

Доклинические исследования специфической активности живой культуральной вакцины VACΔ6 против оспы и других ортопоксвирусных инфекций

С. Н. Щелкунов*, С. Н. Якубицкий, А. Е. Нестеров, И. В. Колосова, А. А. Сергеев, А. В. Зайковская, А. С. Кабанов, Е. А. Нечаева, М. П. Богрянцева, С. В. Усова, Н. С. Куцерубова, Т. В. Трегубчак, Е. В. Гаврилова, Р. А. Максютон

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Новосибирская область

Резюме

Актуальность. Эпидемиологическая обстановка в мире характеризуется увеличением заболеваемости людей и животных ортопоксвирусными инфекциями. В связи с этим необходимо разрабатывать новые безопасные вакцины против этих инфекций. **Цель.** Проведение доклинических исследований специфической активности вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций VACΔ6 на основе вируса осповакцины вируса осповакцины (BOV) с шестью нарушенными генами вирулентности. **Материалы и методы.** Исследования выполнены в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты), Государственной фармакопеи XIII и Европейской Фармакопеи 7.0. **Результаты и обсуждение.** Вакцинный штамм VACΔ6 BOV на модели внутримозгового введения мышам-сосункам проявил значительно уменьшенную нейровирулентность, а на модели внутрикожного введения кроликам – сниженную воспалительно-некротическую активность по сравнению с классической оспенной живой вакциной первого поколения, разрешённой для использования в России. Доклинические исследования трёх серий готовой лекарственной формы вакцины VACΔ6 показали её подлинность, термостабильность, апиrogenность и безвредность. При двукратной внутрикожной вакцинации кроликов в дозе 10⁶ оспообразующих единиц (ООЕ) обеспечивался 100% защитный эффект против интраназального инфицирования кроликов BOV штамм НВ-92 в дозе 4,9 Ig бляшкообразующих единиц (БОЕ) (1995 ЛД₅₀) и при двукратной внутрикожной вакцинации мышей в дозе 10⁶ ООЕ обеспечивалась полная защита против интраназального инфицирования мышей вирусом экстремелии штамм К1 в дозе 3,05 Ig БОЕ (56 ЛД₅₀). **Вывод.** На основании проведённого комплекса исследований можно заключить, что созданная вакцина четвёртого поколения VACΔ6 является более безопасной по сравнению с Вакциной оспенной живой первого поколения и не уступает ей по иммуногенным и протективным свойствам. **Ключевые слова:** живая оспенная вакцина нового поколения, доклинические исследования, специфическая активность вакцины, вирус осповакцины, вирус натуральной оспы. Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Щелкунов С. Н., Якубицкий С. Н., Нестеров А. Е. и др. Доклинические исследования специфической активности живой культуральной вакцины VACΔ6 против оспы и других ортопоксвирусных инфекций. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(6): 34–47. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-6-34-47>

Preclinical Studies of the Specific Activity of the Live Culture Vaccine VACΔ6 against Smallpox and other Orthopoxvirus Infections

SN Shchelkunov**, SN Yakubitskiy, AE Nesterov, IV Kolosova, AA Sergeev, AV Zaykovskaya, AS Kabanov, EA Nechaeva, MP Bogryantseva, SV Usova, NS Kutserubova, TV Tregubchak, EV Gavrilova, RA Maksyutov
Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Novosibirsk region, Russia

Abstract

Relevance. The epidemiological situation in the world is characterized by an increase in the incidence of orthopoxvirus infections in humans and animals. In this regard, it is necessary to develop new safe vaccines against these infections. **Aim.** Conducting preclinical studies on the specific activity of the live vaccine against smallpox and other orthopoxvirus infections VACΔ6 based on the vaccinia virus (VACV) with six deleted virulence genes are presented. **Materials and methods.** The studies were performed in accordance

* Для переписки: Щелкунов Сергей Николаевич, д. б. н., профессор, главный научный сотрудник, ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово, Новосибирская область, Россия. +7 (903) 939-94-80, snshchel@rambler.ru. ©Щелкунов С. Н. и др.

** For correspondence: Shchelkunov Sergei N., Dr. Sci. (Biol.), Professor, Principal Researcher, FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology (SRC VB) «Vector», Rospotebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia. +7 (903) 939-94-80, snshchel@rambler.ru. ©Shchelkunov SN, et al.

with the requirements of the Guidelines for conducting preclinical studies of drugs (immunobiological preparations), the State Pharmacopoeia XIII and the European Pharmacopoeia 7.0. **Results and discussion.** The vaccine strain VACΔ6 VACV showed significantly reduced neurovirulence in the model of intracerebral administration to suckling mice, and reduced inflammatory-necrotic activity in the model of intradermal administration to rabbits compared to the classical first-generation smallpox live vaccine approved for use in Russia. Preclinical studies of three series of the finished dosage form of the VACΔ6 vaccine showed its authenticity, thermal stability, non-pyrogenicity and safety. Double intradermal vaccination of rabbits at a dose of 10^6 PFU/animal, a 100% protective effect was provided against the intranasal infection of rabbits with VACV strain HB-92 at a dose of 1995 LD₅₀ and a double intradermal vaccination of mice at a dose of 10^6 PFU/animal, full protection was provided against the intranasal infection of mice with ectromelia virus strain K1 at a dose of 56 LD₅₀. **Conclusion.** Based on the conducted complex of studies, it can be concluded that the created vaccine of the fourth generation VACΔ6 is safer compared to the live smallpox vaccine of the first generation and is not inferior to it in immunogenic and protective properties.

Keywords: new generation live smallpox vaccine, preclinical studies, specific vaccine activity, smallpox vaccine virus, smallpox virus
No conflict of interest to declare.

For citation: Shchelkunov SN, Yakubitskiy SN, Nesterov AE et al. Preclinical studies of the specific activity of the live culture vaccine VACΔ6 against smallpox and other orthopoxvirus infections. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(6): 34–47 (In Russ.). <https://doi:10.31631/2073-3046-2022-21-6-34-47>

Вирус натуральной оспы (ВНО) вместе с такими патогенными для человека видами, как вирусы оспы обезьян (ВОО), оспы коров (ВОК), оспы буйволов (ВОБ) и осповакцины (ВОВ), принадлежит к роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* [1]. Ортопоксвирусы антигенно и иммунологически близки друг другу и дают перекрёстные серологические реакции и иммунную защиту. ВНО вызывает натуральную оспу – одно из наиболее опасных и смертоносных, высоко контагиозных инфекционных заболеваний человека со смертностью 20–30%. Это заболевание только в XX веке, когда выполнялись активные противоэпидемические мероприятия и массовая противооспенная вакцинация, унесло сотни миллионов жизней [2]. При этом натуральная оспа – единственное инфекционное заболевание человека, которое в результате глобальной кампании вакцинации и противоэпидемического контроля было ликвидировано к концу 1977 г., что является одним из величайших достижений медицинской науки. Учитывая наличие тяжёлых поствакцинальных осложнений при использовании классической живой вакцины первого поколения и подтверждение ликвидации натуральной оспы, Всемирная организация здравоохранения в 1980 г. рекомендовала вакцинацию против данной инфекции в дальнейшем не проводить [1,3].

В результате отказа 40 лет назад от повсеместной вакцинации против натуральной оспы в человеческой популяции с каждым годом увеличивается доля населения, не имеющая специфического иммунитета не только против данного заболевания, но и против зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека, обусловленных ВОО, ВОК, ВОБ и ВОВ [4]. Распространение этих вирусов в человеческой популяции потенциально может привести к их адаптации к иммунной системе человека и появлению вирусных вариантов, эпидемически опасных для людей [5]. Учитывая растущие масштабы транспортных сообщений по всему

миру, вероятность распространения рассматриваемых зоонозных ортопоксвирусов становится крайне высокой, что подтверждается завозными из Африки случаями заболевания людей оспой обезьян в США, Британии, Израиле и Сингапуре [6].

Кроме того, значительные успехи в развитии современной синтетической биологии обуславливают возрастающую угрозу биотерроризма. В одной из работ последних лет продемонстрирована возможность синтеза геномной ДНК и оживления вируса оспы лошадей, близкородственного ВНО [7].

Потенциальное появление и возрождение заболеваний человека, вызываемых ортопоксвирусами, требует разработки адекватных контрмер. Единственным методом борьбы с натуральной оспой, доказавшим свою эффективность, является вакцинопрофилактика. Но использование классических живых вакцин первого поколения на основе ВОВ для вакцинации населения в настоящее время может привести к ещё большему числу побочных реакций и более тяжёлым их проявлениям, чем во время кампании ликвидации натуральной оспы. Примерно 25% современного населения планеты противопоказана противооспенная вакцинация классической вакциной. В первую очередь это беременные женщины и люди с супрессивным состоянием иммунитета, вызванным раком, трансплантацией органов, ВИЧ-инфекцией и т.п., а также лица с заболеваниями сердца, экземой и атопическим дерматитом [8]. Поэтому настоятельной необходимостью является разработка противооспенной (противоортопоксвирусной) вакцины нового поколения, которая была бы безопасна, но по-прежнему высокоиммуногенна.

