

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-42-50

УДК 616.912:615.371

Л.Ф. Стомба, О.В. Чухраля, А.А. Петров, С.А. Мельников, Д.И. Павельев, С.В. Борисевич

Противооспенная вакцина LC16m8: получение, свойства, перспективы*ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Российская Федерация*

Отмена обязательного оспопрививания привела к падению коллективного иммунитета, и человечество стало уязвимым к таким давно известным инфекциям, как оспа обезьян (мпок), коров, буйволов, верблюдов и вновь появившимся, вызываемым вирусами Аляска и Ахмета. Поэтому необходимы безопасные оспенные вакцины, иммуногенность которых сравнима с иммуногенностью вакцин, применяемых в период ликвидации натуральной оспы. **Цель** обзора – анализ исследований японских ученых по получению и изучению свойств противооспенной вакцины LC16m8 и оценка дальнейших перспектив применения штамма LC16m8. На основе одного из клонов Lister получена вакцина LC16m8, которая лицензирована в Японии с 1975 г. При полногеномном секвенировании выявлено, что основным ее отличием от генома исходного штамма является мутация в гене *B5R*, которая определяет его безопасность для лабораторных животных и человека. Иммуногенность вакцины на основе штамма сопоставима с иммуногенностью вакцин I поколения: Lister, Dryvax, Ikeda. По рекомендации ВОЗ вакцины II поколения ACAM 2000 и III поколения на основе штамма LC16m8 являются препаратами резерва. Однако установленная способность штамма LC16m8 при пассировании в культуре клеток спонтанно ревертировать к исходному варианту штамма Lister обусловила проведение генно-инженерных работ по делетированию гена *B5R* для получения мутанта LC16m8Δ, не способного к реверсии. Вакцина на основе штамма LC16m8Δ формально могла бы быть отнесена к препаратам IV поколения, а с учетом высокой иммуногенности и относительной безопасности этого штамма по результатам доклинических исследований возможна реальная перспектива получения на его основе современного и эффективного препарата резерва. Таким образом, анализ многолетних данных по изучению вакцины LC16m8 свидетельствует о том, что данный препарат по показателям эффективности и безопасности превосходит другие аналоги I, II и III поколений. Дальнейшие генно-инженерные работы с этим штаммом, позволившие получить безопасный, но иммуногенный геновариант штамма LC16m8Δ, – наглядный пример продуктивного движения к разработке безопасных и эффективных вакцин IV поколения.

Ключевые слова: оспенная вакцина, праймирование/бустирование, уровень сероконверсии, безопасность/иммуногенность.

Корреспондирующий автор: Борисевич Сергей Владимирович, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Стомба Л.Ф., Чухраля О.В., Петров А.А., Мельников С.А., Павельев Д.И., Борисевич С.В. Противооспенная вакцина LC16m8: получение, свойства, перспективы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2024; 3:42–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-42-50
Поступила 03.04.2024. Отправлена на доработку 12.04.2024. Принята к публ. 30.05.2024.

L.F. Stovba, O.V. Chukhraya, A.A. Petrov, S.A. Mel'nikov, D.I. Pavel'ev, S.V. Borisevich**Smallpox Vaccine LC16m8: Production, Properties, and Prospects***48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation*

