

УДК 614.47

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma.65095>

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОТРАВЛЕНИЙ РИБОСОМИНГИБИРУЮЩИМИ БЕЛКАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ И РАЗВИТИЯ СРЕДСТВ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ

© В.А. Мясников, А.В. Степанов, О.А. Митева, Р.И. Аль-Шехадат, А.С. Никишин, А.С. Гоголевский, С.В. Чепур

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Проанализированы основные тенденции и перспективы создания высокоэффективных иммунобиологических лекарственных препаратов для профилактики и терапии острых поражений рибосом-ингибирующими токсинами растительного происхождения, рицина и абрина. Обобщены данные, описывающие представления о базовых молекулярных механизмах и природе взаимодействий токсин-антитело, определяющих способность антител нейтрализовать риботоксичные растительные лектины, и лежащие в основе создания успешных кандидатных вакцинных препаратов. Приведены данные, характеризующие поражающие эффекты растительных риботоксинов на молекулярном уровне, определяющие выбор перспективных направлений разработки средств иммунопрофилактики отравлений. Суммированы результаты исследований, направленных на понимание молекулярных механизмов, обеспечивающих формирование протективного иммунитета против нативных риботоксинов, и их отдельных субъединиц. Прослежена эволюция создания средств иммунопрофилактики острых отравлений рицином: от нативного анатоксина до генно-инженерных субъединичных вакцин, созданных на основе метода таргетного мутагенеза. Показаны основные этапы создания, исследования и испытания современных образцов вакцин-кандидатов, разработанных для профилактики ингаляционных и пероральных отравлений рицином. Обобщены результаты исследований, включающие данные, которые были получены в ходе доклинических испытаний, демонстрирующих высокую протективную активность современных иммунобиологических лекарственных препаратов против отравления растительными лектинами, ингибирующими синтез белка в клетке. Приведены подходы к усилению иммуногенности субъединичных вакцин против рибосомингибирующих белков растительного происхождения. Выявлены основные проблемные моменты при создании и применении вакцинных препаратов, определены основные тенденции и перспективы их совершенствования.

Ключевые слова: вакцинопрофилактика; иммунобиологические препараты; отравление; растительные рибосомингибирующие лектины; рекомбинантная субъединичная вакцина; рибосом-ингибирующие белки растительного происхождения; таргетный мутагенез.

Как цитировать:

Мясников В.А., Степанов А.В., Митева О.А., Аль-Шехадат Р.И., Никишин А.С., Гоголевский А.С., Чепур С.В. Молекулярные механизмы создания вакцин для профилактики отравлений рибосомингибирующими белками растительного происхождения: современное состояние, перспективы разработки и развития средств иммунопрофилактики // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2021. Т. 23, № 2. С. 219–228. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma.65095>

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma.65095>

MOLECULAR ASPECTS OF CREATING VACCINES FOR THE PREVENTION OF POISONING RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS OF PLANT ORIGIN: CURRENT SITUATION, PROBLEMS OF VACCINE DEVELOPMENT

© V.A. Myasnikov, A.V. Stepanov, O.A. Miteva, R.I. Al-Shekhadat, A.S. Nikishin, A.S. Gogolevsky, S.V. Chepur

State Scientific-research Test Institute of Military Medicine, Saint-Petersburg, Russia

ABSTRACT: This article reviews the current understanding of the mechanism of action of the toxin, the clinical effects of ricin and abrin intoxication and how these relate to current and continuing prospects for vaccine development. The threat of bioterrorism worldwide has accelerated the demand for the development of therapies and vaccines against the ribosome-inactivating proteins. The diverse and unique nature of these toxins poses a challenge to vaccinologists. This paper will review the mechanism of toxicity and vaccines development to protect against the highly toxic plant-derived ribosomal toxins. Vaccine development is further complicated by the fact that as bioterrorism agents, abrin and ricin would most likely be disseminated as aerosols supplies. Our understanding of the mechanisms by which these toxins cross mucosal surfaces, and importance of mucosal immunity in preventing toxin uptake is only rudimentary. Research is now aimed at developing recombinant, attenuated vaccines based on a detailed understanding of the molecular mechanisms by which these toxins function. The evolution of the development of specific immunoprophylaxis of acute ricin poisoning from native toxoid to genetically engineered subunit vaccines based on the method of targeted mutagenesis is traced. The past several years have seen major advances in the development of a safe and efficacious ricin toxin vaccine. These vaccines are discussed in the context of the toxicity and structure of ricin. In this review we summarize ongoing efforts to leverage recent advances in the design and use of vaccines.

Keywords: intoxication; vaccination; plant-derived lectins; recombinant subunit vaccines; ribosome-inactivating proteins of plant origin; targeted mutagenesis; immunobiological drugs.