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляла собой препарат ВОВ, полученный размножением вируса на коже телят или других животных. Новейший подход к получению аттенуированных противооспенных вакцин так называемого четвёртого поколения состоит во введении в вирусный геном методами генетической

инженерии направленных делеций/инсерций, разрушающих гены, контролирующие защитные реакции организма против вирусной инфекции [5]. Ранее нами была проведена работа по получению методами генетической инженерии штамма BOB VACΔ6 с шестью нарушенными генами вирулентности, и была продемонстрирована перспективность его использования в качестве вакцины четвертого поколения против ортопоксвирусных инфекций [9].

Разрабатываемые профилактические вакцины должны проходить соответствующие стадии доклинического исследования согласно нормативным документам, не противоречащим основам законодательства РФ об охране здоровья граждан, ФЗ РФ от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», национальных и отраслевых стандартов РФ и др. В первую очередь необходимо проводить доклинические исследования на животных, подтверждающие безвредность и эффективность препарата [10]. В случае доклинических исследований противооспенных вакцин программу исследований разрабатывают на основе Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунологические препараты), глава 26 «Доклинические исследования оспенной вакцины» [11], РД 42-28-8-89 «Доклинические испытания новых медицинских лекарственных и иммунологических препаратов» [12] и Европейской Фармакопеи 7.0 [13].

Основной трудностью для лицензирования новых противооспенных вакцин является невозможность напрямую продемонстрировать, что вновь созданные вакцины индуцируют защитный (протективный) иммунитет против оспы у людей. Так как натуральная оспа была ликвидирована, невозможно протестировать эффективность новых вакцин в отношении естественного заболевания. Вместо этого вакцины должны тестироваться и сравниваться с ранее используемыми в период ликвидации оспы традиционными противооспенными вакцинами на суррогатных животных-моделях натуральной оспы [14].

Мышь является подходящим объектом для изучения патогенеза ортопоксвирусных инфекций и развития иммунных реакций в ответ на такие инфекции/вакцинации [15]. Кроме этого, белые мыши являются более чувствительным индикатором энцефалитогенной способности вирусов при внутримозговом заражении по сравнению с другими животными [16]. Также в качестве модели могут служить кролики, у которых, как и у приматов, при нанесении BOB на эпилированную кожу кожные поражения напоминают вакцинальный процесс у человека [1].

Ещё одним важным подходом является использование теста нейтрализации инфекционности ВНО сыворотками крови иммунизированных животных [17]. Результаты теста могут быть использованы в качестве эталонных при сравнении традиционных вакцин с вновь созданными противооспенными вакцинами.

Цель работы – проведение доклинических исследований специфической активности вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций VACΔ6 на основе вируса осповакцины с шестью нарушенными генами вирулентности.

Материалы и методы

Вирусы и культура клеток

В работе использовали вакцинный штамм и производственный штамм BOB VACΔ6 [9] и штаммы BOB Л-ИВП [18], НВ-92 [19], а также штамм К1 вируса экстремелии (ВЭ) из коллекции вирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В качестве контроля и вакцины сравнения служил отраслевой стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины ОСО 42-28-113-2015 (далее – ОСО оспенной вакцины) [20], аттестованный на основе Вакцины оспенной живой (серия № 130406, штамм BOB Л-ИВП) производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ (вакцина первого поколения) [21], полученный из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ.

Вирус VACΔ6 размножали на перевиваемой линии клеток почки африканской зеленой мартышки 4647, полученной из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и аттестованной ГИСК им. Л. А. Тарасевича в соответствии с требованиями РД 42-28-10-89 и рекомендованной для производства профилактических МИБП (протокол № 14 от 28.10.2003 г. заседания Ученого Совета ГИСК им. Л. А. Тарасевича; протокол № 9 от 20.11.2003 г. Комитета МИБП).

Животные

Мыши линии BALB/с, аутбредные мыши стока ICR, морские свинки гладкошерстной породы и кролики породы Шиншилла получены 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 были проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 26.05.2017).

Наработка готовой лекарственной формы (ГЛФ) вакцины VACΔ6

Монослой культуры клеток 4647, выращенный в культуральных флаконах (площадь ростовой поверхности одного флакона 150 см²), инфицировали производственным штаммом BOB VACΔ6 с множественностью 0,1 БОЕ/кл. Инкубировали 48–72 ч. при температуре 37 °С до выявления полного цитопатического действия, после чего получали криолизат инфицированных клеток (три цикла замораживания-оттаивания), который обрабатывали

на ультразвуковом дезинтеграторе. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 15 мин. при 5000 об./мин. и 4 °С. Вирус из полученного супернатанта осаждали центрифугированием при 14000 об./мин. и 4 °С в течение 2 ч. Осадок ресуспендировали в 0,9% растворе натрия хлорида, обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе и добавляли к полученному препарату стабилизатор в составе: сахара (3%), пептон (3%) и желатоза (3%), после чего разливали в ампулы стеклянные для фармацевтической промышленности по ISO 9187, (Лонг Шенг Фарма Лимитед, Гонконг), по 0,2 мл и лиофильно высушивали.

Готовая лекарственная форма вакцины VACΔ6 была аттестована в Отделе биологического и технологического контроля ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в соответствии с проектом фармакопейной статьи предприятия, разработанным с учётом требований Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты) [11], Государственной фармакопеи XIII [22] и Европейской Фармакопеи 7.0 [13].

Исследование безвредности серий ГЛФ вакцины VACΔ6

Изучение аномальной токсичности (безвредности) трёх серий препарата «Вакцина VACΔ6» на животных проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII (том 1, с. 947, ОФС. 1.2.4.0004.15 «Аномальная токсичность») [22] и Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты), часть вторая (с. 121 и 488) [11].

Для определения аномальной токсичности каждой серии ГЛФ VACΔ6 использовали пять белых мышей ICR весом 17–20 г и двух морских свинок массой 250–300 г. Содержимое ампул растворяли в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида (использовано по 7 ампул каждой серии вакцины).

Препарат по 1 мл вводили мышам внутривенно, а морским свинкам – подкожно. Наблюдение за животными осуществляли ежедневно в течение 7 сут с регистрацией всех изменений состояния и здоровья каждого животного.

Исследование пирогенности серий ГЛФ вакцины VACΔ6

Исследование осуществляли в соответствии с требованиями, изложенными в ГФ XIII, том 1, с. 951, ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность» [22]. Тест-доза препарата – 1 прививочная доза на 1 кролика. Для разведения использовали изотонический раствор (0,9%) натрия хлорида для инъекций (ФС.2.2.0014.15).

Исследование пирогенности проводили на здоровых кроликах массой 2,5–2,8 кг, ранее не использованных в работе. В течение 3 сут перед опытом у каждого подопытного кролика ежедневно утром до дачи корма измеряли температуру и массу

тела. В результате были отобраны 9 кроликов, которые в течение этого срока не теряли в массе тела и температура тела которых не превышала 39,5 °С. Согласно требованиям ГФ, на каждую серию использовали по 3 кролика.

Вечером накануне испытания у животных отбирали остаток корма, до и во время опыта корм животные не получали, воду давали без ограничения.

В день испытания перед введением вакцины каждого кролика взвешивали и, с интервалом 30 мин., дважды измеряли температуру тела. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не превышали 0,2 °С. За исходную температуру принимали величину последнего результата измерения перед введением препарата. Содержимое ампулы ГЛФ растворяли в 1,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида и вводили в ушную вену не позднее, чем через 15–30 мин. после последнего измерения температуры, – 1 доза на кролика.

Измерения температуры после введения препарата осуществляли с интервалом 30 мин. в течение трёх часов.

Результаты и обсуждение

В процессе выполнения исследований по подготовке к доклиническим исследованиям было наработано 446 ампул вакцинного штамма и затем 600 ампул производственного штамма VACΔ6 BOB и заложено на хранение. Производственный штамм VACΔ6 BOB был использован для наработки посевного материала и далее изготовления серий ГЛФ Вакцины против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций на основе вируса осповакцины, живой культуральной (далее – Вакцина VACΔ6).

Наработали три серии ГЛФ «Вакцина VACΔ6»: 01-05.17, 02-05.17 и 03-05.17 в количестве 943, 938 и 882 ампул соответственно.

Изучение стабильности вакцины VACΔ6 при хранении

Изучение стабильности лиофильно высушенного производственного штамма VACΔ6 BOB оценивали при помощи стандартного теста ускоренного хранения, рекомендованного Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты) [11], при температуре 37 ± 1 °С в течение 28 суток с последующим определением специфической активности, а также при длительном хранении при температуре от 2 до 8 °С с периодической оценкой специфической активности через каждые 3 месяца хранения.

