

УДК 578.821.5:615.371

Аттенуация вируса осповакцины

С. Н. Якубицкий¹, И. В. Колосова¹, Р. А. Максюттов¹, С. Н. Щелкунов^{1,2*}¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Новосибирская обл., Кольцово²Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

*E-mail: snshchel@rambler.ru; snshchel@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 30.03.2015

РЕФЕРАТ Прекращение противооспенной вакцинации 35 лет назад привело к тому, что большинство людей в мире не имеют иммунитета не только против натуральной оспы, но и других зоонозных ортопоксвирусных инфекций. Поэтому важную задачу представляет разработка современной безопасной вакцины против ортопоксвирусов. На основе штамма L1VP вируса осповакцины (ВОВ), используемого для вакцинации, создан рекомбинантный вариант 1421ABJCN с нарушением пяти генов вирулентности, кодирующих гемагглютинин (*A56R*), γ -интерферонсвязывающий белок (*B8R*), тимидинкиназу (*J2R*), комплементсвязывающий белок (*C3L*) и Bcl-2-подобный ингибитор апоптоза (*N1L*). Показано, что инактивация выбранных генов вирулентности не влияет на репродуктивные свойства ВОВ на культурах клеток млекопитающих. Штамм 1421ABJCN характеризуется значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным L1VP. При интрацеребральном введении продукция вируса 1421ABJCN в головном мозге новорожденных мышей снижена на три порядка по сравнению с родительским ВОВ L1VP. Установлено, что при подкожном введении мышам рекомбинантный вариант 1421ABJCN индуцирует выработку ВОВ-нейтрализующих антител на уровне родительского штамма L1VP и обеспечивает полную защиту мышей от летальной дозы высокопатогенного для них вируса экстремелии. Рекомбинантный вариант ВОВ может быть использован в качестве безопасной живой культуральной вакцины нового поколения для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аттенуация, вакцина, вирус осповакцины, гены вирулентности, протективность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БОЕ – бляшкообразующая единица; ВНО – вирус натуральной оспы; ВОВ – вирус осповакцины; ВОК – вирус оспы коров; ВЭ – вирус экстремелии; ИФН – интерферон; КСБ – комплементсвязывающий белок; L1VP – штамм Л-ИВП вируса осповакцины; MCS – нуклеотидная последовательность с сайтами гидролиза для набора эндонуклеаз рестрикции; ПЦР – полимеразная цепная реакция; *gpt* – ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы; ЦПД – цитопатическое действие.

ВВЕДЕНИЕ

В 1980 году после объявления о ликвидации натуральной оспы Всемирной организацией здравоохранения было рекомендовано прекратить вакцинацию людей против данного особо опасного заболевания [1]. Такое решение было обусловлено тем, что прививки вируса осповакцины (ВОВ) могли в ряде случаев приводить к тяжелым поствакцинальным осложнениям, иногда со смертельным исходом [1, 2].

В результате отказа от вакцинации против натуральной оспы в человеческой популяции с каждым годом становится все меньше людей со специфическим иммунитетом против данного заболевания. Это делает человечество беззащитнее не только перед возможным инфицированием вирусом натуральной оспы (ВНО), но и другими близкородственными ортопоксвирусами, природным резервуаром которых

служат различные животные, в первую очередь, грызуны [3]. К таким вирусам относятся вирусы оспы обезьян (ВОО) и оспы коров (ВОК), вызывающие оспоподобные заболевания животных и человека. Распространение этих вирусов в человеческой популяции потенциально может привести к их адаптации к защитным системам организма человека и появлению вирусных вариантов, эпидемически опасных для людей [3, 4]. В последние годы в различных регионах мира стали регистрировать необычно массовые вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей [3]. Кроме того, большую опасность представляет потенциальная возможность использования ВНО в качестве агента биотеррористических атак [5].

Единственным эффективным методом борьбы с возрастающей угрозой ортопоксвирусных инфекций человека является вакцинопрофилактика [1, 2].

Накопление в последние десятилетия в человеческой популяции иммунодефицитных состояний привело к тому, что использование классических живых вакцин на основе ВОВ для вакцинации населения сейчас противопоказано, так как может привести к большому числу побочных реакций и более тяжелым их проявлениям, чем во время кампании ликвидации натуральной оспы. Поэтому существует настоятельная потребность в создании современных антиортопоксвирусных вакцин, которые должны быть значительно безопаснее по сравнению с предыдущими поколениями противооспенных вакцин и при этом высокоиммуногенны, обеспечивая надежную защиту от вирусной инфекции.

Первые аттенуированные штаммы ВОВ были получены в результате множественных пассажей вируса на культуре фибробластов куриных эмбрионов (штамм MVA) [6] или культуре клеток почки кролика (штамм LC16m8) [7]. В этих случаях аттенуация вируса была обусловлена спонтанными протяженными делециями и мутациями в вирусном геноме. При этом могут затрагиваться не только гены вирулентности, но и гены, функции которых определяют репликативные свойства вируса и круг чувствительных к нему хозяев [5].

С развитием методов молекулярной биологии стало возможным создавать модифицированные варианты ВОВ путем введения нужных последовательностей в вирусный геном, удаления или нарушения генов самого вируса [8]. Выключение генов вирулентности способно существенно снизить патогенные свойства ВОВ. Одно из наиболее перспективных направлений таких работ – создание методами генетической инженерии высокоаттенуированных вариантов ВОВ, обладающих иммуногенностью и протективностью на уровне классической противооспенной вакцины, но при этом с меньшей патогенностью.

Секвенирование полных геномов различных штаммов и разных видов патогенных для человека ортопоксвирусов [9–12], накопление данных о функциях многочисленных генов этих вирусов [2, 13, 14], а также разработка методов введения направленных изменений в вирусный геном [15, 16] позволили нам сформулировать и реализовать новый подход к созданию высокоаттенуированных вариантов ВОВ. Этот подход состоит в строго локализованном последовательном удалении или инактивации индивидуальных генов вирулентности, не затрагивающей функции репликации вируса в культуре клеток и не влияющей на круг хозяев, чувствительных к вирусу.

