

УДК 578.821

Аттенуированный и высокоиммуногенный вариант вируса осповакцины

С. Н. Щелкунов*, С. Н. Якубицкий, К. А. Титова, С. А. Пьянков, И. С. Шульгина,
Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко, Г. А. Щелкунова,
А. А. Сергеев

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

*E-mail: snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.02.2024

Принята к печати 05.04.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27384

РЕФЕРАТ Вирус осповакцины (VACV) многие десятилетия использовался для профилактической иммунизации против оспы. Однако вакцина на его основе была высокоректогенной, поэтому после ликвидации оспы Всемирная организация здравоохранения в 1980 году рекомендовала прекратить вакцинацию против данной инфекции. Это привело к тому, что в последние годы все чаще стали возникать вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей, наибольшей из которых стала эпидемия оспы обезьян 2022 года, распространившаяся на все континенты. Поэтому актуальным остается создание безопасных высокоиммуногенных вакцин новых поколений против ортопоксвирусных инфекций. Ранее на основе штамма ЛИВП (L) VACV, используемого в России в качестве противооспенной вакцины первого поколения, нами получен штамм LAD с мутациями в гене *A34R*, приводящими к увеличенной продукции внеклеточных вирионов, и с делецией гена *A35R*, ингибирующего гуморальный ответ на вирусную инфекцию. В данной работе создан штамм LADA с дополнительной делецией в гене *ati* штамма LAD, направляющего продукцию мажорного невирионного иммуногена. При интраназальном инфицировании мышей линии BALB/c выявлено, что вариант LADA VACV менее реактогенен в сравнении с исходным штаммом L. При внутрикожной иммунизации мышей в дозе 10^5 БОЕ штаммы LAD и LADA индуцируют более выраженный клеточный иммунный ответ по сравнению со штаммом L. При этом максимальный уровень вирусспецифических IFN- γ -продуцирующих клеток для варианта LAD выявлен на 7 день после иммунизации (дни), а для LADA – на 14 дни. Штаммы LAD и LADA индуцировали значительно больший уровень VACV-специфических IgG по сравнению с родительским штаммом L, особенно в период 28–56 дни. Для оценки протективного иммунитета на 62 дни вакцинированных мышей интраназально заражали вирусом оспы коров в дозе 460 ЛД₅₀. Вирус LADA при этом обеспечивал полную защиту мышей, штамм LAD – 70%, а родительский штамм L – лишь 60% животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус осповакцины, ортопоксвирусы, направленная делеция генов, вакцинация, внутрикожная инъекция, иммуногенность, протективность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CPXV – вирус оспы коров; VACV – вирус осповакцины; БОЕ – бляшкообразующая единица; в/к – внутрикожно; дни – день после иммунизации; и/н – интраназально.

ВВЕДЕНИЕ

Особо опасный для человека вирус оспы (*Variola virus*, VARV) и родственные ему зоонозные вирусы оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV), оспы верблюдов (*Camelpox virus*, CMLV) и осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) входят в состав рода *Orthopoxvirus* семейства Poxviridae [1].

Самым надежным способом профилактики любого вирусного заболевания является инфицирование

(иммунизация) человека или животных низковирулентным (аттенуированным) реплицирующимся вариантом/мутантом этого вирусного агента или близкородственным слабопатогенным вирусом. Первым примером такой защиты от инфекционного заболевания стало использование прививок против оспы [2].

Вакцины на основе VACV не имеют выраженной видоспецифичности в отношении ортопоксвирусов, поэтому они могут применяться для иммунизации как людей, так и животных, для профилактики

вспышек инфекционных заболеваний, вызванных любым видом ортопоксвирусов [3].

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляла собой препарат VACV, полученный размножением вируса в коже телят или других животных. В современных условиях вакцинные штаммы VACV продуцируют на культурах клеток млекопитающих, такие препараты относят к противооспенным вакцинам второго поколения [4, 5].

Учитывая, что иммунизация против оспы живой вакциной первого поколения приводила в ряде случаев к тяжелым побочным реакциям, включая летальные исходы, Всемирная организация здравоохранения после заключения о глобальной ликвидации оспы в 1980 году настоятельно рекомендовала прекратить такую вакцинацию во всех странах [1].