Специфическую активность оценивали путём титрования в каждой временной точке содержимого трёх ампул производственного штамма, хранившихся при разных температурных условиях. Для этого содержимое ампулы растворяли в 1 мл среды DMEM. Из приготовленного таким образом вирусосодержащего материала готовили

Original Articles

последовательные 10-кратные разведения на среде DMEM и титровали на монослое культуры клеток 4647 методом бляшек. Титр вируса определяли в бляшкообразующих единицах в мл (БОЕ/мл).

Тест ускоренного хранения показал, что титр производственного штамма VACΔ6 BOB после прогревания при температуре 37 °С в течение 28 суток снизился с исходного $1,11 \pm 0,32 \times 10^7$ БОЕ/мл до $0,16 \pm 0,02 \times 10^7$ БОЕ/мл. После хранения при температуре от 2 до 8 °С в течение более 5 лет (63 месяца) (табл. 1) защитный титр препарата практически остался на одном уровне.

На основании полученных результатов можно заключить, что производственный штамм VACΔ6 высоко стабилен при температуре хранения от 2 до 8 °С.

Специфическая активность серий ГЛФ вакцины VACΔ6 на хорион-аллantoисных оболочках развивающихся куриных эмбрионов (ХАО РКЭ)

Инфекционный титр ГЛФ штамма VACΔ6 BOB в ампулах каждой серии также определяли путём

заражения жизнеспособных 11–12 суточных РКЭ с предварительно отслоенными ХАО и последующим подсчетом специфических поражений (оспин) на них, вызванных BOB. Для этого содержимое трёх ампул каждой серии ГЛФ VACΔ6 растворяли в 3 мл раствора Хэнкса с добавлением стрептомицина (концентрация 100 мкг/мл) и пенициллина (концентрация 100 Ме/мл). Из исходного образца вирусосодержащей жидкости готовили последовательные 10-кратные разведения в 1 мл раствора Хэнкса с антибиотиками. Препарат ОСО оспенной вакцины готовили согласно инструкции по применению. В РКЭ вводили с помощью автоматической пипетки через отверстие в скорлупе по 100 мкл приготовленных разведений ГЛФ вакцины VACΔ6 и ОСО оспенной вакцины на предварительно отслоенную ХАО. Обработанные таким способом РКЭ инкубировали при температуре 37 °С и относительной влажности 80–90% в течение 3 суток. По завершении срока инкубации исследовали ХАО на наличие оспин (оспинообразующих единиц,

Таблица 1. Стабильность производственного штамма VACΔ6 при хранении в условиях 2–8 °С
Table 1. Stability of the production strain VACΔ6 when stored at 2–8 °C

Срок хранения, месяц Shelf life, month	Специфическая активность производственного штамма вируса осповакцины VACΔ6, БОЕ ± станд. отклонение/ампула Specific activity of the production strain of the vaccinia virus VACΔ6, PFU ± standard. deviation/ampoule
1	$(8,39 \pm 1,04) \times 10^6$
5	$(1,43 \pm 0,01) \times 10^7$
7	$(9,20 \pm 1,13) \times 10^6$
9	$(8,08 \pm 0,11) \times 10^6$
12	$(1,16 \pm 0,04) \times 10^7$
19	$(8,55 \pm 1,49) \times 10^6$
21	$(7,18 \pm 1,31) \times 10^6$
25	$(9,93 \pm 0,87) \times 10^6$
27	$(7,26 \pm 2,73) \times 10^6$
30	$(8,71 \pm 2,20) \times 10^6$
33	$(9,81 \pm 3,45) \times 10^6$
36	$(9,82 \pm 0,53) \times 10^6$
39	$(9,75 \pm 0,50) \times 10^6$
42	$(1,13 \pm 0,34) \times 10^7$
45	$(1,37 \pm 0,15) \times 10^7$
48	$(1,25 \pm 0,26) \times 10^7$
51	$(6,42 \pm 0,58) \times 10^6$
54	$(1,11 \pm 0,16) \times 10^7$
57	$(1,39 \pm 0,09) \times 10^7$
60	$(9,75 \pm 0,25) \times 10^6$
63	$(6,03 \pm 0,13) \times 10^6$

ООВ), вызванных ВОВ, подсчитывали их количества. Морфология оспин на ХАО РКЭ для VACΔ6 и ОСО оспенной вакцины была одинакова.

Концентрация ВОВ составила для серий ГЛФ VACΔ6 01-05.17 – $1,0 \pm 0,3 \times 10^7$ ООВ/ампула, 02-05.17 – $0,9 \pm 0,3 \times 10^7$ ООВ/ампула и 03-05.17 – $1,0 \pm 0,6 \times 10^7$ ООВ/ампула.

Концентрация ВОВ в ОСО оспенной вакцины составила $4,8 \pm 1,1 \times 10^8$ ООВ/ампула.

Безвредность серий ГЛФ вакцины VACΔ6

При изучении аномальной токсичности в течение всего срока наблюдения не выявлено гибели, заболеваний, уменьшения массы тела, развития некроза или абсцесса ни у одного животного, что свидетельствует об отсутствии аномальной токсичности у исследуемых серий вакцины VACΔ6.

В тесте пирогенности на трёх кроликах для каждой серии ГЛФ определяли максимальное изменение температуры тела для каждого из кроликов по сравнению с исходным значением. Индивидуальное повышение температуры ни у одного из кроликов не превысило $0,4^\circ\text{C}$, что свидетельствует об отсутствии пирогенных свойств у вакцины VACΔ6.

Нейровирулентные свойства вакцинного штамма VACΔ6 при интрацеребральном введении мышам-сосункам

При оспопрививании классической живой вакциной многообразные формы осложнений можно объединить в три большие группы: неврологические, кожные и соматические [1]. Поскольку к наиболее тяжёлым побочным реакциям при иммунизации классической живой оспенной вакциной относятся неврологические осложнения, важно проводить оценку нейровирулентности созданного вакцинного штамма VACΔ6. Наиболее чувствительным тестом нейровирулентности ВОВ является интрацеребральное инфицирование мышей-сосунков [16].

Трёх группам мышей-сосунков линии BALB/c по 10 животных интрацеребрально вводили по 10 мкл вакцинного штамма VACΔ6 ВОВ в дозе 10^2 БОЕ/мышь. В качестве препарата сравнения использовали ОСО оспенной вакцины в такой же дозе. Через трое суток после введения вируса трёх мышей из каждой группы подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, стерильно извлекали пробы головного мозга, помещали в пробирку и хранили при минус 80°C до титрования. Непосредственно перед титрованием пробы размораживали, гомогенизировали с последующим приготовлением 10% тканевой суспензии на среде DMEM, затем после трёх актов замораживания-оттаивания проводили обработку на ультразвуковом дезинтеграторе и осветление полученного гомогената центрифугированием (5000 об./мин., 10 мин., 4°C). В полученных супернатантах определяли концентрации вирусов

титрованием методом бляшек в монослое культуры клеток 4647 [18].

За оставшимися мышами (7 животных/группа) наблюдали в течение двух недель, учитывая количество выживших и погибших животных. В трёх независимых группах мышей, инфицированных VACΔ6 ВОВ, были выявлены сравнимые показатели нейровирулентности, и выжило 40–50% мышей, в то время как для ОСО оспенной вакцины в той же дозе наблюдалась полная гибель животных (рис. 1). Полученные результаты согласуются со среднегеометрическими значениями вирусной нагрузки в мозге мышей на третьи сутки после инфицирования (рис. 2).

Таким образом, выполненные эксперименты показали значительно сниженную нейровирулентность вакцины четвёртого поколения VACΔ6 по сравнению с классической оспенной живой вакциной первого поколения, разрешённой для использования в России.

Воспалительно-некротические свойства ГЛФ вакцины VACΔ6 при внутрикожном введении кроликам

Осложнения с поражением кожи после противосспенной вакцинации являются важным параметром, который необходимо контролировать при разработке новых поколений безопасных вакцин на основе ВОВ. Испытание трёх серий ГЛФ вакцины VACΔ6 (01-05.17, 02-05.17 и 03-05.17) проводили на шести белокожих кроликах породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг. На предварительно депилированных участках кожи боковой поверхности тела кроликов площадью около 5 см^2 внутрикожно вводили по 100 мкл вакцины в разведениях 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} . Для разведения использовали 0,9% раствор натрия хлорида. На симметричные участки боковой поверхности тела животных аналогично испытываемому образцу наносили разведения ОСО оспенной вакцины.

Через пять суток у животных обеих групп визуально оценивали образование в местах инъекции типичных вакцинальных поражений (папула, везикула, оспина). Было показано (табл. 2), что в местах введения разведений серий ГЛФ VACΔ6 образуются поствакцинальные поражения, аналогичные вызываемым введением разведений ОСО оспенной вакцины, но они менее интенсивны и имеют меньшие размеры, чем поражения, вызываемые ОСО оспенной вакцины, что указывает на снижение воспалительно-некротических свойств вакцины VACΔ6 относительно классической вакцины оспенной живой.