Цель данной работы состояла в создании рекомбинантного варианта ВОВ с пятью нарушенными генами вирулентности, потенциального кандидата на использование в качестве живой аттенуированной вакцины

нового поколения для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека, и в изучении биологических свойств этого вируса. Свойства полученного штамма ВОВ 1421ABJCN, такие, как репродукция на перевиваемых культурах клеток млекопитающих, патогенность для мышей и кроликов, специфичная иммуногенная активность, защита экспериментальных животных от инфицирования летальными дозами высоковирулентного ортопоксвируса, сравнивали со свойствами родительского штамма LIVP (клонный вариант). Эти свойства ортопоксвирусной вакцины относятся к одним из важнейших, изучаемых при проведении доклинических исследований новых вакцин [17].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактерии, вирусы, культуры клеток

В работе использовали бактериальные штаммы *Escherichia coli* JM109 и XL2-blue, а также штамм LIVP ВОВ (производный штамма Lister, полученный в Институте вирусных препаратов, Москва) и штамм К-1 вируса экстремелии (ВЭ) из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», перевиваемые культуры клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1, Vero и 4647 из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Плазмиды интеграции

Плазмиды интеграции, предназначенные для делегирования целевых генов ВОВ, получены на основе векторной плазмиды pMGC20-gpt, несущей селективный ген *gpt* *E. coli* под контролем 7.5K-промотора ВОВ [16] (рис. 1). Методом ПЦР получали два фрагмента генома ВОВ (штамм LIVP), фланкирующие делегируемый ген слева (L-flank) и справа (R-flank) (рис. 1, 2). В плазмиду pMGC20-gpt встраивали одновременно оба фланкирующих фрагмента ДНК для каждого гена, расщепленных после ПЦР соответствующими эндонуклеазами рестрикции, сайты узнавания которых были введены в нуклеотидную последовательность ПЦР-праймеров (рис. 2). Структура плазмид pΔB8R, pΔC3L, pΔA56R и pΔN1L подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием.

Ранее полученная плаزمида pΔTK содержит последовательность MCS, приводящую к инактивации вирусного гена тимидинкиназы (J2R) в результате сдвига рамки трансляции [18].

Получение ВОВ с делецией/нарушением генов вирулентности

ВОВ выращивали в культуре клеток CV-1, используя поддерживающую среду ДМЕМ с добавлением

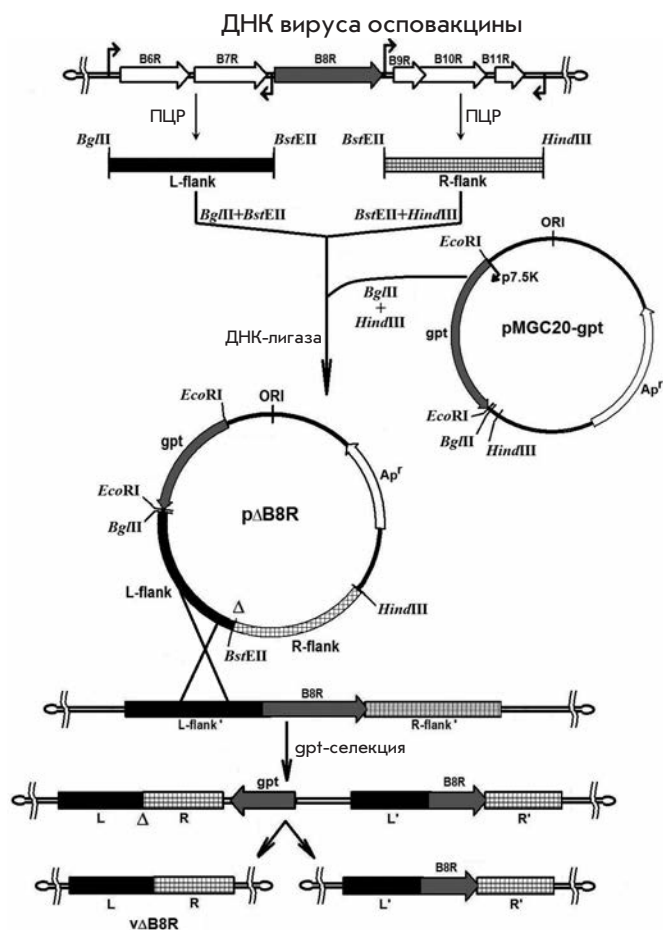


Рис. 1. Общая схема получения ВОВ с направленной делецией гена *B8R* (пояснения в тексте)

2% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота. Все мутантные варианты ВОВ получали методом временной доминантной селекции, описанным ранее [16]. После четырех-пяти пассажей в условиях селекции (до получения ЦПД) вирус клонировали через бляшку под агарозным покрытием [19]. Далее эти клоны подращивали в неселективных условиях и клонировали повторно. ДНК из отобранных клонов рекомбинантных ВОВ выделяли согласно [15]. По результатам ПЦР отбирали по одному реклону от двух-трех клонов, подращивали на культуре CV-1, титровали методом бляшек [19].

ПЦР-анализ ДНК рекомбинантных вирусов

В ДНК клонов рекомбинантных ВОВ методом ПЦР выявляли целевые делеции/инсерции с использованием соответствующих пар олигонуклеотидных праймеров.

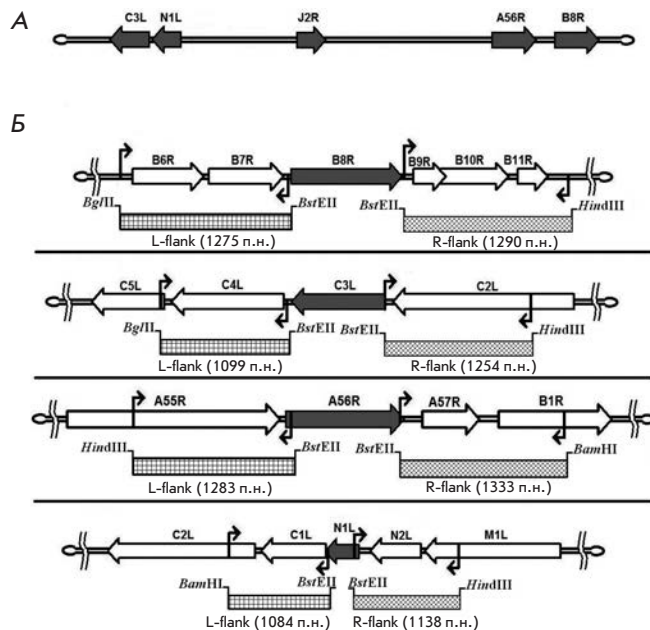


Рис. 2. Схема получения ПЦР-фрагментов ДНК, фланкирующих делелируемые гены ВОВ. А – схема генома ВОВ, на которой стрелками показано расположение генов вирулентности *C3L*, *N1L*, *J2R*, *A56R*, *B8R*; Б – схема расположения ПЦР-фрагментов ДНК ВОВ (заштрихованные блоки), фланкирующие слева (L-flank) и справа (R-flank) делелируемые гены (серые блочные стрелки). Черными ломаными стрелками обозначены места расположения олигонуклеотидных праймеров для ПЦР, рассчитанных таким образом, чтобы делеция целевого гена не нарушала прилегающие к нему вирусные гены, а амплифицируемые фрагменты были ограничены сайтами гидролиза указанными эндонуклеазами рестрикции

Для $\Delta B8R$:

5'-TCACAAATATGATGGTGATGAGCGA-3'
5'-CGTGATATACCCTAGCCATAGGCAT-3'.

