках – В-эпитопы NS4B [21]. Спиральный линкер использовали для разделения функциональных доменов в рекомбинантных белках [22]. При конструировании белка, содержащего эпитопы NS4A и NS4B, он располагался между эпитопами этих антигенов. Для усиления иммуногенности к N-концу был присоединён липидируемый пептид (липопептид), как описано Н.-W. Chen и соавт. [23]. В нуклеотидной последовательности LTNb были вставлены сайты рестрикции SalI и NdeI, позволявшие удалять нуклеотидные последовательности, соответствующие липопептиду или Th-эпитопу, и получать новые рекомбинантные белки LNb (без Th-эпитопа) и TNb (без липопептида).

**Индукция рекомбинантных белков.** Ночную культуру выращивали в бульоне 2ТУ с ампициллином 100 мкг/мл (1/100 объёма). Индукцию проводили в бульоне 2ТУ с ампициллином (50 мкг/мл) и изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) (0,5 мМ) в течение ночи при 28°C.

**Очистка рекомбинантных белков на Ni-сорбенте.** Растворимые белки удаляли после обработки клеток лизоцимом. Рекомбинантные белки оставались в осадке, к которому добавляли 1 мл 7 М гуанидин гидрохлорида в 10 мМ фосфатно-трисовом буфере (рН 8,0) с 20 мМ имидазолом и 0,5 М хлористым натрием, обрабатывали ультразвуком и выдерживали

при комнатной температуре 20 мин. Центрифугировали 10 мин при 13 тыс. об/мин. Полученный супернатант добавляли к Ni-сорбенту («Promega», США). Сорбцию проводили на шейкере (60 мин, температура комнатная). Промывку выполняли 7 М гуанидин гидрохлоридом с 40 мМ имидазолом (1 мл, 3 раза), затем 9 М мочевиной в том же буфере с 40 мМ имидазолом (1 мл, 3 раза). Снятие рекомбинантных белков осуществляли 1 М имидазолом в том же буфере с 4,5 М мочевиной.

**Белковый анализ.** Концентрацию белка определяли стандартным методом Бредфорд. Электрофоретический анализ белков выполняли общепринятым методом Лэммли в 10% полиакриламидном геле с 0,1% додецилсульфатом натрия.

**Атомно-силовую микроскопию (АСМ)** проводили на приборе Ntegra («NT-MDT», РФ).

**Дендритные клетки** из лимфоцитов селезёнки, костного мозга, тимуса и лимфоузлов мышей (Balb/c, масса 18–20 г) получали и активировали по методикам, описанным ранее [24, 25]. После активации рекомбинантными белками (в течение 24–48 ч) дендритные клетки добавляли к сингенным лимфоцитам в соотношении 1:10. Оценку продукции гамма-интерферона выполняли с помощью ELISpot («R&D Systems», США), регистрацию результатов осуществляли, используя прибор AID EliSpot Reader («Autoimmun Diagnostika GmbH», Германия).

**Иммуноферментный анализ и иммуноблоттинг** проводили по стандартным методикам. Сэндвич-ИФА использовали для устранения влияния антител к гистидиновой последовательности (оставшейся во всех рекомбинантных белках, кроме IL-2) на анализ сывороток иммунизированных мышей. В качестве первого слоя использовали моноклональные антитела Pentahis antibody («Qiagen», Германия) в количестве 0,6 мкг на лунку. После закрытия свободных зон 1% бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере (рН 7,3; 1 ч; 37°C) сорбировали рекомбинантные антигены, а затем после промывки вносили сыворотку иммунизированных мышей. Далее следовали стандартные этапы. При анализе взаимодействия мышинных антител с отдельными вирусными белками с помощью коммерческой тест-системы «Бест анти-ВГС-спектр» («Вектор-Бест», РФ) использовали антимышинный конъюгат («Имтек», РФ). Коэффициент позитивности рассчитывали как отношение оптической плотности образца к критической оптической плотности, величина которой в 3 раза превышала среднюю оптическую плотность 10 отрицательных образцов.

