

УДК 578.821

Гены, влияющие на иммуногенность вируса осповакцины

С. Н. Щелкунов^{1,2,3*}, Г. А. Щелкунова¹¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., Кольцово, 630559 Россия²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

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

Поступила в редакцию 16.09.2019

Принята к печати 13.01.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10935

РЕФЕРАТ Противооспенная живая вакцина – исторически первая и одна из наиболее эффективных вакцин. Однако наряду с высокой иммуногенностью вакцинация вирус (VACV) вызывал тяжелые побочные реакции организма вакцинируемых, иногда приводящие к летальному исходу. Поэтому после глобальной ликвидации оспы вакцинация VACV населения была прекращена. Это привело к отсутствию в настоящее время у большей части населения специфического иммунитета не только против оспы, но и против других видов ортопоксвирусов. Поэтому вспышки заболеваний, обусловленных зоонозными ортопоксвирусами, в последние годы все чаще регистрируются у людей на разных континентах. Однако использование классической живой вакцины на основе VACV для защиты от этих инфекций неприемлемо, так как возможно развитие тяжелых побочных реакций, особенно у людей с ослабленной иммунной системой или с иммунодефицитом (в том числе ВИЧ-инфицированных). Поэтому необходимо создавать высокоаттенуированные варианты VACV, но не утратившие при этом свои иммуногенные свойства. В обзоре рассмотрены современные представления о закономерностях развития гуморального и клеточного иммунного ответа на ортопоксвирусную инфекцию/вакцинацию, описаны подходы к получению методами генетической инженерии безопасных и высокоиммуногенных вариантов живых вакцин на основе VACV.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вакцинация, иммуногенность, иммуномодулирующие белки, оспа, протективность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; CPXV – вирус оспы коров; CTL – цитотоксические Т-лимфоциты; EEV – внеклеточный, покрытый оболочкой вирион; HSPV – вирус оспы лошадей; IMV – внутриклеточный зрелый вирион; NK – естественные киллерные клетки; VACV – вакцинация вирус (вирус осповакцины); VARV – вирус оспы.

ВВЕДЕНИЕ

Появление и развитие вакцинологии связано, в первую очередь, с поисками способов защиты от оспы (лат. *variola*), особо опасной инфекции, вызывающей эпидемии с уровнем летальности среди заболевших людей до 40% и более. Переболевшие оспой люди, легко выявляемые по характерным рубцам на коже лица (так называемое «рябое лицо»), образующимся на месте пустул после отпадения засохших корочек, были устойчивы к оспе при возникновении новых вспышек заболевания. По-видимому, такие наблюдения привели к появлению в Индии и Китае процедуры инокуляции инфекционного материала, получаемого после растирания накожных корочек от больных оспой, здоровым людям в насечки на коже (обычно в области предплечья) или интраназально. Эта процедура, получившая название *вари-*

оляция (variolation, от *variola inoculation* – заражение оспой), вызывала заболевание средней тяжести и обеспечивала в дальнейшем надежную защиту от оспы. Однако от 0.5 до 2% пациентов, подвергнутых вариоляции, погибали, что не способствовало широкому распространению этого метода [1].

В 1798 г. английский врач Эдвард Дженнер (Edward Jenner) описал новую более безопасную процедуру защиты от оспы [1, 2]. Было известно, что у сельских жителей, заразившихся от больных оспой домашних животных (коров или лошадей), на руках возникали пустулезные поражения кожи, они в легкой форме переносили эту инфекцию, а после ее завершения на местах пустул оставались рубцы, фенотипически напоминающие рубцы, остающиеся после вариоляции. Более того, было известно, что люди, переболевшие оспой коров, становились

невосприимчивыми к оспе. В 1796 г. Э. Дженнер выполнил первый эксперимент, в котором восьмилетнему ребенку инокулировал внутривожно материал из пустулы женщины, заразившейся оспой коров. Чтобы доказать, что ребенок после такой инфекции стал устойчив к оспе, он подверг его через 6 недель вариоляции и убедился, что мальчик оказался невосприимчивым к этой процедуре.

Учитывая полученные результаты, чтобы подчеркнуть защитный эффект использованного инфекционного начала против оспы, Дженнер вместо названия оспа коров (англ. cow pox) ввел название *variola vaccinae* (лат. оспа коров; от лат. vacca – корова), а процедуру назвал *vaccine inoculation*. В 1803 г. Ричард Даннинг (Richard Dunning) предложил укороченное название *vaccination*. В 1881 г. на 7-м Международном конгрессе медицины в Лондоне Луи Пастер (Louis Pasteur) предложил использовать термин *вакцинация* для всех процедур защитной иммунизации против любых инфекционных заболеваний [2].