Для $\Delta C3L$:

5'-TCGCGCTTTACATTCTCGAATCT-3'
5'-TGTTCTGTGTTCTTTCGGTGA-3'.

Для $\Delta A56R$:

5'-GTGGTATGGGACACCACAAATCCAA-3'
5'-ATTAACATTCCTAGAATTAATCCCGTCT-3'.

Для $\Delta N1L$:

5'-GGGTTGGATCSTTTACACATAGATСТА-
СТАCAGGCGGAACA-3'
5'-GGGAAAGCTTAATTTGTGAAGATGCCA-
TGТАCTACGCT-3'.

Для J2R-MCS:

5'-ATATGTTCTTCATGCCTAAACGA-3'
5'-ATGAAGGAGCAAAAGGTTGTAAC-3'.

ПЦР проводили в 0.2 мл тонкостенных микропробирках (Applied Biosystems, США) в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США). В реакции использовали реактивы: SE-буфер для Taq-ДНК-полимеразы, трифосфаты и Taq-ДНК-полимеразу производства фирмы «СибЭнзим» (г. Новосибирск, Россия), стерильную деионизованную воду. ПЦР проводили по программе: 1.5 мин при 94°C; затем 20 циклов: 20 с при 94°C, 30 с при 55°C и 1 мин при 72°C. После последнего цикла пробирки прогревали в течение 5 мин при 72°C. Продукты амплификации хранили при температуре 4°C до проведения электрофоретического анализа.

Определение динамики роста мутантных вариантов ВОВ

Для изучения динамики развития клона 14 исходного ВОВ LIVP и мутантных штаммов с нарушением генов вирулентности 90–100% монослой клеток линий CV-1 или Vero, полученный на шестилуночных планшетах, инфицировали вирусами с множественностью заражения 0.1 БОЕ/кл. Во временных точках 0, 24, 48 и 72 ч после инфицирования титр вируса определяли традиционным методом бляшек.

Наработка и очистка вирусов для инфицирования мышей

Монослой клеток линии 4647, рекомендованной для производства противосспенной вакцины [20], выращенный на культуральных матрасах с ростовой поверхностью 175 см² (объем 650 мл), инфицировали ВОВ с множественностью заражения 1.0 БОЕ/кл. Инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C до образования полного ЦПД, 80% поддерживающей среды удаляли, а в 20% (около 20 мл) получали криолизат (три цикла замораживания–оттаивания) инфицированных клеток, обрабатывали его на ультразвуковом дезинтеграторе типа MSE 500 мощностью 22 кГц 2–3 раза по 10–15 с. От клеточного дебриса освобождались низкоскоростным центрифугированием (10 мин при 4000 g). Супернатант центрифугировали в течение 1.5 ч при 30000 g. Осадок вируса суспендировали в 4 мл физиологического раствора. Инфекционный титр образцов определяли методом бляшек в монослой клеток 4647.

Животные

В зависимости от поставленных задач использовали мышей линии Balb/c, самок весом 14–16 г (возраст 4–5 нед.) или 1–2-дневных сосунков этой же

линии весом 5–6 г. Животных объединяли в группы по 10 особей. Также использовали кроликов породы Шиншилла весом 2.5–3 кг. Все животные были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Эксперименты с животными проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Оценка вирулентности штаммов ВОВ

Для оценки нейровирулентности штаммов ВОВ 1–2-дневным мышам-сосункам интрацеребрально вводили рекомбинантный ВОВ 1421ABJCN или исходный клоновый вариант 14 ВОВ LIVP, разведенные на физиологическом растворе, в количестве 10² БОЕ/0.01 мл/мышь. Животным контрольной группы вводили равный объем физиологического раствора. За животными наблюдали в течение 8 сут, учитывали количество погибших.

Для определения репликации вируса в тканях головного мозга мышей-сосунков, инфицированных по аналогичной схеме, подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации через 3 сут после заражения, стерильно извлекли пробы головного мозга. Пробы от животных из одной группы объединяли, готовили 10% тканевые суспензии на среде ДМЕМ по методике, описанной в [21]. Затем определяли титры вирусов традиционным методом бляшек в монослой культуры клеток 4647.

Вирулентность штаммов ВОВ при внутрикожном введении оценивали на кроликах, которым предварительно удаляли шерсть на боках. Делали шесть 10-кратных разведений штаммов ВОВ на физиологическом растворе до содержания 10²–10⁷ БОЕ/0.05 мл, которые вводили животным внутрикожно в указанном выше объеме, каждое разведение – в два отдельных участка кожи. На одном боку животного исследовали ВОВ 1421ABJCN, на другом – исходный ВОВ LIVP. Наблюдение за животными проводили в течение 14 сут. Определяли время появления и заживления инфильтратов в зависимости от титра и от штамма вируса.

Иммуногенность вирусов

Способность вирусов индуцировать выработку специфических антител определяли по вируснейтрализующей активности сывороток крови, инфицируя 4–5-недельных мышей подкожно вирусами 1421ABJCN или LIVP в дозах 10⁶, 10⁷ или 10⁸ БОЕ/0.1 мл/мышь. Мышам контрольной группы вводили равный объем физиологического раствора, на котором готовили разведения вируса. Иммунизацию проводили дважды с интервалом 28

сут. Через 28 сут после второй иммунизации (через 56 сут после первой) у предварительно наркотизированных мышей отбирали пробы крови из ретробульбарного венозного сплетения, инкубировали их при 4°C в течение 24 ч для формирования фибринового сгустка. Сывороточную фракцию отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 5000 *g*. Препараты сывороток каждой группы объединяли и прогревали при 56°C в течение 30 мин для инактивации системы комплемента. Титр вируснейтрализующих антител определяли на культуре клеток 4647 согласно [22].