To cite this article:

Myasnikov VA, Stepanov AV, Miteva OA, Al-Shekhadat RI, Nikishin AS, Gogolevsky AS, Chepur SV. Molecular aspects of creating vaccines for the prevention of poisoning ribosome-inactivating proteins of plant origin: current situation, problems of vaccine development. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2021;23(2):219–228. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma.65095>

Received: 14.04.2021

Accepted: 25.05.2021

Published: 20.06.2021

Токсины широко распространены в живых системах — от вирусов до высших растений и позвоночных животных. Интерес специалистов медико-профилактического профиля к токсинам биологического происхождения обусловлен высокой вероятностью их применения в качестве биологических поражающих агентов (БПА), ввиду высокой активности, нередко превышающей классические конвенциональные яды; тяжести интоксикации и высокой летальности в результате отсутствия проведения профилактических и лечебных мероприятий; относительной простоты получения и стабильности хранения; отсутствия в своем большинстве специфических средств терапии и профилактики; скрытости факта воздействия и отсутствия инкубационного периода перед возникновением клинических проявлений; а также наличия определенных затруднений выявления и идентификации в объектах окружающей среды и биологического материала от пораженных. Возможность применения и распространения токсинного оружия в следствие его относительной доступности и простоты получения представляет одну из значимых потенциальных угроз безопасности современного общества. Проблема предотвращения подобных рисков, в том числе в рамках борьбы с биотерроризмом, приоритетна не только для России, но и для мирового сообщества в целом [1].

По своим характеристикам биологические токсины занимают нишу между классическими биологическими и химическими агентами: с одной стороны, они вырабатываются живыми организмами, но, вместе с тем, не способны реплицироваться, вызывая только интоксикацию (острое отравление). Среди известных на сегодняшний день биотоксинов особое место занимают белковые фитотоксины или токсальбумины высших растений. Последние представляют собой сложные белки-гликопротеиды, обладающие высокой биологической активностью, степенью гомологии и универсальностью механизма действия. Токсальбумины являются классическими бинарными белковыми токсинами, состоящими из двух субъединиц — связывающей, рецепторной (ricin toxin B-chain — RTB) и каталитической (ricin toxin A-chain — RTA). В основе цитотоксического действия этих белков лежит депуринизация рибосом [2]. Этот механизм модификации и инактивации 60S субъединицы эукариотической рибосомы широко распространен и встречается у представителей различных таксонов, чрезвычайно удаленных друг от друга в эволюционном древе. Субъединица В, несущая лектиновый остаток, обеспечивает связь с галактозосодержащими рецепторами на поверхности клеточной мембраны эукариот и транслокацию токсина. Каталитическая субъединица, представляющая собой фермент N-гликозилазу, избирательно выщепляет адениновый остаток из консервативного домена 28S рибосомной рибонуклеиновой кислоты (рРНК) рибосомы, вследствие чего нарушается

внутриклеточный синтез белков (трансляция), приводящий клетку к гибели [3].

К настоящему времени известно более 50 растительных белков данной группы, способных блокировать рост пептидной цепи за счет инактивации рибосом. В группу рибосом-инактивирующих белков (РИБ) (ribosome-inactivating proteins — RIP) входят рицин (продукт *Ricinus communis*), абрин (продукт *Abrus precatorius*), вискумин (продукт *Viscum album*), модецин (продукт *Modeca digitata*), относительно нетоксичные нигрин и эбулин бузины (продукты *Sambucus ebulus*, *Sambucus nigra*), и многие другие. Рицин, помимо тетродотоксина и ботулотоксина, входит в список 1 «Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении» [4]. Несмотря на то, что получение и хранение рицина строго регламентировано Организацией по запрещению химического оружия (ОЗХО), регулярно фиксируются попытки его незаконного производства и использования [5]. Абрин близок по своей структуре и свойствам рицину. И, хотя возможность крупномасштабного культивирования продуцента абрина признана малоосуществимой, высокая устойчивость и стабильность как нативного белка, так и отдельных его субъединиц, простота и дешевизна получения сырья, его токсичность, превышающая токсичность рицина, представляют значимую угрозу.

За последнее десятилетие многие страны заметно интенсифицировали государственные программы создания средств диагностики, лечения и профилактики острых отравлений белковыми токсинами различной этиологии. Так, были предприняты значительные усилия по совершенствованию контрмер, предназначенных для сдерживания рисков и последствий отравления РИБ [6, 7], включающих в себя разработку перспективных кандидатных вакцин нового поколения [8–10].

В Российской Федерации для обеспечения биологической безопасности населения создана мощная законодательная и регулирующая база, основой которой является «Закон о биологической безопасности в Российской Федерации», подписанный 30.12.2020. Президентом Российской Федерации. Кроме того, в рамках выполнения ряда указов, целевых и федеральных программ создан обширный материально-технический и методический задел с определением функций, распределением сил и средств силовых, медицинских и иных подразделений, предназначенных для снижения и/или устранения рисков воздействия опасных химических и биологических факторов. Вместе с тем перечень научно-технических и опытно-конструкторских разработок, которые были созданы для принятия своевременных мер по предупреждению биологических угроз, вызванных возможным применением белковых ядов, пока не содержит решений применительно к профилактике и специфической терапии отравлений РИБ.

На сегодняшний день вакцинация является наиболее эффективной мерой, позволяющей обеспечить готовность медицинской службы Вооруженных сил Российской Федерации предотвратить либо существенно снизить поражающие эффекты БПА, в том числе белковой природы. Для проведения эффективной специфической иммунопрофилактики (СИП) необходимо четкое определение ее места, специфической направленности, времени и масштабов. В частности, при разработке эффективных СИП важно учитывать не только антигенные детерминанты, являющиеся мишенями для реализации иммунного ответа, но и терапевтическое окно для данного типа воздействия. Несмотря на успехи, достигнутые в изучении молекулярных аспектов, которые лежат в основе нейтрализации растительных РИБ, сохраняются пробелы в понимании основных механизмов реализации иммунного ответа, опосредованного антителами и обеспечивающего защиту от ингаляционного или перорального поражения растительными лектинами, ингибирующими синтез белка в клетке. Знание этих и других особенностей взаимодействия РИБ с организмом предопределяет правильный выбор стратегии разработки СИП и иммунотерапии острых ингаляционных и пероральных поражений как цельными нативными растительными РИБ, так и их отдельными компонентами.