Иммуногенность вакцины VACΔ6 при внутрикожном введении кроликам

При массовой вакцинации важное значение имеют выбор оптимальной минимальной дозы и схемы введения вакцины для достижения долговременного иммунитета против соответствующего

Рисунок 1. Динамика гибели мышей-сосунков, интрацеребрально инфицированных вакцинным штаммом VACΔ6 BOB (группы VACΔ6-1, VACΔ6-2, VACΔ6-3) в сравнении с ОСО оспенной вакцины в дозе 10^2 БОЕ/мышь
Figure 1. Changes in the death rate in newborn mice intracerebrally inoculated with the VACΔ6 VACV vaccine strain (VACΔ6-1, VACΔ6-2, VACΔ6-3 groups) in comparison with the branch standard sample (BSS) of smallpox vaccine at a dose of 10^2 PFU/mouse

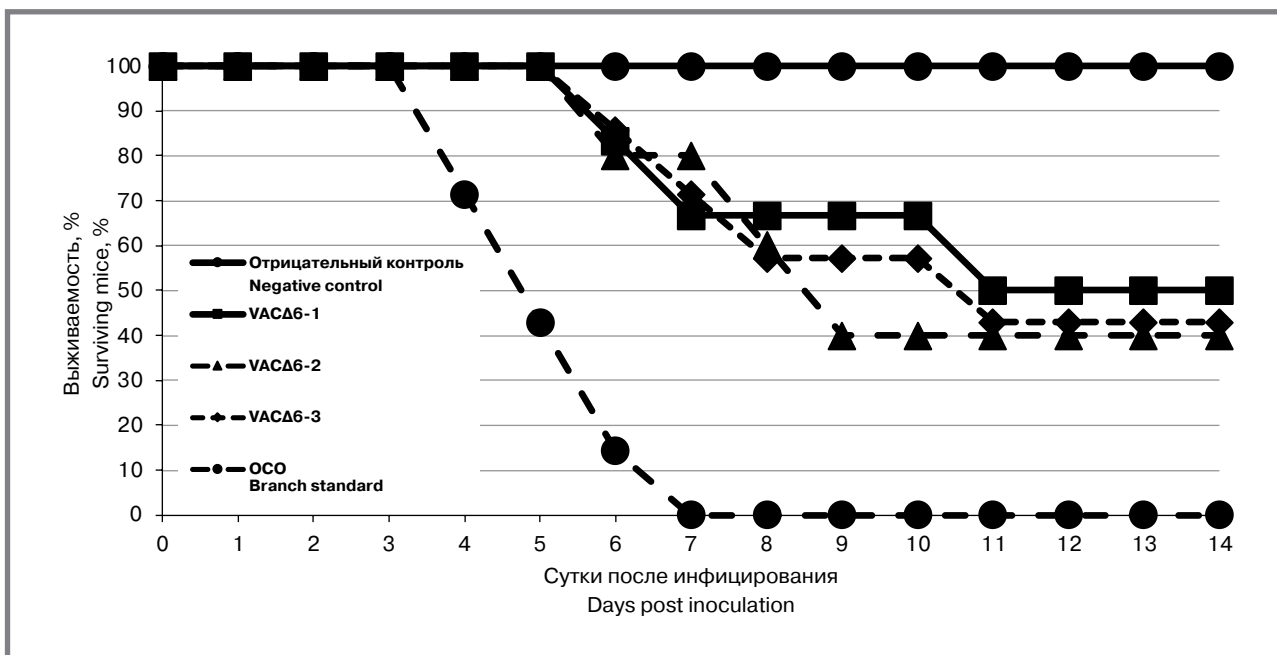
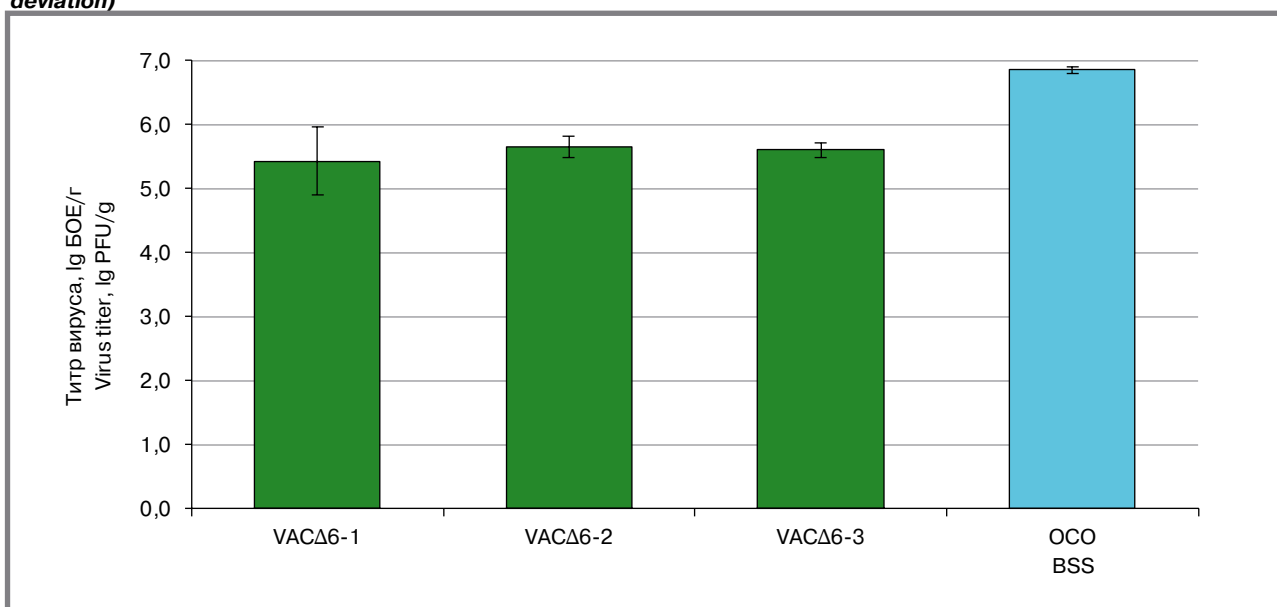


Рисунок 2. Среднегеометрические значения титров BOB в мозге мышей-сосунков на третьи сутки после интрацеребрального заражения вакцинным штаммом VACΔ6 (группы VACΔ6-1, VACΔ6-2, VACΔ6-3) в дозе 10^2 БОЕ/мл в сравнении с инфекцией в той же дозе ОСО оспенной вакцины (данные приведены в виде среднего значения $\log_{10}$ БОЕ/г органа $\pm$ стандартное отклонение)
Figure 2. Geometric mean values of VACV titers in the brain of newborn mice on day 3 after intracerebral inoculation with the VACΔ6 vaccine strain (VACΔ6-1, VACΔ6-2, VACΔ6-3 groups) at a dose of 10^2 PFU/ml in comparison with infection of the smallpox vaccine branch standard sample (BSS) at the same dose (data reported as mean $\log_{10}$ PFU/g organ $\pm$ standard deviation)

Figure 2. Geometric mean values of VACV titers in the brain of newborn mice on day 3 after intracerebral inoculation with the VACΔ6 vaccine strain (VACΔ6-1, VACΔ6-2, VACΔ6-3 groups) at a dose of 10^2 PFU/ml in comparison with infection of the smallpox vaccine branch standard sample (BSS) at the same dose (data reported as mean $\log_{10}$ PFU/g organ $\pm$ standard deviation)



инфекционного агента. На модели кроликов нами проведено сравнение уровней BOB-специфичных вируснейтрализующих антител на 42-е сутки, 6-й и 12-й месяцы после однократной внутрикожной инъекции вакцины VACΔ6 в дозе 10^7 БОЕ или двукратной внутрикожной инъекции с интервалом

21 сутки в дозе 10^6 БОЕ. В качестве контроля сравнения использовали препарат ОСО оспенной вакцины. Содержимое ампулы ОСО растворяли в 2 мл растворителя для оспенной вакцины. 0,1 мл полученного препарата вакцины с помощью автоматической пипетки наносили на предварительно

Таблица 2. Данные изучения воспалительно-некротической активности ГЛФ вакцины VACΔ6 ВОВ и ОСО оспенной вакцины у кроликов

Table 2. Data on the study of inflammatory-necrotic activity of the FDF of the vaccine VACΔ6 and the branch standard sample (BSS) of smallpox vaccine in rabbits

Доза (ООЕ/животное) Dose (PFU/animal)	Характер/размер (мм) элементов специфической сыпи в месте инъекции Type/size (mm) of specific rash elements at the injection site			
	Кролик № 1 Rabbit No. 1		Кролик № 2 Rabbit No. 2	
	VACΔ6-01-05.17	ОСО BSS	VACΔ6-01-05.17	ОСО BSS
10 ³	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3
10 ⁴	оспина/2 pustule/2	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3	папула papula	оспина/3 x 5 pustule/3 x 5
10 ⁵	оспина/2 pustule/2	оспина/5 x 6 pustule/5 x 6	оспина/2 pustule/2	оспина/3 x 5 pustule/3 x 5
	Кролик № 3 Rabbit No. 3		Кролик № 4 Rabbit No. 4	
	VACΔ6-02-05.17	ОСО BSS	VACΔ6-02-05.17	ОСО BSS
	папула papula	оспина/2 x 3 pustule	папула papula	оспина/1 x 3 pustule/1 x 3
10 ³	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3	папула papula	оспина/3 x 4 pustule/3 x 4
10 ⁴	оспина/1 x 2 pustule/1 x 2	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3	папула papula	оспина/3 x 4 pustule/3 x 4
10 ⁵	оспина/1 x 3 pustule/1 x 3	оспина/5 pustule/5	папула papula	оспина/10 pustule/10
	Кролик № 5 Rabbit No. 5		Кролик № 6 Rabbit No. 6	
	VACΔ6-03-05.17	ОСО BSS	VACΔ6-03-05.17	ОСО BSS
	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3
10 ³	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3
10 ⁴	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3	папула papula	оспина/2 x 3 pustule/2 x 3
10 ⁵	четыре оспины four pustules	много сливных оспин confluent pustules	везикула/1 vesicle/1	оспина/2 x 4 pustule/2 x 4

подготовленный участок депилированной кожи кролика одной каплей. В месте нанесения вакцины (сквозь каплю) стерильным медицинским скарификатором делали одиночный некровотокающий надрез (царапину) длиной 0,5 см и втирали вакцину в место надреза плоской стороной того же скарификатора. При этом вакцинирующая доза была не менее 10⁷ БОЕ.