Протективность штаммов ВОВ

Способность вирусных штаммов формировать защитный иммунитет против ортопоксвирусной инфекции определяли на 4–5-недельных мышах, иммунизированных дважды по схеме эксперимента по изучению иммуногенности штаммов ВОВ. Через 28 сут после второй иммунизации животных в состоянии легкого эфирного наркоза подвергали интраназальной инокуляции высокопатогенным для мышей ВЭ в дозе 10 LD₅₀/0.02 мл/мышь согласно [23]. Наблюдение за животными вели в течение 14 дней, учитывая количество выживших и погибших животных.

Анализ данных

Экспериментальные данные оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента и программы Origin Professional 8.1.10.86. Статистически значимой считали величину *P* < 0.05 [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение клонового варианта вируса осповакцины

Перед этапом рекомбинационной интеграции плазмид в вирусный геном клонировали исходный штамм LIVP ВОВ методом предельного разведения через бляшку из-под агарозного покрытия [19], чтобы избежать возможной внутриштаммовой гетерогенности вируса при последующем отборе индивидуальных рекомбинантных клонов. Были отобраны пять клоновых вариантов ВОВ, из которых выделяли ДНК и анализировали ее с использованием эндонуклеазы рестрикции HindIII. Для дальнейшей работы выбрали клоновый вариант 14, не отличающийся по рестрикционной картине ДНК от исходного штамма LIVP ВОВ.

Создание рекомбинантных ВОВ с направленными генами вирулентности

Для последовательной инактивации были выбраны гены γ -интерферонсвязывающего белка (*B8R*), ком-

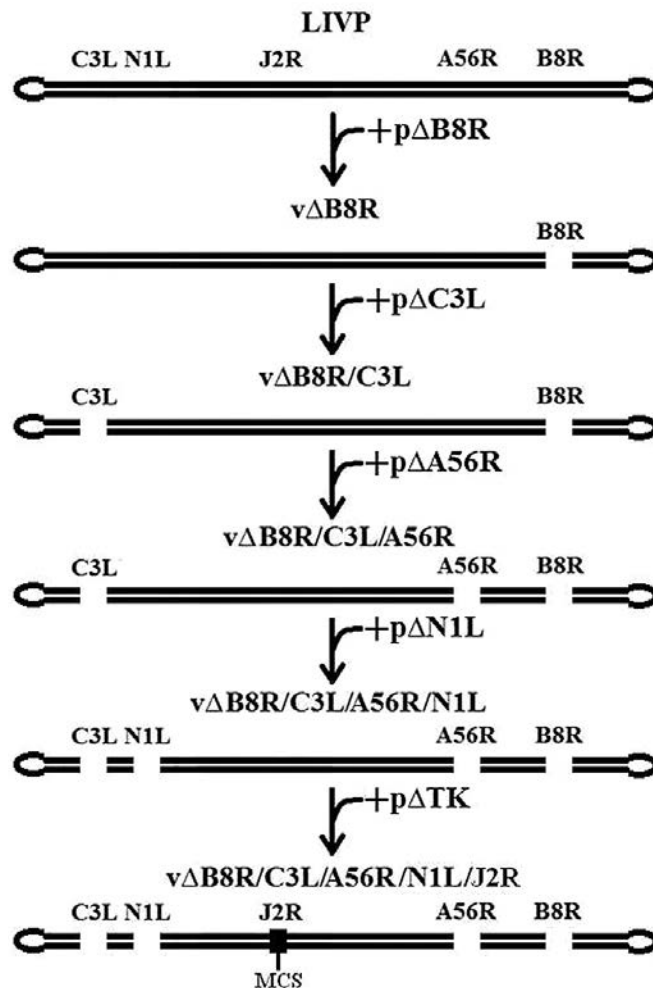


Рис. 3. Схема получения рекомбинантного ВОВ с пятью инактивированными генами вирулентности. Показано как последовательно с использованием соответствующих плазмид интеграции делеции/инсерции направленно вводили в выбранные вирусные гены

плементсвязывающего белка (*C3L*), гемагглютинаина (*A56R*), ингибитора апоптоза (*N1L*) и тимидинкиназы (*J2R*) ВОВ (рис. 2А). Использованы плазмиды интеграции *pΔB8R*, *pΔC3L*, *pΔA56R*, *pΔN1L* и *pΔTK*, обеспечивающие направленную инактивацию нужных генов.

На первом этапе работы монослой клеток CV-1 инфицировали клоновым вариантом 14 ВОВ LIVP и трансфицировали рекомбинантной плазмидой *pΔB8R* в условиях *gpt*-селекции рекомбинантов ВОВ. В результате единичного кроссинговера плазмиды интеграции и вирусной ДНК образовался рекомбинантный вирусный геном, содержащий как селективный ген *gpt*, так и сегмент вирусного генома с целевой делецией и этот же сегмент без делеции. Такая генетическая конструкция нестабильна, она

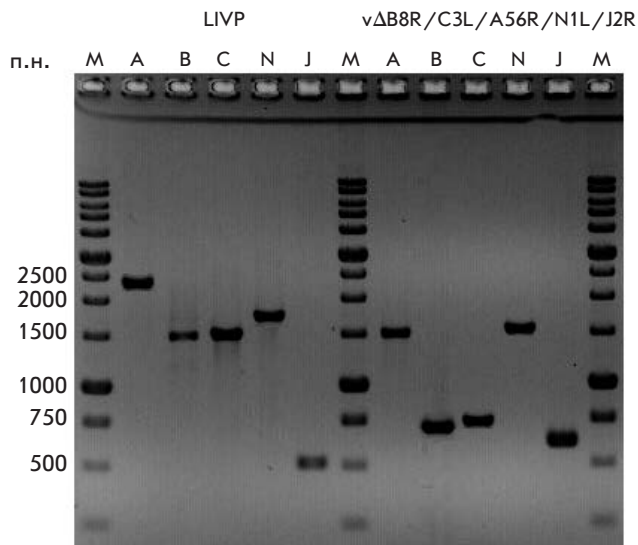


Рис. 4. Анализ наличия целевых делеций/инсерций в продуктах ПЦР-амплификации ДНК ВОВ. Электрофореграмма разделения в 1% агарозном геле фрагментов ДНК ВОВ, полученных в результате ПЦР исходного родительского клона 14 ВОВ LIVP и рекомбинантного ВОВ с делециями пяти генов вирулентности – 1421ABJCN (см. пояснения в тексте). М – ДНК-маркер, длина фрагментов приведена слева. Дорожки А, В, С, N, J – фрагменты ДНК ВОВ, полученные в результате ПЦР с соответствующими парами праймеров на гены *A56R*, *B8R*, *C3L*, *N1L*, *J2R*