Таким образом, формирование адекватной и надежной системы безопасности, а также изучение биологических свойств токсичных белков растительного происхождения с целью последующего создания средств диагностики, профилактики и терапии отравлений РИБ остается актуальной проблемой современной военной медицины.

История создания противорициновой вакцины берет начало с разработки препаратов на основе нетоксичных форм рицина. Первоначально в качестве нетоксичной формы был предложен токсид рицина, или анатоксин, представляющий собой нативный белок, обработанный формалином [11–13]. В качестве иных способов модификации изучено дегликозилирование молекулы цельного белка, а также отдельных его субъединиц [13, 14]. В работах С. Yan, W. Rill, L. Mall [11], G. Griffiths, et al. [13] показано, что после инкапсулирования дегликозилированной формы субъединицы А в липосомы и введения полученного препарата в респираторный тракт достигался необходимый протективный эффект, защищавший животных при ингаляции высокими дозами токсина. Вместе с тем все вышеописанные иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) обладали остаточной токсичностью вследствие сохранения в молекуле антигена участков, ответственных за депуринизацию рРНК [15]. Поэтому, ни вакцина на основе анатоксина, ни вакцина на основе дегликозилированной РТА не нашли широкого практического применения. Дополнительным недостатком, связанным с производством таких ИЛП, является

работа с активным белком. Отчасти снижение указанных рисков достигается при разработке субъединичных рекомбинантных вакцин на основе нетоксичных форм РТА, получаемых с использованием генно-инженерных и биотехнологических подходов на основе метода таргетного мутагенеза [16–18].

Субъединичные вакцины содержат четко определенные макромолекулярные детерминанты токсина, способные вызывать протективный иммунитет. Этот тип вакцин обладает рядом преимуществ по сравнению с другими ИЛП (например, инактивированными, субъединичными), а именно улучшенными профилями безопасности, простотой производства и стабильностью. К недостаткам можно отнести ограничения, связанные с очисткой специфического рекомбинантного белка и изменением его конформации на начальных этапах отработки технологии производства. Еще одной значимой проблемой субъединичных вакцин является их недостаточная иммуногенность, хотя к настоящему времени отработаны определенные подходы к ее усилению, например, использование поливалентных антигенов, адъювантов и ряд других субстратов и методических приемов [17–22].

В настоящее время наиболее перспективными признаются две вакцины — RiVax и RVeс, разработанные в Соединенных Штатах Америки, на основе рекомбинантной формы РТА, лишенной ферментативной активности, но сохранившей третичную структуру.

Препарат RiVax представляет собой полноразмерный вариант (267 а.о.) РТА. Для разработки RiVax в РТА были введены две точечные мутации Tug8 → A1a и Val76 → Met, что позволило нивелировать токсические эффекты, связанные с депуринизацией рРНК (Tug80 → A1a) и способностью вызывать синдром повышенной проницаемости сосудов (Val76 → Met) [16, 17]. Препарат высоко очищен и нетоксичен, при этом даже в отсутствие адъюванта обладает способностью активировать выработку нейтрализующих антирициновых антител в высоком титре у мышей и кроликов [16–18]. Мыши, трехкратно иммунизированные этим ИЛП с четырехнедельным интервалом между повторными инъекциями в количестве 1 мкг, были полностью защищены от токсического эффекта рицина, введенного внутрибрюшинно в дозе 10 ЛД₅₀. Важно отметить, что иммунные сыворотки, полученные от этих же животных, содержали антитела, нейтрализующие рибцин и способные защитить не вакцинированных мышей от одной летальной дозы токсина, введенной внутрибрюшинно. Исследование защитной эффективности ИЛП при реальных аппликациях токсиканта показало, что внутримышечное введение RiVax по вышеописанной схеме защищало мышей от 10-кратной средней смертельной дозы, введенной перорально или ингаляционно [19]. Препарат также обладал высокой иммуногенностью и не проявлял сколько-нибудь выраженной

токсичности при проведении I фазы клинических испытаний, а антитела, полученные из сыворотки вакцинированных добровольцев, обладали протективным эффектом и защищали мышей от ингаляций рицина в дозе не менее одной смертельной [20].

Вторая кандидатная вакцина — RVEc — представляет собой усеченную версию RTA, в которой отсутствуют остатки 199–267 С-конца и небольшая гидрофобная петля в N-конце (остатки 34–43) [21–23]. Эти изменения позволили снизить агрегабельность молекулы RTA и ее осаждение из раствора, что существенно повысило стабильность вакцины. Исследование кристаллической структуры показало, что, несмотря на отсутствие домена свертывания 3, молекула RTA в RVEc способна принимать нормальную третичную структуру в доменах 1 и 2, что, безусловно, способствует ее высокой иммуногенности и является неотъемлемой частью эффективности вакцины. Эффективность данного ИЛП объясняется тем, что ряд сильных токсиннейтрализующих антител нацелен именно на конформационно зависимые эпитопы внутри самих фолдинговых доменов [24].