**Для иммунизации** использовали линейных мышей Balb/c массой 18–20 г (возраст 6–8 нед). Иммунизировали каждым препаратом (5 мышей) в дозе 50 мкг на мышью, двукратно с интервалом 4 нед, подкожно в области передней части спины. Кровь брали на 7-й день после второй иммунизации. Животных забивали путем декапитации под наркозом (смесь эфира с хлороформом в соотношении 1:1) с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

**Статистическую обработку** данных выполняли с помощью пакета программ Statistica 10.0 («Tulsa», США). Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при вероятности более 95% ( $p < 0,05$ ).

### Результаты

Индукция LTNb и LNb сопровождалась лизисом бактериальных клеток, что свидетельствует о токсичности продуктов экспрессии для клеток *E. coli*. Для устранения этого эффекта была заменена питательная среда LB на более богатую среду 2ТУ, понижена концентрация ИПТГ и изменены условия экспрессии (см. «Материал и методы»). При этих условиях экспрессия и выход очищенного белка LTNb повысились. Из 50 мг сырой массы индуцированных клеток в среде 2ТУ получали почти 200 мкг гомогенного белка.

Таблица 1

Результаты анализа сывороток мышей, иммунизированных очищенными препаратами рекомбинантных мозаичных белков и GFP с гистидиновой последовательностью (GFP-his)

Антиген	Сыворотки к LTNb	Сыворотки к LNb	Сыворотки к TNb
LTNb	1:1380	1:612	1:646
LNb	1:603	1:398	1:263
TNb	1:794	1:263	1:692
GFP-his	1:214	Нет реакции	Нет реакции

Примечание. Данные представлены как среднегеометрическое значение титров сывороток. GFP – зелёный флуоресцирующий белок.

Очищенным рекомбинантным белком LTNb иммунизировали мышей. На рис. 1 (см. 3-ю полосу обложки) представлены данные иммуноблоттинга препарата LTNb с сывороткой иммунизированной мыши (рис. 1, а) и большого хроническим гепатитом С (рис. 1, б).

Как следует из рисунка, сыворотка иммунизированной мыши и большого реагировала с рекомбинантным белком LTNb. Реакция сыворотки большого хроническим гепатитом С с препаратом LTNb показала, что В-эпитопы рекомбинантного белка распознаются антителами пациента, сформированными на естественный антиген NS4В.

Для анализа вклада в иммуногенность отдельных компонентов рекомбинантного белка LTNb были получены производные от LTNb: белки LNb (без Th-эпитопа core-белка ВГС) и TNb (без липопептида). На эти препараты были получены мышинные сыворотки, которые анализировали с помощью иммуноферментного анализа (табл. 1).

Самый интенсивный В-клеточный ответ сформировался на препарат LTNb, в конструкции которого присутствовали липопептид и Th-эпитоп из core-белка ВГС. Иммунизированные им мыши имели антитела к LNb (без Th-эпитопа), TNb (без липопептида) и в низком содержании – к GFP, соединённому с гексагистидиновой последовательностью. Антитела к GFP-his в двух других группах мышей отсутствовали. У всех мышей отсутствовали также антитела к липидируемому пептиду из *Neisseria meningitidis* и GFP (данные не приводятся). Оценивая сыворотки мышей, иммунизированных препаратами LNb и TNb, можно отметить близость их показателей (вероятность различия  $p > 0,05$ ). Анализируя сыворотки иммунизированных мышей в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр», обнаружили, что мыши, иммунизированные препаратами LTNb и TNb, имели антитела к NS4AB и core-белку. Наличие антител к core-белку было вызвано тем, что аминокислотная последовательность этого Th-эпитопа перекрывается с В-эпитопом, что не отметили Х.Х. Huang и соавт. [13].

Следующим этапом настоящего исследования было соединение последовательностей, кодирующих NS4A-IL2 с LTNb.

Таблица 2

Гуморальный ответ мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, по данным сэндвич-метода ИФА

Антигены	Сыворотка на препарат LTNb-NS4a-IL2	Сыворотка на препарат LTNb	Сыворотка на препарат NS4a-IL2
GFP-his	Отр.	Отр.	Отр.
IL-2	2,427*	Отр.	3,321
LTNb	6,987	9,512	Отр.
LTNb-NS4a-IL-2	24,106	4,458	4,108
NS4a-IL-2	1,089	Отр.	5,217

Примечание. Отр. – отрицательный результат; \* – коэффициент позитивности.

