

Новые антирабические рекомбинантные вакцины

Е. С. Седова, М. М. Шмаров

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 18.10.2016 г. Принята к публикации 17.11.2016 г.

Обзор посвящен проблемам получения новых антирабических вакцин с помощью рекомбинантных технологий. Новые подходы к созданию антирабических вакцин включают методы обратной генетики, получение антигенов вируса бешенства в культурах растительных клеток, получение вирусоподобных частиц и конструирование ДНК-вакцин и вакцин на основе различных вирусных векторов. Методы обратной генетики позволяют с помощью плазмид конструировать аттенуированные штаммы вируса бешенства. Накопление основного антигена вируса бешенства — гликопротеина G в культурах растительных клеток является перспективным с точки зрения получения «съедобных» вакцин, не требующих тщательной очистки антигена и многократного парентерального введения. Вирусоподобные частицы способны нести сразу несколько антигенов вируса бешенства, а также различные молекулярные адъюванты. ДНК-вакцины характеризуются простотой получения и невысокой стоимостью, однако требуют различных способов повышения иммуногенности. Большой интерес представляют кандидатные антирабические вакцины на основе различных вирусных векторов, экспрессирующих ген основного антигена вируса бешенства — гликопротеина G. На сегодняшний момент активно применяют ветеринарные вакцины на основе рекомбинантного вируса осповакцины и аденовируса человека пятого серотипа. Репликативно-дефектный аденовирус человека пятого серотипа является перспективным кандидатом и при создании вакцин для массовой иммунизации населения.

Ключевые слова: рекомбинантные вакцины; вирус бешенства; обратная генетика; культура клеток растений; вирусоподобные частицы; генетические вакцины.

Библиографическое описание: Седова ЕС, Шмаров ММ. Новые антирабические рекомбинантные вакцины. БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (4): 219–228.

Бешенство — это острая вирусная инфекция, вызываемая вирусами, принадлежащими к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*, сопровождающаяся дегенерацией нейронов головного и спинного мозга с летальным исходом [1]. Бешенством страдают наземные и летающие млекопитающие, заболевание развивается после укуса или ослюнения раны инфицированным животным. Подавляющее большинство (~99 %) случаев инфицирования человека приходится на вирус бешенства (*Rabies virus*) [2]. Вирус бешенства — РНК-содержащий вирус размером 75–180 нм, окруженный липопротеиновой оболочкой, высланной изнутри матриксным М-белком. Снаружи от оболочки отходят шипы гликопротеина G, отвечающего за адсорбцию и внедрение вируса в клетку. Рибонуклеопротеин вируса бешенства состоит из однонитевой линейной минус-РНК и белков: N-белка (nucleocapsid), L-белка (large) и Р-белка (phosphoprotein) [1].

Ежегодно в мире от 12 до 15 млн человек нуждаются в медицинском вмешательстве после укуса потенциально бешеного животного. От 50000 до 100000 смертей в мире (преимущественно в странах Азии и Африки) ежегодно происходит в результате инфицирования вирусом бешенства [3]. В Российской Федерации за медицинской помощью в связи с нападением животных ежегодно обращаются более 360 тыс. человек [4]. Все пострадавшие проходят курс введений вакцины против бешенства в сочетании с антирабическими иммуноглобулинами. Несмотря на эти меры, в России ежегодно регистрируется от четырех до 22 случаев смерти от бешенства [5].

Для вакцинации против бешенства людей, входящих в группы риска (охотников, спелеологов и др.), а также людей, имевших контакт с бешеным животным, применяют инактивированные антирабические вакцины. Существ-

ующие на сегодняшний день вакцины эффективны, однако в ряде случаев их применение связано с риском развития побочных реакций аллергического, невропаралитического или энцефалитного характера. Кроме того, для достижения значимого иммунного ответа инактивированные вакцины требуют многократного введения, что часто является причиной неполного прохождения курса антирабической профилактики [6].

В последние десятилетия появились принципиально новые поколения вакцин — вакцин с заранее программируемыми свойствами. Возможность вносить направленные мутации в вирусный геном, удваивать содержание целевых генов, создавать химерные белки и синтезировать их в удобных системах — все это открыло широкие перспективы для разработки новых, в том числе антирабических вакцин. Выходят на мировой рынок или находятся на разных стадиях клинических исследований вакцины на основе рекомбинантного вируса бешенства или его белков, разрабатываются генно-инженерные вакцины на базе различных вирусных и ДНК-векторов [5–8].

Получение антирабических вакцин методами обратной генетики

В 1994 г. Conzelmann и Schnell описали способ получения штамма SAD-B19 вируса бешенства с помощью плазмид, кодирующих вирусный геном [9]. Сегодня методы обратной генетики используют для повышения иммуногенности вакцинных штаммов вируса бешенства, а также для конструирования новых аттенуированных штаммов.

Одним из способов повышения иммуногенности вакцинных штаммов вируса бешенства является получение их рекомбинантных вариантов, несущих дополнительный

ген, кодирующий гликопротеин G. Были получены несущие две копии гена гликопротеина G вакцинные штаммы SPBNGA-GA [10], rLEP-G (на основе LEP-штамма) [11] и HEP-dG (на основе штамма Flury-HEP) [12]. Все они показали более высокую иммуногенность и протективные свойства по сравнению с родительскими штаммами [6].

Для аттенуирования вируса бешенства проводят модификации или делеции генов, кодирующих G, P и M белки. Был получен рекомбинантный вирус бешенства ERAG3G, несущий гликопротеин G с аминокислотной заменой Arg333 → Glu333. Такой вирус потерял нейровирусные свойства и показал способность индуцировать высокие уровни нейтрализующих антител при иммунизации мышей и собак [13–15]. Аттенуированный вирус бешенства, полученный путем удаления M-гена у штамма SAD-B19, при иммунизации макаков-резусов индуцировал появление в 4 раза более высокого уровня вирус-нейтрализующих антител, чем коммерческая вакцина [16].

Также свои вирулентные свойства потеряли рекомбинантные вирусы бешенства rHEP-MIP1 α , несущий ген макрофагального белка воспаления 1 α , и LBNSE-GM-CSF, несущий ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Оба этих вируса при иммунизации лабораторных животных обладали высокой иммуногенностью и протективными свойствами [17, 18]. На основе штамма вируса бешенства SPBN удалось получить непатогенный для мышей рекомбинантный вирус SPBN- γ , несущий ген мышиного интерферона гамма IFN- γ [19].

Рекомбинантный вирус бешенства RABV-mICAM-1 был получен путем введения в геном мышиного гена, кодирующего молекулу внутриклеточной адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Связывание ICAM-1 с мембранным белком LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1) В-клеток приводило к их активации и улучшению гуморального иммунного ответа. Было показано, что для достижения значительных иммунных реакций требовалась меньшая доза вируса, чем при иммунизации мышей родительским штаммом [20].

Следует отметить, что аттенуированные вакцины могут с успехом применяться для пероральной вакцинации животных, однако их применение для вакцинации людей сопряжено с рядом трудностей. Так введение аттенуированных вакцин совместно с антирабическим иммуноглобулином G может привести к инактивации вакцины и существенному снижению ее эффективности. Кроме того, аттенуированные вакцины могут нести риск остаточной вирулентности, а также вызывать аллергические и неврологические осложнения [6, 7].

Получение рекомбинантных белков вируса бешенства и их эпитопов с помощью клеток растений

Еще одним современным подходом к созданию антирабических вакцин является конструирование вакцин на основе рекомбинантных белков вируса бешенства и их эпитопов. Как известно, гуморальный иммунный ответ имеет решающее значение для защиты от вируса бешенства, а его основной мишенью является гликопротеин G вируса — единственный экспонированный на поверхности вириона белок. Поэтому гликопротеин G и его эпитопы — это наиболее перспективные объекты для создания рекомбинантных субъединичных вакцин [8]. Часто для наработки этих белков используют клетки растений. Антигены, синтезированные в клетках растений, не требуют сложных схем очистки и введения и способны попадать непосред-

ственно в пищеварительный тракт вместе с растением. Растительные вакцины характеризуются более низкой стоимостью, чем их аналоги, полученные с помощью других систем экспрессии, и хорошо подходят для массовой иммунизации населения [21].

