



Современные подходы к созданию безопасных и эффективных генно-инженерных антирабических вакцин для животных

М. И. Доронин, А. Мазлум, Д. В. Михалишин, М. Н. Митрофанова, А. Ю. Сухарьков, В. В. Киселева, А. В. Спрыгин

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

Бешенство является одним из опасных зоонозов, который вызывает поражение центральной нервной системы, приводит к энцефаломиелиматам, параличам с неизбежным летальным исходом. Заболевание наносит значительный экономический ущерб, который связан с гибелью животных, ликвидацией последствий вспышек болезни, введением строгих ограничений, налагаемых на внутреннюю и международную торговлю продукцией животноводства, проведением профилактических и карантинных мероприятий, осуществлением лабораторных исследований. Для борьбы с бешенством Всемирная организация здравоохранения животных рекомендует вакцинопрофилактику. Для глобальной профилактики и борьбы с этим заболеванием производимого количества доступных высококачественных вакцин недостаточно. Стабильные аттенуированные производственные штаммы вируса бешенства с широкой перекрестной активностью против различных вариантов возбудителя являются идеальными кандидатами для создания надежных, безопасных и эффективных препаратов. На сегодняшний день применен ряд подходов для снижения вирулентности вируса и повышения безопасности антирабических вакцин. Большую популярность имеют методы обратной генетики, которые представляют собой новые подходы к исследованию функции конкретного гена путем анализа фенотипических эффектов за счет непосредственного манипулирования последовательностями нуклеотидов. Данная группа методов произвела революцию в молекулярной биологии, стала мощным инструментом для изучения генетики РНК-содержащих вирусов и широко используется в исследованиях возбудителя бешенства. Применение методов обратной генетики позволило проводить модификации производственных штаммов вируса бешенства для использования при изготовлении современных генно-инженерных антирабических препаратов, вызывающих стойкий и длительный иммунитет. В представленном обзоре кратко изложены общие подходы к разработке вирусных векторов с целью создания генно-инженерных вакцин против бешенства.

Ключевые слова: обзор, вирус бешенства, гены, генно-инженерные антирабические вакцины, методы обратной генетики

Благодарности: Работа выполнена в рамках исследовательской программы «Создание комплекса средств защиты против экономически и социально значимых болезней животных на основе отобранных методами геномного секвенирования производственных штаммов микроорганизмов», осуществляемой при выполнении отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы, проводимых при реализации федерального проекта «Развитие масштабных научных и научно-технологических проектов по приоритетным исследовательским направлениям» национального проекта «Наука и университеты».

Для цитирования: Доронин М. И., Мазлум А., Михалишин Д. В., Митрофанова М. Н., Сухарьков А. Ю., Киселева В. В., Спрыгин А. В. Современные подходы к созданию безопасных и эффективных генно-инженерных антирабических вакцин для животных. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (1): 6–12. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-1-6-12.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, заведующий сектором лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: doronin@arriah.ru.

Modern approaches to production of safe and effective genetically modified rabies vaccines for animals

M. I. Doronin, A. Mazloun, D. V. Mikhailishin, M. N. Mitrofanova, A. Yu. Sukharkov, V. V. Kiseleva, A. V. Sprygin

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

SUMMARY

Rabies is a dangerous zoonotic disease that affects the central nervous system, causes encephalomyelitis and paralyses and is almost invariably fatal. The disease causes significant economic losses associated with the death of animals, outbreak consequences, strict restrictions on domestic and international trade in livestock products, preventive and quarantine measures, laboratory tests. The World Organization for Animal Health recommends vaccination to control rabies. Taking into account that there is a lack of affordable high-quality vaccines to globally prevent and control the disease, stable, attenuated production strains of rabies virus with broad cross-activity against various variants of the pathogen shall be considered as ideal candidates to produce high-quality, safe and effective vaccines. Currently, some approaches are applied to reduce the virus virulence and improve safety of rabies vaccines. Reverse genetics is very popular now. It provides new approaches to study functions of a specific gene by analyzing phenotypic effects after direct manipulations with nucleotide sequences. The methods of reverse genetics have revolutionized molecular biology and have become a powerful tool to study genetics of RNA viruses. These methods are widely used to study rabies

© Доронин М. И., Мазлум А., Михалишин Д. В., Митрофанова М. Н., Сухарьков А. Ю., Киселева В. В., Спрыгин А. В., 2023

virus. The use of reverse genetics has made it possible to modify rabies virus production strains for manufacture of modern genetically modified rabies vaccines that induce a persistent and long-term immunity. The review briefly covers general approaches to development of viral vectors with the purpose to create genetically modified rabies vaccines.

Keywords: review, rabies virus, genes, genetically modified rabies vaccines, methods of reverse genetics

Acknowledgements: The work has been done as part of the research program “Creating protection tools for economically and socially significant animal diseases based on production strains of microorganisms selected by genomic sequencing”, implemented within some measures of the Federal Program for Genetic Technologies Development for 2019–2027, taken under the Federal Project “Development of large-scale scientific and scientific-technological projects in priority research areas” of the national project “Science and Universities”.

For citation: Doronin M. I., Mazloum A., Mikhailishin D. V., Mitrofanova M. N., Sukharkov A. Yu., Kiseleva V. V., Sprygin A. V. Modern approaches to production of safe and effective genetically modified rabies vaccines for animals. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (1): 6–12. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-1-6-12.