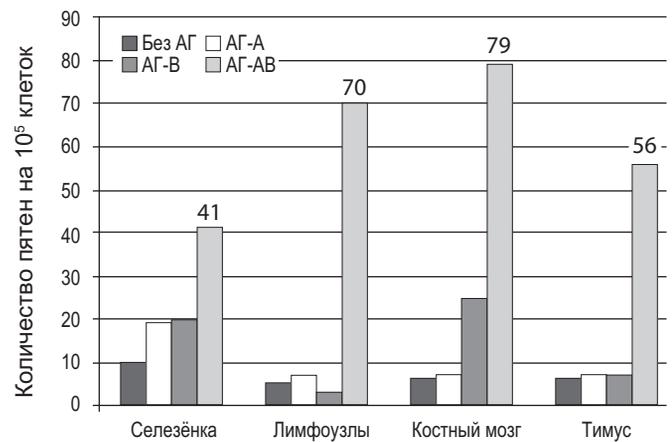


Рис. 3. Продукция гамма-интерферона Т-лимфоцитами при стимуляции дендритных клеток антигенами NS4a-IL2 (АГ-А); LTNb-NS4a-IL2 (АГ-В); LTNb-NS4a-IL2 (АГ-АВ).

Ранее, изучая варианты рекомбинантных белков на основе NS4A, было показано, что для наибольшей эффективности при иммунизации следует использовать полноразмерный белок (54 аминокислотных остатка) [26]. В объединённой конструкции LTNb-NS4a-IL2 адьювантные части локализовались на разных концах молекулы: липопептид – на N-конце, IL-2 – на С-конце.

Индукцированный белок LTNb-NS4a-IL2 находится в осадке лизата бактериальных клеток. Все этапы растворения и очистки проводили с использованием детергентов и хаотропных агентов (см. «Материал и методы»). Очищенный рекомбинантный белок LTNb-NS4a-IL2 имел молекулярную массу около 37 кДа по данным электрофоретического анализа (рис. 2, см. 3-ю полосу обложки).

Как отмечено выше (см. табл. 1), у некоторых мышей были обнаружены антитела к гексагистидиновой последовательности. Чтобы устранить влияние этих антител на оценку иммуногенности рекомбинантных белков, был использован сэндвич-метод ИФА с моноклональными антителами к гистидиновой последовательности (табл. 2).

Этот анализ позволил установить, что рекомбинантные белки, содержащие IL-2, у некоторых мышей индуцируют образование антител к данному цитокину. Препарат LTNb-NS4a-IL2 вызывает образование антител к NS4A, так и к NS4B, при этом образование антител ко второму белку больше, чем к первому (1,089 против 6,987;  $p < 0,03$ ). Сравнивая коэффициент позитивности для сывороток против препаратов, на которые они были получены, можно отметить, что иммуногенность и коэффициент позитивности заметно возрастает в ряду NS4a-IL2 (5,217) – LTNb (9,512) – LTNb-NS4a-IL2 (24,106). Последний препарат эффективнее LTNb и NS4a-IL2 ( $p < 0,02$ ). Коэффициент позитивности белка LTNb-NS4a-IL2 превышает сумму составляющих его частей, что свидетельствует о синергизме действия адьювантов.

Индукцию Т-клеточного ответа анализировали по продукции гамма-интерферона лимфоцитами, смешанными с дендритными клетками после инкубации последних с препаратами рекомбинантных белков (см. «Материал и методы»). Результаты анализа в ELISpot продукции этого цитокина лимфоцитами из разных органов при активации различными препаратами представлены на рис. 3.

Наибольшая продукция гамма-интерферона наблюдалась при активации дендритных клеток препаратом LTNb-NS4a-IL2. В усиление продукции анализируемого цитокина под действием этого препарата, очевидно, внес вклад синергизм действия двух адьювантных компонентов. При стимуляции дендритных клеток препаратом LTNb-NS4a-IL2 самый высо-

кий уровень продукции гамма-интерферона был выявлен у лимфоцитов из костного мозга и лимфоузлов по сравнению с лимфоцитами из селезенки и тимуса ( $p < 0,01$ ).

Учитывая влияние размера белковых комплексов на их иммуногенность [27], изучали аналогичные параметры полученных рекомбинантных белков методом АСМ (рис. 4, см. 3-ю полосу обложки).