Пионерское исследование, проведенное McGarvey и соавт. [22] показало, что гликопротеин G вируса бешенства может быть накоплен в томатах с использованием агробактериальной техники трансформации. В дальнейшем удалось повысить уровень продукции G-белка в растительных клетках листьев табака путем оптимизации кодонов в гене G-белка и использования сигнала удержания эндоплазматического ретикула (ЭР), что способствовало накоплению белка в ЭР и приводило к значительному повышению урожайности [21, 23].

Кукуруза также была использована для экспрессии гликопротеина G вируса бешенства штамма Внуково [21, 24]. Был достигнут высокий выход рекомбинантного белка в кукурузных зернах; пероральная иммунизация овец такой кандидатной вакциной приводила к формированию протективного иммунитета у 83 % животных. Также сообщалось о синтезе гликопротеина G вируса арктического бешенства в моркови [21, 25].

В клетках растений были получены фьюжн-белки, содержащие G-белок вируса бешенства и различные молекулярные адъюванты. Так фьюжн-белок, состоящий из G-белка вируса бешенства штамма ERA и В-субъединицы холерного токсина (СТВ), был получен в трансгенном табаке [26]. Также была получена культура «hairy roots» (культура изолированных корней растений) [27] томатов, экспрессирующая фьюжн-белок, содержащий гликопротеин G вируса бешенства и В-цепь рицина (RGP-RTB), которая обеспечивала эндоцитоз фьюжн-белка на поверхности слизистой. Гибридный белок RGP-RTB был способен индуцировать гуморальный иммунный ответ у мышей при пероральном введении без применения адъювантов [21, 28].

Помимо G-белка вируса бешенства, в растениях были экспрессированы и другие вирусные антигены. Так была показана стабильная экспрессия N-белка вируса арктического бешенства лисы в томатах и в *Nicotiana benthamiana* (табаке Бентхама) [21, 29].

В работе Yusibov и соавт. [30] был получен химерный вирус мозаики люцерны (AIMV, *Alstroemeria Mosaic Virus*), у которого белки оболочки представляли собой фьюжн-конструкции, включающие пептид Drg24, состоящий из В-клеточных эпитопов гликопротеина G и Т-клеточных эпитопов N-белка вируса бешенства. Вирус AIMV был успешно собран в культуре шпината. Иммунизация по схеме, предполагающей кормление мышей рекомбинантным шпинатом, приводила к индукции высокого уровня IgA (иммуноглобулина А) в кишечнике и уменьшению клинических признаков заболевания после заражения животных аттенуированным вирусом бешенства. В качестве «съемной» вакцины трансгенный шпинат вызывал увеличение уровня антирабических антител у добровольцев, уже иммунизированных коммерческой антирабической вакциной [21, 31].

Вирусоподобные частицы как антирабические вакцины

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) представляют собой антигенные детерминанты вирионов без фрагментов генома. ВПЧ имитируют нативную вирусную частицу и, так как не несут вирусного генома, не могут быть причиной инфекции. ВПЧ являются перспективными вакцинными канди-

датами и способны индуцировать мощные гуморальный и клеточный иммунные ответы. Также ВПЧ могут нести различные инородные молекулы, что позволяет включать в их состав молекулярные адъюванты [32].

Важным этапом в разработке ВПЧ, несущих антигены вируса бешенства, является получение стабильных клеточных линий для их производства [33]. Такие клеточные линии получают с помощью плазмид или различных вирусных векторов. Так, Fontana и соавт. [34] с помощью лентивирусного вектора получили стабильную клеточную линию HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293), экспрессирующую ВПЧ, несущие G-белок вируса бешенства. Иммуногенность данных ВПЧ была проверена в экспериментах на лабораторных мышах. Была подтверждена способность ВПЧ индуцировать образование нейтрализующих бешенство антител [34].

Kang с соавт. сконструировали ВПЧ EVLP-G, содержащие гликопротеин G, матричный белок M вируса бешенства штамма ERA и заякоренный на мембране фактор GM-CSF, призванный выполнять функции адъюванта. EVLP-G были успешно получены в клетках насекомых с помощью рекомбинантных бакуловирусов. Иммуногенность и протективность EVLP-G была оценена в эксперименте на мышах, показана индукция высоких титров антирабических антител и защита иммунизированных мышей от заражения вирусом бешенства [35].

Qi и соавт. сконструировали два вида ВПЧ, содержащих G и M-белки вируса бешенства штамма ERA и заякоренные на мембране флагеллин (EVLP-F) или B-субъединицу термолабильного энтеротоксина *E. coli* (EVLP-L) в качестве молекулярных адъювантов. ВПЧ были получены путем трансфекции клеток насекомых рекомбинантными плазмидами. Внутримышечное введение как EVLP-F, так и EVLP-L мышам и собакам приводило к быстрому появлению высоких титров нейтрализующих бешенство антител и вызывало индукцию высоких уровней CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, секретирующих ИФН- γ или ИЛ-4. При иммунизации EVLP-F наблюдалась активация Т-хелперов 1 типа, тогда как при иммунизации EVLP-L была показана активация Т-хелперов 2 типа. При этом иммунизированные животные были полностью защищены от заражения летальной дозой вируса бешенства [36].

Таким образом, ВПЧ, несущие антигены вируса бешенства, могут стать перспективными антирабическими вакцинами как для животных, так и для человека. Однако они требуют введения в их состав различных молекулярных адъювантов и разработки продуцирующих ВПЧ клеточных линий, оптимальных для массового производства вакцин.

Генетические антирабические вакцины

При создании генетической вакцины ген или участок генома патогена встраивается в вектор-носитель, который обеспечивает попадание генетического материала в клетки хозяина. В результате экспрессируемые клетками антигены патогена распознаются иммунной системой, что приводит к индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. При получении генетических вакцин отпадает необходимость в выделении и очистке антигенов, а значит — в работе непосредственно с патогенами. Генетические вакцины можно разделить на две основные группы: ДНК-вакцины и векторные вирусные вакцины. Кроме того, перспективными, хоть и не столь популярными, для создания вакцин являются РНК-векторы.

Антирабические ДНК-вакцины

ДНК-вакцины — это бактериальные плазмиды, в которые включены целевой ген и регуляторные элементы, обеспечивающие его экспрессию после введения такой конструкции в организм. ДНК-вакцины хорошо переносятся, недороги и достаточно стабильны [37]. К настоящему моменту было разработано и опробовано на мышах [38], собаках [39] и приматах [40] несколько стратегий вакцинации против бешенства с помощью ДНК-вакцин.

Уровень иммунного ответа, индуцированного введением ДНК-вакцины, часто бывает недостаточным для формирования защитного иммунитета. Различные исследовательские группы применяли такие стратегии повышения интенсивности антирабического иммунного ответа при ДНК-вакцинации, как использование адъювантов (катионные липиды-DMRIE-DOPE [41], монофосфорил липид A [42]), а также применение молекулярных адъювантов [43], таких как хемокины и цитокины [6].

Еще одним направлением повышения иммуногенности ДНК-вакцин является разработка новых схем и способов их введения. Так внутрикожное введение с использованием генной пушки требует меньшее количество ДНК, необходимой для эффективной иммунизации [44]. Праймирование и бустирование с помощью ДНК-вакцин также показало свою эффективность при иммунизации кошек и собак [45]. Испытания антирабической подкожной ДНК-вакцины на собаках показали, что ее введение во внутреннюю часть уха обеспечивало выработку высоких титров вируснейтрализующих антител и длительную защиту от заражения вирусом бешенства [46].