Прекращение противооспенной вакцинации привело к тому, что за прошедшие годы большая часть человечества (прежде всего, в возрасте до 40–45 лет) не имеет иммунитета против любых зоонозных ортопоксвирусных инфекций. Участвовавшие в последние годы случаи инфицирования людей ортопоксвирусами, в первую очередь вирусом оспы обезьян, заставляют вернуться к рассмотрению вопроса о возможном возврате оспы или подобного заболевания в результате естественной эволюции этих вирусов [6, 7].

Чтобы предотвратить развитие локальных вспышек в распространенные эпидемии и тем самым уменьшить риск возникновения в результате естественной эволюции высокопатогенного для человека ортопоксвируса, усилия исследователей должны быть направлены на создание безопасных живых вакцин новых поколений на основе VACV [3, 8].

Аттенуированные противооспенные вакцины третьего поколения создают в процессе множественных пассажей определенного штамма VACV в культуре клеток гетерологичного хозяина. Например, самая изученная противооспенная вакцина третьего поколения MVA получена в результате большого числа пассажей штамма Ankara VACV на культуре куриных фибробластов. В геноме штамма MVA возникли множественные мутации и протяженные делеции относительно ДНК исходного штамма VACV. MVA характеризуется неспособностью реплицироваться в большинстве клеток млекопитающих, включая клетки человека [9].

Новый подход к получению аттенуированных реплицирующихся противооспенных вакцин четвертого поколения состоит во введении методами генетической инженерии направленных мутаций или делеций/инсерций в гены, контролируемые защитные реакции организма против вирусной инфекции.

Многочисленные работы, посвященные делециям (удалению) генов иммуномодулирующих факторов VACV, позволили выявить некоторые гены, инактивация которых приводила к аттенуации вируса. С разной долей успеха делались попытки получения аттенуированных и одновременно высокоиммуногенных вариантов VACV в результате направленной инактивации отдельных или нескольких вирусных генов, но они не были доведены до клинического применения полученных вариантов VACV [3, 4, 10].

На основе штамма LIVP (L) VACV, используемого в России в качестве противооспенной вакцины первого поколения, нами создан рекомбинантный вариант VACΔ5 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 выбранных генов вирулентности не влияет на репродуктивные свойства VACV на культурах клеток млекопитающих. Полученный штамм VACΔ5 характеризовался значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным штаммом L [11]. Для увеличения продукции вирусспецифических антител в геноме VACΔ5 дополнительно направленно инактивировали ген *A35R*, белковый продукт которого ингибирует представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II, иммунное примирование Т-лимфоцитов и последующий синтез хемокинов и цитокинов. Созданный вариант VACΔ6 индуцировал в организме мышей достоверно более высокий уровень вируснейтрализующих антител и обеспечивал большую протективность, чем у исходного штамма L [12]. После доклинических исследований [13] и клинических испытаний вакцина ОртопоксВак (VACΔ6) была зарегистрирована в России в ноябре 2022 года [2] и стала первой в мире вакциной четвертого поколения против ортопоксвирусных инфекций человека.

Поскольку VACV кодирует большой набор генов, контролирующих формирование вирусного потомства и регулирующих развитие иммунного ответа на вирусную инфекцию [10, 14], нами продолжены исследования по созданию методами генетической инженерии новых аттенуированных и высокоиммуногенных вариантов VACV.

Целью данной работы было получение на основе штамма L VACV рекомбинантного варианта LADA с мутациями в гене *A34R*, приводящими к увеличенной продукции внеклеточных вирионов, с делецией гена *A35R*, ингибирующего антительный ответ

на вирусную инфекцию, и с делецией гена *ati*, направляющего продукцию мажорного невирионного иммуногена, а также изучение на мышинной модели реактогенности и динамики развития VACV-специфичного иммунного ответа на вакцинацию этим вирусом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусы, культура клеток

В работе использовали клон 14 штамма ЛИВП VACV (L) [11], полученный на его основе штамм LIVP-A34R*-dA35R (LAD) [15], и штамм GRI-90 CPXV [16]. Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток почки африканской зеленой марышки линии CV-1 из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Получение рекомбинантного штамма LIVP-A34R*-dA35R-*ati*

Для направленной делеции гена *ati* VACV монослой клеток CV-1 инфицировали штаммом LAD и проводили трансфекцию рекомбинантной плазмидой *pΔati* в условиях *gpt*-селекции рекомбинантов VACV как описано ранее [17]. Искомый вариант вируса LIVP-A34R*-dA35R-*ati* (LADA) выявляли ПЦР-анализом с последующим секвенированием вирусной ДНК.