Результаты этих экспериментов, представленные на рисунке 3, показали, что двукратная иммунизация кроликов вакциной VACΔ6 в дозе 10⁶ БОЕ обеспечивает более напряженный иммунный ответ в течение длительного времени по сравнению с однократной внутрикожной инъекцией вакцины в дозе 10⁷ БОЕ. При этом уровень вируснейтрализующих антител, индуцируемых разработанной аттенуированной вакциной VACΔ6, не имел достоверных отличий от аналогичного показателя для ОСО оспенной вакцины.

Важным тестом на соответствие по иммуногенности новой вакцины VACΔ6 классической

противооспенной вакцине первого поколения является сравнение уровней вируснейтрализующих антител, синтезированных в организме иммунизированных кроликов, относительно ВНО [17]. Результаты таких исследований с использованием штаммов ВНО Ind-3a и Butler, представленные на рисунке 4, показывают, что живая аттенуированная вакцина четвертого поколения VACΔ6 после двукратной иммунизации кроликов в дозе 10⁶ БОЕ индуцирует ВНО-нейтрализующие антитела на уровне, характерном для Вакцины оспенной живой первого поколения.

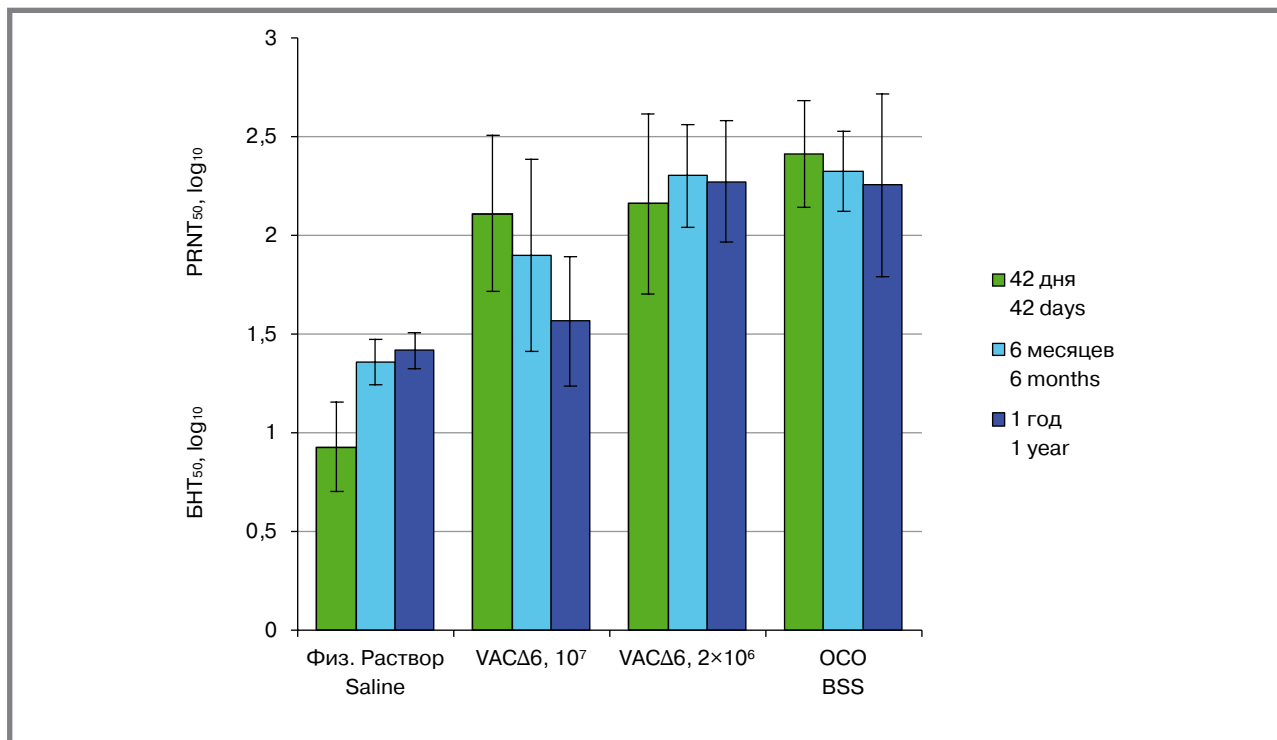
Изучение защитной эффективности серий ГЛФ вакцины VACΔ6 на мышах

Для изучения протективного иммунного ответа самок мышей линии BALB/c с массой тела 15–18 г дважды внутрикожно иммунизировали сериями ГЛФ вакцины VACΔ6 (с интервалом 21 сутки между иммунизациями; по 8 животных на серию) в дозе

Рисунок 3. Обратные титры антител, нейтрализующих образование 50% бляшек (БНТ₅₀) ВОВ LIVP на культуре клеток Vero, после иммунизации кроликов вакциной VACΔ6 однократно в дозе 10⁷ БОЕ, а также ОСО оспенной вакцины в дозе 10⁷ БОЕ

Указано время взятия сывороток крови после начала иммунизации

Figure 3. Reciprocal geometric mean titers of antibodies neutralizing the formation of 50% plaques (PRNT₅₀) of VACV LIVP in a Vero cell culture, after immunization of rabbits with the VACΔ6 vaccine once at a dose of 10⁷ or twice at a dose of 10⁶ PFU, as well as the branch standard sample (BSS) of smallpox vaccine at a dose of 10⁷ PFU. The time of blood serum sampling after the start of immunization is indicated



10⁶ ООЕ/животное. При этом каждому животному вводили 0,01 мл (1 доза) вакцины из ампулы, содержимое которой предварительно восстанавливали в 0,1 мл физиологического раствора (по 2 ампулы каждой серии на обе вакцинации). Контрольную группу (8 животных) иммунизировали двукратно внутрикожно в дозе 10⁶ ООЕ/0,01 мл/животное препаратом ОСО оспенной вакцины. Группу отрицательного контроля (12 животных) составили интактные мыши.

Для определения уровня защиты вакцинированных животных использовали интраназальную инокуляцию летального для мышей штамма К1 ВЭ. Для определения ЛД₅₀ разрешающего вируса использовали самок мышей линии BALB/с с массой тела 21–23 г, которым после предварительной наркотизации диэтиловым эфиром интраназально вводили десятикратные разведения ВЭ в дозе от 3 × 10¹ до 3 × 10⁵ БОЕ/0,03 мл/животное, используя по 10 животных на разведение вируса. После заражения животных в течение 21 суток учитывали их гибель, исключая погибших в первые двое суток, как умерших от манипуляций. Величина ЛД₅₀ для ВЭ составила 1,3 lg БОЕ/животное.