Abstract. Abrogation of obligatory vaccination against smallpox has led to degradation of herd immunity and humanity has become vulnerable to long known infections, such as monkeypox (mpox), cowpox, camelpox, buffalopox and emerging ones, caused by viruses Alaska and Akhmeta. This situation demands availability of safe smallpox vaccines, the immunogenicity of which is comparable to vaccines used in the period of smallpox elimination. **The aim** of this review is to analyze the research of Japanese scientists on the production and investigation of properties of the smallpox vaccine LC16m8 and to assess further prospects for the use of the LC16m8 strain. The LC16m8 vaccine was obtained based on one of the Lister clones and has been licensed in Japan since 1975. Whole-genome sequencing revealed that its main difference from the genome of the original strain is a mutation in the *B5R* gene, which determines its safety for laboratory animals and humans. The immunogenicity of the vaccine based on this strain is comparable to the immunogenicity of the first generation vaccines: Lister, Dryvax, Ikeda. According to WHO recommendations, second generation vaccines ACAM 2000 and third generation vaccines based on the LC16m8 strain are reserve drugs. However, the established fact that the LC16m8 strain, when passaged in cell culture, spontaneously reverts to the original variant of the Lister strain led to genetic engineering work to delete the *B5R* gene to obtain the LC16m8Δ mutant, which is not capable of reversion. A vaccine based on the LC16m8Δ strain could technically be classified as a fourth generation drug, and taking into account the high immunogenicity and relative safety of this strain based on the results of preclinical studies, there is a real prospect of producing an advanced and effective reserve drug based on it. Thus, analysis of long-term data on the study of the LC16m8 vaccine indicates that this drug is superior to other analogues of the 1st, 2nd and 3rd generation in terms of effectiveness and safety. Further genetic engineering work with this strain, which made it possible to obtain a safe but immunogenic genovariant of the LC16m8Δ strain, is a clear example of a productive movement towards the development of safe and effective fourth generation vaccines.

Key words: vaccines against smallpox, priming/boosting, rate of seroconversion, safety and immunogenicity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Sergey V. Borisevich, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Stovba L.F., Chukhraya O.V., Petrov A.A., Mel'nikov S.A., Pavel'ev D.I., Borisevich S.V. Smallpox Vaccine LC16m8: Production, Properties, and Prospects. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 3:42–50. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-42-50

Received 03.04.2024. *Revised* 12.04.2024. *Accepted* 30.05.2024.

Stovba L.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>
Chukhraya O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2603-0860>
Petrov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>

Mel'nikov S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3487-5829>
Pavel'ev D.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3204-1897>
Borisevich S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

На протяжении XIX столетия для противооспенной иммунизации использовались вирусы оспы коров и лошадей [1]. Производственные штаммы вакцин на протяжении XIX в. могли содержать смеси этих двух вирусов, что приводило к различным генетическим модификациям, в результате которых образовались естественно эволюционировавшие современные штаммы вируса вакцины [2], представляющие собой препараты первого поколения, которые получали размножением возбудителя на коже телят. Вакцины, наработанные с помощью более безопасного субстрата накопления – культур клеток и использовавшие клонированные вакцинные вирусы первого поколения, представляли собой вакцины второго поколения [3].

Аттенуированные противооспенные вакцины третьего поколения получены в процессе множественных пассажей определенного штамма вируса вакцины в культуре клеток гетерологичного хозяина, что индуцирует спонтанные мутации, приводящие порой к непредсказуемым изменениям [4].

Вакцины четвертого поколения создаются с использованием генно-инженерных технологий [5].

Получение вируса вакцины, штамм LC16m8.

В 1960-х гг. в Японии для противооспенной вакцинации применялась вакцина на основе штамма Ikeda, которая обладала высокой реактогенностью по сравнению со штаммом Lister, рекомендованным для иммунизации Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). Штамм Ikeda вызывал энцефалиты с частотой около 20 человек на миллион. Наивысший риск смертельных исходов отмечен у первично вакцинированных, особенно детей [6, 7]. В связи с этим для рутинной противооспенной иммунизации в 1970-х гг. вакцины, основанные на штамме Ikeda, заменили на вакцины, основанные на штамме Lister [8].

Однако смертельные исходы продолжались. Поэтому в 1966 г. правительством Японии была сформирована группа исследователей (Smallpox Vaccine Research Group – SVRG) для создания новой противооспенной вакцины с низкой реактогенностью. К этому времени в Германии уже был получен штамм MVA вируса вакцины [9], который относился к вакцинам третьего поколения благодаря своей низкой реактогенности, но обладал недостаточной иммуногенностью и применялся только при двукратном введении. Другой аттенуированный штамм, CV-I, применялся в США. В то же время данный штамм проявлял такую нейротоксичность, которая превосходила проявляемую неаттенуированными

вакцинами Ikeda, Lister, NYC3ВН. Индуцированный им гуморальный иммунный ответ был значительно ниже, чем у вакцин Lister и Ikeda [10].