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

For correspondence: Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Head of Sector, Laboratory for FMD Prevention, FGBI “ARRIAH”, 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство – острое вирусное заболевание, поражающее почти все виды млекопитающих, включая человека [1]. В случае развития клинических признаков летальность составляет 100%. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, более 59 000 случаев смерти людей ежегодно в мире обусловлены укусами инфицированных вирусом бешенства животных.

Для успешного искоренения заболевания необходимо: выполнять комплекс мер по вакцинопрофилактике диких плотоядных животных (программа по оральной иммунизации); осуществлять вакцинопрофилактику домашних животных; проводить по современной схеме лечебно-профилактическую иммунизацию обратившихся за антирабической помощью людей и профилактическую вакцинацию людей групп риска, прежде всего профессионального; контролировать проводимые антирабические мероприятия, включающие в себя блок задач и методик. Учитывая, что для глобальной профилактики и борьбы с этим заболеванием производимого количества доступных высококачественных вакцин недостаточно, идеальными кандидатами для создания относительно недорогих, надежных, безопасных и эффективных препаратов представляются стабильные аттенуированные производственные штаммы вируса бешенства с широкой перекрестной активностью против различных вариантов возбудителя [2]. Однако разработка таких препаратов требует значительных усилий.

С момента получения первой антирабической вакцины Пастером в конце XIX века препараты значительно усовершенствовались, а иммунизация стала проводиться как для домашних и сельскохозяйственных животных, так и для видов – резервуаров возбудителя [3]. Долгое время для изготовления вакцин применяли ткани головного мозга, пораженные вирусом. Сообщалось о серьезных побочных реакциях при использовании антирабических вакцин из нервных тканей либо из тканей развивающихся эмбрионов птиц. Появление современных технологий промышленного культивирования и ферментации клеток значительно расширило возможности производства вакцин высо-

кого качества с заданным количеством иммуногенных компонентов [2].

Для борьбы с бешенством широко применяются инактивированные и аттенуированные вакцины, при этом они имеют определенные недостатки, наиболее важные из которых связаны с их безопасностью и жесткими требованиями к уровню биологической безопасности лаборатории. Современные вакцины против бешенства, представляющие собой химически инактивированный цельный вирусный препарат, соединенный с адъювантом, либо живые вакцины (чаще всего используются в энзоотических районах), оказались очень успешными в снижении числа вспышек во всем мире [4, 5]. Однако при использовании живых антирабических вакцин существует риск возврата вирулентности применяемого штамма, что крайне опасно. Кроме того, важной проблемой, связанной с изготовлением коммерческих вакцин, является необходимость в дорогостоящих производственных мощностях, локализованных в помещениях с уровнем биобезопасности BSL-3, и образование большого количества инфекционного агента для производства препарата. Возможность обойти эти ограничения появилась за счет разработок генно-инженерных вакцин, которые безопасны в производстве. Применяемые модифицированные конструкции являются неинфекционными и могут использоваться для изготовления препаратов в лабораториях уровня BSL-2. Но при этом необходимо доказывать отсутствие вирулентности вируса, полученного методами обратной генетики, или его принадлежность к 3–4-й группам патогенности [6–8].

В 1994 г. M. J. Schnell et al. удалось клонировать кДНК каждого гена вируса бешенства и получить модифицированный вирус. В последнее время в связи с накоплением большого количества данных о последовательностях генов для определения их функций стали применять методы обратной генетики. Сущность данного подхода заключается в движении «от генотипа к фенотипу», а именно в проведении различных манипуляций с последовательностями генов, изменяя или выключая тот или иной ген, и последующем анализе того, какие изменения они вызовут [9]. При этом

в отличие от классических подходов методы обратной генетики позволяют использовать нуклеотидные последовательности для анализа специфической роли гена в определении фенотипа.

В настоящее время существуют 4 основные группы данных методов: замещение/выключение гена путем гомологичной рекомбинации; РНК-интерференция/генный сайленсинг; инсерционный Т-ДНК-мутагенез (T-DNA tagging); TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes). Следует отметить, что создание методов обратной генетики значительно облегчило проведение молекулярно-биологического анализа РНК-содержащих вирусов за счет появления возможности проводить исследования непосредственно с молекулами рибонуклеиновой кислоты [10].

Вследствие проведения реверсии *in vitro* РНК вируса преобразуется в соответствующую ей кДНК. Дальнейшие манипуляции с последовательностью полученной нуклеиновой кислоты, такие как сайт-специфическая мутация, делеция, вставка, замена участка гена, либо полностью всего гена, могут быть выполнены на уровне кДНК для изучения структуры и функции конкретного гена [11]. Так, M. J. Schnell et al. в 1994 г. применяли методы обратной генетики для исследования ослабленного фиксированного штамма SAD-B19 вируса бешенства [9]. В последующем многие исследователи стали использовать этот мощный инструмент для изучения молекулярной биологии вирусов бешенства генетической группы RABV. Методы обратной генетики открыли широкие перспективы для разработки современных генно-инженерных вакцин против бешенства, которые гораздо безопаснее, чем традиционные вакцины [10, 12, 13].