Через 21 сутки после второго введения вакцины животных интраназально заражали десятикратными разведениями препарата штамма К1 ВЭ в объеме 0,03 мл, используя по 4 животных на дозу, после предварительной наркотизации их парами

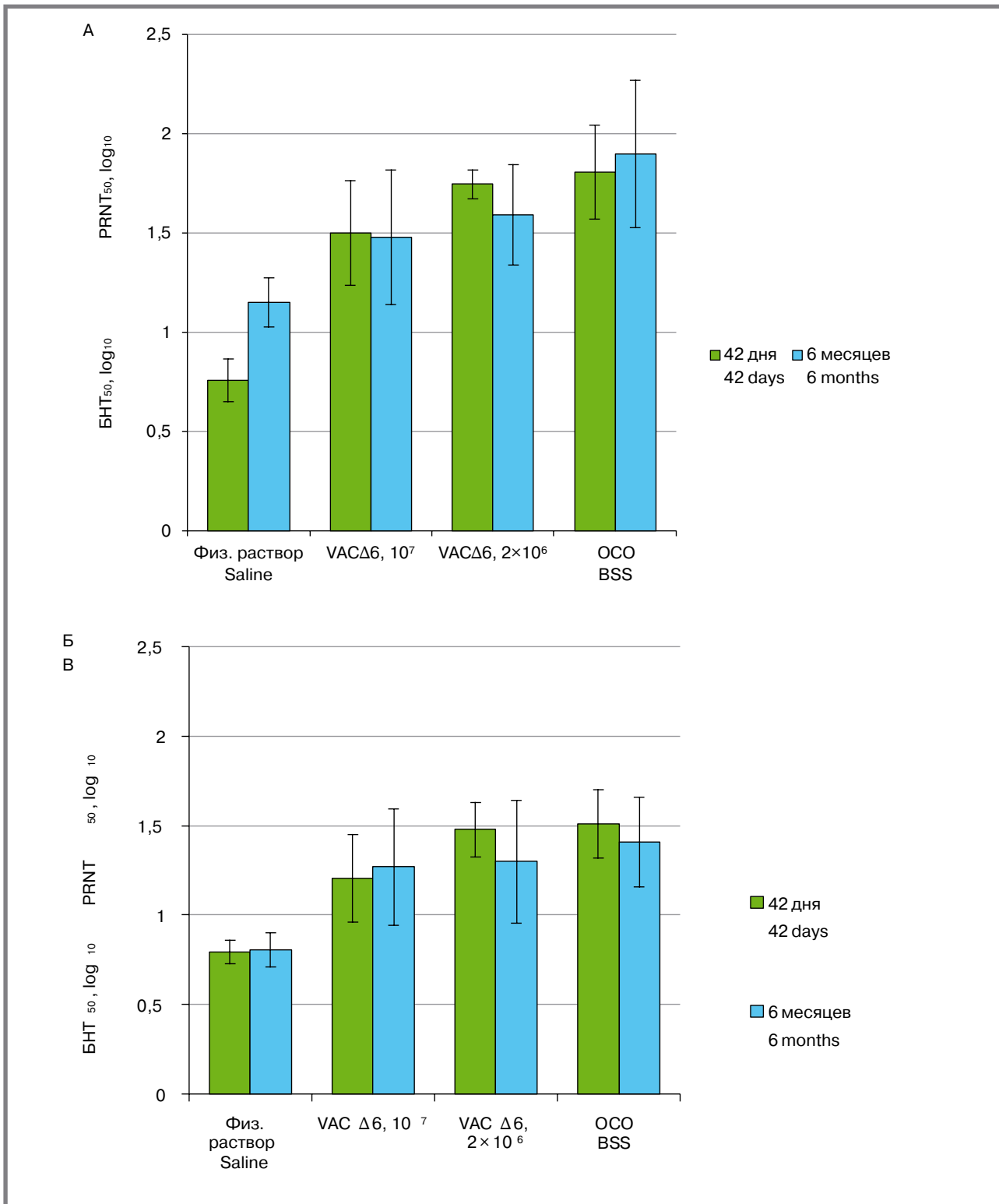
диэтилового эфира. После инфицирования мышей регистрировали их гибель в группах в течение 21 суток. Результаты этого эксперимента (табл. 3) показали, что двукратное внутрикожное введение VACΔ6 в дозе 10⁶ ООЕ/мышь для всех трех серий ГЛФ обеспечивает 100% защитный эффект против интраназального инфицирования мышей штаммом К1 ВЭ в дозе 56ЛД₅₀ (3,05 lg БОЕ), демонстрируя протективные свойства на уровне ОСО оспенной вакцины.

Кроме того, на 19-е сутки после второй иммунизации тремя сериями исследуемой вакцины проводили оценку гуморального иммунного ответа. Для этого у всех животных, предварительно наркотизированных диэтиловым эфиром, прижизненно забирали образцы крови из ретроорбитального венозного синуса, из которых после формирования фибринового сгустка и последующего центрифугирования отбирали сыворотки, в которых после тепловой обработки определяли титры ВОВ-нейтрализующих антител на культуре клеток 4647.

Оценку титров противооспенных антител проводили в реакции нейтрализации с применением штамма Л-ИВП ВОВ по ранее описанному методу [23], используя последовательные пятикратные разведения исследуемых сывороток, которые смешивали с рабочим разведением ВОВ (50 БОЕ/лунка). Полученную смесь инкубировали в течение 1 ч. при 37 °С, после чего наносили на монослой культуры клеток 4647, предварительно выращенный

Рисунок 4. Обратные титры антител, нейтрализующих образование 50% бляшек (БНТ₅₀) ВНО штаммы Ind-3a (А) или Butler (Б) на культуре клеток Vero, после иммунизации кроликов вакциной VACΔ6 однократно в дозе 10⁷ или двукратно в дозе 10⁶ БОЕ, а также ОСО ослепленной вакцины в дозе 10⁷ БОЕ
Указано время взятия сывороток крови после начала иммунизации

Figure 4. Reciprocal geometric mean titers of antibodies neutralizing the formation of 50% plaques (PRNT₅₀) of VARV strains Ind-3a (A) or Butler (B) in a Vero cell culture, after immunization of rabbits with the VACΔ6 vaccine once at a dose of 10⁷ or twice at a dose of 10⁶ PFU, as well as the branch standard sample (BSS) of smallpox vaccine at a dose of 10⁷ PFU. The time of blood serum sampling after the start of immunization is indicated



в 24-луночных культуральных планшетах. Титр сыворотки, подавляющий образование 50% БОЕ BOB по сравнению с количеством БОЕ в лунках

с неиммунной сывороткой, рассчитывали по методу Спирмена-Кербера [24] и выражали в виде 50% бляшкоподавляющего нейтрализующего титра

Таблица 3. Защитная эффективность серий ГЛФ вакцины VACΔ6 и ОСО оспенной вакцины у мышей линии BALB/c, интраназально инфицированных летальными дозами ВЭ штамм К1

Table 3. Protective efficacy of VACΔ6 series of FDF vaccine and BSS of smallpox vaccine in BALB/c mice intranasally infected with lethal doses of ECTV K1 strain

Доза ВЭ, Ig БОЕ/ животное Dose of ECTV, Ig PFU/animal	Количество погибших/заражённых мышей Number of dead/infected mice				
	Серия ГЛФ вакцины VACΔ6 Series of FDF vaccine VACΔ6			ОСО BSS	Физ. Раствор Saline
	01-05.17	02-05.17	03-05.17		
1,05	-	-	-	-	2/4
2,05	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4
3,05	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4

Таблица 4. Уровень гуморального иммунного ответа у мышей после двукратной внутрикожной вакцинации сериями ГЛФ вакцины VACΔ6 или ОСО оспенной вакцины

Table 4. The level of humoral immune response in mice after double intradermal vaccination with a series of FDF vaccine VACΔ6 or BSS smallpox vaccine

Показатель Indicator	Значения показателей гуморального иммунного ответа у мышей на 19 сут после двукратной вакцинации Values of humoral immune response indicators in mice on day 19 after double vaccination			
	Серия ГЛФ вакцины VACΔ6 Series of FDF vaccine VACΔ6			ОСО BSS
	01-05.17	02-05.17	03-05.17	
СГТ (БНТ ₅₀ /мл) GMT (PNT ₅₀ /ml)	1082	722	854	1082
I _{95мин} - I _{95макс}	677-1730	453-1150	475-1536	654-1791
Сероконверсия Seroconversion (%)	100	100	100	100

Примечание: СГТ – средний геометрический титр; БНТ₅₀ – 50% бляшкоредактирующий нейтрализующий титр; I_{95мин}-I_{95макс} – диапазон значений с доверительной вероятностью 95%; сероконверсия – доля сывороток с титром, превышающим пороговое значение 150 БНТ₅₀/мл, измеренное для группы отрицательного контроля (при p<0,05).

Note: GMT – Geometric mean values of titers; PNT₅₀ – 50% plaque-reducing neutralizing titer; I_{95min}-I_{95max} – a range of values with a confidence probability of 95%; Seroconversion is the proportion of sera with a titer exceeding the threshold value of 150 PNT₅₀/ml, measured for the negative control group (at p<0.05).

в 1 мл сыворотки (БНТ₅₀/мл). Для групп образцов сывороток рассчитывали значение среднего геометрического титров противооспенных антител. Результаты исследования приведены в таблице 4.

Проведённые исследования показали, что уровни ВОВ-нейтрализующих антител в периферической

крови животных, вакцинированных испытуемыми сериями ГЛФ вакцины VACΔ6, не имели достоверных отличий от аналогичных показателей в группе, иммунизированной ОСО оспенной вакцины.