Животные

В работе использовали мышей линии BALB/c, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Манипуляции на животных проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02-06.2022 от 28.06.2022 г.).

Иммунизация мышей и взятие образцов на анализы

Мышей линии BALB/c в возрасте 6–7 недель иммунизировали штаммами L, LAD или LADA VACV (28 животных в группе, доза вируса 10^5 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/20 мкл/мышь), используя внутрикожную (в/к) инъекцию в дорсальную сторону хвоста (около 1 см от основания) [18]. В качестве отрицательного контроля мышам вводили физиологический раствор.

На 7, 14 и 21 день после иммунизации (дпи) анализировали гуморальный и клеточный иммун-

ные ответы у мышей. В каждой временной точке (указаны выше) в анализ брали по шесть мышей в группе. Кровь у мышей прижизненно забирали из ретроорбитального венозного синуса с помощью иглы 23G × 1.25 in. Из индивидуальных образцов крови животных получали сыворотку путем осаждения форменных элементов с помощью центрифугирования с относительной центробежной силой 1000 *g* в течение 10 мин. Полученные сыворотки выдерживали при температуре 56°C в течение 30 мин и хранили при температуре –20°C.

После взятия крови на 7, 14 и 21 дпи мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации и стерильно извлекали селезенки индивидуально у каждой из шести мышей изучаемых групп в анализируемой временной точке.

На 28, 42 и 56 дпи у одних и тех же мышей (по 10 животных в группе) прижизненно забирали кровь из ретроорбитального венозного синуса и получали индивидуальные сыворотки как описано выше.

Выделение спленоцитов

Спленоциты выделяли путем протирания индивидуальной селезенки через клеточные фильтры 70 и 40 мкм (BD Falcon™, США) с использованием поршня шприца. После удаления эритроцитов с помощью буфера для лизиса эритроцитов (Sigma, США), спленоциты промывали и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин и гентамицин (50 мкг/мл). Жизнеспособность и концентрацию клеток определяли в тесте с красителем трипановым синим (Bio-Rad, США) на автоматическом счетчике клеток TC20 (Bio-Rad).

Определение количества клеток, продуцирующих IFN-γ

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ, с помощью метода IFN-γ ELISpot. Анализ проводили с использованием наборов Murine IFNγ ELISPOT Kit (with precoated plates) (Abcam, США) согласно инструкции производителя. Спленоциты пассивировали (10^5 клеток/лунка) в среде Лимфоген («ПанЭко», Россия). Для стимуляции клеток использовали смесь VACV-специфичных иммунодоминантных для мышей BALB/c пептидов SPYAAGYDL, SPGAAGYDL, VGPSNSPTF, KYGRLFNEI, GFIRSLQTI, KYMWCYSQV, SFIRSLQNI (по 20 мкг/мл каждого) [19, 20]. В качестве митогена использовали конканавалин А, в качестве отрицательного контроля – среду Лимфоген. Подсчет

количества IFN- γ -продуцирующих клеток осуществляли с помощью ELISpot-ридера фирмы Carl Zeiss (Германия).

Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей

Иммуноферментный анализ (ИФА) индивидуальных сывороток крови мышей выполняли согласно [18]. В качестве антигена использовали очищенный центрифугированием через сахарозную подушку препарат вирионов штамма L VACV. Все исследуемые образцы сыворотки крови мышей титровали серией двукратных последовательных разведений – от 1:100 до 1:12800. Повтор титрования ИФА проводили на следующий день. Для определения титров IgG использовали растворы с пероксидазными конъюгатами анти-IgG мыши (Sigma, США). Титры IgG для каждого исследуемого образца сыворотки крови определяли для каждого повтора по отдельности, а затем усредняли. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

Оценка уровня протективности у иммунизированных мышей

На 62-й дни группы иммунизированных штаммами L, LAD или LADA и контрольных животных заражали интраназально (и/н) CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀ (2.0×10^6 БОЕ/50 мкл/мышь) (10 животных в каждой группе). За животными наблюдали в течение 14 дней, регистрировали клинические проявления инфекции и гибель.