В представленном обзоре кратко изложены общие подходы к разработке вирусных векторов с целью создания генно-инженерных антирабических вакцин. Проанализировано множество работ, посвященных применению методов обратной генетики вирусов с отрицательной цепью РНК, а также истории и разработке вакцин против бешенства [2, 3, 5, 7, 14–16]. В статье обобщены применяемые в настоящее время технологии с использованием методов обратной генетики для снижения вирулентности и повышения безопасности вакцин против бешенства. Рассматриваются также общие вопросы, касающиеся применения данной группы методов для работы с вирусами, геном которых представлен РНК с отрицательным смыслом.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРОЕНИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Возбудителем бешенства является нейротропный вирус, принадлежащий к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. За подавляющее большинство случаев ответственен вирус бешенства генетической группы RABV (*Rabies virus*) [8].

Структура вириона представляет собой пулевидную частицу длиной примерно 250 нм и диаметром 70 нм. Геном вируса бешенства – одноцепочечная РНК отрицательной полярности размером 11 000–12 000 н. о., кодирующая следующие пять структурных белков в консервативном порядке 3'→5': нуклеопротеин (N-белок), фосфопротеин (P-белок), матриксный белок (M-белок), гликопротеин (G-белок) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L-белок) [4].

Транскрипция начинается с синтеза короткой лидерной РНК с 3'-конца геномной РНК. Вирусная нукле-

иновая кислота служит матрицей для транскрипции РНК-зависимым РНК-полимеразным комплексом, состоящим из L- и P-белков, что приводит к синтезу мРНК для экспрессии N-, P-, M-, G- и L-белков. Репликация геномов с отрицательной цепью приводит к образованию антигеномов, которые служат шаблонами для синтеза геномов с отрицательной цепью. Геномная и комплементарная ей антигеномная РНК плотно инкапсулируются нуклеопротеином с образованием спирального рибонуклеопротеина. В качестве шаблона для репликации и транскрипции подходит только рибонуклеопротеин, а не свободная РНК. Вирусный капсид окружен мембраной, полученной из клетки-хозяина, которая взаимодействует с матриксным белком и гликопротеином вируса бешенства [17–19].

Каждое соединение между генами вируса бешенства в составе генома содержит последовательность, определяющую конец вышестоящего гена, межгенный участок и начальный фрагмент для нижестоящего гена. Эти последовательности функционируют как сигнал для полиаденилирования, а также для инициации, укоротки и метилирования нисходящей РНК. Межгенные участки вируса бешенства N-P, P-M, M-G и G-L (нетранслируемая псевдогенная ψ -область) составляют 2, 5, 5 и 24 нуклеотида соответственно [14, 20].

АНАЛИЗ ГЕНОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

G-ген вируса бешенства и его экспрессия. Гликопротеин – белок вируса бешенства, который локализован на поверхности пулевидного вириона. Он является основным структурным белком и антигеном вируса бешенства, который вызывает высокий иммуногенный ответ. G-белок выполняет две основные функции: определяет патогенность вирусной частицы и отвечает за индуцирование гуморального и клеточного иммунитета против данного возбудителя [19, 21]. Кроме того, гликопротеин обеспечивает взаимодействие вириона с соответствующими рецепторами на поверхности клеток для его проникновения внутрь, определяет нейротропный характер заражения организма [22]. Важно отметить, что в отличие от полевых изолятов ослабленные вакцинные штаммы вируса бешенства способны синтезировать более высокие уровни гликопротеина в инфицированных нейронах [23]. Исследователи С. E. Rupprecht et al. обращают внимание на то, что ослабленные штаммы возбудителя бешенства вызывают массовый апоптоз нейронов, в то время как при заражении патогенным уличным изолятом данные явления наблюдаются гораздо реже [8]. Искусственное внесение мутаций в G-ген вируса бешенства позволяет получать материал для создания антирабических вакцин нового поколения на основе генно-инженерных конструкций.

Генные конструкции вируса бешенства, содержащие две и три копии G-гена. Как показывают результаты исследований ряда авторов, модификация вируса бешенства, содержащего две копии G-гена, позволяла увеличивать экспрессию гликопротеина, что значительно улучшало эффективность вакцин, повышая их иммуногенность. Патогенность штаммов при этом резко снижалась. Исследователи также показали, что уровень экспрессии G-белка обратно коррелирует со степенью патогенности вируса бешенства [21, 24, 25]. Повышенный синтез гликопротеина связан с усиленным

апоптозом, который способствует индукции процесса регуляции генов, связанных с иммунными реакциями хозяина, наблюдаемыми в нейронах, инфицированных ослабленными штаммами вируса [21].

Коллективом японских ученых J. Hosokawa-Muto et al. был создан штамм R(NPMGGL) рекомбинантного вируса бешенства, несущий гены двойного гликопротеина G. Данная конструкция была получена с помощью методов обратной генетики с использованием клонированной кДНК штамма RC-HL. Биологические свойства созданного вируса сравнивались с таковыми у рекомбинантного штамма RC-HL (rRC-HL). Интенсивность репродукции штамма R(NPMGGL) вируса бешенства в клеточных линиях и вирулентность для взрослых мышей были почти такими же, как у штамма rRC-HL. При этом содержание G-белка в очищенном вирионе штамма R(NPMGGL) и уровень экспрессии гликопротеина в инфицированных клетках были в 1,5 раза выше, чем у штамма rRC-HL. В результате последовательных пассажей штамма R(NPMGGL) в культуре клеток уровень экспрессии G-белка сохранялся, титр инфекционной активности вируса повышался по мере адаптации к клеткам. Было также показано, что штамм R(NPMGGL) обладает более высокой иммуногенностью, чем штамм rRC-HL [6]. Таким образом, модифицированный штамм вируса бешенства, несущий двойной G-ген, позволит в будущем проводить разработки новых генно-инженерных вакцин против бешенства. Следует также отметить, что в данном случае речь идет об инактивированном препарате, поскольку в качестве единственной модификации выступает дублирование G-гена, позволяющее значительно увеличить концентрацию иммуногенных компонентов и, как следствие, иммуногенность вакцины.