Стародубовой и соавт. [47] был предложен оптимизированный дизайн G-белка вируса бешенства для использования его в составе ДНК-вакцин. Был сконструирован территориально-адаптированный антиген с консенсусной аминокислотной последовательностью гликопротеина вирусов бешенства, зарегистрированных на территории Российской Федерации, и вакцинного штамма Внуково-32. В культуре клеток, трансфицированной плазмидой rVAX1, несущей целевой ген, было зарегистрировано двукратное усиление экспрессии этого гена по сравнению с экспрессией гена вирусного гликопротеина штамма Внуково-32 в аналогичном векторе; накопление модифицированного G-белка в 20 раз превышало количество контрольного белка, синтезированного при использовании плазмиды с геном вирусного гликопротеина штамма Внуково-32 [47].

С целью усиления антирабического иммунного ответа Kaig и соавт. исследовали трафик G-белка вируса бешенства в различные клеточные компартменты. Были созданы плазмиды, несущие ген G-белка со следующими сигнальными последовательностями: тканевой активатор плазминогена, убиквитин и лизосомально-ассоциированный мембранный белок-1. Первые две последовательности и их комбинации позволяли усилить активацию CD4⁺ Т-клеток и выработку антител по сравнению с нативной конструкцией. Введение последовательности убиквитина приводило к усилению CD8⁺ ответа. Все эти конструкции при иммунизации мышей вызывали появление нейтрализующих антител и индукцию протективного иммунного ответа [48]. Также было показано, что пятикратное введение мышам после заражения бешенством конструкции, включающей ген G-белка со сродством к лизосомам, вместе с адъювантом Emulsigen-D приводило к полному предотвращению развития заболевания [49].

Антирабические вакцины на основе РНК-векторов

РНК-вакцины представляют собой РНК-векторы, несущие матричную РНК (мРНК) целевых антигенов. Они продемонстрировали свою эффективность при создании как противоопухолевых, так и вакцинных препаратов против различных инфекций. Кроме того, РНК-вакцины дешевы в получении и стабильны при хранении [50]. Schnee с соавт. сконструировали РНК-вектор, несущий матричную РНК (мРНК) гликопротеина репликативно-дефектного вируса бешенства (RABV-G). При иммунизации мышей такой вектор приводил к формированию антирабических антител, а также индукции как CD4+, так и CD8+ Т-клеток. Кроме того, иммунизированные животные были защищены от заражения вирусом бешенства. Аналогичные данные были получены при иммунизации свиней [51]. Антирабическая вакцина на основе РНК-вектора RNaActive® Rabies Vaccine (CV7201) на сегодняшний день проходит первую стадию клинических исследований на взрослых добровольцах [52].

Антирабические вакцины на основе вирусных векторов

Вирусные векторы представляют собой рекомбинантные вирусы, в геном которых встроен целевой ген с набором регуляторных элементов. Они имеют естественный меха-

низм проникновения в клетку, способны обеспечивать длительную экспрессию антигена, а вирусная оболочка защищает целевой генетический материал. Кроме того, они обладают способностью активировать врожденный иммунитет путем связывания генетического материала или белков оболочки с паттерн-распознающими рецепторами (TLR (toll like receptors), RIG-1 (retinoic acid-inducible gene 1) и др.). При этом происходит активация различных транскрипционных факторов, формирование очага воспаления и быстрая активация защитных реакций организма [53, 54].

Важным свойством вирусных векторов в качестве базы для создания антирабических вакцин является их способность индуцировать мощный иммунный ответ уже после однократного введения. Такие вакцины могли бы быть особенно востребованы в эндемичных по бешенству районах развивающихся стран, где часто не соблюдаются сроки и кратность вакцинации из-за недостаточного информирования населения, слабо развитой инфраструктуры и плохой доступности вакцинных препаратов [6]. Наиболее перспективные кандидатные антирабические вакцины на основе вирусных векторов представлены в таблице 1.

Первый вирусный вектор для иммунизации против бешенства был создан в 1984 году и представлял собой рекомбинантный вирус осповакцины V-RG, несущий ген G-белка вируса бешенства штамма ERA [55]. На его основе

Таблица 1. Наиболее перспективные антирабические вакцины на основе вирусных векторов

Вирусный вектор	Кандидатная вакцина	Полученные результаты	Литература
Рекомбинантный поксвирус	Вирус осповакцины V-RG, несущий ген G-белка вируса бешенства	Создана антирабическая вакцина RABORAL V-RG, которая широко применяется для оральной вакцинации диких животных с помощью приманок в Канаде и США	[55, 56]
Вирус чумы плотоядных	Вирус rCDVRV-G, несущий ген модифицированного (R333Q) G-белка вируса бешенства	Иммунизация мышей приводила к индукции вирус-нейтрализующих антител, как против вируса бешенства, так и против вируса чумы плотоядных	[59]
Рекомбинантный вирус парагриппа	Вирус праргриппа 5, несущий ген G-белка вируса бешенства	При однократной инъекции или интраназальном применении полностью защищал мышей от заражения бешенством, а также был способен защищать животных при введении после инфицирования	[61]
Рекомбинантный бакуловirus	Бакуловirus, экспрессирующий ген G-белка вируса бешенства, а также несущий G-белок на своей поверхности	При иммунизации мышей выявлены вирус-нейтрализующие антитела; протекция против заражения вирусом бешенства составила 100 %	[63]
Рекомбинантный аденовирус	Репликативно-компетентный аденовирус собак, несущий ген G-белка вируса бешенства	Вакцина показала иммуногенность и протективные свойства при иммунизации собак, кошек и хорьков	[66, 67, 68]
	Аденовирус птиц CEL0, несущий ген G-белка вируса бешенства	Иммунизация мышей приводила к индукции высоких титров нейтрализующих бешенство антител и протективного иммунного ответа	[69]
	Аденовирус шимпанзе, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства	Иммунизация нечеловекообразных обезьян (яванские макаки и макаки-резусы) приводила к появлению вирус-нейтрализующих антител и протекции от заражения вирусом бешенства	[70]
	Репликативно-компетентный аденовирус человека пятого серотипа AdG1.3, несущий ген G-белка вируса бешенства	Вакцина ONRAB® на основе AdG1.3 с 2012 г. разрешена как ветеринарная антирабическая вакцина для пероральной иммунизации в Канаде, сейчас проходит испытания в США	[72–82]
	Репликативно-дефектный аденовирус человека пятого серотипа nAd5-BD06-G, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства	Мыши, иммунизированные nAd5-BD06-G, продемонстрировали индукцию вирус-нейтрализующих антител и 90 % уровень защиты при заражении 120 ЛД ₅₀ вируса бешенства	[84]

была создана антирабическая вакцина RABORAL V-RG, которая широко применяется для оральной вакцинации диких животных с помощью приманок в Канаде и США [56]. Также были получены рекомбинантные поксвирус на-нареек и парапоксвирус, несущие гены антигенов вируса бешенства [57, 58]. Поксвирусные вакцины способны индуцировать защитный иммунный ответ после однократного перорального введения, однако их потенциальная реактогенность не позволяет использовать их для иммунизации человека. Таким образом, главная область применения таких вакцин — иммунизация диких животных с помощью приманок [7].

В качестве вирусного вектора для создания кандидатных антирабических вакцин также был использован ослабленный вирус чумы плотоядных rCDVRV-G, экспрессирующий ген модифицированного (R333Q) гликопротеина G вируса бешенства штамма Flury-LEP. Иммунизация лабораторных мышей rCDVRV-G приводила к индукции вируснейтрализующих антител как против вируса бешенства, так и против вируса чумы плотоядных. Такая вакцина удобна для вакцинации собак и других плотоядных животных [59]. Также для создания кандидатных ветеринарных антирабических вакцин в качестве вирусного вектора был использован вирус болезни Ауески [60].

Был разработан рекомбинантный вирус парагриппа 5 (PIV5), несущий ген G-белка вируса бешенства штамма LBSNE. Показано, что при одноразовой инъекции или интраназальном применении этот препарат полностью защищает мышей от летальной дозы вируса бешенства, а также способен защищать животных даже при введении после инфекции [61]. Иммунизация животных рекомбинантным вирусом леса Семлики, несущим ген G-белка вируса бешенства, приводила к индукции как гуморального, так и клеточного антирабического иммунного ответа [62].