Использовали балльную оценку выявляемых симптомов заболевания: 0 – признаков заболевания нет, 1 – легкая взъерошенность шерсти, 2 – сильная взъерошенность шерсти, 3 – сильная взъерошенность шерсти, а также сутулая поза или конъюнктивит, 4 – затрудненное дыхание или отсутствие движения, 5 – гибель.

Мышей взвешивали по отдельности каждые 2 дня. Рассчитывали средние арифметические значения массы тела для каждой группы мышей на временную точку и выражали в процентах от начального веса.

Получали данные для групп животных, иммунизированных изучаемыми вариантами VACV, а также для групп неиммунизированных мышей, которых не инфицировали (Отрицательный контроль, О.К.) или заражали CPXV GRI-90 (Положительный контроль, П.К.).

Оценка патогенности штаммов VACV

В исследованиях по изучению патогенности штаммов L и LADA VACV при и/н заражении использовали 3-недельных мышей линии BALB/c массой 10–12 г (по 10 животных в группе). Мышам после ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром вводили в полость носа вирусосодержащую жидкость (50 мкл, доза 10^7 БОЕ/мышь) либо физиологический раствор (контрольная группа). За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали их гибель.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку и сравнение результатов проводили стандартными методами, используя пакет компьютерных программ Statistica 13.0 (StatSoft Inc. 1984–2001). Значение *P* менее 0.05 считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клеточный иммунный ответ на вакцинацию мышей вариантами VACV

Взрослых мышей линии BALB/c в возрасте 6–7 недель вакцинировали методом в/к инъекции, используя штаммы L, LAD или LADA VACV в дозе 10^5 БОЕ/животное. Через 7, 14 и 21 дни мышей (по шесть животных каждой группы после прижизненного забора крови) умерщвляли и извлекали селезенки, выделяли спленоциты и у каждого животного определяли методом ELISpot количество клеток, продуцирующих IFN- γ , в ответ на стимуляцию пулом VACV-специфических пептидов. Результаты выполненных анализов, приведенные на рис. 1, показывают, что три изученных варианта VACV различаются по динамике и уровню развития клеточного иммунного ответа на в/к иммунизацию ими лабораторных мышей.

Гуморальный иммунный ответ на вакцинацию мышей вариантами VACV

У мышей линии BALB/c в возрасте 6–7 недель, в/к иммунизированных штаммами L, LAD или LADA VACV в дозе 10^5 БОЕ, через 7, 14, 21, 28, 42 и 56 дни проводили прижизненный забор индивидуальных проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали сыворотки. На 7, 14 и 21 дни образцы крови брали у 6 животных каждой группы в каждой временной точке; у этих животных извлекали селезенки для тестирования IFN- γ -продуцирующих клеток (см. выше). На 28, 42 и 56 дни прижизненно брали образцы крови у одних и тех же животных (по 10 мышей в группе). Методом ИФА определяли титры VACV-