За последние 10 лет RiVax и RVEc были подвергнуты всесторонним доклиническим исследованиям, включая оценку эффективности и безопасности, проведенную на двух видах лабораторных животных — мышах и кроликах. Показано, что подкожное, внутрибрюшинное или внутримышечное введение RiVax обеспечивало развитие протективного иммунитета против системных и местных (слизистые оболочки) поражений у мышей [16, 19, 25, 26]. RVEc также обеспечивала формирование системного и мукозального иммунитета респираторного тракта, защищая мышей и кроликов от ингаляционного поражения летальными дозами токсина [22, 27, 28].

Результаты I фазы клинических исследований RiVax и RVEc позволили сделать заключение, что обе вакцины действуют аналогично друг другу [8–10]. Исследования их безопасности свидетельствуют, что по этому показателю RiVax и RVEc схожи между собой. Так, подавляющее большинство добровольцев (80–100%) сообщали о легких системных нежелательных симптомах, регистрируемых после вакцинации (температура, головная боль, артралгия, миалгия, и т. п.). Важно отметить, что уровни специфических противорициновых антител в крови вакцинированных RiVax или RVEc в сопоставимых дозах были практически идентичны. Хотя наименьшая исследованная прививочная доза RiVax (1 мкг) не вызвала выработки специфических антител ни у одного из вакцинированных, у четырех из пяти привитых RiVax в дозе 10 мкг, и пяти из пяти, привитых RiVax в дозе 100 мкг, регистрировали высокие уровни сероконверсии спустя 14 сут после третьей вакцинации.

При исследовании иммунного статуса добровольцев, иммунизированных RVEc, у десяти из десяти (100%) и девяти из десяти (90%) привитых препаратом

в дозах 20 и 50 мкг соответственно, сероконверсия была установлена после третьей вакцинации. Самые высокие уровни специфических противорициновых антител были выявлены при введении препаратов в средних, а не максимальных дозах. Например, через 10 сут после второй вакцинации сероконверсия была выявлена у девяти из десяти добровольцев, привитых RVEc в дозе 20 мкг, при этом среди добровольцев, привитых препаратом в дозе 50 мкг, только у семи из десяти (70%) выявлены высокие уровни специфических антител. Пиковые токсин-специфические сывороточные титры антител иммуноглобулина (Ig) G в клинических исследованиях RiVax и RVEc были зарегистрированы через 2–4 нед после третьей вакцинации. Однако, вследствие различий в методике определения, прямое сравнение абсолютных титров невозможно. В обоих случаях титры токсин-специфических сывороточных антител IgG имели тенденцию к снижению через 2–4 нед после последней вакцинации с периодом полураспада от 100 до 180 сут. Следовательно, обе вакцины являются относительно безопасными и иммуногенными для людей. Однако ввиду быстрого снижения титров токсин-специфических сывороточных IgG по причине их короткого периода полураспада ни одна из вакцин не оказалась значимо более эффективной при оценке в тесте токсиннейтрализующей активности. Кроме того, был выявлен целый ряд других проблем применительно к обоим ИЛП. Так, по результатам I фазы клинических исследований отмечено, что ни одна из вакцин RVEc или RiVax, содержащих в своем составе альгидрогель, не является достаточно иммуногенной для людей, что определяет необходимость дальнейшего совершенствования ИЛП против рицина путем применения более эффективных адъювантов, способных увеличить иммуногенность существующих препаратов.

Вместе с тем нельзя не признать, что данные, полученные в исследованиях на животных, особенно ИЛП, не всегда могут быть экстраполированы на человека. С одной стороны, значение показателей титра токсиннейтрализующих антител в защите от поражений рицином бесспорно. С другой стороны, уровни токсин-специфических сывороточных IgG, по крайней мере у мышей, не являются надежными индикаторами развития напряженного иммунитета [29].

В настоящее время единственным признаком формирования напряженного иммунного ответа является оценка токсиннейтрализующей активности (toxin-neutralizing activity — TNA) *in vitro* с использованием анализа цитотоксичности на клетках млекопитающих. Проблема заключается в том, что сама по себе TNA может быть слишком жестким порогом, по которому оценивают эффективность защиты. В исследованиях, проведенных на мышинной модели, показано, что выживание после введения смертельной дозы рицина может происходить и в отсутствие детектируемой токсиннейтрализующей

активности [29, 30]. В исследовании, проведенном под руководством J.M. O'Hara, L.M. Neal, E.A. McCarthy [31], беспородных белых мышей ($n = 10$) иммунизировали RiVax или RVEc в дозе 0,3 мкг/мышь двукратно, с интервалом 30 сут. Далее, при отравлении мышей рицином в дозе, превышающей 10 средних смертельных доз (LD_{50}), все иммунизированные животные выжили несмотря на то, что TNA с сывороткой иммунизированных мышей оказалась отрицательной. Высказано предположение, что уровни циркулирующих токсиннейтрализующих антител, достаточных для достижения протективного эффекта, были ниже порога, который может быть зафиксирован применяемыми методами. В качестве альтернативы нельзя исключать вероятность того, что смесь поликлональных «не нейтрализующих» антител (как определено с помощью текущих исследований *in vitro*) потенциально способна инактивировать рицин *in vivo* с помощью механизмов, до настоящего момента еще не изученных [10].