В своей работе Y. Tan et al. использовали саморасщепляющуюся последовательность 2A-гена вируса ящура для экспрессии двойных или тройных копий G-гена вируса бешенства из одной открытой рамки считывания, полученной из аденовируса человека 5-го типа (AdHu-5). Рекомбинантные аденовирусы продуцируют вирус в сходных титрах, что указывает на то, что вставка двойных или тройных копий G-гена вируса бешенства, связанного с последовательностью 2A-гена вируса ящура, не влияет на репликацию вируса. Гликопротеин эффективно экспрессировался конструкциями, содержащими последовательность 2A-гена, и сохранял свои антигенные свойства. Саморасщепляющийся пептид 2A опосредовал эффективную генерацию индивидуального гликопротеина вируса бешенства при оценке транзиторной экспрессии. Методами проточной цитометрии доказали, что уровни экспрессии G-гена были выше в рекомбинантных аденовирусных конструкциях, несущих несколько копий гена гликопротеина вируса бешенства [26].

Таким образом, повышение уровня экспрессии G-гена обладает рядом преимуществ для создания генно-инженерных вакцин: 1) существенно улучшает производственные мощности и биобезопасность; 2) снижает экономические затраты. Эти факторы имеют решающее значение для современного изготовления безопасных и эффективных доступных антирабических вакцин. Таким образом, рекомбинантный вирус бешенства, экспрессирующий две или три копии гликопротеина, является кандидатом для разработки генно-инженерных антирабических вакцин нового поколения.

Значимые нуклеотидные замены в G-гене вируса бешенства. По данным M. Faber et al., замена одной аминокислоты в положении 333 гликопротеина с положительно заряженного остатка аргинина (Arg) или лизина (Lys) на глутамин (Gln) либо изолейцин (Ile) делает вирулентный штамм вируса бешенства апатогенным для взрослых мышей при интрацеребральном введении [21]. При этом есть сведения, что аминокислоты гликопротеина в позиции 333 не полностью ответственны за патогенность вируса. Соответственно, некоторые штаммы возбудителя бешенства, имеющие замену на Gln₃₃₃, сохраняют нейроинвазивную способность и патогенность [17].

При анализе методами обратной генетики штамма RC-HL вируса бешенства Y. Ito et al. пришли к выводу о том, что аминокислоты, расположенные между позициями 164–303 в G-белке, особенно аминокислоты в положениях 242, 255 и 268, также играют важную роль в определении апатогенности штамма [27]. В процессе исследования M. Faber et al. обнаружили, что аминокислотная замена в позиции 194 гликопротеина с аспарагина (Asn) на лизин (Lys) исключительно ответственна за восстановление патогенности у непатогенного, аттенуированного штамма SPBNGA вируса бешенства [21].

Учитывая опыт многих исследователей, можно сделать вывод, что при использовании рекомбинантных штаммов вируса бешенства, которые несут два или более G-генов, кодирующих гликопротеин с мутациями в позициях 149, 194 и 333, значительно снижается риск возвращения к патогенному фенотипу.

Значимые мутации в M-белке вируса бешенства. Матриксный белок вируса бешенства является многофункциональным, имеет небольшой молекулярный вес около 20–25 кДа и длину 202 а. о. Этот фосфопротеин представлен двумя изоформами M₁ и M₂, которые отличаются друг от друга степенью фосфорилирования. Матриксный белок структурно представляет собой мостик между N- и G-белком. M-ген является гораздо более консервативным по сравнению с P-белком. Считается, что матриксный белок образует слой между гликопротеином в оболочке вириона и спиральным ядром нуклеокапсида, состоящим из РНК и N-, L-, P-белков. M-белок является основным фактором, способствующим морфогенезу вириона [28].

В своей работе S. Finke et al. продемонстрировали, что M-белок устанавливает баланс между процессами транскрипции и репликации вируса [15, 16]. Он взаимодействует с рибонуклеопротеином вируса бешенства, который конденсирует в плотную пулевидную форму, и играет ключевую роль в сборке и почковании зрелых вирионов [29].

По данным C. Wirblich et al., в структуре матриксного белка имеется L-домен с четырьмя мотивами, одним из которых является PPxY (PPEY), замыкающийся на конце M-белка. Авторы создали конструкции с точечными мутациями и выявили, что PPEY необходим для эффективного высвобождения вириона из клеточной мембраны. Аминокислотные делеции и замены в мотиве PPEY приводят к уменьшению распространения вирусной инфекции. Сконструированные на этой основе рекомбинантные вирусы обладали ослабленной вирулентностью для мышей, при этом вызывали мощные иммунные реакции [30]. Таким образом, значимые замены в матриксном белке вируса бешенства могут позволить создавать генные конструкции для получения современных антирабических вакцин.