С целью получения нового вакцинного штамма группа SVRG, возглавляемая Dr. Hazhizume, поставила задачу, пользуясь новейшими технологиями того времени, получить такой вариант вируса Lister, который бы не обладал нейропатогенностью, но при однократном введении индуцировал сравнимый уровень нейтрализующих антител [11].

Для получения вакцинного препарата штамм Lister был сначала пассирован на первичных клетках почки кролика (PRK) при температуре 30 °С. Проводился отбор 25 клонов, которые оценивались по способности репродуцироваться в культуре клеток Vero. Был отобран клон с наименьшими титрами репродукции (обозначен LC16), который проверяли по его способности к росту на коже кролика и нейропатогенности для кроликов и обезьян при сравнении со штаммом Lister, а затем оценивали на детях. Это первое небольшое клиническое испытание изолята LC16 по сравнению со штаммом Lister, проведенное на 34 детях [12]. Изолят хорошо переносился, вызывая низкий уровень лихорадки.

Далее клон LC16 пассировали 6 раз в PRK-клетках при температуре 30 °С и вносили на хорион-аллантоисные оболочки развивающихся куриных эмбрионов (ХАО РКЭ). Были отобраны оспины средних размеров (2–3 мм), которые обозначили как LC16mO. Далее клоны LC16mO трижды пассировались в PRK-клетках и затем на ХАО РКЭ, с которых отбирали оспины еще меньших размеров (0,5–1,0 мм). Финальный аттенуированный клон обозначили как LC16m8.

Изучение свойств вируса вакцины, штамм LC16m8. Изучение свойств этого клона проводилось по сравнению с клонами LC16 и LC16mO и штаммами Lister и CVI. Было показано, что в отличие от них он не способен репродуцироваться при температуре 40,5 °С, обладает меньшей нейропатогенностью, которая определялась по способности вызывать энцефалит при интрацеребральном заражении кроликов [12]. Кроме того, проведена клиническая оценка нейропатогенности на 56 детях в возрасте 6–8 лет, которым были сделаны энцефалограммы до вакцинации сравниваемыми штаммами и после нее. Изменения в энцефалограммах обнаружены у детей, вакцинированных штаммом Lister (у 26,3 %), CVI – (у 3,3 %), у вакцинированных клоном LC16m8 изменений не было [6].

Клон LC16m8 вызывал более слабые побочные реакции у обезьян, кроликов, иммунокомпромированных мышей, причем не только среди указанных вирусов, но и среди вакцинных штаммов NYBH и EM-63 [13].

Защитная эффективность и безопасность штамма LC16m8 после дермального введения соответствовали таковым для вакцины на основе штамма Lister, причем определялись не только на животных, но и в клинических испытаниях. Результаты вакцинации 50 тыс. японских детей в 1973–1974 гг. свидетельствовали об отсутствии серьезных побочных реакций [12].

В 1974 г. проведено большое клиническое испытание вакцин на основе штаммов LC16m8 и LC16m0 в 29 префектурах Японии на 50 тыс. взрослых и 3 тыс. детей в возрасте 2–5 лет [6]. Из числа иммунизируемых были исключены люди с сердечными нарушениями, «влажной» экземой, лекарственной аллергией, печеночной и почечной недостаточностью, эпилепсией, иммуносупрессией [6, 14]. Иммунизируемым волонтерам предоставлялось право выбора вакцины: на основе штаммов LC16m8, LC16m0 или стандартного Lister. После иммунизации оценивались такие симптомы, как лихорадка, локальное покраснение, лимфаденопатия, уплотнения.