Еще одним примером кандидатных антирабических вакцин на основе вирусных векторов является рекомбинантный бакуловир, экспрессирующий ген гликопротеина G вируса бешенства штамма ERA под контролем промотора цитомегаловируса, а также несущий гликопротеин G на своей поверхности. У мышей, иммунизированных таким рекомбинантным вирусом, выявлялись вируснейтрализующие антитела и защита от заражения вирусом бешенства составила 100 % [63].

Одними из самых распространенных вирусных векторов для создания кандидатных вакцин являются рекомбинантные аденовирусы (Ад). Ад обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого трансгена и способны накапливаться в культуре клеток в высоких титрах. При этом ДНК Ад остается в экстрахромосомной форме [64]. При введении в организм Ад способны активировать рецепторы TLR-9 и RIG-I, также активация врожденного иммунитета происходит и в результате проникновения Ад в антиген-презентирующие клетки [65].

Для создания кандидатных антирабических вакцин использовались различные рекомбинантные Ад. Так, вакцина на основе репликативно-компетентного Ад собак, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства штамма SRV9, показала свою эффективность при иммунизации собак, кошек и хорьков [66–68]. Подобная вакцина призвана защитить собак как от бешенства, так и от аденовирусной инфекции. Было показано, что иммунизация мышей рекомбинантным аденовирусом птиц CELO (Chicken Embryo Lethal Orphan), несущим ген гликопротеина G вируса бешенства штамма TS-80, приводила к индукции у животных протективного антирабического иммунного ответа [69].

Создана кандидатная вакцина на основе аденовируса шимпанзе, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства штамма LEP. Иммунизация такой вакциной приводила к появлению вируснейтрализующих антител и протекции от заражения вирусом бешенства нечеловекообразных обезьян (яванские макаки и макаки-резусы) [70].

Наиболее популярным вектором для создания кандидатных вакцин является рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа (Ад5) [71]. Ад5, несущий гены антигенов вируса бешенства, хорошо зарекомендовал себя, как платформа для создания антирабических кандидатных вакцин. Так был получен репликативно-компетентный Ад5 AdRG1, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства штамма ERA под контролем раннего промотора SV40. AdRG1 показал свою эффективность при иммунизации мышей, собак и скунсов [72]. В дальнейшем с целью увеличения уровня экспрессии гликопротеина G был получен вирус AdRG1.3, где экспрессия целевого гена шла под контролем эндогенного Ад5 промотора. Было налажено производство антирабической вакцины на основе AdRG1.3 в клетках линии HEK 293, и в серии полевых испытаний, проведенных в 2006–2009 гг. в Канаде, была показана ее высокая эффективность при оральной вакцинации с помощью приманки для различных типов диких животных [73, 74]. В 2009 г. в рамках экспериментов по оценке безопасности аденовируса AdRG1.3 было показано, что негативное воздействие AdRG1.3 на различные типы животных маловероятно [75], продемонстрирована его генетическая стабильность [76]. Приманка с ветеринарной вакциной на основе AdRG1.3 ONRAB® в 2006 и 2007 гг. была разбросана над лесами канадской провинции Онтарио, и воздушное распределение вакцины было признано успешным способом контроля бешенства среди диких животных [77, 78]. Изучение образцов, взятых от различных целевых и нецелевых диких животных, показало, что репликация ONRAB® у животных скоротечна и вероятность его горизонтальной передачи крайне низка [79]. С 2012 г. в Канаде ONRAB® разрешена как ветеринарная антирабическая вакцина для пероральной иммунизации. На сегодняшний момент эта вакцина проходит испытания в США [80, 81]. Однако AdRG1.3 является репликативно-компетентным вирусом и изучение его биобезопасности при массовом выходе в окружающую среду пока нельзя считать окончательным [75, 76, 82].

Получение кандидатных вакцин для человека требует использования репликативно-дефектных Ад5, несущих делеции различных областей вирусного генома (E1, E2, E3, E4), необходимых для репликации вируса [83]. Wang и соавт. была создана кандидатная вакцина на основе репликативно-дефектного Ад5, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства штамма BD06 [84]. Мыши, иммунизированные pAd5-BD06-G, продемонстрировали индукцию вируснейтрализующих антител и 90 % уровень защиты при заражении 120 ЛД₅₀ вируса бешенства. Таким образом, рекомбинантный репликативно-дефектный Ад5 может быть успешной платформой для создания антирабических вакцин для человека.

Заключение

Рассмотренные в данном обзоре рекомбинантные кандидатные вакцины могут быть использованы как для создания ветеринарных вакцин, так и для массовой иммунизации населения. Так, живые аттенуированные вакцины, а также генетические вакцины (ДНК-вакцины и вакцины на

основе вирусных векторов) перспективны для вакцинации свободноживущих животных с помощью приманок. Эффективность такого подхода продемонстрирована успешным применением вакцин на основе вирусов осповакцины и аденовируса человека пятого серотипа RABORAL V-RG и ONRAB® для иммунизации диких животных в Канаде и США. Кандидатные вакцины на основе вирусных векторов, например, вируса парагриппа и аденовирусов, могут вызывать протективный антирабический иммунитет уже после однократного введения, что является несомненным плюсом при разработке вакцин для массовой иммунизации населения. Наращивание вирусных антигенов с помощью культур растительных клеток позволит существенно удешевить процесс получения инактивированных антирабических вакцин как для животных, так и для человека. Кроме того, данные о протекции животных, которым вводили кандидатные генетические вакцины (ДНК-вакцины, а также вакцина на основе вируса парагриппа 5) уже после заражения вирусом бешенства, дают надежду на разработку новых типов препаратов для экстренной помощи лицам, имевшим контакт с инфицированными животными.