На основании полученных результатов можно заключить, что двукратная внутрикожная

Таблица 5. Протективность серий ГЛФ вакцины VACΔ6 и ОСО оспенной вакцины у кроликов, интраназально инфицированных летальными дозами ВОВ штамма HB-92

Table 5. Protective efficacy of VACΔ6 series of FDF vaccine and BSS of smallpox vaccine in rabbits intranasally infected with lethal doses of VACV HB-92 strain

Доза ВОВ, Ig БОЕ/животное Dose of VACV, Ig PFU/animal	Количество погибших/заражённых кроликов Number of dead/infected rabbits				
	Серия ГЛФ вакцины VACΔ6 Series of FDF vaccine VACΔ6			ОСО BSS	Физ. Раствор Saline
	01-05.17	02-05.17	03-05.17		
1,9	-	-	-	-	3/4
2,9	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4
3,9	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4
4,9	0/4	0/4	0/4	0/4	-

Таблица 6. Уровень гуморального иммунного ответа у кроликов после двукратной внутрикожной вакцинации ГЛФ вакцины VACΔ6

Table 6. The level of humoral immune response in rabbits after double intradermal vaccination with a series of FDF vaccine VACΔ6 or BSS smallpox vaccine

Показатель Indicator	Значения показателей гуморального иммунного ответа у кроликов на 21 сут после двукратной вакцинации Values of humoral immune response indicators in rabbits on day 21 after double vaccination			
	Серия ГЛФ вакцины VACΔ6 Series of FDF vaccine VACΔ6			ОСО BSS
	01-05.17	02-05.17	03-05.17	
СГТ (БНТ ₅₀ /мл) GMT (PNT ₅₀ /ml)	820	802	780	827
I _{95мин} –I _{95макс}	634-1006	586-1018	402-1158	695-959
Сероконверсия (Seroconversion (%))	100	100	100	100

Примечание: СГТ – среднее геометрическое титров; БНТ₅₀ – 50% бляшкоредуцирующий нейтрализующий титр; I_{95мин}–I_{95макс} – диапазон значений с доверительной вероятностью 95%; сероконверсия – доля сывороток с титром, превышающим пороговое значение 150 БНТ₅₀/мл, измеренное для группы отрицательного контроля (при $p < 0,05$).

Note: GMT – Geometric mean values of titers; PNT₅₀ – 50% plaque-reducing neutralizing titer;

I_{95min}–I_{95max} – a range of values with a confidence probability of 95%; Seroconversion is the proportion of sera with a titer exceeding the threshold value of 150 PNT₅₀/ml, measured for the negative control group (at $p < 0.05$).

вакцинация ГЛФ вакцины VACΔ6 в дозе 10⁶ ООЕ/мышь обеспечивает 100% защитный эффект против интраназального инфицирования мышей штаммом К1 ВЗ в дозе 56 ЛД₅₀, демонстрируя протективные свойства на уровне противооспенной вакцины первого поколения.

Изучение эффективности серий ГЛФ вакцины VACΔ6 на кроликах

Изучение протективного иммунного ответа проводили на кроликах породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг (12 животных на серию ГЛФ). Животных дважды внутрикожно иммунизировали ГЛФ вакцины VACΔ6 в дозе 10⁶ ООЕ/0,05 мл с интервалом 21 сутки между иммунизациями. Контрольную группу (12 кроликов) иммунизировали ОСО оспенной вакцины двукратно внутрикожно в дозе 10⁶ ООЕ/животное в объеме 0,05 мл. Группе отрицательного контроля (12 кроликов) дважды внутрикожно вводили физиологический раствор в объеме 0,05 мл с интервалом 21 сутки. Через 20 суток после второго введения у всех животных отбирали образцы крови из краевой вены уха для получения сыворотки (как описано выше при изучении эффективности серий вакцины на мышинной модели) с последующим определением титров противооспенных антител в реакции нейтрализации на культуре клеток 4647.

Для определения уровня защиты вакцинированных животных использовали интраназальную инокуляцию летального для кроликов штамма НВ-92 ВОВ. Величина ЛД₅₀ в эксперименте для штамма НВ-92 составила 1,6 lg БОЕ/животное.

Через 21 сутки после второго введения вакцины животных интраназально заражали разными дозами ВОВ штамм НВ-92 в объеме 1,0 мл, используя по 4 животных на дозу, после предварительной наркотизации животных парами диэтилового

эфира. После заражения кроликов регистрировали их гибель в группах в течение 21 суток. Результаты эксперимента, представленные в таблице 5, позволяют заключить, что двукратная внутрикожная вакцинация ГЛФ вакцины VACΔ6 в дозе 10⁶ ООЕ/кролик обеспечивает 100% защитный эффект против интраназального инфицирования кроликов штаммом НВ-92 ВОВ в дозе 1995 ЛД₅₀, демонстрируя протективные свойства на уровне противооспенной вакцины первого поколения.

На 21-е сутки после второй иммунизации кроликов оценивали уровень гуморального иммунного ответа. Оценку титров противооспенных антител в сыворотках крови животных проводили в реакции нейтрализации с применением штамма Л-ИВП ВОВ. Разведения исследуемой сыворотки смешивали с рабочим разведением ВОВ, содержащим 400–600 БОЕ/мл. Полученную смесь инкубировали в течение 1 ч. при 37 °С, после чего наносили на монослой культуры клеток 4647, предварительно выращенный в 24-луночных культуральных планшетах. Титр сыворотки, подавляющий образование 50% БОЕ по сравнению с количеством БОЕ в контрольных лунках, рассчитывали по методу Спирмена-Кербера [24] и выражали в виде 50% бляшкоподавляющего нейтрализующего титра в 1 мл сыворотки (БНТ₅₀/мл). Для групп образцов сывороток рассчитывали средний геометрический титр противооспенных антител. Результаты исследования приведены в таблице 6.

Проведенные исследования показали, что уровни нейтрализующих ВОВ антител в периферической крови кроликов, вакцинированных испытуемыми сериями ГЛФ живой противооспенной вакцины VACΔ6, не имели достоверных отличий от аналогичных показателей в группах животных, вакцинированных ОСО оспенной вакцины.

Original Articles

Закключение

Вакцинный штамм VACΔ6 BOB демонстрирует на модели внутримозгового введения мышам-сосунам значительно уменьшенную нейровирулентность, а на модели внутрикожного введения кроликам – сниженную воспалительно-некротическую активность по сравнению с классической оспенной живой вакциной первого поколения, разрешённой для использования в России.

Доклинические исследования трёх серий ГЛФ вакцины VACΔ6 показали:

- подлинность вакцины, так как на поверхности ХАО 11-12-суточных РКЭ формируются специфические патологические образования (оспины), схожие по своей морфологии с патологическими образованиями, характерными для штамма Л-ИВП BOB. Показана идентичность кожных поражений, вызванных введением кроликам ГЛФ и препарата сравнения (ОСО оспенной вакцины № 42-28-113-2015);

- термостабильность;
- апиrogenность;
- безвредность;
- специфическую активность (при двукратной вакцинации кроликов в дозе 10^6 ООЕ/животное), обеспечивающую 100% защитный эффект против интраназального инфицирования кроликов BOB штамм НВ-92 в дозе 1995 ЛД₅₀;
- специфическую активность (при двукратной вакцинации мышей в дозе 10^6 ООЕ/животное), обеспечивающую 100% защитный эффект против интраназального инфицирования мышей ВЭ штамм К1 в дозе 56 ЛД₅₀.

Таким образом, на основании проведённого комплекса исследований можно заключить, что созданная вакцина четвёртого поколения VACΔ6 является более безопасной по сравнению с Вакциной оспенной живой первого поколения и не уступает ей по иммуногенным и протективным свойствам.

Литература

1. Маренникова С. С., Щелкунов С. Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: Товарищество научных изданий КМК, 1998. 386 с.
2. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*. 2011;29S:D49–53.
3. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., et al. *Smallpox and Its Eradication*. Geneva: World Health Organization; 1988.
4. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003756.
5. Щелкунов С. Н., Щелкунова Г. А. Нужно быть готовыми к возврату оспы. *Вопросы вирусологии*. 2019;64(5):206–14.
6. Yong S.E.F., Ng O.T., Ho Z.J.M., et al. Imported monkeypox, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(8):1826–30.
7. Noyce R.S., Lederman S., Evans D.H. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One*. 2018;13(1):e0188453.
8. Kemper A.R., Davis M.M., Freed G.L. Expected adverse events in a mass smallpox vaccination campaign. *Eff Clin Pract.* 2002;5:84–90.
9. Якубицкий С. Н., Колосова И. В., Максюттов Р. А., Щелкунов С. Н. Высокоиммуногенный вариант аттенуированного вируса осповакцины. *Доклады Академии наук*. 2016;466(2):241–4.
10. Бектимиров Т. А. Современные концепции и принципы обеспечения качества при производстве вакцинных препаратов. – Бюлл.: Вакцинация. Гарантия качества вакцин. 2000; №9.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты), часть вторая. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. М., 2012 г.
12. РД 42-28-8-89. Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения. М., 1989.
13. Европейская фармакопея. 7.0. - 7-е изд. - Москва: Ремедиум, 2011.
14. Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol Rev.* 2011;239:8–26.
15. Tschärke D.C., Smith G.L. A model for vaccinia virus pathogenesis and immunity based on intradermal injection of mouse ear pinnae. *J Gen Virol.* 1999;80:2751–5.
16. Zhang C.X., Sauder C., Malik T., et al. A mouse-based assay for the pre-clinical neurovirulence assessment of vaccinia virus-based smallpox vaccines. *Biologicals*. 2010;38:278–83.
17. Damon I.K., Davidson W.B., Hughes C.M., et al. Evaluation of smallpox vaccines using variola neutralization. *J Gen Virol.* 2009;90:1962–6.
18. Якубицкий С. Н., Колосова И. В., Максюттов Р. А., Щелкунов С. Н. Аттенуация вируса осповакцины. *Acta Naturae*. 2015;7(4):125–34.
19. Щелкунов С. Н., Сергеев А. А., Якубицкий С. Н. и др. Оценка иммуногенности и протективности вируса осповакцины LIVP-GFP на трех видах лабораторных животных. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(6):1167–72.
20. Мухачева А. В., Перекрест В. В., Мовсесянц А. А. и др. Результаты переекспертизы отраслевого стандартного образца и использование его при экспертизе качества вакцин против натуральной оспы. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2016;6:70–9.
21. Перекрест В. В., Мовсесянц А. А., Мухачева А. В. и др. Препараты для специфической профилактики натуральной оспы, зарегистрированные в Российской Федерации. *Биопрепараты*. 2013;2:4–13.
22. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. 2015. М.: МЗ РФ.
23. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., et al. Effect of the route of administration of the vaccinia virus strain LIVP to mice on its virulence and immunogenicity. *Viruses*. 2020;12(8):795.
24. Sachs, L. *Statistische Auswertungsmethoden*; Springer: Heidelberg, Germany, 1972; 193p.