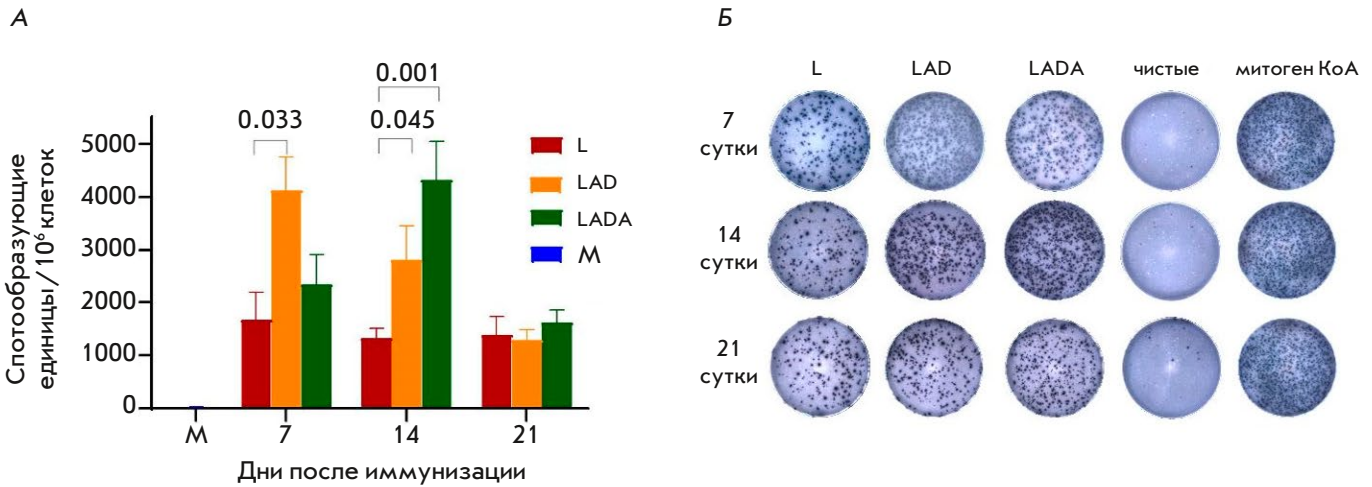


Рис. 1. Результаты анализа VACV-специфического клеточного ответа у мышей линии BALB/c, иммунизированных вирусами L, LAD или LADA, с использованием метода ELISpot. М – мыши контрольные (не иммунизированные). А – количество спленоцитов, экспрессирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пулом VACV-специфических пептидов, на миллион спленоцитов. Данные приведены в виде медиан с диапазоном. Графический и статистический анализ осуществлен с использованием программы GraphPad Prism 9.0; над скобками указаны значения *P*. Б – репрезентативные изображения лунок ELISpot

специфических IgG в каждой индивидуальной сыворотке крови.

Результаты выполненных анализов, представленные на рис. 2, позволяют заключить, что рекомбинантные штаммы LAD и LADA, начиная с 14 дни, индуцируют продукцию существенно большего количества VACV-специфических IgG по сравнению с родительским штаммом L. При этом наибольшим уровнем антител был у штамма LADA в интервале 28–56 дни.

Уровни защиты иммунизированных мышей от летальной ортопоксвирусной инфекции

Для оценки того, как изучаемые штаммы L, LAD и LADA влияют на формирование протективного иммунитета против летальной инфекции мышей гетерологичным ортопоксвирусом, на 62 дни группы иммунизированных и контрольных (не иммунизированных) животных и/н заражали CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀. Во всех экспериментальных группах наблюдали клинические проявления вирусной инфекции (рис. 3), сопровождающиеся изменениями массы тела животных (рис. 4). При этом наименьшим патогенное воздействие CPXV на мышей было в группе животных, вакцинированных штаммом LADA (рис. 3 и 4). Все животные этой группы выжили, в то время как в группах мышей, вакцинированных штаммами LAD или L, выжило 70 и 60% животных соответственно (рис. 5).

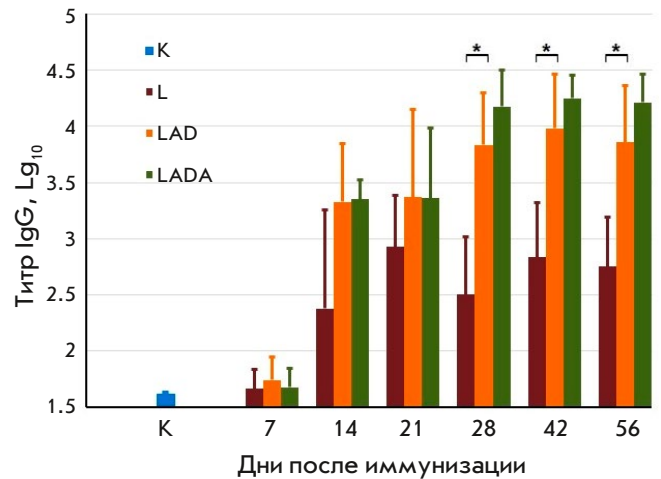


Рис. 2. Титры VACV-специфических IgG в сыворотках крови мышей, иммунизированных вирусами L, LAD или LADA. К – сыворотки крови мышей, которым вводили физиологический раствор. Данные приведены в виде медиан с диапазоном. Графический и статистический анализ осуществлен с использованием программы GraphPad Prism 9.0.

*Статистически значимые различия с *P* < 0.05

Патогенные свойства штаммов L и LADA при интраназальном заражении мышей

При изучении патогенности штаммов L и LADA в данной работе использовали 3-недельных мышей линии BALB/c (по 10 животных в группе).