может существовать лишь под селективным давлением [15, 16]. После снятия селективного давления по гену *gpt* и внутримолекулярной рекомбинации по районам R-R' образовывался рекомбинантный вирус *vΔB8R* (рис. 1). Клоны данного варианта вируса выявляли ПЦР-анализом вирусной ДНК (см. «Экспериментальную часть», данные не приведены).

Один из отобранных клонов рекомбинантного ВОВ использовали на следующем этапе для удаления гена *C3L*. В результате получили вариант ВОВ с делециями двух генов – *B8R* и *C3L*, а затем последовательно трех и четырех генов и с одновременно нарушенными пятью генами вирулентности (*vΔB8R/C3L/A56R/N1L/J2R*, рис. 3). Последний вариант рекомбинантного вируса сокращенно обозначили как 1421ABJCN.

Делеции/инсерции в районе каждого гена ВОВ выявляли с использованием ПЦР с соответствующими парами праймеров (см. «Экспериментальную часть»). На рис. 4 представлены результаты ПЦР-анализа ДНК рекомбинантного вируса 1421ABJCN с нарушением пяти генов вирулентности. ПЦР-фрагменты, соответствующие полноразмерным копиям генов *A56R*,

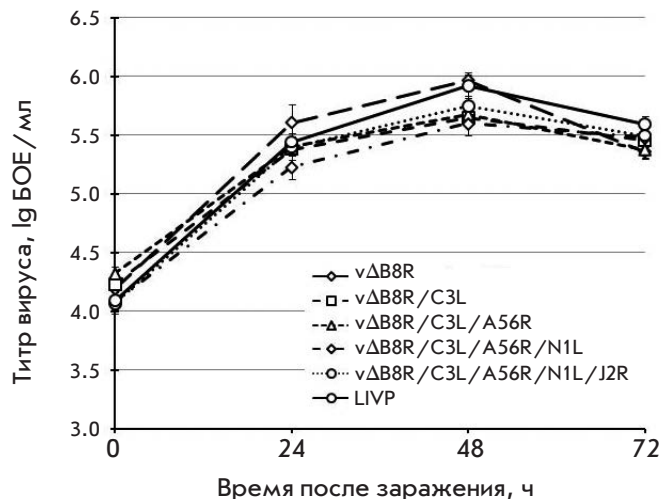


Рис. 5. Сравнительный анализ динамики размножения вариантов ВОВ в культуре клеток линии CV-1

B8R, *C3L*, *N1L* и *J2R*, у исходного вируса LIVP имели длину 2366, 1555, 1542, 1784 и 512 п.н. соответственно, а ПЦР-фрагменты, соответствующие делеционным вариантам генов $\Delta A56R$, $\Delta B8R$, $\Delta C3L$, $\Delta N1L$ и инсерционному варианту *J2R-MCS* вируса 1421ABJCN, составляли 1425, 737, 751, 1431 и 617 п.н. соответственно, что совпадало с расчетными величинами.

Эффективность размножения мутантных вариантов ВОВ в культурах клеток млекопитающих

При создании современной высокоаттенуированной вакцины важно, чтобы получаемый вариант вируса сохранил репродуктивные свойства на культурах клеток. Поэтому на первом этапе изучения биологических свойств сконструированных рекомбинантных вариантов ВОВ оценили эффективность их репликации в культурах клеток CV-1, Vero и 4647. На этих культурах клеток определяли титр вирусов в динамике развития инфекционного процесса для ВОВ с нарушением как одного гена, так и двух, трех, четырех и пяти генов вирулентности. Результаты таких экспериментов на культуре клеток CV-1, приведенные на рис. 5, показали, что кривые размножения рекомбинантных вирусов не различаются статистически значимо между собой, а также не отличаются от исходного ВОВ LIVP. Сходные данные зарегистрированы и при выращивании указанных выше вариантов ВОВ на культурах клеток линий Vero и 4647.

Показано, что рекомбинантные варианты ВОВ жизнеспособны и стабильно сохраняют генотип в течение 10 пассажей на культурах клеток CV-1 и 4647.

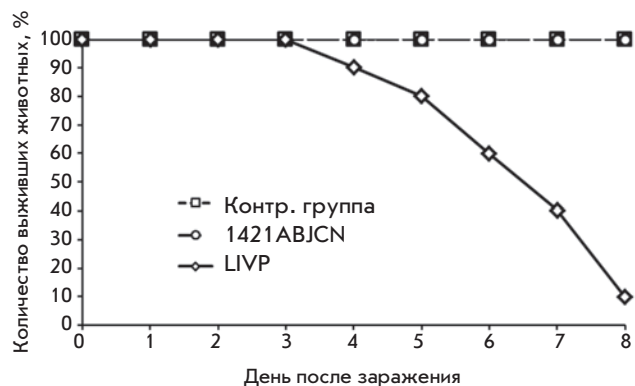


Рис. 6. Динамика гибели новорожденных мышей при интрацеребральном заражении штаммами 1421ABJCN и L1VP ВОВ

Нейровирулентность вариантов ВОВ

Способность вирусов вызывать гибель при интрацеребральном заражении изучали на новорожденных мышках, за которыми вели наблюдение в течение 8 дней после инфицирования. В группе животных, зараженных ВОВ L1VP в дозе 10^2 БОЕ/мышь, гибель началась с 4-х суток, а смертность на конец экспе-

римента составила 90%. В группе мышей, инфицированных такой же дозой ВОВ 1421ABJCN, гибель животных за время эксперимента не наблюдали (рис. 6).