Ранее с помощью метода АСМ мы показали, что препарат NS4a-IL2 образует наночастицы размером 6–8 нм [26]. В настоящем исследовании в препарате LTNb выявлялись наночастицы размером 30–50 нм, а в препарате LTNb-NS4a-IL2 – до 100–120 нм.

### Обсуждение

Конструирование и анализ свойств рекомбинантных мозаичных белков являются сложной задачей, поскольку свойство и конформация отдельных компонентов в искусственном протеине могут изменяться из-за их взаимного влияния друг на друга и нарушения доступности зон, расщепляемых протеазами в дендритных клетках. Недавно сконструирован мультиэпитопный мозаичный рекомбинантный белок для выявления антител к разным антигенам ВГС [28].

В наши конструкции, основанные на вирусных антигенах NS4A и NS4B, были включены пептидные последовательности, соответствующие Т-цитотоксическим, Т-хелперным и В-клеточным эпитопам, усиленные адьювантными компонентами нескольких видов с учётом разработок, обеспечивающих правильный процессинг и презентацию пептидов дендритными клетками [8, 12]. Ранее нами было показано, что рекомбинантный полноразмерный NS4A обладает более высокой иммуногенностью, если он соединен с мышинным IL-2 [26]. Однако в новом рекомбинантном мозаичном белке LTNb-NS4a-IL2, содержащем Т- и В-эпитопы белка NS4B и полную аминокислотную последовательность NS4A, гуморальный ответ на NS4A, слитый с IL-2, оказался более слабым, чем в препарате NS4a-IL2 [26]. Очевидно, в структуре нового рекомбинантного белка LTNb-NS4a-IL2 В-эпитопы NS4A были менее доступными для презентации в дендритных клетках, чем эпитоп NS4B.

В рекомбинантном белке LTNb-NS4a-IL2 содержались Т-цитотоксические и Th-эпитопы NS4B, охарактеризованные другими авторами [12–14, 29, 30]. Х.Х. Huang и соавт. [13] для стимуляции CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа поместили Th-эпитоп из core-белка ВГС (KFPGGGQIVGGVYLLPRRG-PRL) между двумя цитотоксическими эпитопами. Авторы показали эффективность этой конструкции в индукции клеточного иммунного ответа по сравнению с рекомбинантным белком без этого Th-эпитопа. Однако они не отметили, что Th-эпитоп из core-белка перекрывается с В-клеточным эпитопом, что было обнаружено в нашем исследовании. Анализ гуморального ответа на компоненты конструкции LTNb-NS4a-IL2 показал более высокую эффективность в индукции В-клеточного ответа эпитопов NS4B, чем NS4A, что может быть связано с большей доступностью для протеаз дендритных клеток В-эпитопа из NS4B.

Т-клеточный ответ на препараты оценивали по индукции выработки гамма-интерферона. Этот интерферон, продуцируемый Т-лимфоцитами, является ключевым цитокином, его продукция служит индикатором формирования иммунного ответа по Th1-типу, с недостаточной эффективностью которого связывают развитие хронического гепатита С. Наличие продукции гамма-интерферона является хорошим показателем формирования Т-клеточного ответа под действием рекомбинантных белков (см. рис. 3). Максимальный ответ наблюдался при стимуляции препаратом LTNb-NS4a-IL2, особенно в лимфоцитах костного мозга и лимфоузлов, что также говорит об эффективной стимуляции как В-клеточного, так и Т-клеточного ответа.

Как отмечено ранее М.Ф. Bachmann и Г.Т. Jennings [27], наиболее эффективными иммуногенами являются белковые

частицы, имеющие размер 50–100 нм. Исследование препаратов наших рекомбинантных белков с помощью АСМ показало увеличение размеров образующихся белковых частиц от 6–8 нм для NS4a-IL2 [26] до 30–50 нм для LTNb и 100–120 нм для LTNb-NS4a-IL2. Вероятно, можно говорить о вкладе в иммуногенность препарата LTNb-NS4a-IL2, связанном с размером белковых частиц.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что сконструированный финальный рекомбинантный белок LTNb-NS4a-IL2 высокоиммуногенен, и адьювантные компоненты IL-2 и липопептид действуют синергично, взаимно усиливая иммуногенность препарата, и эффективно стимулируют В- и Т-клеточный иммунный ответ.