Введение вакцины на основе штамма LC16m8 вызывало те же побочные эффекты (локальные уплотнения в месте введения вакцины, лихорадка), что и другие вакцины, однако на значительно меньших уровнях, чем вакцина на основе штамма Lister. Из 8544 иммунизированных вакциной LC16m8 отмечены 8 случаев крапивницы, 1 – вакцинальной экземы, 9 – аутоинокуляции, 28 случаев локальной сыпи вокруг места введения и 3 мягкие лихорадочные реакции невыясненной этиологии [6, 14]. Для определения интервала, достаточного для формирования защитного иммунитета, исследовались сроки от 10 суток до 13 месяцев. Выявлено, что кросс-защита против других ортопоксвирусов, таких как натуральная оспа, формируется достаточно быстро и поддерживается в течение года, что соответствует таковой при иммунизации вакцинами Ikeda/Dairen [6].

Гуморальный иммунный ответ, индуцируемый к 1–6 месяцам после вакцинации вакцинным штаммом LC16m8 незначительно отличался от формируемого штаммами Lister и CV78 [6].

Таким образом, данные клинических исследований показывали, что штамм LC16m8, полученный группой SVRG, вызывает побочные реакции, но с меньшей частотой, чем все известные к тому времени вакцинные штаммы, и не обладает нейротоксичностью. В 1974 и 1975 гг. были использованы 90 тыс. доз для иммунизации детей и взрослых, без серьезных побочных реакций.

Поскольку штамм LC16m8 реплицируется в клетках млекопитающих, то может применяться при однократном введении, что выгодно отличает его от лицензированной вакцины на основе штам-

ма MVA. Поэтому на основе данного штамма может быть изготовлена безопасная и эффективная противооспенная вакцина [15]. Вакцина на основе штамма LC16m8 лицензирована в Японии в 1975 г. как противооспенная вакцина. Однако она никогда не применялась в районах, эндемичных по натуральной оспе, поскольку это заболевание было практически искоренено к моменту ее получения и лицензирования. Эффективность этой вакцины против натуральной оспы не была испытана на людях [15, 16].

Изучение молекулярно-биологических свойств вируса вакцины, штамм LC16m8. В 2005 г. определены полногеномные последовательности штамма LC16m8, родительского штамма LC16m0 и прародительского штамма Lister [17]. Геном штамма LC16m8 содержит 189 157 нуклеотидов, а геномы LC16m0 и Lister – по 189 158 нуклеотидов. Структурные организации этих геномов одинаковы и соответствуют таковым для всех ортопоксвирусов [18]. Они представлены линейной двуцепочечной ДНК, в центральной части которой содержатся гены, относительно консервативные между всеми ортопоксвирусными видами. Гены этой области кодируют структурные компоненты вириона и ферменты, необходимые для транскрипции, репликации и упаковки вирусной ДНК в цитоплазме хозяйской клетки. Весь цикл репродукции ортопоксвирусов проходит в цитоплазме хозяйской клетки. Гены по концам вирусного генома более разнообразны, не существенны для репродукции вируса в культуре клеток, но оказывают большое влияние на патогенность вируса для животных. В геноме штамма LC16m8, по сравнению с геномом штамма Lister, имелось только 6 точечных мутаций, однако наиболее значительным изменением была мутация со сдвигом рамки в гене, соответствующем гену *B5R* в штамме Копенгаген. F. Takahashi-Nishimaki *et al.* [19] впервые идентифицировали ген *B5R* вируса вакцины как ответственный за крупнобляшечный фенотип и способность репродуцироваться в клетках Vero. Полноразмерный ген кодирует белок B5 размером 42 kDa, который индуцирует выработку нейтрализующих антител у внеклеточной формы вируса. Внеклеточные вирусы – это свободные вирионы, которые высвобождаются из инфицированных клеток и способствуют диссеминации инфекции. Разрушение гена *B5R* уменьшает образование внеклеточного вируса в 5–10 раз.