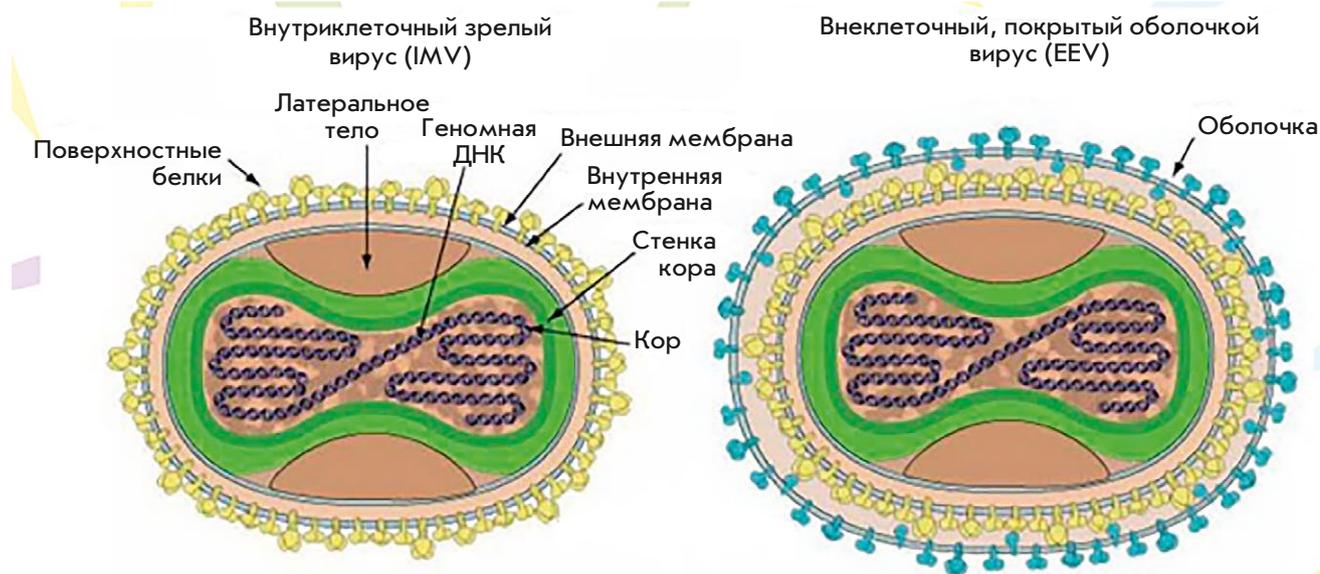
Следует отметить, что царство вирусов было обнаружено спустя столетие после введения Э. Дженнером противооспенной вакцинации. Первый вирус животных (вирус ящура) был выявлен лишь в 1898 г. Возбудители оспы и оспы коров оказались крупнейшими вирусами млекопитающих. В отличие от других вирусов, их вирионы после специального окрашивания наблюдали в световой микроскоп в виде «элементарных частиц» начиная с 1886 г., но смогли доказать инфекционную природу этих частиц только в 1931 г. [1].

Долгие годы считалось, что вирус *variola vaccinae*, введенный Э. Дженнером в практику оспопрививания, происходит от вируса оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV) [1, 3]. В 1939 г. выяснилось, что штаммы вируса, используемого для противооспенной вакцинации, существенно отличаются по свойствам от природных изолятов CPXV, выделенных от коров [4]. Поэтому они были отнесены к отдельному виду *Vaccinia virus* (VACV) [1, 3]. В русскоязычной литературе данный вирус часто называют вирусом осповакцины. Вопрос о происхождении VACV прояснился после секвенирования в 2006 г. полного генома вируса оспы лошадей (*Horsepox virus*, HSPV) [5], который оказался близкородственным изученным изолятам VACV. Стоит отметить, что Э. Дженнер именно больных оспой лошадей считал источником заражения коров [1–3]. На основании этого можно предположить, что VACV произошел от зоонозного HSPV. Судя по всему, в 19-м веке повсеместно применяли для противооспенной вакцинации не CPXV, а изоляты HSPV, потомки которых в 20-м веке отнесены к виду VACV [6].

Следует отметить, что, не зная природы инфекционного агента и механизмов защиты человека от оспы после инокуляции вакцины, Э. Дженнер в своей работе, опубликованной в 1801 г., предсказывал, что «окончательным результатом данной практики должно стать исчезновение оспы, самого ужасного бича человеческого рода» [1]. В настоящее время мы знаем, что этиологическими агентами оспы, оспы коров, оспы лошадей являются близкородственные вирусы, относящиеся к роду *Orthopoxvirus* семейства Poxviridae. Ортопоксвирусы антигенно близки друг другу и дают перекрестные серологические реакции и иммунную защиту. Вирус оспы (*Variola virus*, VARV) размножается только в организме человека, в то время как CPXV, HSPV и VACV являются зоонозными вирусами с широким кругом чувствительных животных, включая человека [3, 6]. Благодаря международной кампании по строгому эпидемиологическому надзору за оспой и противооспенной вакцинации, выполнявшейся под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) с 1958 г., оспу удалось полностью ликвидировать и зарегистрировать последний природный случай данного заболевания в октябре 1977 г. [1]. Интуитивное предвидение Э. Дженнера сбылось. Это одно из величайших достижений медицины, которое привело к спасению миллионов человеческих жизней.

Ликвидация оспы произошла до появления современных методов вирусологии, иммунологии и молекулярной биологии, а поскольку нет животных, чувствительных к VARV, закономерности развития протективного иммунного ответа против оспы приходится изучать опосредованно на суррогатных моделях оспенной инфекции. К таким моделям относятся инфицирование мышей вирусами оспы мышей (эктромелии, ECTV) или VACV, кроликов – вирусом оспы кроликов (RPXV) или VACV, обезьян – вирусом оспы обезьян (MPXV) и др. Общие закономерности развития специфического иммунного ответа изучают также при противооспенной вакцинации добровольцев вирусом VACV [7–9].