Кроме того, определяли титр вирусов в мозге инфицированных сосунков на 3-и сутки после интрацеребрального заражения. Выявлено значительное снижение эффективности размножения в мозге мышей штамма 1421ABJCN (титр вируса \pm стандартное отклонение: 2.78 ± 0.66 lg БОЕ/г органа) в сравнении с исходным штаммом ВОВ L1VP (6.12 ± 0.20 lg БОЕ/г органа).

Патогенность для кроликов

Оценивали воспалительно-некротические проявления на эпилированной коже кроликов после внутрикожного введения вирусных препаратов. ВОВ 1421ABJCN вызывал воспалительную реакцию лишь начиная с дозы 10^5 БОЕ/инъекцию, в то время как родительский ВОВ L1VP – с наименьшей использованной дозы 10^2 БОЕ/инъекцию (таблица). Воспалительно-некротические проявления от 1421ABJCN были менее выражены по сравнению с ВОВ L1VP. Полное заживление инфильтратов, вызванных рекомбинантным вариантом 1421ABJCN, наступало на 9-е сутки от момента заражения, а не-

Сравнение воспалительно-некротических показателей штаммов ВОВ при внутрикожном инфицировании кроликов

День после заражения	Титр вируса, БОЕ/инъекцию											
	1421ABJCN						L1VP					
	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
1	-	-	-	-	В	В	-	-	-	В	В	В
	-	-	-	В	В	В	-	-	-	В	В	В
2	-	-	-	-	В	В	-	-	В	В	В	В/Н
	-	-	-	В	В	В	-	-	В	В	В	В/Н
3	-	-	-	-	В	В/Н	В	В	В/Н	В/Н	В/Н	В/Н
	-	-	-	В	В/Н	В/Н	В	В	В/Н	В/Н	В/Н	В/Н
6	-	-	-	-	Н	Н	-	-	В/Н	В/Н	В/Н	В/Н
	-	-	-	-	Н	Н	-	-	-	В/Н	В/Н	В/Н
7	-	-	-	-	-	Н	-	-	В/Н	В/Н	В/Н	В/Н
	-	-	-	-	-	Н	-	-	-	-	В/Н	В/Н
9	-	-	-	-	-	Н	-	-	Н	В/Н	В/Н	В/Н
	-	-	-	-	-	Н	-	-	-	-	В/Н	В/Н
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н	Н	В/Н
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н	В/Н
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н	Н	Н
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Н
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. В – воспаление, Н – некроз. Кожные поражения детектировали в двух независимых повторах для каждой дозы вируса.

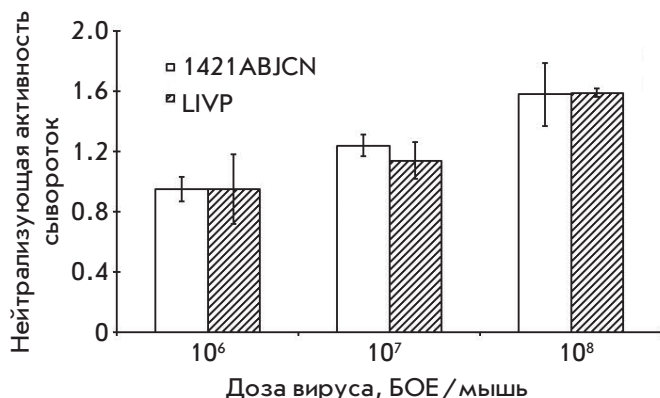


Рис. 7. Уровни ВОВ-нейтрализующей активности сывороток, полученных после двукратной подкожной иммунизации мышей штаммами 1421ABJCN и LIVP в различных дозах. Титры вируснейтрализующих антител рассчитывали как -lg от наибольшего разведения сыворотки, при котором достигается 50% нейтрализация ВОВ ± стандартное отклонение

крозы, вызванные исходным штаммом LIVP, проходили лишь к 14-м суткам.

Иммуногенная активность штаммов ВОВ

Иммуногенность вариантов ВОВ оценивали по уровню индуцируемых ими вируснейтрализующих антител в сыворотках крови мышей, полученных через 28 сут после второй иммунизации. Иммунизацию проводили дозами вирусов 10⁶, 10⁷ или 10⁸ БОЕ/мышь. Как видно из данных, приведенных на рис. 7, рекомбинантный штамм 1421ABJCN при подкожной иммунизации животных вызывает наработку вируснейтрализующих антител, на уровне, сопоставимом с уровнем антител индуцируемых родительским ВОВ LIVP. Это свидетельствует о том, что аттенуированный вариант ВОВ обладает иммуногенной активностью, характерной для исходного штамма ВОВ LIVP. Сыворотки, полученные от мышей контрольной группы, не обладали детектируемой ВОВ-нейтрализующей активностью.

Защитные свойства вариантов ВОВ

Оценку протективных свойств штаммов ВОВ проводили на мышах, дважды подкожно иммунизированных разными дозами вирусов (10⁶, 10⁷ или 10⁸ БОЕ/мышь), которых затем интраназальным путем заражали высокопатогенным для мышей ВЭ в дозе 10 LD₅₀/мышь. Наблюдение за мышами вели в течение 2 нед., учитывая процент выживших животных. Результаты этих экспериментов (рис. 8) показали полную защиту животных при иммунизации

как штаммом 1421ABJCN, так и ВОВ LIVP при всех использованных дозах вирусов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Род *Orthopoxvirus* семейства Poxviridae включает такие патогенные для человека виды, как ВНО, ВОО, ВОК и ВОВ. ВНО вызывает одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека, унесшее в свое время миллионы жизней [1]. ВНО в процессе своей эволюции сузил круг чувствительных хозяев до одного вида – человека. Отсутствие другого природного резервуара (чувствительных животных), а также наличие высокоэффективной противооспенной вакцины на основе ВОВ позволило успешно реализовать международную программу по глобальной ликвидации оспы [1, 2].

Прекращение после 1980 года противооспенной вакцинации привело к постепенной утрате человеческой популяцией иммунитета к ВНО и другим ортопоксвирусам, патогенным для человека [4]. Это повышает опасность возрождения и более широкого распространения среди людей ортопоксвирусных инфекций, возбудители которых потенциально могут эволюционировать ко все более патогенным и эпидемически опасным вариантам [3].

Для создания высокоаттенуированного варианта ВОВ, который может быть использован в качестве антиортопоксвирусной вакцины и/или онколитического вируса, в нашей работе реализован подход последовательного удаления/инактивации генов различных молекулярных факторов вирулентности. По результатам анализа опубликованных данных в качестве перспективных генов нами выбраны гены ВОВ: B8R, C3L, A56R, N1L и J2R.