Хотя внеклеточная форма вируса составляет менее 1 % от общей вирусной популяции, в дальнейшем были проведены исследования по изучению безопасности и уровней иммунных ответов, индуцированных вакцинными штаммами, имеющими интактный ген *B5R*, и LC16m8 с мутацией в этом гене.

Отсутствие полноразмерного гена *B5R* в вакцинном штамме LC16m8 подтверждено результатами однократной иммунизации им мышей линии BALB/c. Спектр индуцированных антител не содержал антитела к белку B5 [17]. Проведение сравнительной оценки иммуноглобулинов G в сыворотках

крови мышей BALB/c, иммунизированных вакцинами LC16m8 и Dryvax [20], выявило, что обе вакцины индуцировали выработку иммуноглобулинов класса G, которые достигали максимальных значений к 6-й неделе после вакцинации и сохранялись на том же уровне к 12-й неделе. Иммуноглобулины нейтрализовали и вне-, и внутриклеточный вирус и вызывали клеточно-опосредованный иммунитет, включая активацию клеток CD4⁺ и CD8⁺. К усеченной форме белка B5 (~8 kDa) также вырабатывались иммуноглобулины, хотя на белок B5 при иммунизации вакциной на основе штамма LC16m8 антитела практически не вырабатывались.

Необходимо отметить, что вследствие ликвидации натуральной оспы невозможно было определить эффективность новых вакцин в отношении естественного заболевания. Поэтому вакцины должны были тестироваться и сравниваться с ранее используемыми в период ликвидации натуральной оспы традиционными противооспенными вакцинами на суррогатных животных – моделях натуральной оспы [21].

Имеется несколько исследований, которые приводят данные о вкладе антител против белка B5 в иммунный ответ [22], однако результаты экспериментов об иммунном ответе, индуцированном вакциной LC16m8, дефицитной по гену B5R, свидетельствуют о формировании иммунитета, подобного таковому у вакцин, которые интенсивно использовались в кампании по искоренению натуральной оспы в мире.

Доклиническая оценка вакцины LC16m8. Однократная иммунизация вакциной LC16m8, так же как и вакциной Lister, защищала обезьян (*synomolgus monkeys*) от интраназального или подкожного заражения летальной дозой вируса оспы обезьян [16, 17]. При интраназальном заражении у иммунизированных обезьян не проявлялось никаких симптомов заболевания. При подкожном заражении появлялись мягкие язвы в месте введения вируса, других симптомов не наблюдалось.

Длительность и защитная эффективность индуцированного иммунного ответа на введение вакцины LC16m8 по сравнению с вакциной Lister также оценивались на обезьянах *synomolgus monkeys* при подкожном и интраназальном заражении летальной дозой вируса оспы обезьян на 6-й и 12-й месяцы после вакцинации [23]. Гуморальный иммунный ответ у всех обезьян достигал максимума к 28-м суткам. Однако у животных, иммунизированных вакциной LC16m8, он был ниже, чем у иммунизированных вакциной Lister. У обезьян, иммунизированных вакциной Lister, он почти не изменялся во все сроки наблюдения, в то время как у вакцинированных вакциной LC16m8 он медленно понижался, но оставался достаточным для защиты животных от летальной дозы вируса оспы обезьян через 6 и 12 месяцев после иммунизации. У всех вакцинированных животных после инфицирования вирусом оспы обезьян не отмечалось никаких симптомов заболевания, в отли-

чие от контрольных животных, которые все погибли. Полученные результаты дают основание предполагать, что вакцинация человека вакциной LC16m8 будет индуцировать длительную защиту против заражения вирусом оспы обезьян [23].