Поксвирусы являются уникальными среди ДНК-содержащих вирусов животных, так как весь цикл их размножения проходит в цитоплазме клеток в обособленных структурах, называемых вирусными фабриками, или виросомами. Вирионы кирпичеобразной формы с закругленными гранями имеют размер 250–300 × 200 × 250 нм. Вирусный геном ортопоксвирусов представляет собой двухцепочечную линейную ДНК с ковалентно замкнутыми концами и, в зависимости от вида, имеет размер 190–220 т.п.н. и кодирует около 200 белков, примерно половина из которых высококонсервативна и обеспечивает жизненно важные функции этих вирусов [3,



Морфология зрелого внутриклеточного (IMV) и внеклеточного (EEV) вирионов ортопоксвирусов [14] (ViralZone 2008, с разрешения SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

10–13]. Основная инфекционная форма данных вирусов – так называемый внутриклеточный зрелый вирион (intracellular mature virion, IMV) (рисунки), который состоит из нуклеопротеиновой сердцевинки (core), содержащей вирусный геном, полную транскрипционную систему для ранних вирусных генов и ряд других ферментов, латеральных белковых тел и липопротеиновой мембраны, покрывающей частицу [8, 14, 15]. Методами масс-спектрометрии показано, что в состав IMV вируса VACV входят 85 разных вирусных белков, при этом более 20 ассоциированы с поверхностной мембраной [15–18]. Небольшая часть вновь синтезируемых вирусных частиц одевается дополнительной липопротеиновой оболочкой и в результате экзоцитоза такие оболочечные вирионы (extracellular enveloped virion, EEV) (рисунки) выходят из инфицированных клеток. EEV дополнительно содержат восемь вирусных белков, ассоциированных с внешней оболочкой [8].

Как живые, так и инактивированные вакцины на основе VACV содержат в основном IMV-частицы, получаемые после разрушения инфицированных клеток и очистки вирусных препаратов. Следует отметить, что только при размножении VACV в организме животного индуцируются антитела к антигенам как IMV-, так и EEV-форм. Более того, только живой вирус в организме животного индуцирует синтез протективных антител к невирионным белкам, а также стимулирует клеточный иммунный ответ. Именно поэтому инактивированные VACV вакцины не обеспечивают полноценной противовирусной защиты [8, 19].

АНТИТЕЛА, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ В ОТВЕТ НА VACV ВАКЦИНАЦИЮ

Известно, что антительный ответ на противоспенную вакцинацию играет решающую роль в защите от последующей вирусной инфекции [8, 9, 20]. Показано, что при вируснейтрализующем титре антител в сыворотке крови вакцинированных людей от 1:32 и выше обеспечивается надежная защита от оспенной инфекции [21]. При дефектах гуморального иммунитета вакцинация может не обеспечивать противоспенной защиты. На модели мышей с дефицитом В-клеток показана их неспособность противостоять повторной инфекции ECTV, несмотря на детектируемую активность антивирусных CD8⁺ Т-клеток [22].

Вирионные белки VARV и VACV в большинстве случаев имеют высокую идентичность аминокислотных последовательностей (93–99%) [10, 12], что и обеспечивает высокий перекрестный антительный ответ этих вирусов. Однако углубленный анализ некоторых индивидуальных иммунодоминантных вирусных белков выявил отличия этих вирусов по профилю индуцируемых антител. Например, белок оболочки EEV VACV B5 и его гомолог VARV B7 имеют 23 аминокислотных различия (93.06% идентичности) [10], и поликлональные антитела к B5 VACV реагируют перекрестно с гомологичным B7 VARV. Однако из 26 моноклональных антител к B5 с гомологичным белком VARV реагировали только 16 [23].

Используя микрочипы с белками VACV, синтезированными в бактериальной бесклеточной системе,

Таблица 1. Основные антигены VACV, на которые выявлен синтез антител у более чем 25% вакцинированных добровольцев [15, 24–26]

Вирусный антиген ¹	Время синтеза ²	Функция	Локализация в вирионе	Число тестированных доноров	Антиген-специфичные антитела, % выявления ³
A10	L	Структурный	Сердцевина (кор)	73	93.2
H3	L	Структурный	Мембрана IMV	336	90.5
B5	E/L	Структурный	Оболочка EEV	287	88.5
A33	L	Структурный	Оболочка EEV	155	72.9
A27	L	Структурный	Мембрана IMV	336	67.6
A56	E/L	Структурный	Оболочка EEV	155	63.9
WR148 ⁴	L	Неструктурный	Укороченная (растворимая) форма белка АТІ	70	62.9
D8	L	Структурный	Мембрана IMV	124	46
D13	L	Неструктурный	Обеспечивающий сборку IMV	124	46
A13	L	Структурный	Мембрана IMV	123	39
A11	L	Неструктурный	Обеспечивающий сборку IMV	74	37.8
I1	L	Структурный	Сердцевина	124	37.1
L1	L	Структурный	Мембрана IMV	205	31.2
A26	L	Структурный	Мембрана IMV	123	29.3
L4	L	Структурный	Сердцевина	73	28.8
F13	L	Структурный	Оболочка EEV	73	27.4
A14	L	Структурный	Мембрана IMV	124	26.6

¹Названия белков приведены по номенклатуре VACV, штамм Copenhagen [10].

²E/L – ранне-поздняя, L – поздняя продукция белка.

³Процент добровольцев, у которых выявлены антитела, специфичные к данному антигену.

⁴Номенклатура VACV, штамм WR. Ген этого белка делетирован в штамме Copenhagen VACV [3].