Заметим, что публикации, посвященные разработке рекомбинантных вакцин к другим типам рибосом-ингибирующих белков, в частности к абрину практически отсутствуют. До недавнего времени о мишенях абринейтрализующих антител было известно крайне мало. В работе M.S. Kumar, A.A. Karande [32] описано два иммунодоминантных эпитопа, расположенных на субъединице А абрина. Анализ паттерна связывания антител выявил 11 линейных эпитопов для субъединицы А и 14 эпитопов для субъединицы В молекулы холотоксина, которые расположены на поверхности токсина и, следовательно, доступны для взаимодействия с антителами [33].

Несмотря на описанный научно-практический задел в области разработки и испытания вакцин против РИБ, в частности рицина, на сегодняшний день информация о разработке вакцин-кандидатов против абрина отсутствует. Однако несколько лет назад опубликована серия работ, посвященных исследованию и оценке свойств рекомбинантного модифицированного белка А, представляющего собой химерную молекулу, содержащую участок цепи В как абрина, так и рицина [34, 35]. Был сконструирован оптимизирующий ген, кодирующий В-субъединицы как рицина, так и абрина, созданы методики очистки экспрессированного продукта и подтверждения его структуры методом масс-спектрометрии высокого разрешения. В экспериментах на белых

беспородных мышах показана высокая иммуногенность и защитный эффект разработанной двойной субъединичной рекомбинантной вакцины при четырехкратной с интервалом в неделю подкожной иммунизации в дозах 15 или 25 мкг на животное с последующим пероральным или ингаляционным отравлением токсинами в дозах от 2 до 4 LD_{50} .

По мнению специалистов в области вакцинологии, стратегия применения В-субъединиц А-В токсинов для иммунизации имеет ряд преимуществ ввиду невысокой токсичности транспортной субъединицы по сравнению с ферментативной, а также выявленными адъювантными свойствами субъединицы В. В 2015 г. было объявлено о проведении доклинических испытаний безопасности и иммуногенности препарата на животных моделях [36], однако в ходе исследований было установлено, что защитный титр антител снижался до минимальных величин менее чем за 3 мес, что не позволило провести весь спектр доклинических исследований.

Способность антител частично или полностью инактивировать последствия поражения рицином была признана более века назад. Тем не менее основные механизмы, с помощью которых достигался протективный эффект были изучены сравнительно недавно. В первую очередь, это было достигнуто благодаря детальной характеристике десятков нейтрализующих и ненейтрализующих моноклональных рицин-специфических антител, что послужило основой для разработки средств иммунизации. Появилось понимание молекулярных механизмов, обеспечивающих формирование протективного иммунитета против нативных риботоксинов и их отдельных субъединиц.