Литература

- Davis BM, Rall GF, Schnell MJ. Everything you always wanted to know about rabies virus (but were afraid to ask). *Annu Rev Virol*. 2015; 2(1): 451–71.
- World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Second Report. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2013; (982): 1–139.
- Willoughby RE Jr. Rabies: rare human infection — common questions. *Infect Dis Clin North Am*. 2015; 29(4): 637–50.
- Эпидемиологический надзор. О ситуации по бешенству в Российской Федерации [Интернет] 2015 [cited 2016 Sept 12] Available from: http://rospotrebnadzor.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=5610&sphrase_id=731393.
- Стародубова ЕС, Преображенская ОВ, Кузьменко ЮВ, Латанова АА, Ярыгина ЕИ, Карпов ВЛ. Вакцины против бешенства: современное состояние и перспективы развития. *Молекулярная биология* 2015; 49(4): 577–84.
- Kaur M, Garg R, Singh S, Bhatnagar R. Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading? *Expert Rev Vaccines*. 2015; 14(3): 369–81.
- Rupprecht CE, Nagarajan T, Ertl H. Current status and development of vaccines and other biologics for human rabies prevention. *Expert Rev Vaccines*. 2016; 15(6):731–49.
- Hicks DJ, Fooks AR, Johnson N. Developments in rabies vaccines. *Clin Exp Immunol*. 2012; 169(3):199–204.
- Conzelmann KK, Schnell M. Rescue of synthetic genome RNA analogs of rabies virus by plasmid encoded proteins. *J Virol*. 1994; 68(2):713–9.
- Blanton JD, Self J, Niezgoda M, Faber ML, Dietzschold B, Rupprecht C. Oral vaccination of raccoons (*Procyon lotor*) with genetically modified rabies virus vaccines. *Vaccine* 2007; 25(42): 7296–300.
- 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. *Viral J*. 2011; 8: 454.
- Liu X, Yang Y, Sun Z, Chen J, Ai J, Dun C, et al. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge. *PLoS One* 2014; 9(2): e87105.
- Сафонов ГА, Баньковский ДО. Оценка антигенных и иммунологических свойств штамма ERA G333 вируса бешенства. *Вестник российской сельскохозяйственной науки* 2010; (5): 61–3.
- Yang DK, Nakagawa K, Ito N, Kim HH, Hyun BH, Nah JJ, et al. A single immunization with recombinant rabies virus (ERAG3G) confers complete protection against rabies in mice. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014; 3(2): 176–84.
- Shuai L, Feng N, Wang X, Ge J, Wen Z, Chen W, et al. Genetically modified rabies virus ERA strain is safe and induces long-lasting protective immune response in dogs after oral vaccination. *Antiviral Res*. 2015; 121: 9–15.
- Cenna J, Hunter M, Tan GS, Papaneri AB, Ribka EP, Schnell MJ, et al. Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J Infect Dis*. 2009; 200(8): 1251–60.
- Zhao L, Toriumi H, Wang H, Kuang Y, Guo X, Morimoto K, et al. Expression of MIP-1 alpha (CCL3) by a recombinant rabies virus enhances its immunogenicity by inducing innate immunity and recruiting dendritic cells and B cells. *J Virol*. 2010; 84(18): 9642–8.
- Wen Y, Wang H, Wu H, Yang F, Tripp RA, Hogan RJ, et al. Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. *J Virol*. 2011; 85(4): 1634–44.
- Barkhouse DA, Garcia SA, Bongiorno EK, Lebrun A, Faber M, Hooper DC. Expression of interferon gamma by a recombinant rabies virus strongly attenuates the pathogenicity of the virus via induction of type I interferon. *J Virol*. 2015; 89(1): 312–22.
- Norton JE, Lytle AG, Shen S, Tzvetkov EP, Dorfmeier CL, McGettigan JP. ICAM-1-based rabies virus vaccine shows increased infection and activation of primary murine B cells in vitro and enhanced antibody titers in-vivo. *PLoS One* 2014; 9(1): e87098.
- Rosales-Mendoza S. Current developments and future prospects for plant-made biopharmaceuticals against rabies. *Mol Biotechnol*. 2015; 57(10): 869–79.
- McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* 1995; 13(13): 1484–7.
- Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shahnawaz M, Mishra S, Sawant SV, et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol*. 2005; 119(1): 1–14.
- Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, Lypetz J, Olivera-Flores MT, Gómez-Lim M, Tapia-Pérez G. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine* 2012; 30(37): 5551–6.
- Rojas-Anaya E, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MT, Gímez-Lim M. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Transgenic Res*. 2009; 18(6): 911–9.
- Roy S, Tyagi A, Tiwari S, Singh A, Sawant SV, Singh PK, et al. Rabies glycoprotein fused with B subunit of cholera toxin expressed in tobacco plants folds into biologically active pentameric protein. *Protein Expr Purif*. 2010; 70(2): 184–90.
- Skarjinskaia M, Ruby K, Araujo A, Taylor K, Gopalasamy-Raju V, Musychuk K, et al. Hair roots as a vaccine production and delivery system. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013; 134: 115–34.
- Singh A, Srivastava S, Chouksey A, Panwar BS, Verma PC, Roy S, et al. Expression of rabies glycoprotein and ricin toxin B chain (RGP-RTB) fusion protein in tomato hairy roots: A step towards oral vaccination for rabies. *Mol Biotechnol*. 2015; 57(4): 359–70.
- Perea Arango I, Loza Rubio E, Rojas Anaya E, Olivera Flores T, Gonzalez de la Vara L, Gómez Lim MA. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Reports* 2008; 27(4): 677–85.
- Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, et al. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(5): 2481–5.
- Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002; 20(25–26): 3155–64.
- Lua LHL, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg APJ. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol Bioeng*. 2014; 111(3): 425–40.
- Hua RH, Li YN, Chen ZS, Liu LK, Huo H, Wang XL, et al. Generation and characterization of a new mammalian cell line continuously expressing virus-like particles of Japanese encephalitis virus for a subunit vaccine candidate. *BMC Biotechnol*. 2014; 14: 62.
- Fontana D, Kratje R, Etcheverrigaray M, Prieto C. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine* 2015; 33(35): 4238–46.
- Kang H, Qi Y, Wang H, Zheng X, Gao Y, Li N, et al. Virus-like particles containing membrane-anchored GM-CSF enhances the immune response against rabies virus. *Viruses* 2015; 7(3): 1134–52.

36. Qi Y, Kang H, Zheng X, Wang H, Gao Y, Yang S, et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immunogenicity of rabies virus-like particles in mice and dogs. *Front Microbiol.* 2015; 6: 169.
37. Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res.* 2008; 42(1–3): 219–32.
38. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HC. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994; 199(1): 132–40.
39. Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Sütien A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmazières E, et al. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999; 18(5–6): 479–86.
40. Lodmell DL, Ray NB, Parnell MJ, Ewalt LC, Hanlon CA, Shaddock JH, et al. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med.* 1998; 4(8): 949–52.
41. Margalith M, Vilalta A. Sustained protective rabies neutralizing antibody titers after administration of cationic lipid-formulated pDNA vaccine. *Genet Vaccines Ther.* 2006; 4: 2.
42. Lodmell DL, Ray NB, Ulrich JT, Ewalt LC. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL). *Vaccine* 2000; 18(11–12): 1059–66.
43. Pinto AR, Reyes-Sandoval A, Ertl HCJ. Chemokines and TRANCE as genetic adjuvants for a DNA vaccine to rabies virus. *Cell Immunol.* 2003; 224(2): 106.
44. Lodmell DL, Parnell MJ, Bailey JR, Ewalt LC, Hanlon CA. Rabies DNA vaccination of non-human primates: post-exposure studies using gene gun methodology that accelerates induction of neutralizing antibody and enhances neutralizing antibody titers. *Vaccine* 2002; 20(17–18): 2221–8.
45. Borhani K, Ajorloo M, Bamdad T, Mozghani SH, Ghaderi M, Gholami AR. A comparative approach between heterologous prime-boost vaccination strategy and DNA vaccinations for rabies. *Arch Iran Med.* 2015; 18(4): 223–7.
46. Bahloul C, Taieb D, Diouani MF, Ahmed SB, Chtourou Y, B'Chir BI, et al. Field trials of a very potent rabies DNA vaccine which induced long lasting virus neutralizing antibodies and protection in dogs in experimental conditions. *Vaccine* 2006; 24(8): 1063–72.
47. Стародубова ЕС, Кузьменко ЮВ, Латанова АА, Преображенская ОВ, Карпов ВЛ. Создание ДНК-вакцинного вектора на основе кодон-оптимизированного гена гликопротеина (белка G) вируса бешенства с консенсусной аминокислотной последовательностью. *Молекулярная биология* 2016; 50(2): 376–80.
48. Kaur M, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine: no impact of MHC class I and class II targeting sequences on immune response and protection against lethal challenge. *Vaccine* 2009; 27(15): 2128–37.
49. Kaur M, Saxena A, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. *FASEB J.* 2010; 24(1): 173–83.
50. Kramps T, Probst J. Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications. *Wiley interdisciplinary reviews: RNA* 2013; 4(6): 737–49.
51. Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(6): e0004746.
52. Clinicaltrials.gov RActive® Rabies vaccine (CV7201) in Healthy Adults [Internet]. 2016 [cited 2016 August 12] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02241135?term=rabies+vaccine&rank=39>.
53. Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(1): 62–73.
54. Седова ЕС, Щербинин ДН, Мизунов АИ, Смирнов ЮА, Лозунов ДЮ, Шмаров ММ и др. Групповые рекомбинантные вакцины. *Acta naturae* 2012; 4(15): 17–27.
55. Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81(22): 7194–8.
56. Follmann E, Ritter D, Swor R, Dunbar M, Hueffer K. Preliminary evaluation of Raboral V-RG® oral rabies vaccine in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *J Wildl Dis.* 2011; 47(4): 1032–5.
57. Amann R, Rohde J, Wulle U, Conlee D, Raue R, Martinon O, et al. A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein. *J Virol.* 2013; 87(3): 1618–30.
58. Marrow JC, Padilla LR, Hayek LA, Bush M, Murray S. Comparison of antibody response to a nonadjuvanted, live canarypox-vectored recombinant rabies vaccine and a killed, adjuvanted rabies vaccine in eld's deer (*Rucervus eldi thamin*). *J Zoo Wildl Med.* 2014; 45(2): 315–20.
59. Li Z, Wang J, Yuan D, Wang S, Sun J, Yi B, et al. A recombinant canine distemper virus expressing a modified rabies virus glycoprotein induces immune responses in mice. *Virus Genes* 2015; 50(3): 434–41.
60. Yuan Z, Zhang S, Liu Y, Zhang F, Fooks AR, Li Q, et al. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: Safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine* 2008; 26(10): 1314–21.
61. Huang Y, Chen Z, Huang J, Fu Z, He B. Parainfluenza virus 5 expressing the G protein of rabies virus protects mice after rabies virus infection. *J Virol.* 2015; 89(6): 3427–9.
62. Astray RM, Ventini DC, Boldorini VL, Silva FG, Rocca MP, Pereira CA. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. *Vaccine* 2014; 32(24): 2829–32.
63. Wu Q, Yu F, Xu J, Li Y, Chen H, Xiao S, et al. Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. *Vet Microbiol.* 2014; 171(1–2): 93–101.
64. Карпов АП, Тутыхина ИЛ, Лозунов ДЮ, Верховская ЛВ, Шмаров ММ, Валихов АФ и др. Конструирование рекомбинантных аденовирусов птиц CELo, экспрессирующих гены гликопротеинов gB, gE, gI вируса болезни Марека. *Биотехнология* 2007; (5): 38–44.
65. Тутыхина ИЛ, Щербинин ДН, Шмаров ММ, Лозунов ДЮ, Народицкий БС. Преимущества и перспективы использования генетических вакцин для защиты от опасных и социально значимых инфекций. *Вестник РАН* 2011; (10): 37–49.
66. Zhang S, Liu Y, Fooks AR, Zhang F, Hu R. Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine* 2008; 26(3): 345–50.
67. Hu RL, Liu Y, Zhang SF, Zhang F, Fooks AR. Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody response against rabies. *Vaccine* 2007; 25(29): 5301–7.
68. Zhao J, Liu Y, Zhang S, Fang L, Zhang F, Hu R. Experimental oral immunization of ferret badgers (*Melogale moschata*) with a recombinant canine adenovirus vaccine CAV-2-E3D-RGP and an attenuated rabies virus SRV9. *J Wildl Dis.* 2014; 50(2): 374–7.
69. Шмаров ММ, Тутыхина ИЛ, Лозунов ДЮ, Верховская ЛВ, Народицкий БС, Гинцбург АЛ. Индукция протективного иммунного ответа у мышей, вакцинированных рекомбинантным аденовирусом птиц CELo, экспрессирующим гликопротеин G вируса бешенства. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 2006; (4): 69–71.
70. Xiang ZQ, Greenberg L, Ertl HC, Rupprecht CE. Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine. *Virology* 2014; 450–451: 243–9.
71. Tutykhina IL, Logunov DY, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Tikhvatulin AI, Naroditsky BS, et al. Development of adenoviral vector-based mucosal vaccine against influenza. *J Mol Med (Berl).* 2011; 89(4): 331–41.
72. Yarosh OK, Wandeler AI, Graham FL, Campbell JB, Prevec L. Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. *Vaccine* 1996; 14(13): 1257–64.
73. Shen CF, Lanthier S, Jacob D, Montes J, Beath A, Beresford A, et al. Process optimization and scale-up for production of rabies vaccine live adenovirus vector (AdRG1.3). *Vaccine* 2012; 30(2): 300–6.
74. Lutze-Wallace C, Wandeler A, Prevec L, Sidhu M, Sapp T, Armstrong J. Characterization of a human adenovirus 5: rabies glycoprotein recombinant vaccine reisolated from orally vaccinated skunks. *Biologicals* 1995; 23(4): 271–7.