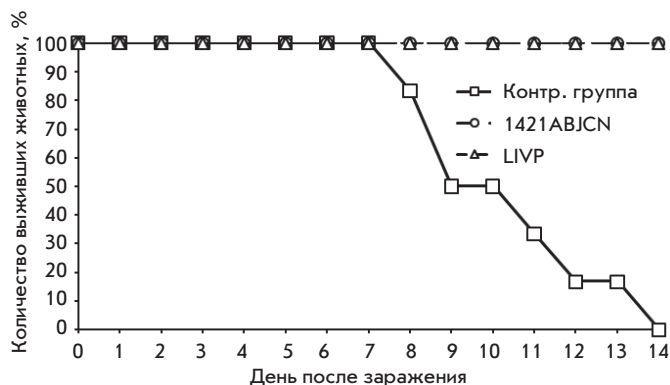


Рис. 8. Динамика гибели мышей, дважды иммунизированных штаммами 1421ABJCN или LIVP ВОВ в дозе 10⁶ БОЕ/мышь, после заражения ВЭ в дозе 10 LD₅₀/мышь

Ген *B8R* ВОВ кодирует гликопротеин, секретлируемый из зараженной клетки в виде гомодимера на ранней стадии развития инфекции. Этот белок имеет сходство по аминокислотной последовательности с внеклеточным доменом клеточного рецептора γ -интерферона (гИФН), связывается и ингибирует активность гИФН у широкого круга млекопитающих [25]. Удаление гена *B8R* приводило к аттенуации ВОВ по сравнению с вирусом дикого типа на мышинных моделях [26], вызывая меньшую заболеваемость даже при высоких дозах [27].

Ген *C3L* кодирует комплементсвязывающий белок (КСБ), секретлируемый в больших количествах инфицированной клеткой на раннем этапе вирусной инфекции [28] и ингибирующий активность системы комплемента через взаимодействие с C3b и C4b [14, 29]. КСБ ингибирует воспалительные реакции [30] и антитело-зависимую нейтрализацию вирионов ВОВ, усиленную комплементом [31]. В опытах на животных мутанты ВОВ, лишенные КСБ, обладали сниженной вирулентностью [14, 31].

Раннепоздний ген *A56R* кодирует гемагглютинин – поверхностный гликопротеин, обеспечивающий способность вируса присоединяться к клетке-хозяину, а также ингибирующий слияние инфицированных клеток и протеолитически активирующий инфекционность вирионов. Показано, что делеция гена *A56R* у штамма NYCBH ВОВ вызывает снижение величины LD_{50} приблизительно на 4 порядка при интрацеребральном и интраназальном введении мышам по сравнению с родительским штаммом [32]. Показано также, что нарушение гена гемагглютинина приводит к значительной аттенуации ВОВ штамма WR [33].

Ген *N1L* относится к группе раннепоздних генов ВОВ. Он несуществен для размножения вируса *in vitro*, но важен для проявления вирулентности *in vivo*. Продукт этого гена представляет собой внутриклеточный гомодимер [34]. Белок N1 относится к семейству Vcl-2-подобных белков [35], ингибирует как апоптоз, так и активацию провоспалительного транскрипционного фактора NF- κ B (nuclear factor kappa B) [36].

Ранний ген *J2R* ВОВ кодирует вирусную тимидинкиназу. Показано, что нарушение гена тимидинкиназы ВОВ значительно снижает вирулентность вируса *in vivo* [37, 38].

Для получения запланированных вариантов ВОВ разработана схема направленной инактивации целевых вирусных генов (рис. 1, 2). Последовательно в состав генома клонового варианта 14 ВОВ LIVP вводили делеции/инсерции целевых генов (рис. 3). Изменения в геноме ВОВ с пятью инактивированными генами вирулентности подтверждены ПЦР-анализом (рис. 4) и секвенированием.

Поскольку задача нашей работы состояла в создании высокоаттенуированной вакцины без утраты функций репликации ВОВ на культурах клеток млекопитающих, проанализировали эффективность размножения полученных вариантов ВОВ на линиях клеток CV-1, Vero и 4647. Оказалось, что как ВОВ с нарушением выбранных единичных генов, так и варианты с одновременной инактивацией нескольких генов вирулентности не уступали исходному ВОВ LIVP в эффективности размножения на изученных культурах клеток (рис. 5). Полученные результаты позволяют заключить, что удаление/нарушение выбранных генов вирулентности не влияет на продуктивные свойства созданных вариантов ВОВ на культурах клеток млекопитающих, что важно для наработки вакцины.

Считается, что неврологические осложнения при противооспенной вакцинации обусловлены инфицированием ВОВ мозга человека и развитием вследствие этого энцефалита. Поэтому важнейшая характеристика вакцинного штамма ВОВ – его нейровирулентность, тестируемая обычно при интрацеребральном заражении новорожденных мышей [39, 40]. Вакцинный штамм ВОВ LIVP, введенный в дозе 10^2 БОЕ/мышь, приводил за 8 сут наблюдения к гибели 90% экспериментальных животных, в то время как полученный на его основе штамм 1421ABJCN при той же дозе интрацеребрального заражения вирулентных свойств не проявил (рис. 6). Оценка накопления вируса в мозге новорожденных мышей на 3-й день после инфицирования показала, что рекомбинантный ВОВ 1421ABJCN размножается в мозге мышей в 1000 раз менее эффективно по сравнению с родительским штаммом ВОВ LIVP.

При внутрикожном заражении кроликов обнаружено также, что ВОВ 1421ABJCN как минимум на 2 порядка менее вирулентен, чем родительский ВОВ LIVP (таблица).