Современные исследования продемонстрировали потенциал субъединичных вакцин в достижении протективного эффекта и являются свидетельством того, что концепция, принятая при разработке кандидатных вакцин, верна. Дальнейшие усилия исследователей должны быть направлены на более глубокое понимание принципов развития протективного иммунитета, изучение молекулярных основ взаимодействия антиген-антитело, составление полной антигенной карты рицина и абрина и более точное определение эпитопов, связанных с нейтрализующей активностью. Это позволит создать образцы рекомбинантных субъединичных вакцин, полностью лишенных риботоксических свойств, с высокими протективными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Janik E., Cheremuga M., et al. Biological toxins as the potential tools for bioterrorism // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. No. 5. P. 1181–2019. DOI: 10.3390/ijms20051181
2. Olsnes S., Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin a toxic protein inhibiting protein synthesis // *Biochemistry*. 1973. Vol. 12. No. 16. P. 3121–3126. DOI: 10.1021/bi00740a028
3. Audi J., Belson M., Patel M., et al. Ricin poisoning: a comprehensive review // *JAMA*. 2005. Vol. 294. No. 18. P. 2343–2351. DOI: 10.1001/jama.294.18.2342
4. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия от 13.01.1993 // *Бюллетень международных договоров*. 1998. Vol. 4. P. 3–125.
5. Bozza W.P., Tolleson W.H., Rosado L.A.R., Zhang B. Ricin detection: Tracking active toxin // *Biotechnology advances*. 2015. Vol. 33. No. 1. P. 117–123. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.11.012
6. Mantis N.J., Morici L.A., Roy C.J. Mucosal vaccines for biodefense // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2011. Vol. 354. P. 181–195. DOI: 10.1007/82_2011_122
7. Mantis N.J. Ricin Toxin. Manual of security sensitive microbes and toxins. Boca Raton: CRC Press, 2014.
8. Pittman P.R., Reisler R.B., Lindsey C.Y., et al. Safety and immunogenicity of ricin vaccine, RVEc™, in a phase 1 clinical trial // *Vaccine*. 2015. Vol. 33. No. 51. P. 7299–7306. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.10.094
9. Vitetta E.S., Smallshaw J.E., Schindler J. Pilot phase IB clinical trial of an alhydrogel-adsorbed recombinant ricin vaccine // *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. Vol. 19. No. 10. P. 1697–1699. DOI: 10.1128/0142-0296.00381-12
10. Vance D.J., Mantis N.J. Progress and challenges associated with the development of ricin toxin subunit vaccines // *Expert Rev. Vaccines*. 2016. Vol. 15. No. 9. P. 1213–1222. DOI: 10.1586/14760584.2016.1168701
11. Yan C., Rill W.L., Mall L.R. Intranasal stimulation of long-lasting immunity against aerosol ricin challenge with ricin toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres // *Vaccine*. 1996. Vol. 14. No. 11. P. 1031–1038. DOI: 10.1016/0264-410x(96)00063-1
12. Griffiths G.D., Phillips G.J., Bailey S.C. Comparison of the quality of protection elicited by toxoid and peptide liposomal vaccine formulations against ricin as assessed by markers of inflammation // *Vaccine*. 1999. Vol. 17. No. 20–21. P. 2562–2568. DOI: 10.1016/s0264-410x(99)00054-7
13. Griffiths G.D., Bailey S.C., Hambrook J.L., Keyte M.P. Local and systemic responses against ricin toxin promoted by toxoid or peptide vaccines alone or in liposomal formulations // *Vaccine*. 1998. Vol. 16. No. 5. P. 530–535. DOI: 10.1016/s0264-410x(97)80007-2
14. Mantis N.J. Vaccines against the category B toxins, staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005. Vol. 57. P. 1424–1439. DOI: 10.1016/j.addr.2005.01.017
15. Hewetson J.F., Rivera V.R., Creasia D.A. Protection of mice from inhaled ricin by vaccination with ricin or by passive treatment with heterologous antibody // *Vaccine*. 1993. Vol. 11. No. 7. P. 743–746. DOI: 10.1016/0264-410x(93)90259-z
16. Smallshaw J.E., Firan A., Fulmer J.R. A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication // *Vaccine*. 2002. Vol. 20. No. 27–28. P. 3422–3427. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00312-2
17. Smallshaw J.E., Richardson J.A., Pincus S. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin // *Vaccine*. 2005. Vol. 23. No. 39. P. 4775–4784. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.04.037
18. Vitetta E.S., Smallshaw J.E., Coleman E. A pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103. No. 7. P. 2268–2273. DOI: 10.1073/pnas.0510893103
19. Smallshaw J.E., Richardson J.A., Vitetta E.S. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol // *Vaccine*. 2007. Vol. 25. No. 42. P. 7459–7469. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.08.018
20. Vitetta E.S., Smallshaw J.E., Coleman E. A pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103. No. 7. P. 2268–2273. DOI: 10.1073/pnas.0510893103
21. McHugh C.A., Tammariello R.F., Millard C.B., Carra J.H. Improved stability of a protein vaccine through elimination of a partially unfolded state // *Protein Sci.* 2004. Vol. 13. No. 10. P. 2736–2743. DOI: 10.1110/ps.04897904
22. Olson M.A., Carra J.H., Roxas-Duncan V. Finding a new vaccine in the ricin protein fold // *Protein Engineering Design and Selection*. 2004. Vol. 17. No. 4. P. 391–397. DOI: 10.1093/protein/gzh043
23. Carra J.H., McHugh C.A., Mulligan S., et al. Fragment-based identification of determinants of conformational and spectroscopic change at the ricin active site // *BMC Structural Biology*. 2007. Vol. 7. No. 1. P. 72. DOI: 10.1186/1472-6807-7-72
24. Compton J.R., Legler P.M., Clingan B.V., et al. Introduction of a disulfide bond leads to stabilization and crystallization of a ricin immunogen // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2011. Vol. 79. No. 4. P. 1048–1060. DOI: 10.1002/prot.22933
25. Smallshaw J.E., Vitetta E.S. Ricin vaccine development // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012;357:259–272. DOI: 10.1007/82_2011_156
26. Marconescu P.S., Smallshaw J.E., Pop L.M., et al. Intradermal administration of RiVax protects mice from mucosal and systemic ricin intoxication // *Vaccine*. 2010. Vol. 28. No. 32. P. 5315–5322. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.05.045
27. McLain D.E., Lewis B.S., Chapman J.L., et al. Protective effect of two recombinant ricin subunit vaccines in the New Zealand white rabbit subjected to a lethal aerosolized ricin challenge: survival, immunological response, and histopathological

findings // *Toxicological Sciences*. 2011. Vol. 126. No. 1. P. 72–83. DOI: 10.1093/toxsci/kfr274

28. McLain D.E., Horn T.L., Detrisac C.J., et al. Progress in biological threat agent vaccine development: A repeat-dose toxicity study of a recombinant ricin toxin A-chain (rRTA) 1-33/44-198 vaccine (RVEc) in male and female New Zealand white rabbits // *International Journal of Toxicology*. 2011. Vol. 30. No. 2. P. 143–152. DOI: 10.1177/1091581810396730

29. O'Hara J.M., Brey R.N., Mantis N.J. Comparative efficacy of two leading candidate ricin toxin a subunit vaccine in mice // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. Vol. 20. No. 6. P. 89–794. DOI: 10.1128/CVI.00098-13

30. Vance D.J., Greene C.J., Rong Y., et al. Comparative adjuvant effects of type II heat-labile enterotoxins in combination with two different candidate ricin toxin vaccine antigens // *Clin. Vaccine Immunol.* 2015. Vol. 22. No. 12. P. 1285–1293. DOI: 10.1128/CVI.00402-15