Нuw Davies и соавт. [24] охарактеризовали профили гуморального иммунного ответа, развивающегося в ответ на вакцинацию добровольцев живым VACV. Оказалось, что у вакцинированных в целом индуцировался антительный ответ на 47 различных вирусных белков, при этом наблюдались значительные индивидуальные вариации как по спектру антигенов, так и по уровню продукции антител на конкретные антигены. Результаты этой и других работ, суммированные в *табл. 1*, показывают многочисленные вирусные антигены, на которые наиболее часто развивается выраженный гуморальный иммунный ответ. Полагают, что такое разнообразие антигенов указывает на избыточность и пластичность антительного ответа у вакцинируемых, а наличие антител на большое число антигенов создает «сеть безопасности», обеспечивающую эффективную противовирусную защиту, несмотря на индивидуальные различия людей в спектре синтезируемых антител [25, 26].

Биосинтез антител индуцируется, прежде всего, на вирионные белки, гены которых экспрессируются на позднем этапе цикла развития VACV (*табл. 1*). Восемь белков (H3, B5, D8, L1, A17, A27, A28 и A33) к настоящему времени выявлены как антигены, индуцирующие продукцию вируснейтрализующих

антител [8, 25, 27–29]. Участие других вирусных антигенов в развитии протективного иммунного ответа пока недостаточно изучено. Это указывает на неполноту наших знаний о развитии гуморального иммунного ответа на противооспенную иммунизацию/ортопоксвирусную инфекцию.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ VACV

Сложная организация ортопоксвирусов является причиной того, что механизм иммунной защиты от оспы (и других ортопоксвирусных инфекций) до сих пор не полностью ясен. Наряду с индукцией вирусспецифичных антител важную роль в контроле инфекции играет и развитие ответа цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺ (CTL). В организме первично вакцинируемых людей с дефектами Т-клеточного иммунитета может развиваться генерализованная VACV инфекция (прогрессирующая вакцинация), в то время как при нарушении синтеза гамма-глобулинов такого не происходит, что указывает на необходимость клеточного иммунного ответа в контроле первичной инфекции данным вирусом [8].

На модели мышей, предварительно инфицированных авирулентным штаммом ECTV, показано,

Таблица 2. Основные антигены VACV, на которые выявлена продукция CD8⁺ Т-клеток у вакцинированных добровольцев [3, 26, 31–33]

Вирусный антиген ¹	Время синтеза ²	Функция	Число тестируемых доноров	Процент выявления антиген-специфичных Т-клеток ³
D12	Е	Малая субъединица мРНК кепирующего фермента	81	22.2
C7	Е	Ингибирование активности антивирусного фактора SAMD9 клетки	119	18.5
A47	IE	Неизвестна	44	18.2
A8	IE	Фактор промежуточной транскрипции	68	16.2
O1	IE	Активация внеклеточной сигнал-регулируемой киназы ERK1/2	75	16.0
J6	Е	Субъединица 147 кДа вирусной РНК-полимеразы	80	13.8
D5	Е	Нуклеозидтрифосфатаза	154	13.6
M1	Е	Анкирин-подобный	30	13.3
D1	Е	Большая субъединица мРНК-кепирующего фермента	183	13.1
I8	Е	Нуклеозид трифосфат-фосфогидролаза	70	12.8
C10	Е	Блокирование рецепторов IL-1	71	12.7
C12	Е	Ингибитор сериновой протеазы, SPI-1	79	11.4
B6	Е	Неизвестна	45	11.1
B8	Е	Секретируемый γ -IFN-связывающий белок	120	10.8

¹Названия белков приведены по номенклатуре VACV, штамм Copenhagen [10].

²Е – ранняя, IE – предранняя продукция белка.

³Процент добровольцев, у которых выявлены CTL, специфичные к данному антигену.

что при повторной инфекции высоковирулентным ECTV для защиты животных от гибели необходимы и достаточны противовирусные антитела, а отсутствие Т-клеточного иммунного ответа при этом не сказывается на выживаемости мышей [30]. На мышках с дефицитом В-клеток (синтез антител) показано, что инфицирование VACV предварительно вакцинированных животных сопровождается снижением массы их тела, как и у невакцинированных мышей, но за счет индукции вирусспецифичных CTL предотвращается смертность и наблюдается позднее выздоровление [20]. Такая реакция на повторную инфекцию может объясняться тем, что предсуществующие антитела, индуцированные вакцинацией, могут быстро нейтрализовать инфицирующий вирус, в то время как для реактивации вирусспецифичных Т-клеток, возникших после вакцинации, требуется несколько дней. Хотя CD8⁺ Т-клетки важны для контроля первичной инфекции ортопоксвирусов, антитела играют доминантную роль в защите от повторной инфекции (инфекции после вакцинации).

В ранних работах по изучению развития CTL-ответа на ортопоксвирусную инфекцию/вакцинацию внимание исследователей фокусировалось лишь на ограниченном числе антигенов. Oseroff и соавт. [31] в результате биоинформатического анализа последовательностей всех белков VACV выявили 6055 потенциальных пептидных Т-клеточных эпитопов, кото-

рые были синтезированы и использованы при анализе мононуклеарных клеток периферической крови 31 вакцинированного добровольца. Выявлено 48 эпитопов из 35 разных белков VACV, которые эффективно взаимодействовали с CD8⁺ Т-лимфоцитами вакцинированных. В последующих работах были обнаружены дополнительные ортопоксвирусные Т-антигены [26, 32, 33]. Как и в случае с биосинтезом антител, спектр ортопоксвирусных антигенов, на которые наблюдается CTL-ответ при инфицировании/вакцинации людей или животных, имеет существенные индивидуальные различия [26, 33]. Вирусные белки, на которые наиболее часто выявляются CD8⁺ Т-клеточные ответы у вакцинированных индивидов, приведены в табл. 2. В подавляющем большинстве это белки, синтезируемые на раннем этапе вирусной инфекции, хотя иногда выявляется CTL-ответ и на некоторые поздние вирусные белки [26, 33].