Значимые мутации в Р-гене вируса бешенства. Важнейшим структурным белком вируса бешенства является фосфопротеин, молекулярный вес которого составляет 260 кДа, длина около 330 а. о. N-концевая развернутая область Р-белка взаимодействует с РНК-полимеразой. Р-ген кодирует не менее четырех белков, синтезирующихся в инфицированной клетке. Фосфопротеин выполняет функцию шаперона и образует связь с N-белком, который еще не связан с вирусной РНК. С-концевой домен Р-белка связывается с комплексом «нуклеопротеин – РНК» и присоединяет полимеразный комплекс [29].

В процессе исследования М. J. Schnell et al. обнаружили иммунодоминантный сайт Р-белка, который располагается в диапазоне 191–206 а. о. и является антагонистом интерферона [9, 31, 32]. В начале века Y. Jacob et al. выявили, что легкая цепь цитоплазматического динеина, участвующая во внутриклеточном транспорте органелл, взаимодействует с фосфопротеином вируса бешенства [33]. Показано, что делеция домена Р-белка, связывающего динеин LC8, значительно подавляла репликацию и транскрипцию вируса в нейронах. Следует отметить, что такой рекомбинантный вирус отличался снижением уровня экспрессии генов в культурах нейрональных клеток, в то время как характер роста на ненейрональных клетках оставался неизменным [17, 26]. Таким образом, аминокислотные мутации в связывающем динеин домене Р-белка позволяют ослабить вирулентность вируса бешенства, а созданные на этой основе рекомбинантные вирусы дают возможность разрабатывать генно-инженерные вакцины против бешенства.

СИНТЕЗ ИНФЕКЦИОННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ С ПОМОЩЬЮ МОДИФИЦИРОВАННОЙ КДНК

В 1994 г. М. J. Schnell et al. впервые сконструировали вирус бешенства с применением клонированной кДНК [9]. Принципиальная схема данного процесса включала по меньшей мере одновременную трансфекцию в клетку четырех плазмид, кодирующих N-, P-, L-белки и полную РНК вируса. (-)РНК вируса бешенства подвергали обратной транскрипции в антигеномную кДНК с положительным смыслом (рис.). Путем амплификации специфического гена из полной РНК сконструировали 3 плазмиды p-N, p-P, p-L,

экспрессирующие N-, P- и L-белки вируса бешенства. Во избежание мутаций L-ген собирали из поэтапно клонированных фрагментов. Аналогично конструировали плазмиду, несущую информацию о всем геноме вируса бешенства (р-геном).

С помощью рестриктаз проводили поэтапную сборку вирусной кДНК в составе плазмиды с целью создания полноценной матрицы для реализации генетического материала вируса бешенства. Для осуществления транскрипции сконструированных плазмид использовали T7-РНК-полимеразу либо эндогенные клеточные РНК-полимеразы I или II типов. Для того чтобы получить точные 5'- и 3'-концы вирусной РНК, клонированную вирусную кДНК фланкировали автокаталитическими последовательностями рибозима. N-, P- и L-белки вируса бешенства, экспрессируемые тремя плаزمидами, инкапсулируют транскрибируемую полноразмерную антигеномную смысловую РНК с образованием рибонуклеопротеина, который функционирует в качестве матрицы для дальнейшей экспрессии структурных вирусных белков и амплификации (-)РНК вируса бешенства. Основопологающим в данном случае является применение транскриптов с антигеномным смыслом, поскольку только они могут обеспечить процесс экспрессии генов и избежать гибридизации между генной (-)РНК и плазмидными (+)РНК. Рибонуклеопротеин конденсируется в форму пули с помощью матричного белка и отделяется от цитоплазматической мембраны, где накапливались гликозилированные тримерные трансмембранные соединения. В завершении процесса формируются инфекционные вирионы, и наступает следующий цикл заражения [34–36].

В ряде работ описаны процедуры, облегчающие и повышающие эффективность создания жизнеспособного вируса бешенства. Так, для доставки РНК-полимеразы T7 вместо заражения клеток рекомбинантным вирусом осповакцины была создана клеточная линия, которая экспрессирует РНК-полимеразу T7 – BSR-T7/5 [37]. Коллективом авторов К. Inoue et al. был разработан сегментированный вариант вируса и показано, что дополнительные нуклеотиды на терминальном конце генома могут влиять на эффективность экспрессии. На 5'- и 3'-концы генома вируса бешенства были «пришиты» кодирующие последовательности