### Выводы

1. Из четырех исследованных конструкций наибольшая иммуногенность была обнаружена у препарата LTNb-NS4a-IL2, содержащего Т- и В-эпитопы NS4B, полноразмерный NS4A, липопептид *Neisseria meningitidis* и мышинный IL-2.

2. При иммунизации мышей рекомбинантным мозаичным белком LTNb-NS4a-IL2 обнаружена преимущественная выработка антител к В-эпитопам NS4B, уровень антител к NS4A был заметно ниже.

3. Наблюдали синергизм иммуностимулирующего действия адьювантных компонентов липопептида *Neisseria meningitidis* и мышинного IL-2, когда они располагались на N- и C-концах рекомбинантного белка.

4. Учитывая эффективный Т- и В-клеточный ответ, рекомбинантный мозаичный белок LTNb-NS4a-IL2 можно рассматривать как конструкционный прототип для разработки вакцинного препарата против гепатита С.

**Финансирование.** Исследование поддержано грантом РФФИ №16-04-00450.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-6, 8-25, 27–30 см. REFERENCES)

1. Николаева Л.И., Макашова В.В., Петрова Е.В., Шипулин Г.А., Самохвалов Е.И., Токмалаев А.К. и др. Снижение содержания антител к вирусу гепатита С при антивирусной терапии. *Биомедицинская химия*. 2009; 55(2): 201-12.
26. Куприянов В.В., Николаева Л.И., Зыкова А.А., Махновский П.И. Изучение перспектив использования антигена NS4A вируса гепатита С для разработки мозаичной рекомбинантной вакцины с самоадьювантными свойствами. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(1): 61-7.

### REFERENCES

1. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01436357>
2. Ridge J.P., Di Rosa F., Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998; 393(6684): 474-8.
3. Jallow S., Leligidowicz A., Kramer H.B., Onyango C., Cotton M., Wright C., et al. The presence of prolines in the flanking region of an immunodominant HIV-2 gag epitope influences the quality and quantity of the epitope generated. *Eur. J. Immunol.* 2015; 45(8): 2232-42.
4. Chang J.C., Seidel C., Ofenloch B., Jue D.L., Fieds H.A., Khudyakov Y.E. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as modeled with synthetic peptides. *Virology*. 1999; 257(1): 177-90.
5. Bermúdez-Aguirre A.D., Padilla-Noriega I., Zenteno E., Reyes-Leyva J. Identification of amino acid variants in the hepatitis C virus non-structural protein 4A. *Tohoku J. Exp. Med.* 2009; 218(3): 165-75.
6. Desombere I., Van Vlierberghe H., Wieland O., Hultgren C., Sallberg M., Quiroga J., et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 2007; 79(6): 701-13.
7. Nikolaeva L.I., Makashova V.V., Petrova E.V., Shipulin G.A., Samokhvalov E.I., Tokmalaev A.K., et al. The decline in antibodies to hepatitis C virus during antiviral therapy. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2009; 55(2): 201-12. (in Russian)
8. Li X.D., Sun L., Seth R.B., Pineda G., Chen Z.J. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the

- mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(49): 17717-22.
9. Li K., Foy E., Ferreon J.C., Nakamura M., Ferreon A.C., Ikeda M., et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(8): 2992-7.
  10. Nitta S., Sakamoto N., Nakagawa M., Kakinuma S., Mishima K., Kusano-Kitazume A., et al. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*. 2013; 57(1): 46-58.
  11. Einav S., Sklan E.H., Moon H.M., Gehrig E., Liu P., Hao Y., et al. The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology*. 2008; 47(3): 827-35.
  12. Duan L., Lei P., Yumei X., Xiaoping X., Futao Z., Li M., et al. Prediction and identification-based prediction of chinese hepatitis C viral-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes. *J. Med. Virol.* 2011; 83(8): 1315-20.
  13. Huang X.J., Lü X., Lei Y.F., Yang J., Yao M., Lan H.Y., et al. Cellular immunogenicity of a multi-epitope peptide vaccine candidate based on hepatitis C virus NS5A, NS4B and core proteins in HHD-2 mice. *J. Virol. Meth.* 2013; 189(1): 47-52.
  14. Day C.L., Lauer G.M., Robbins G.K., McGovern B., Wurcel A.G., Gandhi R.T., et al. Broad specificity of virus-specific CD4 T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12584-95.
  15. Alexander J., Oseroff C., Dahlberg C., Qin M., Ishioka G., Beebe M. A Decapeptide polypeptide primes for multiple CD8+, IFN-gamma and Th lymphocyte responses: evaluation of multipeptide polypeptides as a mode for vaccine delivery. *J. Immunol.* 2002; 168(12): 6189-98.
  16. Chua B.Y., Eriksson E.M., Brown L.E., Zeng W., Gowans E.J., Torresi J., et al. A self-adjuncting lipopeptide-based vaccine candidate for the treatment of hepatitis C virus infection. *Vaccine*. 2008; 26(37): 4866-75.
  17. Langhans B., Braunschweiler I., Schweitzer S., Jung G., Inchausti G., Sauerbruch T., et al. Lipidation of T helper sequences from hepatitis C virus core significantly enhances T-cell activity *in vitro*. *Immunology*. 2001; 102(4): 460-5.
  18. Shamriz S., Ofoghi H. Design, structure prediction and molecular dynamics simulation of a fusion construct containing malaria pre-erythrocytic vaccine candidate, PfcElTOS, and human interleukin 2 as adjuvant. *BMC Bioinformatics*. 2016; 17: 71-86.
  19. Faulkner L., Buchan G., Lockhart E., Slobbe L., Wilson M., Baird M. IL-2 linked to a peptide from influenza hemagglutinin enhances T cell activation by affecting the antigen-presentation function of bone marrow-derived dendritic cells. *Int. Immunol.* 2001; 13(6): 713-21.
  20. Zhang H.X., Qiu Y.Y., Zhao Y.H., Liu X.T., Liu M., Yu A.-L. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. *Mol. Cell Probes*. 2014; 28(1): 25-30.
  21. Peptide Cleavage. Available at: [http://peptibase.cs.biu.ac.il/PepCleave\\_I/ SYFPEITHI](http://peptibase.cs.biu.ac.il/PepCleave_I/ SYFPEITHI). Available at: <http://www.syfpeithi.de> MAPPP. Available at: <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP> Immune epitope database and analysis resource. Available at: <http://www.iedb.org>
  22. Arai R., Wriggers W., Nishikawa Y., Nagamune T.I., Fujisawa T. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. *Proteins*. 2004; 57(4): 829-38.
  23. Chen H.W., Liu S.J., Liu H.H., Kwok Y., Lin C.L., Lin L.H., et al. A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. *Vaccine*. 2009; 27(9): 1400-9.
  24. Lu L., Hsieh M., Oriss T.B., Morel P.A., Starzl T.E., Rao A.S., et al. Generation of DC from mouse spleen cell cultures in response to GM-CSF: immunophenotypic and functional analyses. *Immunology*. 1995; 84(1): 127-34.
  25. Muccioli M., Pate M., Omosebi O., Benencia F. Generation and labeling of murine bone marrow-derived dendritic cells with Qdot nanocrystals for tracking studies. *J. Vis. Exp.* 2011; (52): e2785.
  26. Kupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Zykova A.A., Makhnovskiy P.I. Study the prospects for using the hepatitis C virus antigen NS4A to develop a mosaic recombinant vaccine with self-adjuncting properties. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2017; 16(1): 61-7. (in Russian)
  27. Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(6): 787-96.
  28. Galdino A.S., Santos J.C., Souza M.Q., Nóbrega Y.K.M., Xavier M.A.E., Felipe M.S.S., et al. A novel structurally stable multipeptide protein for detection of HCV. *Hepat. Res. Treat.* 2016; 2016: 6592143.
  29. Chang K.M., Rehmann B., McHutchison J.G., Pasquinelli C., Southwood S., Sette A., et al. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(9): 2376-85.
  30. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Gruner N.H., Jung M.C., Schraut W., Schirren C.A., et al. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J. Virol.* 2005; 79: 12425-33.

Поступила 10.11.17  
Принята в печать 12.12.17

## РЕЦЕНЗИИ

© АЛЕКСЕЕВА С.В., 2018

УДК 616.993/995(049.32)

**Макаров В.В., Лозовой Д.А.** Новые особо опасные инфекции, ассоциированные с рукокрылыми. Владимир: РУДН, ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2016. — 160 с.