Важно отметить, что иммунный CD8 ответ, с одной стороны, и CD4/антительный ответ, с другой стороны, реагируют на разные антигены VACV и охватывают огромный спектр вирусных белков [26] (табл. 1 и 2). Картина иммунного ответа на ортопоксвирусную инфекцию/вакцинацию со значительными персональными различиями индивидов по спектру антигенов, на которые реагирует система адаптивного иммунного ответа, обнаружена не только у этих вирусов, но и у инфекционных агентов *Plasmodium falciparum*

и *Francisella tularensis* [24]. Все это указывает на трудно решаемую проблему создания для таких сложно организованных инфекционных агентов эффективных инактивированных или субъединичных вакцин.

ПОЛУЧЕНИЕ АТТЕНУИРОВАННЫХ ПРОТИВООСПЕННЫХ ВАКЦИН

Поскольку при массовой противооспенной вакцинации вирусом VACV в небольшом проценте случаев наблюдались тяжелые побочные реакции, иногда завершавшиеся летальным исходом, после глобальной ликвидации оспы ВОЗ рекомендовала такую вакцинацию прекратить [1, 3]. В результате отказа от вакцинации против оспы к настоящему времени большая часть человеческой популяции не имеет специфического иммунитета не только против данного заболевания, но и других зоонозных ортопоксвирусных инфекций [6]. Именно поэтому в последние годы в различных регионах мира стали регистрировать необычно массовые вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей [34, 35].

Единственным эффективным методом борьбы с возрастающей угрозой ортопоксвирусных инфекций человека является вакцинопрофилактика [1, 3]. Однако накопление в последние десятилетия иммунодефицитных состояний (ВИЧ-инфекция; пациенты, перенесшие трансплантацию органов; онкобольные и др.) привело к тому, что массовая вакцинация населения классической живой вакциной на основе VACV сейчас противопоказана. Поэтому существует настоятельная потребность в создании современных живых вакцин, которые должны быть значительно безопаснее по сравнению с классической противооспенной вакциной [36, 37].

Современный подход к аттенуации вирусов состоит в направленной инактивации генов вирулентности, не затрагивая жизненно важных генов вируса [38]. К генам вирулентности в первую очередь относятся гены, продукты которых модулируют или подавляют многочисленные механизмы врожденного и/или адаптивного иммунитета инфицируемого вирусом организма [39]. Ортопоксвирусы характеризуются уникально большим набором таких генов, многие из которых в последние годы идентифицированы и изучены свойства кодируемых ими белков [40]. Такое разнообразие генов вирулентности, с одной стороны, позволяет создавать различные варианты аттенуированных VACV, с другой стороны, увеличивает неопределенность в получении наиболее эффективной и безопасной вакцины. Для каждого получаемого нового варианта VACV необходимо проводить многочисленные эксперименты на лабораторных животных [9].

Аттенуация VACV часто может приводить к снижению продукции вируса *in vivo* и, как следствие,

к снижению индуцируемой иммунной защиты организма. Поэтому для достижения эффективного противовирусного иммунного ответа необходимо вводить значительно более высокие дозы вновь созданного вируса по сравнению с исходными штаммами VACV, а также осуществлять ревакцинацию [41]. Недостаточность наших знаний о функциях и взаимодействиях ортопоксвирусных белков-иммуномодуляторов с многофакторной иммунной системой млекопитающих приводит к необходимости использования интуитивных предположений экспериментатора при выборе изменяемых генов и их комбинаций для создания новых аттенуированных штаммов VACV. Иммуногенность/протективность и безопасность этих штаммов проверяются в различных биологических системах. Наибольший интерес представляет такое геномное редактирование VACV, которое, наряду с аттенуацией, может приводить к увеличению иммуногенности создаваемого вируса.

УВЕЛИЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ АТТЕНУИРОВАННОЙ ПРОТИВООСПЕННОЙ ВАКЦИНЫ

Млекопитающие в процессе длительной эволюции выработали многочисленные механизмы защиты от различных инфекционных агентов, в том числе от вирусов. Их подразделяют на неспецифические (врожденный иммунитет) и специфические (адаптивный иммунитет) реакции на инфекцию.

Неспецифические реакции немедленного действия индуцируются после молекулярного распознавания консервативных микробных компонентов в зараженных клетках и запуска внутриклеточных сигнальных каскадов, которые в результате активации транскрипционных факторов NF- κ B и/или IRF3 включают реакции врожденного иммунитета [42]. К этим реакциям относят апоптоз клеток, воспалительные реакции, хемотаксис макрофагов, естественных киллерных клеток (НК) и других типов клеток к очагу инфекции, активацию комплемента, синтез интерферонов – универсальных противовирусных белков, и др. [39, 40]. Белки семейства Bcl-2-подобных (B cell lymphoma-2 protein) ингибируют/модулируют активацию провоспалительных транскрипционных факторов и/или апоптоза [40].

Адаптивный иммунный ответ на инфекцию, развитие которого происходит в течение нескольких суток, представляет собой сложное взаимодействие клеток разного типа, контролируемое цитокинами, в результате которого появляются В-лимфоциты, синтезирующие специфичные противовирусные антитела, и возникают вирусспецифичные CTL. Антитела взаимодействуют с вирусными частицами и их компонентами индивидуально или в комплексе с компонентом и инактивируют их. Цитотоксические

T-лимфоциты CD8⁺ обуславливают лизис инфицированных клеток [9, 39].