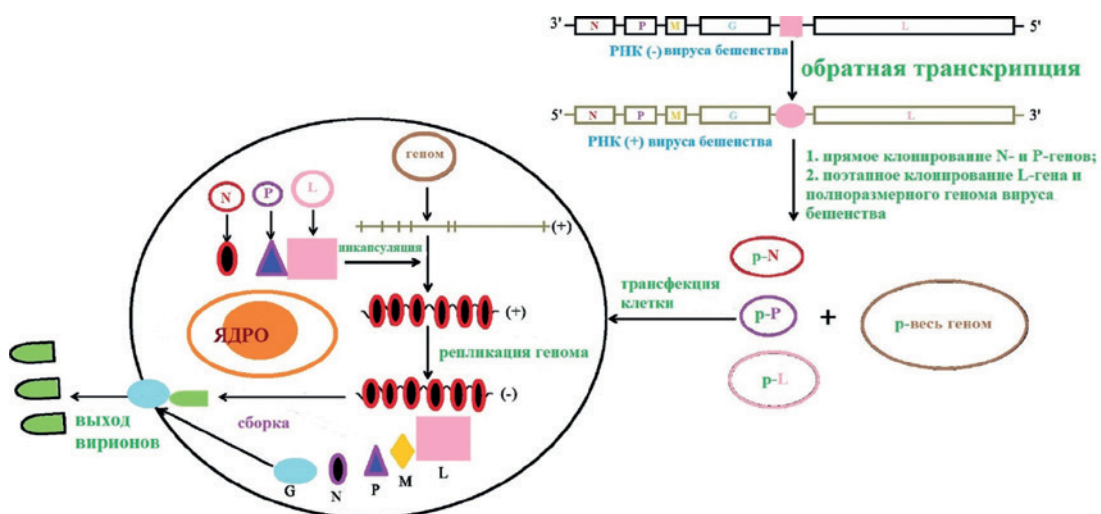


Рис. Схема процесса синтеза инфекционных рекомбинантных частиц вируса бешенства из клонированной кДНК
Fig. Synthesis of infectious recombinant rabies virus particles from cloned cDNA

двух рибозимов (HamRz и HdvRz) для получения полноразмерных транскриптов вируса с точными концами [35]. Подобные модификации значительно расширяют возможности методов обратной генетики нуклеиновой кислоты возбудителя бешенства для различных клеточных линий и позволяют быстро и эффективно генерировать рекомбинантный вирус.

Следует отметить, что учеными также проводился анализ ψ -области генома возбудителя бешенства. Они обнаружили, что вирус с выключенным псевдогеном характеризовался нормальными показателями репродукции в биологических тест-системах и не имел различий с изолятами и штаммами, которые не лишены данного региона [9, 34]. Таким образом, псевдоген ψ является идеальной мишенью для инсерций и дает возможность осуществлять различные генетические манипуляции с геномом вируса бешенства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с руководством Всемирной организации здравоохранения животных для борьбы с бешенством рекомендуется применять вакцинацию животных. В настоящее время для этих целей используют живые, а также культуральные инактивированные сорбированные и эмульсионные антирабические вакцины. При этом существует ряд недостатков, связанных с жесткими требованиями к уровню биологической безопасности производственных лабораторий и вероятностью возврата вирулентности аттенуированных штаммов вируса бешенства [3, 11, 14].

Для снижения вирулентности вируса и повышения безопасности антирабических вакцин в настоящее время применяются методы обратной генетики [38]. Как показывают результаты исследований ряда авторов [9, 12, 31], многие свойства, присущие вирусу бешенства с отрицательной несегментированной РНК, идеально подходят для конструирования векторов доставки генов с целью разработки генно-инженерных антирабических вакцин. Простой и консервативный состав генома вируса бешенства позволяет легко применять методы генной инженерии и экспрессировать измененные гены.

Инкапсуляция нуклеиновой кислоты возбудителя бешенства в рибонуклеопротеин обладает преимуществом, позволяющим значительно снизить вероятность рекомбинации и тем самым поддерживать стабильность генома [19, 38–41]. Следует учитывать высокую частоту реверсии во время репродукции вируса в инфицированной клетке, связанной с низкой точностью транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой, что указывает на необходимость одновременного внесения нескольких изменений.

После многочисленных исследований по внесению изменений в геном вируса бешенства с помощью методов обратной генетики стали конструировать аттенуированные живые штаммы возбудителя данного заболевания, что позволит разрабатывать современные генно-инженерные антирабические вакцины с высокими показателями безопасности и эффективности. В настоящее время исследователями делается акцент на значимые мутации, вносимые в G-, M-, P-гены вируса бешенства, приводящие к утрате патогенности. Особое внимание уделяется генным конструкциям, включающим в свой состав две и даже три копии G-гена, что позволяет получать суспензии с высокой концентрацией гликопротеина и индуцировать сильный иммунный от-