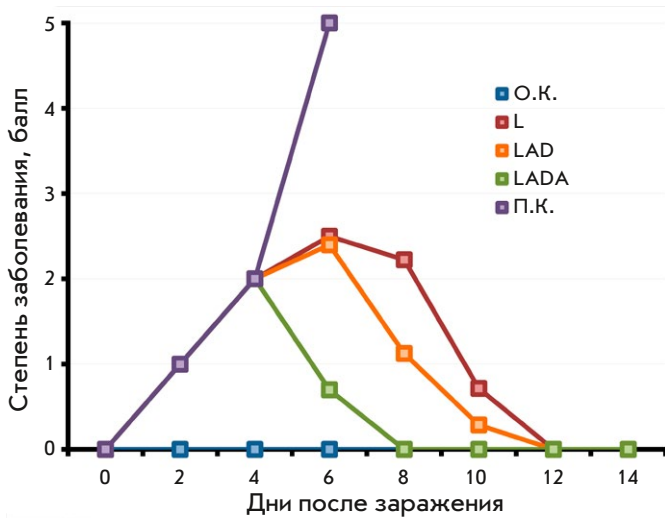


Рис. 3. Динамика клинических проявлений инфекции у мышей, вакцинированных вирусами L, LAD или LADA в дозе 10^5 БОЕ, после интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀ на 62 день после иммунизации. Приведены данные для групп из 10 животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также не иммунизированных групп и не инфицированных (О.К.) или зараженных CPXV (П.К.)

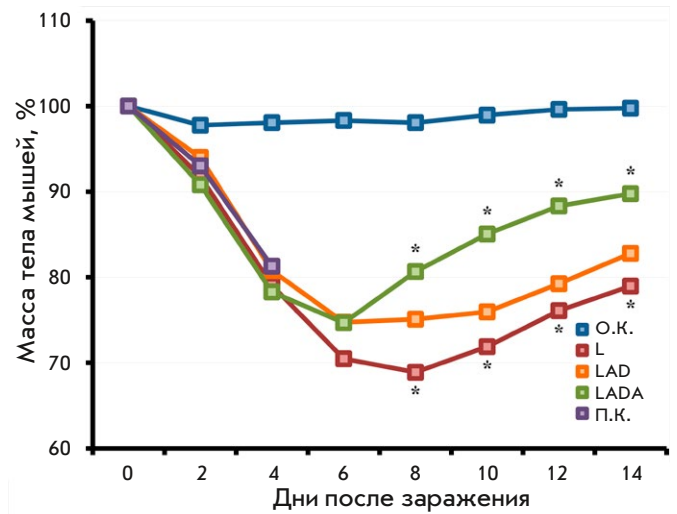


Рис. 4. Динамика изменения массы тела у мышей, вакцинированных вирусами L, LAD или LADA в дозе 10^5 БОЕ, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀ на 62 день после иммунизации. Приведены данные для групп из 10 животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также не иммунизированных групп и не инфицированных (О.К.) или зараженных CPXV (П.К.). *Статистически значимые ($P < 0.05$) различия средних значений между группами LADA и L

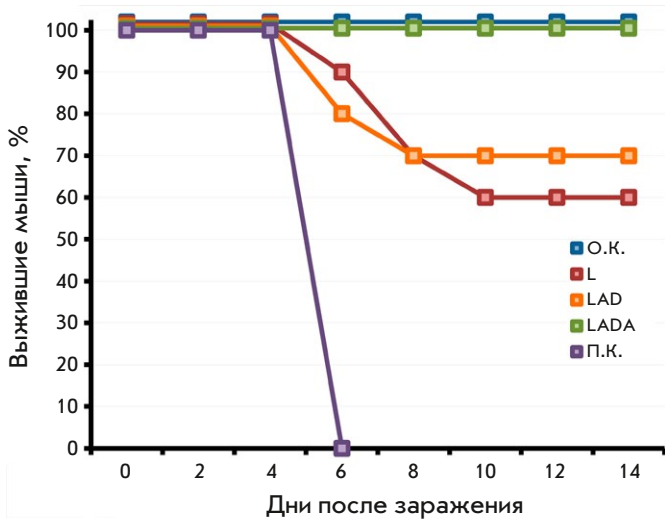


Рис. 5. Динамика гибели мышей, вакцинированных вирусами L, LAD или LADA в дозе 10^5 БОЕ, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 460 ЛД₅₀ на 62 день после иммунизации. Приведены данные для групп из 10 животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также не иммунизированных групп и не инфицированных (О.К.) или зараженных CPXV (П.К.)