Монография представляет собой редкий для отечественной научной литературы аналитический труд по проблеме вирусных зоонозов, ассоциированных с рукокрылыми, что особенно важно в связи с эмерджентной природой данных инфекций. Авторами проведено глубокое всестороннее изучение фундаментальных основ новых особо опасных инфекций рукокрылых и их эпидемиологических особенностей. Привлечено внимание к малоизученности инфекций, связанных с рукокрылыми, в отечественной эпидемиологии, особенно ветеринарной, хотя несомненным является факт серьёзной глобальной эпидемиологической опасности системы вирус—рукокрылые. В качестве наиболее актуального примера можно привести бешенство рукокрылых, являющееся потенциальным риском для людей практически на всех континентах. Недавняя вспышка геморрагической лихорадки Эбола в странах Западной Африки, объявленная ВОЗ угрозой международного масштаба, всколыхнула также интерес к природно-очаговым инфекциям, связанным с рукокрылыми, и вовлечению других восприимчивых видов в эпидемический процесс. Актуальность исследуемого авторами вопроса подтверж-

дается ростом количества научных работ и публикаций по данной проблематике в мире.

Для лучшего раскрытия темы авторами в начале монографии большое внимание уделено рассмотрению систематики, биологии и экологии рукокрылых. Собранный материал чрезвычайно полезен для специалистов, так как позволяет ознакомиться с уникальными биоэкологическими особенностями отряда рукокрылых и связанных с ними причин возникновения особой резервуарной роли этих млекопитающих в эпидемическом процессе. Несоразмерно малый интерес у ветеринарных и медицинских эпидемиологов к рукокрылым, а они являются вторым по численности отрядом млекопитающих после грызунов, связан с необычайной обособленностью существования этих животных, отсутствием информации в учебной и научной специальной литературе. Представленная монография успешно решает задачу по привлечению внимания соответствующих специалистов и создаёт основу для дальнейшего прикладного применения знаний хироптологов (биологов, изучающих рукокрылых) в ветеринарной и медицинской эпидемиологии.

Важное сугубо эпидемиологическое значение имеет

информация, приведённая в разделе о системе вирусы—рукокрылые и эпидемиологических особенностях восприимчивости рукокрылых. Система вирус—рукокрылые рассматривается как классическая эволюционно сложившаяся система паразит—хозяин с преобладанием бессимптомных форм инфекции и формированием природно-очаговой эндемии в популяции, время от времени выносимой как тупиковая инфекция за её пределы за счёт нерезервуарных восприимчивых видов. Необычайно интересным является факт существования особых условий в организме, влияющих на восприимчивость рукокрылых к инфекционным возбудителям, основанных на гетеротермии и других особенностях иммунной системы этих животных. Представленная информация важна для дальнейшего научного осмысления протекания инфекционного процесса у рукокрылых, что может раскрыть непредвиденные механизмы иммунной системы организма млекопитающих, полезные для понимания патфизиологии не только инфекционных болезней, но, к примеру, злокачественных заболеваний человека, отсутствующих у рукокрылых. Большое значение придаётся феномену повышенной виральности рукокрылых как глобального фактора эпидемической эмерджентности, что необходимо для определения приоритетных эпидемических опасностей существующих резервуаров. На основе анализа представленных данных авторы делают вывод о сравнительной лёгкости заражения ассоциированными с рукокрылыми болезнями других видов млекопитающих из-за отсутствия у последних защитных механизмов, способных противостоять так называемым «bat-borne» вирусам.

Информация о вирусах, которые ассоциированы с рукокрылыми, представлена в отдельной главе в виде сводного материала по эпидемической роли отдельных вирусов для определённых стран, эпидемиологическим особенностям вспышек, эпидемиологической географии, систематическим и биологическим особенностям. В этой главе много таблиц, рисунков и фотографических изображений, выгодно структурирующих и отображающих аналитическую информацию.