Оба изучаемых вируса при подкожной иммунизации мышей индуцировали сравнимый по уровню синтез специфичных вируснейтрализующих антител (рис. 7) и обеспечивали полную защиту животных от высоковирулентного для мышей ортопоксвируса ВЭ (в дозе $10 LD_{50}$ /мышь) даже при минимальной использованной иммунизирующей дозе ВОВ 10^6 БОЕ/мышь (рис. 8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами генетической инженерии получен эффективно размножающийся в культурах клеток млекопитающих штамм ВОВ 1421ABJCN с пятью направленно-инактивированными генами вирулентности. Реактогенность и нейровирулентность у рекомбинантного ВОВ 1421ABJCN значительно

снижены по сравнению с родительским штаммом ВОВ LIVP, используемым в России для вакцинации людей. При этом ВОВ 1421ABJCN сохранил иммуногенные и протективные свойства исходного штамма LIVP. Такой вирус может составить основу живой аттенуированной противороптопоксвирусной вакцины нового поколения, а также служить вектором для создания безопасных живых рекомбинантных поливалентных вакцин и/или онколитических вирусов. ●

*Авторы выражают благодарность
П.Ф. Сафронову и И.Н. Бабкиной
за конструирование плазмид интеграции.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Федеральной целевой программы
«Национальная система химической
и биологической безопасности (2009–2014 годы)»,
а также Российского фонда фундаментальных
исследований (грант № 15-04-01326а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fenner F, Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2005. 425 p.
- Shchelkunov S.N. // PLoS Path. 2013. V. 9. № 12. e1003756.
- Shchelkunov S.N. // Vaccine. 2011. V. 29. Suppl. 4. D49–D53.
- Artenstein A.W., Grabenstein J.D. // Expert Rev. Vaccines. 2008. V. 7. P. 1225–1237.
- Mayr A., Stickl H., Muller H.K., Danner K., Singer H. // Zentralbl. Bakteriologie. 1978. V. 167. P. 375–390.
- Kenner J., Cameron F., Empig C., Jobs D.V., Gurwith M. // Vaccine. 2006. V. 24. P. 7009–7022.
- Moss B. // Vaccine. 2013. V. 31. P. 4220–4222.
- Shchelkunov S.N., Massung R.F., Esposito J.J. // Virus Res. 1995. V. 36. P. 107–118.
- Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. // Virology. 1998. V. 243. P. 432–460.
- Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Loparev V.N., Safronov P.F., Gutorov V.V., Chizhikov V.E., Knight J.C., Parsons J.M., Massung R.F., Esposito J.J. // Virology. 2000. V. 266. P. 361–386.
- Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Safronov P.F., Mikheev M.V., Gutorov V.V., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Babkin I.V., Uvarova E.A., Sandakhchiev L.S., et al. // Virology. 2002. V. 297. P. 172–194.
- Shchelkunov S.N. // Virus Genes. 2010. V. 41. P. 309–318.
- Shchelkunov S.N. // Adv. Virol. 2012. V. 2012. 524743.
- Falkner F.G., Moss B. // J. Virol. 1990. V. 64. P. 3108–3111.
- Kochneva G., Kolosova I., Maksyutova T., Ryabchikova E., Shchelkunov S. // Arch. Virol. 2005. V. 150. P. 1857–1870.
- Миронова А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты), часть вторая. М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, 2012. 536 с.
- Максютов Р.А., Трегубчак Т.В., Денисова Н.И., Максютов А.З., Гаврилова Е.В. // Рос. иммунол. журн. 2013. Т. 4. С. 456–459.
- Вирусология. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Б. Мейхи. М.: Мир, 1988. 344 с.
- Скарнович М.О., Радаева И.Ф., Вдовиченко Г.В., Нечаева Е.А., Сергеев А.А., Петрищенко В.А., Плясунов И.В., Шишкина Л.Н., Терновой В.А., Сметанникова М.А. и др. // Вопр. вирусол. 2007. Т. 2. С. 37–40.
- Vijaysri S., Jentarra G., Heck M.C., Mercer A.A., McInnes C.J., Jacobs B.L. // Vaccine. 2008. V. 26. P. 664–676.
- Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.-H., Fuchs F., Crance J.-M. // J. Clin. Virol. 2005. V. 32. P. 47–52.
- Martinez M.J., Bray M.P., Huggins J.W. // Arch. Pathol. Lab. Med. 2000. V. 124. P. 362–377.
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. 186 с.
- Mossman K., Upton C., Buller R.M., McFadden G. // Virology. 1995. V. 208. P. 762–769.
- Verardi P.H., Jones L.A., Aziz F.H., Ahmad S., Yilma T.D. // J. Virol. 2001. V. 75. P. 11–18.
- Denes B., Gridley D.S., Fodor N., Takatsy Z., Timiryasova T.M., Fodor I. // J. Gene Med. 2006. V. 7. P. 814–823.
- Kotwal G.J., Isaacs S.N., McKenzie R., Frank M.M., Moss B. // Science. 1990. V. 250. P. 827–830.
- Sahu A., Isaacs S.N., Soulika A.M., Lambris J.D. // J. Immunol. 1998. V. 160. P. 5596–5604.
- Miller C.G., Shchelkunov S.N., Kotwal G.J. // Virology. 1997. V. 229. P. 126–133.
- Isaacs S.N., Kotwal G.J., Moss B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 628–632.
- Lee M.S., Roos J.M., McGuigan L.C., Smith K.A., Cormier N., Cohen L.K., Roberts B.E., Paynet L.G. // J. Virol. 1992. V. 66. P. 2617–2630.
- Shida H., Hinuma Y., Hatanaka M., Morita M., Kidokoro M., Suzuki K., Maruyama T., Takahashi-Nishimaki F., Sugimoto M., Kitamura R., et al. // J. Virol. 1988. V. 62. P. 4474–4480.
- Bartlett N.W., Symons J.A., Tschärke D.C., Smith G.L. // J. Gen. Virol. 2002. V. 83. P. 1965–1976.
- Cooray S., Bahar M.W., Abrescia N.G., McVey C.E., Bartlett N.W., Chen R.A., Stuart D.I., Grimes J.M., Smith G.L. // J. Gen. Virol. 2007. V. 88. P. 1656–1666.
- Maluquer de Motes C., Cooray S., Ren H., Almeida G.M., McGourty K., Bahar M.W., Stuart D.I., Grimes J.M., Graham S.C., Smith G.L. // PLoS Path. 2011. V. 7. e1002430.
- Buller R.M., Smith G.L., Cremer K., Notkins A.L., Moss B. // Nature. 1985. V. 317. P. 813–815.
- Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. // J. Gen. Virol. 1991. V. 72. P. 125–130.
- Li Z., Rubin S.A., Taff R.E., Merchlinsky M., Ye Z., Carbone K.M. // Vaccine. 2004. V. 22. P. 1486–1493.
- Zhang C.X., Sauder C., Malik T., Rubin S.A. // Biologicals. 2010. V. 38. P. 278–283.