Ортопоксвирусы в процессе коэволюции с чувствительными к ним животными выработали различные молекулярные механизмы подавления разных этапов развития врожденного и адаптивного иммунных ответов на инфекцию. Они кодируют многочисленные внутриклеточные белки, которые ингибируют развитие апоптоза, разные этапы молекулярных сигнальных путей, индуцирующих продукцию интерферонов, провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также секретируемые из клеток белки, которые взаимодействуют и нейтрализуют активность интерферонов, комплемента, различных цитокинов и хемокинов [39, 40]. Эти белки обычно не являются жизненно важными и не влияют на эффективность размножения вируса в культурах клеток. Направленная инактивация генов таких иммуномодулирующих белков обычно приводит к снижению вирулентных свойств VACV в системе *in vivo*, а следовательно, к его большей безопасности [38]. В то же время можно предположить, что удаление вирусных генов, которые подавляют иммунный ответ организма на инфекцию, в некоторых случаях, несмотря на снижение эффективности размножения вируса *in vivo*, может обуславливать увеличение его иммуногенности.

Многочисленные работы, посвященные делеции (удалению) генов иммуномодулирующих факторов VACV, позволили выявить некоторые вирусные гены, инактивация которых наряду с аттенуацией вируса приводит к увеличению его иммуногенности [43–53]. Как видим из данных, приведенных в табл. 3, в ряд таких генов попадают ранние вирусные гены,

белковые продукты которых участвуют в регуляции/ингибировании реакций как врожденного, так и адаптивного иммунных ответов на вирусную инфекцию.

VACV кодирует многочисленные внутриклеточные Bcl-2-подобные белки, ингибирующие разные этапы сигнальных каскадов активации ядерных транскрипционных факторов NF-κB и/или IRF3 [40]. Показано, что удаление гена каждого из четырех белков этого семейства (C6, N1, K7 и A52) приводит к повышенной продукции NK-клеток, усилению CD8⁺ T-клеточного иммунного ответа на VACV инфекцию и увеличению защитного эффекта (протективности) от повторной инфекции [43–46].

Воспалительные процессы играют важную роль в ранней неспецифической защите организма от вирусной инфекции. Они быстро развиваются, ограничивая распространение вируса в первые часы и дни после инфицирования, пока формируется адаптивный иммунный ответ. Известно, что ключевую роль в индукции воспалительных реакций играют такие цитокины, как IL-1β, IL-18, TNF и γ-интерферон, которые запускают молекулярные воспалительные каскады, в частности, экспрессию хемокинов. Хемокины являются хемоаттрактантами цитокинами, регулирующими перемещение и эффекторную функцию лейкоцитов, которые играют важную роль в развитии воспалительной реакции и защите от патогенов. Система комплемента состоит более чем из 20 белков плазмы крови. Механизмы антивирусного действия системы комплемента включают нейтрализацию вируса, лизис вирус-инфицированных клеток, усиление воспалительного и адаптивного иммунного ответов [40]. Оказалось, что делеция индивидуальных генов, кодирующих ингибиторы IL-1β,

Таблица 3. Гены VACV, удаление которых усиливает противовирусный иммунный (протективный) ответ после вакцинации

Ген COP / WR / IND ¹	Время экспрессии ²	Функция	Ссылка
C6L / 022L / D9L	Е	Bcl-2-подобный ингибитор активации IRF3 и JAK/STAT	[43]
N1L / 028L / P1L	Е/L	Bcl-2-подобный ингибитор апоптоза и активации NF-κB	[44]
K7R / 039R / C4R	Е	Bcl-2-подобный ингибитор активации NF-κB и IRF3	[45]
A52R / 178R / -	Е	Bcl-2-подобный ингибитор активации NF-κB	[46]
- / 013L / D5L	Е	Секретируемый IL-18-связывающий белок	[47]
B16R / 197R / -	Е	Секретируемый IL-1β-связывающий белок	[48]
A41L / 166L / A46L	Е/L	Секретируемый СС-хемокинсвязывающий белок	[49]
C3L / 025L / D12L	Е	Секретируемый комплементсвязывающий белок	[50]
A35R / 158R / -	Е	Ингибитор представления антигенов МНС класса II	[51, 52]
- / 169R / -	Е	Ингибитор инициации трансляции	[53]

¹Гены обозначены, как принято для штаммов Copenhagen (COP) и Western Reserve (WR) вируса VACV и штамма India-1967 (IND) вируса VARV [3]. Прочерк обозначает отсутствие соответствующего гена.

²Е – ранняя, Е/L – ранне-поздняя транскрипция.

IL-18, хемокинов и комплемента, наряду со снижением вирулентных свойств VACV, усиливает иммуногенные свойства данного вируса [46–49] (табл. 3).

Показано, что белок A35 – ранний внутриклеточный белок VACV – ингибирует представление вирусных антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II [54, 55]. Удаление гена A35R приводит к увеличению продукции вирусспецифичных антигенов и усилению протективности VACV [51, 52].

При изучении функции гена 169R штамма WR VACV обнаружили, что кодируемый им белок ингибирует инициацию трансляции мРНК инфицированной клетки, не влияя на трансляцию вирусных мРНК в обособленных виросомах. Это обуславливает широкий круг эффектов белка 169, в том числе ингибирование реакций врожденного иммунного ответа на вирусную инфекцию [53]. Делеция гена 169R приводила к тому, что при интраназальной инфекции мышей полученным мутантным VACV наблюдались повышенная продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов, увеличенная инфильтрация легких лейкоцитами и, как следствие, более строгий CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ и более эффективная противовирусная защита от повторной инфекции.