31. O'Hara J.M., Neal L.M., McCarthy E.A., et al. Folding domains within the ricin toxin A subunit as targets of protective antibodies // *Vaccine*. 2010. Vol. 28. No. 43. P. 7035–7046. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.08.020

32. Kumar M.S., Karande A.A. A monoclonal antibody to an abrin chimera recognizing a unique epitope on abrin A chain confers protection from abrin-induced lethality // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016. Vol. 12. P. 124–131. DOI: 10.1080/21645515.2015.1067741

33. Alcalay R. Mapping immunodominant antibody epitopes of abrin // *Antibodies*. 2020. Vol. 9. No. 2. P. 11. DOI: 10.3390/antib9020011

34. Han Y. A recombinant mutant abrin A chain expressed in *E. coli* can be used an effective vaccine candidate // *Human Vaccin.* 2011. Vol. 7. No. 5. P. 838–844. DOI: 10.4161/hv.7.8.16258

35. Wang J., Gao Sh., Zhang T., et al. A recombinant chimeric protein containing B chains of ricin and abrin is an effective vaccine candidate // *Human Vaccin. Immunother.* 2014. Vol. 10. No. 4. P. 938–944. DOI: 10.4161/hv.27870

36. Wang J, Gao Sh., Xin W., et al. A novel recombinant vaccine protecting mice against abrin intoxication // *Human Vaccin. Immunother.* 2015. Vol. 11. No. 6. P. 1361–1367. DOI: 10.1080/21645515.2015.1008879

REFERENCES

1. Janik E, Cheremuga M, et al. Biological toxins as the potential tools for bioterrorism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1181–2019. DOI: 10.3390/ijms20051181

2. Olsnes S., Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*. 1973;12(16):3121–3126. DOI: 10.1021/bi00740a028

3. Audi J, Belson M, Patel M, et al. Ricin poisoning. A comprehensive review. *JAMA*. 2005;294(18):2343–2351. DOI: 10.1001/jama.294.18.2342

4. Konvenciya o zapreshchenii razrabotki, proizvodstva, nakopleniya i primeneniya himicheskogo oruzhiya ot 13.01.1993. *Byulleten' mezhdunarodnyh dogovorov*. 1998;4:3–125. (In Russ.).

5. Bozza WP, Tolleson WH, Rosado LAR, Zhang B. Ricin detection: Tracking active toxin. *Biotechnology advances*. 2015;33(1):117–123. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.11.012

6. Mantis NJ, Morici LA, Roy CJ. Mucosal vaccines for biodefense. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;354:181–195. DOI: 10.1007/82_2011_122

7. Mantis NJ. *Ricin Toxin. Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins*. Boca Raton: CRC Press; 2014.

8. Pittman PR, Reisler RB, Lindsey CY, et al. Safety and immunogenicity of ricin vaccine, RVEc™, in a phase 1 clinical trial. *Vaccine*. 2015;33(51):7299–7306. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.10.094

9. Vitetta ES, Smallshaw JE, Schindler J. Pilot phase IB clinical trial of an alhydrogel-adsorbed recombinant ricin vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(10):1697–1699. DOI: 10.1128/CVI.00381-12

10. Vance DJ, Mantis NJ. Progress and challenges associated with the development of ricin toxin subunit vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(9):1213–1222. DOI: 10.1586/14760584.2016.1168701

11. Yan C, Rill WL, Mall LR. Intranasal stimulation of long-lasting immunity against aerosol ricin challenge with ricin toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres. *Vaccine*. 1996;14(11):1031–1038. DOI: 10.1016/0264-410x(96)00063-1

12. Griffiths GD, Phillips GJ, Bailey SC. Comparison of the quality of protection elicited by toxoid and peptide liposomal vaccine formulations against ricin as assessed by markers of inflammation. *Vaccine*. 1999;17(20–21):2562–2568. DOI: 10.1016/s0264-410x(99)00054-7

13. Griffiths GD, Bailey SC, Hambrook JL, Keyte MP. Local and systemic responses against ricin toxin promoted by toxoid or peptide vaccines alone or in liposomal formulations. *Vaccine*. 1998;16(5):530–535. DOI: 10.1016/s0264-410x(97)80007-2

14. Mantis NJ. Vaccines against the category B toxins, staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57:1424–1439. DOI: 10.1016/j.addr.2005.01.017

15. Hewetson JF, Rivera VR, Creasia DA. Protection of mice from inhaled ricin by vaccination with ricin or by passive treatment