вет при введении животным. Интересным также является подход к применению методов обратной генетики для синтеза инфекционных рекомбинантных вирусных частиц с помощью модифицированной кДНК вируса бешенства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Hidaka Y., Lim C. K., Takayama-Ito M., Park C. H., Kimitsuki K., Shiwa N., et al. Segmentation of the rabies virus genome. *Virus Res.* 2018; 252: 68–75. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.05.017.
- Wu X., Smith T. G., Rupprecht C. E. From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines.* 2011; 10 (11): 1597–1608. DOI: 10.1586/erv.11.140.
- Briggs D. J., Nagarajan T., Rupprecht C. E. Rabies vaccines. In: *Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management*. Ed. by A. C. Jackson. 3rd ed. Academic Press; 2013; Chapter 13: 497–526. DOI: 10.1016/B978-0-12-396547-9.00013-4.
- Evans J. S., Horton D. L., Easton A. J., Fooks A. R., Banyard A. C. Rabies virus vaccines: is there a need for a pan-lyssavirus vaccine? *Vaccine.* 2012; 30 (52): 7447–7454. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.10.015.
- Hicks D. J., Fooks A. R., Johnson N. Developments in rabies vaccines. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 169 (3): 199–204. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04592.x.
- Hosokawa-Muto J., Ito N., Yamada K., Shimizu K., Sugiyama M., Minamoto N. Characterization of recombinant rabies virus carrying double glycoprotein genes. *Microbiol. Immunol.* 2006; 50 (3): 187–196. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03785.x.
- Nel L. H. Vaccines for lyssaviruses other than rabies. *Expert. Rev. Vaccines.* 2005; 4 (4): 533–540. DOI: 10.1586/14760584.4.4.533.
- Rupprecht C. E., Plotkin S. A. Rabies vaccines. In: *Vaccines*. Ed. by S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, P. A. Offit. 6th ed. Elsevier Saunders; 2013: 646–668. DOI: 10.1016/B978-1-4557-0090-5.00036-7.
- Schnell M. J., Mebatsion T., Conzelmann K. K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 1994; 13 (18): 4195–4203. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06739.x.
- Yin J., Wang X., Mao R., Zhang Z., Gao X., Luo Y., et al. Research advances on the interactions between rabies virus structural proteins and host target cells: accrued knowledge from the application of reverse genetics systems. *Viruses.* 2021; 13 (11):2288. DOI: 10.3390/v13112288.
- Conzelmann K. K. Reverse Genetics of *Mononegavirales*: The Rabies Virus Paradigm. In: *Sendai Virus Vector*. Ed. by Y. Nagai. Tokyo: Springer; 2013: 1–20. DOI: 10.1007/978-4-431-54556-9_1.
- Huang Y., Tang Q., Nadin-Davis S. A., Zhang S., Hooper C. D., Ming P., et al. Development of a reverse genetics system for a human rabies virus vaccine strain employed in China. *Virus Res.* 2010; 149 (1): 28–35. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.12.009.
- Larsen D. D., Wickersham I. R., Callaway E. M. Retrograde tracing with recombinant rabies virus reveals correlations between projection targets and dendritic architecture in layer 5 of mouse barrel cortex. *Front. Neural Circuits.* 2008; 1:5. DOI: 10.3389/neuro.04.005.2007.
- Conzelmann K. K., Cox J. H., Schneider L. G., Thiel H. J. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology.* 1990; 175 (2): 485–499. DOI: 10.1016/0042-6822(90)90433-r.
- Finke S., Conzelmann K. K. Recombinant rhabdoviruses: vectors for vaccine development and gene therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2005; 292: 165–200. DOI: 10.1007/3-540-27485-5_8.
- Finke S., Mueller-Waldeck R., Conzelmann K. K. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J. Gen. Virol.* 2003; 84: 1613–1621. DOI: 10.1099/vir.0.19128-0. PMID: 12771432.
- Mebatsion T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. *J. Virol.* 2001; 75 (23): 11496–11502. DOI: 10.1128/JVI.75.23.11496-11502.2001.
- Morimoto K., Shoji Y., Inoue S. Characterization of P gene-deficient rabies virus: propagation, pathogenicity and antigenicity. *Virus Res.* 2005; 111 (1): 61–67. DOI: 10.1016/j.virusres.2005.03.011.
- Wang Z. W., Sarmiento L., Wang Y., Li X. Q., Dhingra V., Tsegai T., et al. Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system. *J. Virol.* 2005; 79 (19): 12554–12565. DOI: 10.1128/JVI.79.19.12554-12565.2005.
- Walker P. J., Dietzgen R. G., Joubert D. A., Blasdel K. R. Rhabdovirus accessory genes. *Virus Res.* 2011; 162 (1–2): 110–125. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.09.004.
- Faber M., Faber M. L., Papaneri A., Bette M., Weihe E., Dietzschold B., Schnell M. J. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.* 2005; 79 (22): 14141–14148. DOI: 10.1128/JVI.79.22.14141-14148.2005.
- Etessami R., Conzelmann K. K., Fadai-Ghotbi B., Natelson B., Tsiang H., Ceccaldi P. E. Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies

- virus recombinant: an *in vitro* and *in vivo* study. *J. Gen. Virol.* 2000; 81: 2147–2153. DOI: 10.1099/0022-1317-81-9-2147.
23. Yan X., Prosnjak M., Curtis M. T., Weiss M. L., Faber M., Dietzschold B., Fu Z. F. Silver-haired bat rabies virus variant does not induce apoptosis in the brain of experimentally infected mice. *J. Neurovirol.* 2001; 7 (6): 518–527. DOI: 10.1080/135502801753248105.
24. Zhang G., Wang H., Mahmood F., Fu Z. F. Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms. *Vet. Microbiol.* 2013; 162 (2–4): 601–613. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.11.031.
25. Tao L., Ge J., Wang X., Wen Z., Zhai H., Hua T., et al. Generation of a recombinant rabies Flury LEP virus carrying an additional G gene creates an improved seed virus for inactivated vaccine production. *Virol. J.* 2011; 8:454. DOI: 10.1186/1743-422X-8-454.
26. Tan Y., Liang H., Chen A., Guo X. Coexpression of double or triple copies of the rabies virus glycoprotein gene using a 'self-cleaving' 2A peptide-based replication-defective human adenovirus serotype 5 vector. *Biologicals.* 2010; 38 (5): 586–593. DOI: 10.1016/j.biologicals.2010.06.001.
27. Ito Y., Ito N., Saito S., Masatani T., Nakagawa K., Atoji Y., Sugiyama M. Amino acid substitutions at positions 242, 255 and 268 in rabies virus glycoprotein affect spread of viral infection. *Microbiol. Immunol.* 2010; 54 (2): 89–97. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2009.00192.x.
28. Zandi F., Khalaj V., Goshadrou F., Meyfour A., Gholami A., Enayati S., et al. Rabies virus matrix protein targets host actin cytoskeleton: a protein-protein interaction analysis. *Pathog. Dis.* 2021; 79 (1):ftaa075. DOI: 10.1093/femspd/ftaa075.
29. Mebatsion T., König M., Conzelmann K. K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell.* 1996; 84 (6): 941–951. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81072-7.
30. Wirblich C., Tan G. S., Papaneri A., Godlewski P. J., Orenstein J. M., Harty R. N., Schnell M. J. PPEY motif within the rabies virus (RV) matrix protein is essential for efficient virion release and RV pathogenicity. *J. Virol.* 2008; 82 (19): 9730–9738. DOI: 10.1128/JVI.00889-08.
31. Schnell M. J., McGettigan J. P., Wirblich C., Papaneri A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8 (1): 51–61. DOI: 10.1038/nrmicro2260.
32. Schnell M. J., Tan G. S., Dietzschold B. The application of reverse genetics technology in the study of rabies virus (RV) pathogenesis and for the development of novel RV vaccines. *J. Neurovirol.* 2005; 11 (1): 76–81. DOI: 10.1080/13550280590900436.
33. Jacob Y., Badrane H., Ceccaldi P. E., Tordo N. Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J. Virol.* 2000; 74 (21): 10217–10222. DOI: 10.1128/jvi.74.21.10217-10222.2000.
34. Ceccaldi P. E., Fayet J., Conzelmann K. K., Tsiang H. Infection characteristics of rabies virus variants with deletion or insertion in the pseudogene sequence. *J. Neurovirol.* 1998; 4 (1): 115–119. DOI: 10.3109/13550289809113489.
35. Inoue K., Shoji Y., Kurane I., Iijima T., Sakai T., Morimoto K. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J. Virol. Methods.* 2003; 107 (2): 229–236. DOI: 10.1016/s0166-0934(02)00249-5.
36. Le Mercier P., Jacob Y., Tanner K., Tordo N. A novel expression cassette of lyssavirus shows that the distantly related Mokola virus can rescue a defective rabies virus genome. *J. Virol.* 2002; 76 (4): 2024–2027. DOI: 10.1128/jvi.76.4.2024-2027.2002.
37. Buchholz U. J., Finke S., Conzelmann K. K. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J. Virol.* 1999; 73 (1): 251–259. DOI: 10.1128/JVI.73.1.251-259.1999.
38. Wenqiang J., Yin X., Lan X., Li X., Liu J. Development of a reverse genetics system for the aG strain of rabies virus in China. *Arch. Virol.* 2014; 159 (5): 1033–1038. DOI: 10.1007/s00705-013-1919-9.
39. Wall N. R., Wickersham I. R., Cetin A., De La Parra M., Callaway E. M. Monosynaptic circuit tracing *in vivo* through Cre-dependent targeting and complementation of modified rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107 (50): 21848–21853. DOI: 10.1073/pnas.1011756107.
40. Wickersham I. R., Finke S., Conzelmann K. K., Callaway E. M. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nat. Methods.* 2007; 4 (1): 47–49. DOI: 10.1038/nmeth999.
41. Wickersham I. R., Sullivan H. A., Seung H. S. Production of glycoprotein-deleted rabies viruses for monosynaptic tracing and high-level gene expression in neurons. *Nat. Protoc.* 2010; 5 (3): 595–606. DOI: 10.1038/nprot.2009.248.

Поступила в редакцию / Received 03.11.2022

Поступила после рецензирования / Revised 15.11.2022

Принята к публикации / Accepted 09.12.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, заведующий сектором лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4682-6559>, e-mail: doronin@arriah.ru.

Мазлум Али, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, e-mail: mazlum@arriah.ru.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishin_dv@arriah.ru.

Митрофанова Мария Николаевна, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0126-9653>, e-mail: mitrofanova@arriah.ru.

Сухарьков Андрей Юрьевич, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5326-2440>, e-mail: suharkov@arriah.ru.

Киселева Валерия Владимировна, ведущий биолог лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7114-6267>, e-mail: kiseleva_vv@arriah.ru.

Спрыгин Александр Владимирович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, e-mail: sprygin@arriah.ru.

Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Head of Sector, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4682-6559>, e-mail: doronin@arriah.ru.

Ali Mazloun, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, e-mail: mazlum@arriah.ru.

Dmitry V. Mihalishin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishin_dv@arriah.ru.

Maria N. Mitrofanova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0126-9653>, e-mail: mitrofanova@arriah.ru.

Andrey Yu. Sukharkov, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Rabies and BSE, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5326-2440>, e-mail: suharkov@arriah.ru.

Valeriya V. Kiseleva, Leading Biologist, Reference Laboratory for Rabies and BSE, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7114-6267>, e-mail: kiseleva_vv@arriah.ru.

Alexander V. Sprygin, Doctor of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, e-mail: sprygin@arriah.ru.