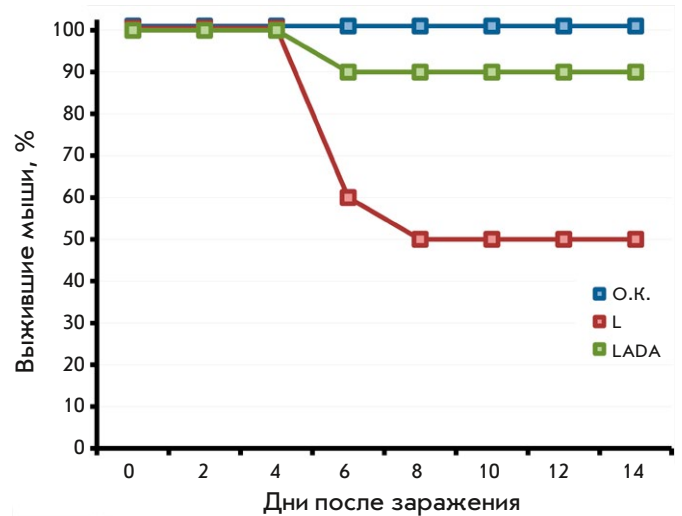


Рис. 6. Динамика гибели мышей интраназально зараженных вирусами L или LADA в дозе 10^7 БОЕ. О.К. – мыши, которым интраназально вводили физиологический раствор. Приведены данные для групп из 10 животных

Осуществляли и/н заражение мышей вирусами в дозе 10^7 БОЕ/животное. За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали их гибель. В группе мышей, зараженных VACV штамма L, погибло 50% животных, а в группе инфицированных штаммом LADA – только 10% (рис. 6), что указывает на значительную аттенуацию штамма LADA по сравнению с родительским штаммом L.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ортопоксвирусы в процессе коэволюции с чувствительными к ним животными выработали различные молекулярные механизмы подавления разных этапов развития врожденного и адаптивного иммунных ответов на инфекцию [10]. Гены, контролирующие иммунный ответ, обычно не являются жизненно важными и не влияют на эффективность размножения вируса в культурах клеток. Поэтому их направленная инактивация или модификация может быть продуктивным направлением получения аттенуированных и высокоиммуногенных вариантов VACV [10, 14, 21–25].

Ранее нами было изучено развитие гуморального и Т-клеточного иммунных ответов, возникающих после иммунизации мышей вариантами VACV с мутантным геном *A34R*, обуславливающим увеличенную продукцию внеклеточных вирионов, или с делетированным геном *A35R*, белковый продукт которого ингибирует представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II, иммунное примирование Т-лимфоцитов и последующий синтез хемокинов и цитокинов. Одновременная модификация гена *A34R* и делеция гена *A35R* способствовала у штамма LAD VACV синергическому эффекту в отношении повышения иммуногенных свойств вируса по сравнению с родительским штаммом L [15].

Нами также было изучено влияние продукции невирионного мажорного иммуногенного белка, кодируемого геном *ati*, на проявление патогенности и иммуногенности VACV [17]. Направленная делеция гена *ati* обуславливала у полученного варианта вируса LIVPΔ*ati* после в/к иммунизации им мышей увеличение продукции VACV-специфичных IgG по сравнению с вакцинацией родительским штаммом L и большую защиту от повторной ортопоксвирусной инфекции.

В данной работе нами получен вариант LADA, у которого в ген *A34R* введены мутации, приводящие к увеличенной продукции внеклеточных вирионов, делетирован ген *A35R*, ингибирующий антительный ответ на вирусную инфекцию, а также удален ген *ati*, направляющий продукцию ма-

жорного невирионного иммуногена, антитела против которого не обладают вируснейтрализующей активностью. Изучение свойств штамма LADA на мышиной и/н модели показало, что полученный вариант VACV аттенуирован по сравнению с исходным штаммом L (рис. 6).