- with heterologous antibody. *Vaccine*. 1993;11(7):743–746. DOI: 10.1016/0264-410x(93)90259-z
16. Smallshaw JE, Firan A, Fulmer JR. A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication. *Vaccine*. 2002;20(27–28):3422–3427. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00312-2
17. Smallshaw JE, Richardson JA, Pincus S. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. *Vaccine*. 2005;23(39):4775–4784. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.04.037
18. Vitetta ES, Smallshaw JE, Coleman E. A pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(7):2268–2273. DOI: 10.1073/pnas.0510893103
19. Smallshaw JE, Richardson JA, Vitetta ES. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. *Vaccine*. 2007;25(42):7459–7469. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.08.018
20. Vitetta ES, Smallshaw JE, Coleman E. A pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(7):2268–2273. DOI: 10.1073/pnas.0510893103
21. McHugh CA, Tammariello RF, Millard CB., Carra JH. Improved stability of a protein vaccine through elimination of a partially unfolded state. *Protein Sci*. 2004;13(10):2736–2743. DOI: 10.1110/ps.04897904
22. Olson MA, Carra JH, Roxas-Duncan V. Finding a new vaccine in the ricin protein fold. *Protein Engineering Design and Selection*. 2004;17(4):391–397. DOI: 10.1093/protein/gzh043
23. Carra JH, McHugh CA, Mulligan S, et al. Fragment-based identification of determinants of conformational and spectroscopic change at the ricin active site. *BMC Structural Biology*. 2007;7(1):72. DOI:10.1186/1472-6807-7-72
24. Compton JR, Legler PM, Clingan BV, et al. Introduction of a disulfide bond leads to stabilization and crystallization of a ricin immunogen. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2011;79(4):1048–1060. DOI: 10.1002/prot.22933
25. Smallshaw JE, Vitetta ES. Ricin vaccine development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;259–272. DOI: 10.1007/82_2011_156
26. Marconescu PS, Smallshaw JE, Pop LM, et al. Intradermal administration of RiVax protects mice from mucosal and systemic ricin intoxication. *Vaccine*. 2010;28(32):5315–5322. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.05.045
27. McLain DE, Lewis BS, Chapman JL, et al. Protective effect of two recombinant ricin subunit vaccines in the New Zealand white rabbit subjected to a lethal aerosolized ricin challenge: survival, immunological response, and histopathological findings. *Toxicological Sciences*. 2011;126(1):72–83. DOI: 10.1093/toxsci/kfr274
28. McLain DE, Horn TL, Detrisac CJ, et al. Progress in biological threat agent vaccine development: A repeat-dose toxicity study of a recombinant ricin toxin A-chain (rRTA) 1-33/44-198 vaccine (RVEc) in male and female new zealand white rabbits. *International journal of toxicology*. 2011;30(2):143–152. DOI: 10.1177/1091581810396730
29. O'Hara JM, Brey RN, Mantis NJ. Comparative efficacy of two leading candidate ricin toxin a subunit vaccine in mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(6):789–794. DOI: 10.1128/CVI.00098-13
30. Vance DJ, Greene CJ, Rong Y, et al. Comparative adjuvant effects of type II heat-labile enterotoxins in combination with two different candidate ricin toxin vaccine antigens. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(12):1285–1293. DOI: 10.1128/CVI.00402-15
31. O'Hara JM, Neal LM, McCarthy EA, et al. Folding domains within the ricin toxin A subunit as targets of protective antibodies. *Vaccine*. 2010;28(43):7035–7046. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.08.020
32. Kumar MS, Karande AA. A monoclonal antibody to an abrin chimera recognizing a unique epitope on abrin A chain confers protection from abrin-induced lethality. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12:124–131. DOI: 10.1080/21645515.2015.1067741
33. Alcalay R. Mapping immunodominant antibody epitopes of abrin. *Antibodies*. 2020;9(2):11. DOI: 10.3390/antib9020011
34. Han Y. A recombinant mutant abrin A chain expressed in *E. coli* can be used an effective vaccine candidate. *Human Vaccin*. 2011;7(5):838–844. DOI: 10.4161/hv.7.8.16258
35. Wang J, Gao Sh, Zhang T, et al. A recombinant chimeric protein containing B chains of ricin and abrin is an effective vaccine candidate. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(4):938–944. DOI: 10.4161/hv.27870
36. Wang J, Gao Sh, Xin W, et al. A novel recombinant vaccine protecting mice against abrin intoxication. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(6):1361–1367. DOI: 10.1080/21645515.2015.1008879

ОБ АВТОРАХ

***Ольга Анатольевна Митева**, научный сотрудник;
e-mail: letto2004@inbox.ru; ORCID: 0000-0002-3874-6954;
SCOPUS: 55195685300; SPIN-код: 2070-7250

Вадим Александрович Мясников, кандидат медицинских наук;
SPIN-код: 5084-2723

AUTHORS INFO

***Olga A. Miteva**, researcher;
e-mail: letto2004@inbox.ru; ORCID: 0000-0002-3874-6954;
SCOPUS: 55195685300; SPIN-code: 2070-7250

Vadim A. Myasnikov, candidate of medical sciences;
SPIN-code: 5084-2723

Александр Валентинович Степанов, доктор медицинских наук, профессор; SPIN-код: 7279-7055

Александр Сергеевич Никишин, научный сотрудник; SPIN-код: 8503-0338

Александр Сергеевич Гоголевский, доктор медицинских наук; SPIN-код: 5807-9998

Руслан Исмаилович Аль-Шехадат, кандидат биологических наук; SPIN-код: 4900-9032

Alexander V. Stepanov, doctor of medical sciences, professor; SPIN-code: 7279-7055

Alexander S. Nikishin, researcher; SPIN-code: 8503-0338

Alexander S. Gogolevsky, doctor of medical sciences; SPIN-code: 5807-9998

Ruslan I. Al-Shehadat, candidate of biological sciences; SPIN-code: 4900-9032