75. Knowles MK, Nadin-Davis SA, Sheen M, Rosatte R, Mueller R, Beresford A. Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB®) in target and non-target species. *Vaccine* 2009; 27(47): 6619–26.
76. Knowles MK, Roberts D, Craig S, Sheen M, Nadin-Davis SA, Wandler AI. In vitro and in vivo genetic stability studies of a human adenovirus type 5 recombinant. *Vaccine* 2009; 27(20): 2662–8.
77. Rosatte RC, Donovan D, Davies JC, Brown L, Allan M, von Zuben V, et al. High-density baiting with ONRABH rabies vaccine Bait to control arctic-variant rabies in striped skunks in Ontario, Canada. *J Wildl Dis.* 2011; 47(2): 459–65.
78. Mainguy J, Rees EE, Canac-Marquis P, Bélanger D, Fehlner-Gardiner C, Séguin G, et al. Oral rabies vaccination of raccoons and striped skunks with ONRAB® baits: multiple factors influence field immunogenicity. *J Wildl Dis.* 2012; 48(4): 979–90.
79. Sobey KG, Walpole AA, Rosatte R, Fehlner-Gardiner C, Donovan D, Bachmann P, et al. An assessment of ONRAB® oral rabies vaccine persistence in free-ranging mammal populations in Ontario, Canada. *Vaccine* 2013; 31(17): 2207 – 13.
80. Slate D, Chipman RB, Algeo TP, Mills SA, Nelson KM, Croson CK, et al. Safety and immunogenicity of Ontario rabies vaccine bait (ONRAB) in the first us field trial in raccoons (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis.* 2014; 50(3): 582–95.
81. Fry TL, Vandalen KK, Duncan C, Vercauteren K. The safety of ONRAB® in select non-target wildlife. *Vaccine* 2013; 31(37): 3839–42.
82. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human contacts with oral rabies vaccine baits distributed for wildlife rabies management—Ohio, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013; 62(14): 267–9.
83. Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol.* 1996; 70(12): 8934–43.
84. Wang S, Sun C, Zhang S, Zhang X, Liu Y, Wang Y, et al. Glycoprotein from street rabies virus BD06 induces early and robust immune responses when expressed from a nonreplicative adenovirus recombinant. *Arch Virol.* 2015; 160(9): 2315–23.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

Седова Елена Сергеевна. Научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, канд. биол. наук.

Шмаров Максим Михайлович. Руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии, д-р биол. наук.

Адрес для переписки: Седова Елена Сергеевна; sedova-es@yandex.ru

New recombinant rabies vaccines

E. S. Sedova, M. M. Shmarov

Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The review covers problems of construction and production of new recombinant rabies vaccine. New approaches are being investigated to develop rabies vaccine and include methods of reverse genetic, production of virus antigens in plant cells cultures, obtaining of virus like particles and DNA and virus vector-based vaccines. Reverse genetics techniques let to manipulate the rabies genome and construct new attenuated strains of rabies virus. The production of the rabies virus main antigen (the glycoprotein G) in the plant cells cultures is promising for getting «edible» vaccines that do not require cleaning of antigen and repeated parenteral administration. Virus-like particles are capable to carry several rabies virus antigens, as well as different molecular adjuvants. DNA vaccines are characterized by ease preparation and low cost, but require different ways to enhance immunogenicity. Such approaches as DNA and virus vector-based vaccines delivering foreign genes, for example the gene of the glycoprotein G. Nowadays veterinary vaccines based on recombinant replication-competent vaccinia virus and human adenovirus type 5 are being actively used. Non-replicative human adenovirus type 5, expressing rabies glycoprotein G gene, is a good candidate for development of vaccines for mass immunization of the population.

Key words: recombinant vaccines; rabies virus; reverse genetic; plant cells cultures; virus-like particles; genetic vaccine.

For citation: Sedova ES, Shmarov MM. New recombinant rabies vaccines. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (4): 219–228.