Штаммы LAD и LADA при в/к иммунизации мышей в дозе 10^5 БОЕ индуцируют более выраженный клеточный иммунный ответ по сравнению со штаммом L (рис. 1). При этом максимальный уровень вирусспецифических IFN- γ -продуцирующих клеток для варианта LAD выявлен на 7 дни, а LADA – на 14 дни. Наблюдаемый для LADA сдвиг в динамике количества IFN- γ -продуцирующих клеток, по-видимому, обусловлен отсутствием синтеза мажорного невирионного иммуногена.

Активную продукцию VACV-специфичных IgG вызывали все изучаемые штаммы, начиная с 14 дни (рис. 2). При этом рекомбинантные варианты LAD и LADA индуцировали значительно больший уровень специфичных антител по сравнению с родительским штаммом L, особенно в период 28–56 дни. Следует отметить, что штамм LADA обуславливал наибольший уровень VACV-специфичных антител в период 28–56 дни.

Для оценки протективного иммунитета, индуцированного вакцинацией вариантами VACV, на 62 дни мышей и/н заражали гетерологичным CPXV в высоко летальной дозе (460 ЛД₅₀). Вирус LADA при этом обеспечивал полную защиту (рис. 5), хотя у животных этой группы на 2–6 сутки отмечались незначительные клинические проявления инфекции (рис. 3) и достоверно меньшее временное снижение массы тела по сравнению с другими экспериментальными группами мышей (рис. 4). Родительский штамм L в этих же условиях обеспечивал защиту лишь 60%, а штамм LAD – 70% животных.

Таким образом, созданный вариант LADA является аттенуированным и более иммуногенным по сравнению со штаммом L, на основе которого получают противооспенную вакцину первого поколения, разрешенную для клинического применения в России.

Учитывая полученные результаты, гены *A35R* и *ati* можно рассматривать в качестве мишеней для встройки целевых генов в ДНК штамма LIVP-*A34R** при создании безопасных эффективных живых поливалентных вакцин на основе VACV. ●

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

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. Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // *Viruses*. 2023. V. 15. P. 103.
3. Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26.
4. Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. // *Viruses*. 2015. V. 7. P. 1726–1803.
5. Esparza J., Schrick L., Damaso C.R., Nitsche A. // *Vaccine*. 2017. V. 35. P. 7222–7230.
6. Shchelkunov S.N. // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9. e1003756.
7. Harapan H., Ophinni Y., Megawati D., Frediansyah A., Marnada S.S., Salampe M., Bin Emran T., Winardi W., Fathima R., Sirinam S., et al. // *Viruses*. 2022. V. 14. P. 2155.
8. Shchelkunov S.N. // *Vaccine*. 2011. V. 29. P. D49–D53.
9. Volz A., Sutter G. // *Adv. Virus Res.* 2017. V. 97. P. 187–243.
10. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12. P. 33–41.
11. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. P. 113–121.
12. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 35–38.
13. Щелкунов С.Н., Якубицкий С.Н., Нестеров А.Е., Колосова И.В., Сергеев А.А., Зайковская А.В., Кабанов А.С., Нечаева Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В. и др. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022. Т. 21. № 6. С. 34–47.
14. Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. // *Viruses*. 2018. V. 10. P. 101.
15. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Starostina E.V., Titova K.A., Pyankov S.A., Shchelkunova G.A., Borgoyakova M.B., Zadorozhny A.M., Orlova L.A., et al. // *Viruses*. 2022. V. 14. P. 1453.
16. 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.
17. Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Titova K.A., Shulgina I.S., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae*. 2023. V. 15. P. 52–57.
18. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. // *Viruses*. 2020. V. 12. P. 795.
19. Oseroff C., Peters B., Pasquetto V., Moutaftsi M., Sidney J., Panchanathan V., Tschärke D.C., Maillere B., Grey H., Sette A. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 7193–7202.
20. Russell T.A., Tschärke D.C. // *Immunol. Cell Biol.* 2014. V. 92. P. 466–469.
21. Rehm K.E., Connor R.F., Jones G.J.B., Yimbu K., Roper R.L. // *Virology*. 2010. V. 397. P. 176–186.
22. Garber D., O'Mara L., 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.
23. Benfield C.T.O., Ren H., Lucas S.J., Bahsoun B., Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2013. V. 94. P. 1647–1657.
24. Summer R.P., Ren H., Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2013. V. 94. P. 1121–1126.
25. Strnadova P., Ren H., Valentine R., Mazzon M., Sweeney T.R., Brierley I., Smith G.L. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. e1005151.