Следуя логике изложения, далее авторы пристальное внимание уделяют отдельным нозологическим единицам, связанным с рукокрылыми. Это лиссавирусные, парамиксовирусные, коронавирусные и филловирусные инфекции. Из всех представленных болезней бешенство является наиболее изученным, его природно-очаговый характер и эпидемиологические особенности давно и хорошо известны. В последние годы это касается и бешенства рукокрылых, которое рассмотрено авторами с особым вниманием к зоонотическому потенциалу инфекции для человека в условиях синантропизации рукокрылых. Представители группы зоонозных природно-очаговых вирусных геморрагических лихорадок — Марбургвирусная болезнь и болезнь, вызываемая вирусом Эбола, — возникли в 60—70-е годы прошлого столетия и с тех пор не прекращают проявлять свой эмерджентный потенциал в эндемичных зонах. Особенно большую тревогу вызвали очередные вспышки, вызванные вирусом Эбола в 2014—2015 гг., выявившие серьёзный эмерджентный риск и признанные ВОЗ угрозой международного масштаба. Эти эпидемии ещё раз подтвердили неясность факторов, влияющих в совокупности на эпидемические проявления такой особо опасной вирусной болезни, каковой является болезнь, вызванная вирусом Эбола. Авторы делают важный вывод о необходимости оценки риска заноса болезни в Россию из неблагополучных зон, а также пристального внимания к свиньям как вероятным промежуточным хозяевам вируса и факторам риска распространения инфекции. Относительно «молодыми» инфекциями с 20—30-летней историей являются экзотические и потому малоизвестные в России болезни

Хендра, Нипах, Хенипавирусная инфекция и болезнь Менангале. Перечисленные зоонозные инфекции рукокрылых требуют пристального внимания вирусологов и эпидемиологов с целью дальнейшего углубления фундаментальных знаний о возбудителях, их взаимодействии с хозяевами и влиянии на проявления эпидемического процесса. Тяжёлый острый респираторный синдром (ТОРС) является новой эмерджентной инфекцией (с 2002 г.), возникшей в Китае и экспортированной в дальнейшем в другие страны. Быстрое выявление ключевых звеньев эпидемической цепи, в основе которой лежали рукокрылые как резервуар, а некоторые восприимчивые животные как промежуточный хозяин вируса, позволило за короткий срок значительно снизить заболеваемость человека вплоть до спорадической. Это ещё раз подчёркивает важность изучения инфекций рукокрылых и системы вирус—хозяин для принятия противоэпидемических мер.

По результатам проведённого информационного анализа данных о вирусах и вирусных инфекциях рукокрылых авторы монографии внедряют рассмотренные ими категории в область теоретических знаний об инфекционном и эпидемическом процессе. На примере рассмотренных инфекций рукокрылых вводятся понятия сукцессия, амплификация, spill-over, индекс-случай и другие, что, несомненно, является важным процессом гармонизации терминов отечественной и мировой науки, однако, по мнению рецензента, требует всестороннего обсуждения целесообразности введения некоторых англицизмов в российскую эпидемиологию. Неприятие в качестве основополагающей теории эпидемиологического процесса Л.В. Громашевского вызывает удивление, так как приведённые авторами утверждения относительно определённых понятий и явлений не отвергают, а расширяют и углубляют современные знания об инфекции и инфекционном процессе и давно известны российским эпидемиологам.

Завершающая глава монографии является синтетической, в ней подводятся итог и рассматриваются отдельные эпидемические особенности особо опасных инфекций рукокрылых. Особенно интересными для специалиста являются сведения о структурных моделях эпидемической динамики болезней, ассоциированных с рукокрылыми, а также о факторах макроэпидемиологического риска.

В заключении кратко представлены выводы по рассмотренной в монографии проблематике эмерджентного потенциала особо опасных инфекций рукокрылых, на основе которых даны рекомендации по дальнейшему использованию в ветеринарной науке и практике представленного аналитического материала.

Ещё раз следует отметить хорошее структурирование столь многопланового материала авторами монографии с помощью таблиц, графиков, рисунков, а также наглядность за счёт качественного иллюстративного материала различных видов рукокрылых и их вирусов. Объективность представленной информации не оставляет сомнений ввиду использования большого количества литературных источников, проработано 200 научных работ, большая часть из которых — иностранные источники. В приложениях приведён большой объём справочной информации.

Монография будет полезна специалистам федеральных служб ветеринарного и санитарно-эпидемиологического надзора, а также работникам, занятым в сфере научных исследований инфекционных болезней. Она может использоваться студентами, аспирантами, слушателями ФПК, интересующимися инфекционной патологией и эпизоотологией, как источник углублённых научных знаний.

*Доцент С.В. Алексеева (Москва)*