References

1. Davis BM, Rall GF, Schnell MJ. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). *Annu Rev Virol.* 2015; 2(1): 451–71.
2. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Second Report. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2013; (982): 1–139.
3. Willoughby RE Jr. Rabies: rare human infection — common questions. *Infect Dis Clin North Am.* 2015; 29(4): 637–50.
4. Surveillance. About rabies situation in the Russian Federation [Internet] 2015 [cited 2016 Sept 12] Available from: http://rospotrebнадзор.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=5610&sphrase_id=731393 (in Russian).
5. Starodubova ES, Preobrazhenskaia JV, Kuzmenko YV, Latanova AA, Yarygina EI, Karpov VL. Rabies vaccines: current status and prospects for the development. *Molekulyarnaya biologiya* 2015; 49(4): 577–584 (in Russian).
6. Kaur M, Garg R, Singh S, Bhatnagar R. Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading? *Expert Rev Vaccines.* 2015; 14(3): 369–81.
7. Rupprecht CE, Nagarajan T, Ertl H. Current status and development of vaccines and other biologics for human rabies prevention. *Expert Rev Vaccines.* 2016; 15(6): 731–49.
8. Hicks DJ, Fooks AR, Johnson N. Developments in rabies vaccines. *Clin Exp Immunol.* 2012; 169(3): 199–204.
9. Conzelmann KK, Schnell M. Rescue of synthetic genome RNA analogs of rabies virus by plasmid encoded proteins. *J Virol.* 1994; 68(2): 713–9.

10. Blanton JD, Self J, Niezgoda M, Faber ML, Dietzschold B, Rupprecht C. Oral vaccination of raccoons (*Procyon lotor*) with genetically modified rabies virus vaccines. *Vaccine* 2007; 25(42): 7296–300.
11. 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. *Virology* 2011; 8: 454.
12. Liu X, Yang Y, Sun Z, Chen J, Ai J, Dun C et al. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge. *PLoS One* 2014; 9(2): e87105.
13. Safonov GA, Ban'kovsky DO. Evaluating antigenic and immunogenic properties of rabies virus strain ERA G333. *Vestnik Rossiiskoi sel'skhozhoizvestvennoi nauki* 2010; (5): 61–3 (in Russian).
14. Yang DK, Nakagawa K, Ito N, Kim HH, Hyun BH, Nah JJ, et al. A single immunization with recombinant rabies virus (ERAG3G) confers complete protection against rabies in mice. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014; 3(2): 176–84.
15. Shuai L, Feng N, Wang X, Ge J, Wen Z, Chen W, et al. Genetically modified rabies virus ERA strain is safe and induces long-lasting protective immune response in dogs after oral vaccination. *Antiviral Res.* 2015; 121: 9–15.
16. Cenna J, Hunter M, Tan GS, Papaneri AB, Ribka EP, Schnell MJ, et al. Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J Infect Dis.* 2009; 200(8): 1251–60.
17. Zhao L, Toriumi H, Wang H, Kuang Y, Guo X, Morimoto K, et al. Expression of MIP-1 α (CCL3) by a recombinant rabies virus enhances its immunogenicity by inducing innate immunity and recruiting dendritic cells and B cells. *J Virol.* 2010; 84(18): 9642–8.
18. Wen Y, Wang H, Wu H, Yang F, Tripp RA, Hogan RJ, et al. Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. *J Virol.* 2011; 85(4): 1634–44.
19. Barkhouse DA, Garcia SA, Bongiorno EK, Lebrun A, Faber M, Hooper DC. Expression of interferon gamma by a recombinant rabies virus strongly attenuates the pathogenicity of the virus via induction of type I interferon. *J Virol.* 2015; 89(1): 312–22.
20. Norton JE, Lytle AG, Shen S, Tzvetkov EP, Dorfmeier CL, McGettigan JP. ICAM-1-based rabies virus vaccine shows increased infection and activation of primary murine B cells in vitro and enhanced antibody titers in-vivo. *PLoS One* 2014; 9(1): e87098.
21. Rosales-Mendoza S. Current developments and future prospects for plant-made biopharmaceuticals against rabies. *Mol Biotechnol.* 2015; 57(10): 869–79.
22. McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* 1995; 13(13): 1484–7.
23. Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shah Nawaz M, Mishra S, Sawant SV, et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol.* 2005; 119(1): 1–14.
24. Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, Lypez J, Olivera-Flores MT, Gómez-Lim M, Tapia-Pérez G. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine* 2012; 30(37): 5551–6.
25. Rojas-Anaya E, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MT, Gymez-Lim M. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Transgenic Res.* 2009; 18(6): 911–9.
26. Roy S, Tyagi A, Tiwari S, Singh A, Sawant SV, Singh PK, et al. Rabies glycoprotein fused with B subunit of cholera toxin expressed in tobacco plants folds into biologically active pentameric protein. *Protein Expr Purif.* 2010; 70(2): 184–90.
27. Skarjinska M, Ruby K, Araujo A, Taylor K, Gopalasamy-Raju V, Musiyichuk K, et al. Hair roots as a vaccine production and delivery system. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013; 134: 115–34.
28. Singh A, Srivastava S, Chouksey A, Panwar BS, Verma PC, Roy S, et al. Expression of rabies glycoprotein and ricin toxin B chain (RGP-RTB) fusion protein in tomato hairy roots: A step towards oral vaccination for rabies. *Mol Biotechnol.* 2015; 57(4): 359–70.
29. Perea Arango I, Loza Rubio E, Rojas Anaya E, Olivera Flores T, Gonzalez de la Vara L, Gymez Lim MA. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Reports* 2008; 27(4): 677–85.
30. Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, et al. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(5): 2481–5.
31. Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002; 20(25–26): 3155–64.
32. Lua LHL, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg APJ. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol Bioeng.* 2014; 111(3): 425–40.
33. Hua RH, Li YN, Chen ZS, Liu LK, Huo H, Wang XL, et al. Generation and characterization of a new mammalian cell line continuously expressing virus-like particles of Japanese encephalitis virus for a subunit vaccine candidate. *BMC Biotechnol.* 2014; 14: 62.
34. Fontana D, Kratje R, Etcheverrigaray M, Prieto C. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine* 2015; 33(35): 4238–46.
35. Kang H, Qi Y, Wang H, Zheng X, Gao Y, Li N, et al. Virus-like particles containing membrane-anchored GM-CSF enhances the immune response against rabies virus. *Viruses* 2015; 7(3): 1134–52.
36. Qi Y, Kang H, Zheng X, Wang H, Gao Y, Yang S, et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immunogenicity of rabies virus-like particles in mice and dogs. *Front Microbiol.* 2015; 6: 169.
37. Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res.* 2008; 42(1–3): 219–32.
38. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HC. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994; 199(1): 132–40.
39. Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Sertien A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmúzières E, et al. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999; 18(5–6): 479–86.
40. Lodmell DL, Ray NB, Parnell MJ, Ewalt LC, Hanlon CA, Shaddock JH, et al. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med.* 1998; 4(8): 949–52.
41. Margalith M, Vilalta A. Sustained protective rabies neutralizing antibody titers after administration of cationic lipid-formulated pDNA vaccine. *Genet Vaccines Ther.* 2006; 4: 2.
42. Lodmell DL, Ray NB, Ulrich JT, Ewalt LC. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL). *Vaccine* 2000; 18(11–12): 1059–66.
43. Pinto AR, Reyes-Sandoval A, Ertl HCJ. Chemokines and TRANCE as genetic adjuvants for a DNA vaccine to rabies virus. *Cell Immunol.* 2003; 224(2): 106.
44. Lodmell DL, Parnell MJ, Bailey JR, Ewalt LC, Hanlon CA. Rabies DNA vaccination of non-human primates: post-exposure studies using gene gun methodology that accelerates induction of neutralizing antibody and enhances neutralizing antibody titers. *Vaccine* 2002; 20(17–18): 2221–8.
45. Borhani K, Ajorloo M, Bamdad T, Mozghani SH, Ghaderi M, Gholami AR. A comparative approach between heterologous prime-boost vaccination strategy and DNA vaccinations for rabies. *Arch Iran Med.* 2015; 18(4): 223–7.
46. Bahloul C, Taieb D, Diouani MF, Ahmed SB, Chtourou Y, B'Chir BI, et al. Field trials of a very potent rabies DNA vaccine which induced long lasting virus neutralizing antibodies and protection in dogs in experimental conditions. *Vaccine* 2006; 24(8): 1063–72.
47. Starodubova ES, Kuzmenko YuV, Latanova AA, Preobrazhenskaya OV, Karpov VL. Construction of a DNA vaccine vector based on a codon-optimized gene of rabies virus glycoprotein (G protein) with consensus amino acid sequence. *Mol Biol.* 2016; 50(2): 376–80 (in Russian).
48. Kaur M, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine: no impact of MHC class I and class II targeting sequences on immune response and protection against lethal challenge. *Vaccine* 2009; 27(15): 2128–37.
49. Kaur M, Saxena A, Rai A, Bhatnagar R. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. *FASEB J.* 2010; 24(1): 173–83.
50. Kramps T, Probst J. Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications. *Wiley interdisciplinary reviews: RNA* 2013; 4(6): 737–49.

51. Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(6): e0004746.
52. Clinicaltrials.gov RActive® Rabies vaccine (CV7201) in Healthy Adults [Internet]. 2016 [cited 2016 August 12] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02241135?term=rabies+vaccine&rank=39>.
53. Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(1): 62–73.
54. Sedova ES, Shcherbinin DN, Migunov AI, Smirnov IA, Logunov DY, Shmarov MM, et al. Influenza recombinant vaccines. *Acta naturae* 2012; 4(15): 17–27 (in Russian).
55. Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(22): 7194–8.
56. Follmann E, Ritter D, Swor R, Dunbar M, Hueffer K. Preliminary evaluation of Raboral V-RG® oral rabies vaccine in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *J Wildl Dis*. 2011; 47(4): 1032–5.
57. Amann R, Rohde J, Wulle U, Conlee D, Raue R, Martinon O, et al. A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein. *J Virol*. 2013; 87: 1618–30.
58. Marrow JC, Padilla LR, Hayek LA, Bush M, Murray S. Comparison of antibody response to a nonadjuvanted, live canarypox-vectored recombinant rabies vaccine and a killed, adjuvanted rabies vaccine in eld's deer (*Rucervus eldi thamin*) *J Zoo Wildl Med*. 2014; 45(2): 315–20.
59. Li Z, Wang J, Yuan D, Wang S, Sun J, Yi B, et al. A recombinant canine distemper virus expressing a modified rabies virus glycoprotein induces immune responses in mice. *Virus Genes* 2015; 50(3): 434–41.
60. Yuan Z, Zhang S, Liu Y, Zhang F, Fooks AR, Li Q, et al. A recombinant pseudorabies virus expressing rabies virus glycoprotein: Safety and immunogenicity in dogs. *Vaccine* 2008; 26(10): 1314–21.
61. Huang Y, Chen Z, Huang J, Fu Z, He B. Parainfluenza virus 5 expressing the G protein of rabies virus protects mice after rabies virus infection. *J Virol*. 2015; 89(6): 3427–9.
62. Astray RM, Ventini DC, Boldorini VL, Silva FG, Rocca MP, Pereira CA. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. *Vaccine* 2014; 32(24): 2829–32.
63. Wu Q, Yu F, Xu J, Li Y, Chen H, Xiao S, et al. Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. *Vet Microbiol*. 2014; 171(1–2): 93–101.
64. Karpov AP, Tutykhina IL, Logunov DY, Verkhovskaya LV, Shmarov MM, Valikhov AF, et al. Construction of recombinant avian adenoviruses CELO that express MDV glycoproteins gB, gE and gI. *Biotechnology in Russia* 2007; (5): 46–55 (in Russian).
65. Tutykhina IL, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Logunov DY, Naroditsky BS. Advantages and prospects of the use of genetic vaccines for the protection from dangerous and socially significant infections. *Vestnik RAMN* 2011; (10): 37–49 (in Russian).
66. Zhang S, Liu Y, Fooks AR, Zhang F, Hu R. Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine* 2008; 26(3): 345–50.
67. Hu RL, Liu Y, Zhang SF, Zhang F, Fooks AR. Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody response against rabies. *Vaccine* 2007; 25(29): 5301–7.
68. Zhao J, Liu Y, Zhang S, Fang L, Zhang F, Hu R. Experimental Oral immunization of ferret badgers (*Melogale moschata*) with a recombinant canine adenovirus vaccine CAV-2-E3D-RGP and an attenuated rabies virus SRV9. *J Wildl Dis*. 2014; 50(2): 374–7.
69. Shmarov MM, Tutykhina IL, Logunov DY, Verkhovskaya LV, Nedosekov VV, Cybanov SZ. The induction of protective immune response in mice vaccinated by recombinant avian adenovirus CELO expressing glycoprotein G of the rabies virus. *Jurnal mikrobiologii, epidemiologii i immynobiologii* 2006; (4): 69–71 (in Russian).
70. Xiang ZQ, Greenberg L, Ertl HC, Rupprecht CE. Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine. *Virology* 2014; 450–451: 243–9.
71. Tutykhina IL, Logunov DY, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Tikhvatulin AI, Naroditsky BS, et al. Development of adenoviral vector-based mucosal vaccine against influenza. *J Mol Med (Berl)*. 2011; 89(4): 331–41.
72. Yarosh OK, Wandeler AI, Graham FL, Campbell JB, Prevec L. Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. *Vaccine* 1996; 14(13): 1257–64.
73. Shen CF, Lanthier S, Jacob D, Montes J, Beath A, Beresford A, et al. Process optimization and scale-up for production of rabies vaccine live adenovirus vector (AdRG1.3). *Vaccine* 2012; 30(2): 300–6.
74. Lutze-Wallace C, Wandeler A, Prevec L, Sidhu M, Sapp T, Armstrong J. Characterization of a human adenovirus 5: rabies glycoprotein recombinant vaccine reisolated from orally vaccinated skunks. *Biologicals* 1995; 23(4): 271–7.
75. Knowles MK, Nadin-Davis SA, Sheen M, Rosatte R, Mueller R, Beresford A. Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB®) in target and non-target species. *Vaccine* 2009; 27(47): 6619–26.
76. Knowles MK, Roberts D, Craig S, Sheen M, Nadin-Davis SA, Wandeler AI. In vitro and in vivo genetic stability studies of a human adenovirus type 5 recombinant. *Vaccine* 2009; 27(20): 2662–8.
77. Rosatte RC, Donovan D, Davies JC, Brown L, Allan M, von Zuben V, et al. High-density baiting with ONRABH rabies vaccine Baits to control arctic-variant rabies in striped skunks in Ontario, Canada. *J Wildl Dis*. 2011; 47(2): 459–65.
78. Mainguy J, Rees EE, Canac-Marquis P, Bélanger D, Fehlner-Gardiner C, Séguin G, et al. Oral rabies vaccination of raccoons and striped skunks with ONRAB® baits: multiple factors influence field immunogenicity. *J Wildl Dis*. 2012; 48(4): 979–90.
79. Sobey KG, Walpole AA, Rosatte R, Fehlner-Gardiner C, Donovan D, Bachmann P, et al. An assessment of ONRAB® oral rabies vaccine persistence in free-ranging mammal populations in Ontario, Canada. *Vaccine* 2013; 31(17): 2207–13.
80. Slate D, Chipman RB, Algeo TP, Mills SA, Nelson KM, Croson CK, et al. Safety and immunogenicity of Ontario rabies vaccine bait (ONRAB) in the first us field trial in raccoons (*Procyon lotor*). *J Wildl Dis*. 2014; 50(3): 582–95.
81. Fry TL, Vandalen KK, Duncan C, Vercauteren K. The safety of ONRAB® in select non-target wildlife. *Vaccine* 2013; 31(37): 3839–42.
82. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human Contacts with Oral Rabies Vaccine Baits Distributed for Wildlife Rabies Management—Ohio, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013; 62(14): 267–9.
83. Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol*. 1996; 70(12): 8934–43.
84. Wang S, Sun C, Zhang S, Zhang X, Liu Y, Wang Y, et al. Glycoprotein from street rabies virus BD06 induces early and robust immune responses when expressed from a nonreplicative adenovirus recombinant. *Arch Virol*. 2015; 160(9): 2315–23.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Gamalei street 18, Moscow 123098, Russian Federation.

Sedova ES. Researcher of the Laboratory of Molecular Biotechnology. Candidate of Biological Sciences.

Shmarov MM. Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology. Doctor of Biological Sciences.