References

1. Marennikova S.S., Shchelkunov S.N. *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. M.: RVR Scientific Press Ltd, 1998. 386 (In Russ.).
2. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*. 2011;29S:D49–53.
3. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., et al. *Smallpox and Its Eradication*. Geneva: World Health Organization; 1988.
4. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003756.
5. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019;64(5):206–14 (In Russ.).
6. Yong S.E.F., Ng O.T., Ho Z.J.M., et al. Imported monkeypox, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(8):1826–30.
7. Noyce R.S., Lederman S., Evans D.H. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One*. 2018;13(1):e0188453.
8. Kemper A.R., Davis M.M., Freed G.L. Expected adverse events in a mass smallpox vaccination campaign. *Eff Clin Pract.* 2002;5:84–90.
9. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Highly immunogenic variant of attenuated vaccinia virus. *Dokl Biochem Biophys.* 2016;466:35–8 (In Russ.).
10. Bektimirov T.A. Modern concepts and principles of quality assurance in the production of vaccine preparations. *Vaccination. Vaccine Prophylaxis news. Quality assurance of vaccines*. 2000;3(9) (In Russ.).
11. Mironov A.N., editor. *Guidelines for Preclinical Trials of Medicinal Products. Part 2*. Moscow: Grif i K; 2012:536 (In Russ.).
12. Preclinical testing of new medical immunobiological preparations. The main provisions. *RD 42-28-8-89*. Moscow; 1989 (In Russ.).
13. *European Pharmacopoeia 7.0*. 7th Edition. M: Group Remedium, 2011 (In Russ.).
14. Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol Rev.* 2011;239:8–26.
15. Tschärke D.C., Smith G.L. A model for vaccinia virus pathogenesis and immunity based on intradermal injection of mouse ear pinnae. *J Gen Virol.* 1999;80:2751–5.
16. Zhang C.X., Sauder C., Malik T., et al. A mouse-based assay for the pre-clinical neurovirulence assessment of vaccinia virus-based smallpox vaccines. *Biologicals*. 2010;38:278–83.

17. Damon I. K., Davidson W.B., Hughes C.M., et al. Evaluation of smallpox vaccines using variola neutralization. *J Gen Virol.* 2009;90:1962–6.
18. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae.* 2015;7(4):125–34 (In Russ.).
19. Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Yakubitskiy S.N., et al. Assessing immunogenicity and protectiveness of the vaccinia virus LVP-GFP in three laboratory animal models. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2021;11(6):1167–72 (In Russ.).
20. Mukhacheva A.V., Perekrst V.V., Movsesyants A.A., et al. The Results of re-certification of reference standard sample used for the examination of quality smallpox vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2016;15(6):70–9 (In Russ.).
21. Perekrst V.V., Movsesyants A.A., Mukhacheva A.V., et al. Preparations for the specific prophylaxis of smallpox approved in the Russian Federation // *Biopreparation (Biopharmaceuticals).* 2013;2:4–13 (In Russ.).
22. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition 2015. M.: MH RF (In Russ.).
23. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., et al. Effect of the route of administration of the vaccinia virus strain LVP to mice on its virulence and immunogenicity. *Viruses.* 2020;12(8):795.
24. Sachs, L. *Statistische Auswertungsmethoden*; Springer: Heidelberg, Germany, 1972; 193p.

Об авторах

- **Сергей Николаевич Щелкунов** – д. б. н., профессор, г. н. с. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (903) 939-94-80, snshchel@rambler.ru. ORCID: 0000-0002-6255-9745.
- **Станислав Николаевич Якубицкий** – м. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (923) 241-07-26, yakubizkiy@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0002-0496-390X.
- **Андрей Егорович Нестеров** – с. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (962) 825-21-10, nesterov_ae@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0001-7943-3287.
- **Ирина Валерьевна Колосова** – к. б. н., с. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-00, доп. 23-51, kolosova_iv@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0003-2317-4153.
- **Александр Александрович Сергеев** – к. м. н., в. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-00, доп. 22-31, sergeev_ala@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0001-8355-5551.
- **Анна Владимировна Зайковская** – к. б. н., с. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-10, zaykovskaya_av@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0002-0450-5212.
- **Алексей Сергеевич Кабанов** – к. б. н., с. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (913) 716-20-92, kabanov@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0002-6287-0912.
- **Елена Августовна Нечаева** – к. м. н., заместитель генерального директора по научной и производственной работе, зав. отделом клеточных технологий, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-00, доп. 28-33, nechayeva@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0002-7118-5749.
- **Марина Поликарповна Богрянцева** – к. б. н., заведующая отделом биологического и технологического контроля ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-00, доп. 28-37, bogryantseva@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0003-0467-5024.
- **Светлана Владимировна Усова** – к. м. н., в. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-00, доп. 29-93, usova_sv@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0001-5059-2778.
- **Наталья Сергеевна Куцерубова** – н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-00, доп. 20-27, ekutserubova_ns@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0002-5089-2225.
- **Татьяна Владимировна Трегубчак** – в. н. с., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-00, доп. 23-09, tregubchak_tv@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0001-9608-2044.
- **Елена Васильевна Гаврилова** – к. б. н., заместитель генерального директора по научной работе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 363-47-00, доп. 12-12, gavrilova_ev@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0002-7118-5749.
- **Ринат Амирович Максютков** – д. б. н., генеральный директор ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. +7 (383) 336-60-10, maksyutov_ra@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0003-1314-281X.

Поступила: 30.03.2022. Принята к печати: 15.11.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Sergei N. Shchelkunov** – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Principal Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (903) 939-94-80, snshchel@rambler.ru. ORCID: 0000-0002-6255-9745.
- **Stanislav N. Yakubitskiy** – Junior Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (923) 241-07-26, yakubizkiy@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0002-0496-390X.
- **Andrey E. Nesterov** – Senior Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (962) 825-21-10, nesterov_ae@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0001-7943-3287.
- **Irina V. Kolosova** – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-00, add. 23-51, kolosova_iv@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0003-2317-4153.
- **Alexandr A. Sergeev** – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-00, add. 22-31, sergeev_ala@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0001-8355-5551.
- **Anna V. Zaykovskaya** – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-10, zaykovskaya_av@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0002-0450-5212.
- **Alexey S. Kabanov** – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (913) 716-20-92, kabanov@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0002-6287-0912.
- **Elena A. Nechaeva** – Cand. Sci. (Med.), Deputy Director, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-00, add. 28-33, nechayeva@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0002-7118-5749.
- **Marina P. Bogryantseva** – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Biological and Technology Supervision Department, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-00, add. 28-37, bogryantseva@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0003-0467-5024.
- **Svetlana V. Usova** – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-00, add. 29-93, usova_sv@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0001-5059-2778.
- **Natalia S. Kutserubova** – Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-00, add. 20-27, kutserubova_ns@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0002-5089-2225.
- **Tatyana V. Tregubchak** – Leading Researcher, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-00, add. 23-09, tregubchak_tv@vector.nsc.ru. ORCID 0000-0001-9608-2044.
- **Elena V. Gavrilova** – Cand. Sci. (Biol.), Deputy Director for Academic Affairs, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 363-47-00, add. 12-12, gavrilova_ev@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0002-7118-5749.
- **Rinat A. Maksyutov** – ScD, Director General, FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор. +7 (383) 336-60-10, maksyutov_ra@vector.nsc.ru. ORCID: 0000-0003-1314-281X.

Received: 30.03.2022. Accepted: 15.11.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.