Безопасность вакцины на основе штамма LC16m8 также показана на макаках-резус, у которых проводилось истощение Т- или В-клеток, при последующей иммунизации этой вакциной и Dryvax [24]. Истощение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток не оказывало неблагоприятного воздействия на животных, вакцинированных вакциной LC16m8, в то время как у макак, иммунизированных вакциной Dryvax, оно вызывало прогрессирующую реакцию на вакцинацию. Обезьяны *synomolgus monkeys*, будучи вакцинированы обеими вакцинами, индуцировали иммунный ответ, который защищал их от заражения летальной дозой оспы обезьян через 60 суток после иммунизации. Эти данные подтверждают безопасность вакцины LC16m8 по сравнению с вакциной Dryvax в условиях моделирования ослабления иммунитета при доклинической оценке вакцин.

Определение LD₅₀ вируса вакцины для штамма LC16m8 для макак выявило, что этот показатель значительно превышает таковой у всех других вакцин, за исключением вакцинного штамма DIs, который отнесен к вакцинам третьего поколения, так же как и MVA [25, 26].

Проверялась защитная эффективность иммунных ответов, индуцируемых вакцинами LC16m8 и Dryvax, у кроликов [15]. Обе вакцины формировали схожие уровни иммунитета, достаточного для защиты животных от заражения летальной дозой вируса оспы кроликов.

Мыши BALB/c, иммунизированные вакцинами Lister, LC16m0 и LC16m8, были на 100 % защищены от гибели при инфицировании летальной дозой специально полученного вирулентного для мышей вируса вакцины, штамм WR, к 3-й неделе после вакцинации [17].

Определялась способность вакцины LC16m8 индуцировать иммунный ответ у беспородных белых мышей и иммунодефицитных мышей (дефектных по клеткам CD4⁺, по антигенам гистосовместимости класса I, класса II, классов I и II), сравнивая его с таковым для вакцины Lister [27]. Полученные результаты показали, что у мышей дикого типа иммунные ответы, индуцированные обеими вакцинами, были примерно на одном уровне и начинали формироваться уже на вторые сутки, полная защита против инфицирования летальной дозой нейропатогенного штамма WR сохранялась в течение года. У иммунодефицитных мышей иммунный ответ формировался на вторую или третью недели и не отличался от такового у беспородных белых мышей. Индуцирование иммунного ответа активировало факторы гуморального и клеточного иммунитета, включая продуцирование интерферонов, воспалительных цитокинов, хемокинов и NK-клеток.

Безопасность вакцины оценивалась на трех моделях иммунодефицитных мышей. Одна модель включала мышей-сосунков, вторая – с тяжелой комбинированной иммунодефицитностью (SCID), третья – беспородных белых мышей, обработанных циклоспорином [28]. Полученные результаты подтвердили безопасность вакцины для всех трех типов мышей. Эти исследования являются доказательством возможности использования данной вакцины для лиц с иммунодефицитностью.

Итак, на трех модельных животных было показано, что вакцина LC16m8 вызывает защитный иммунный ответ, сравнимый с таковым вакцин первого поколения, и предохраняет от заражения летальной дозой соответствующего вируса (табл. 1). Таким образом, мутация в гене *B5R* не оказывала значительного влияния на выработку полноценного иммунного ответа.

Результаты экспериментов свидетельствовали также о том, что в формировании защитного иммунитета принимают участие антитела и специфические Т-клетки ко многим вирусным антигенам. Это подтверждено исследованием спектра антител, полученных из сывороток 200 первично вакцинированных вакциной LC16m8 и бустированных ею взрослых людей.

Спектры индуцированных антител были подобны таковым, вызываемым при иммунизации другими оспенными вакцинами, что также свидетельствует об иммуногенности и защитной эффективности вакцины LC16m8 [29, 30]. Кроме того, как показано ранее [16, 23, 24], иммунизация вакциной на основе штамма LC16m8 защищает обезьян от оспы обезьян.