Известно, что люди, переболевшие оспой, приобретали пожизненный иммунитет против данного заболевания. Вакцинация VACV обеспечивала эффективную защиту от этой особо опасной инфекции, однако для длительного поддержания надежного уровня защиты от оспы требовалось проведение ревакцинации [1]. В связи с этим важно обратить внимание на то, что возбудитель оспы VARV не имеет в составе своего генома как минимум четырех генов, удаление которых усиливает противовирусный иммунный ответ с вовлечением различных молекулярных механизмов (табл. 3).

С разной долей успеха делались попытки получения аттенуированных и высокоиммуногенных вариантов VACV в результате направленной инактивации нескольких вирусных генов.

На штамме NYVAC показано, что делеция одновременно трех генов Bcl-2-подобных белков – A52R, B15R и K7R, приводит к усилению врожденного иммунного ответа у инфицированных мышей, что выражается в увеличении продукции хемокинов и большей миграции нейтрофилов, NK-клеток и дендритных клеток в очаг инфекции [46].

Из генома штамма MVA VACV удалили гены, кодирующие IL-18-связывающий (C12L), IL-1β-связывающий (B16R) и CC-хемокинсвязывающий (A41L) белки, а также Bcl-2-подобный белок (A46R) [56]. Полученный вариант VACV с удаленными четырьмя иммуномодулирующими генами индуцировал в организме макаков-резус более высокий

уровень противовирусных антител по сравнению с исходным VACV MVA.

Более высокий адаптивный Т-клеточный иммунный ответ вызывал штамм MVA VACV с направленно делетированными тремя генами, кодирующими IL-18-связывающий белок (C12L или O13L для VACV WR), Bcl-2-подобный белок (A46R) и 3β-гидроксистероиддегидрогеназу (A44L) [57].

На основе штамма LIVP VACV создан рекомбинантный вариант с нарушением пяти генов вирулентности, кодирующих гемагглютинин (A56R), гамма-интерферонсвязывающий белок (B8R), тимидинкиназу (J2R), комплементсвязывающий белок (C3L) и Bcl-2-подобный ингибитор апоптоза (N1L). Показано, что инактивация этих генов вирулентности не влияет на репродуктивные свойства VACV на культурах клеток млекопитающих. Полученный штамм VACV характеризовался значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным LIVP. При подкожном введении мышам рекомбинантный вариант VACV индуцировал наработку VACV-нейтрализующих антител на уровне родительского штамма LIVP [38]. Для увеличения продукции вирусспецифичных антител дополнительно инактивировали ген A35R (табл. 3). Созданный штамм LIVPΔ6 индуцировал в организме мышей достоверно более высокий уровень вируснейтрализующих антител и обеспечивал большую протективность, чем исходный штамм VACV [52].

Учитывая, что удаление индивидуальных генов Bcl-2-подобных белков N1, C6 или K7 VACV не только приводило к аттенуации вируса, но и увеличивало его иммуногенность [43–45], создан вариант VACV WR, у которого делетировали все три указанных гена. Оказалось, что полученный тройной мутант VACV не утратил способность к эффективному размножению на культуре клеток, но в системе *in vivo* он показал большую аттенуацию по сравнению с одиночными мутантами по данным генам и сниженную продукцию вируснейтрализующих антител и специфичных Т-клеток CD8⁺ [58].

Суммируя результаты этих исследований, можно заключить, что при создании безопасных и высокоиммуногенных вариантов VACV необходимо соблюдать баланс между аттенуацией и иммуногенностью. Поскольку имеющийся уровень знаний не позволяет заранее предсказать эффекты, которые будут достигнуты при нарушении нескольких целевых генов VACV, каждый получаемый вариант вируса следует тщательно изучать на разных модельных животных. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fenner F, Henderson D.A., Arita I, Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
2. Esparza J, Schrick L., Damaso C.R., Nitsche A. // *Vaccine*. 2017. V. 35. P. 7222–7230.
3. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. New York: Springer, 2005. 425 p.
4. Downie A.W. // *Br. J. Exp. Pathol.* 1939. V. 20. P. 158–176.
5. Tulman E.R., Delhon G., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F., Rock D.L. // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 9244–9258.
6. Shchelkunov S.N. // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9. e1003756.
7. Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M., Poland G.A. // *Curr. Opin. Immunol.* 2009. V. 21. P. 314–320.
8. Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26.
9. Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. // *Viruses*. 2018. V. 10. e101.
10. Shchelkunov S.N. // *Virus Genes*. 1995. V. 10. P. 53–71.
11. 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.
12. 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.
13. 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. 509. P. 66–70.
14. Le Mercier P. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39 (Database issue). P. D576–D582.
15. Condit R.C., Moussatche N., Traktman P. // *Adv. Virus. Res.* 2006. V. 66. P. 31–124.
16. Yoder J.D., Chen T.S., Garnier C.R., Vemulapalli S., Maier C.S., Hrubby D.E. // *Virol. J.* 2006. V. 3. e10.
17. Chung C.S., Chen C.H., Ho M.Y., Huang C.Y., Liao C.L., Chang W. // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 2127–2140.
18. Resch W., Hixson K.K., Moore R.J., Lipton M.S., Moss D. // *Virology*. 2007. V. 358. P. 233–247.
19. Forsyth K.S., DeHaven B., Mendoca M., Paul S., Sette A., Eisenlohr L.C. // *J. Immunol.* 2019. V. 202. P. 1340–1349.
20. Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 9458–9463.
21. Mack T.M., Noble J., Thomas D.B. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1972. V. 21. P. 214–218.
22. Chaudhri G., Panchanathan V., Bluethmann H., Karupiah G. // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 6339–6344.
23. Aldaz-Carroll L., Xiao Y., Whitbeck J.C., de Leon M.P., Lou H., Kim M., Yu J., Reinherz E.L., Isaacs S.N., Eisenberg R.J., et al. // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 8131–8139.
24. Huw Davies D., Molina D.M., Wrammer J., Miller J., Hirst S., Mu Y., Pablo J., Unal B., Nakajima-Sasaki R., Liang X., et al. // *Proteomics*. 2007. V. 7. P. 1678–1686.
25. Benhnia M.R., McCausland M.M., Su H., Singh K., Hoffmann J., Davies D.H., Felgner P.L., Head S., Sette A., Garboczi D.N., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 3751–3768.
26. Moutaftsi M., Tschärke D.C., Vaughan K., Koelle D.M., Stern L., Calvo-Calle M., Ennis F., Terajima M., Sutter G., Crotty S., et al. // *Future Microbiol.* 2010. V. 5. P. 221–239.
27. Amanna I.J., Slifka M.K., Crotty S. // *Immunol. Rev.* 2006. V. 211. P. 320–337.
28. Matho M.H., Schlossman A., Meng X., Benhnia M.R., Kaever T., Buller M., Doronin K., Parker S., Peters B., Crotty S., et al. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. e1005148.
29. Zajonc D.M. // *Subcell. Biochem.* 2017. V. 83. P. 103–126.
30. Panchanathan V., Chaudhri G., Karupiah G. // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 6333–6338.
31. Oseroff C., Kos F., Bui H., Peters B., Pasquetto V., Glenn J., Palmore T., Sidney J., Tschärke D.C., Bennink J.R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 13980–13985.
32. Moutaftsi M., Peters B., Pasquetto V., Tschärke D.C., Sidney J., Bui H.H., Grey H., Sette A. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 817–819.
33. Croft N.P., Smith S.A., Pickering J., Sidney J., Peters B., Faridi P., Witney M.J., Sebastian P., Flesch I.E.A., Heading S.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. P. 3112–3117.
34. Olson V.A., Shchelkunov S.N. // *Viruses*. 2017. V. 9. e242.
35. Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2019. V. 17. P. 129–139.
36. Shchelkunov S.N. // *Vaccine*. 2011. V. 29. Suppl. 4. D49–D53.
37. Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae*. 2017. V. 9. P. 4–12.
38. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. P. 113–121.
39. Shchelkunov S.N. // *Mol. Biol.* 2011. V. 45. P. 24–35.
40. Shchelkunov S.N. // *Adv. Virol.* 2012. V. 2012. Article ID 524743.
41. Ferrier-Rembert A., Drillien R., Tournier J.N., Garin D., Crance J.M. // *Vaccine*. 2008. V. 26. P. 1794–1804.
42. Drutskaya M.S., Belousov P.V., Nedospasov S.A. // *Mol. Biol.* 2011. V. 45. P. 5–15.
43. Summer R.P., Ren H., Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2013. V. 94. P. 1121–1126.
44. Mathew A., O'Bryan J., Marshall W., Kotwal G.J., Terajima M., Green S., Rothman A.L., Ennis F.A. // *PLoS One*. 2008. V. 3. e3323.
45. Benfield C.T.O., Ren H., Lucas S.J., Bahsoun B., Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2013. V. 94. P. 1647–1657.
46. Di Pilato M., Mejias-Perez E., Sorzano C.O.S., Esteban M. // *J. Virol.* 2017. V. 91. e00575–17.
47. Falivene J., Del Medico Zajac M.P., Pascutti M.F., Rodriguez A.M., Maeto C., Perdiguero B., Gomez C.E., Esteban M., Calamante G., Gherardi M.M. // *PLoS One*. 2012. V. 7. e32220.
48. Staib C., Kisling S., Erfle V., Sutter G. // *J. Gen. Virol.* 2005. V. 86. P. 1997–2006.
49. Clark R.H., Kenyon J.C., Bartlett N.W., Tschärke D.C., Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2006. V. 87. P. 29–38.
50. Girgis N.M., DeHaven B., Xiao Y., Alexander E., Viner K., Isaacs S.N. // *J. Virol.* 2011. V. 85. P. 2547–2556.
51. Rehm K.E., Roper R.L. // *Vaccine*. 2011. V. 29. P. 3276–3283.
52. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 35–38.
53. Strnadova P., Ren H., Valentine R., Mazzon M., Sweeney T.R., Brierley I., Smith G.L. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. e1005151.
54. Rehm K.E., Connor R.F., Jones G.J.B., Yimbu K., Mannie M.D., Roper R.L. // *Immunology*. 2009. V. 128. P. 381–392.
55. Rehm K.E., Connor R.F., Jones G.J.B., Yimbu K., Roper R.L. // *Virology*. 2010. V. 397. P. 176–186.
56. Garber D.A., O'Mara L.A., Gangadhara S., McQuoid M., Zhang X., Zheng R., Gill K., Verma M., Yu T., Johnson B., et al. // *J. Virol.* 2012. V. 86. P. 12605–12615.
57. Holgado M.P., Falivene J., Maeto C., Amigo M., Pascutti M.F., Vecchione M.B., Bruttomesso A., Calamante G., del Medico-Zajac M.P., Gherardi M.M. // *Viruses*. 2016. V. 8. e139.
58. Sumner R.P., Ren H., Ferguson B.J., Smith G.L. // *Vaccine*. 2016. V. 34. P. 4827–4834.