Клиническая оценка вакцины LC16m8. Безопасность и иммуногенность вакцины LC16m8 оценивалась и в клинических испытаниях. Так, в испытании,

проведенном в Японии, при иммунизации 3221 здорового волонтера в возрасте 18–55 лет, из которых 1529 ранее не были вакцинированы против оспенной вакциной [31], получены следующие результаты. Установлено, что побочные реакции представлены 2 случаями аллергического дерматита и мультиформной эритемой, 2 случаями боли в паху, вызванными бактериальной инфекцией, и опуханием подмышечных лимфоузлов у 15,5 % волонтеров, ранее не вакцинированных против оспенной вакциной, и 3,5 % – ревакцинированных, лихорадкой – у 2,6 % ранее не вакцинированных и 1,4 % – ревакцинированных. Побочные реакции начинались раньше у ревакцинированных волонтеров и не зависели от их возраста. Сероконверсия, основанная на определении уровня нейтрализующих антител, была выше у первично вакцинированных и составляла 90,2 %, а у ревакцинированных – 60,0 %. Геометрические значения титров не различались между двумя группами.

Дальнейшее испытание вакцины LC16m8 проведено в 2005 г. на 267 волонтерах в возрасте 19–52 лет, из которых 196 не были ранее вакцинированы оспенной вакциной. При этом серьезных побочных реакций не установлено, однако кожные побочные реакции наблюдались у 94,4 % ранее не вакцинированных волонтеров и 81,7 % – ранее вакцинированных. Сероконверсия отмечалась через 1 месяц после иммунизации у 84,2 % ранее не вакцинированных волонтеров [22].

Клиническое испытание фазы I/II двух вакцин на основе штаммов LC16m8 и Dryvax проводилось в США [32]. В испытании участвовали 154 здоровых, ранее не вакцинированных волонтеров в возрасте 18–34 лет. Сравнительная характеристика обеих вакцин показала, что в месте их введения иногда наблюдались эритема и припухлость, размеры ко-

Таблица 1 / Table 1

Результаты оценки иммунного ответа, индуцированного вакциной LC16m8 у лабораторных животных
The results of assessment of immune response induced by the vaccine LC16m8 in laboratory animals

Лабораторное животное Laboratory animal	Вакцина сравнения Compared vaccine	Результат иммунизации The result of immunization	Источники литературы References
Обезьяны Cynomolgus monkeys	Lister	Защита от заражения летальной дозой вируса оспы обезьян – для обеих вакцин Protection from infection with lethal dose of monkeypox virus for both vaccines	[16, 23]
		Защита от заражения летальной дозой вируса оспы обезьян через 6 и 12 месяцев – для обеих вакцин Protection from infection with lethal dose of monkeypox virus in 6 and 12 months for both vaccines	
Обезьяны макаки-резус Macaque rhesus	Dryvax	Защита от заражения летальной дозой вируса оспы обезьян через 60 суток – для обеих вакцин Protection from infection with lethal dose of monkeypox virus in 60 days for both vaccines	[24]
Кролики Rabbits		Защита от заражения летальной дозой вируса оспы кроликов – для обеих вакцин Protection from infection with lethal dose of rabbitpox virus for both vaccines	[15]
Мыши BALB/c Mice, BALB/c	Lister, LC16m0	Защита от заражения летальной дозой вируса вакцины, штамм WR, – для всех вакцин Protection from infection with lethal dose of vaccinia virus, strain WR for all vaccines	[17]
Мыши дикого типа и иммунодефицитные Mice of wild-type and immune deficient	Lister	Защита от заражения летальной дозой вируса вакцины, штамм WR, – для обеих вакцин Protection from infection with lethal dose of vaccinia virus, strain WR, for both vaccines	[27]

торых были больше вызываемых вакциной Dryvax. У 75 % волонтеров, вакцинированных Dryvax, и 74 %, вакцинированных вакциной на основе штамма LC16m8, наблюдалось увеличение подмышечных узлов. Виремия отмечалась только у вакцинированных Dryvax. Серьезных побочных реакций, как то генерализованная вакцинная, вакцинальная экзема и поражения сердца, не отмечалось.

Результаты оценки иммуногенности обеих вакцин показали, что они вызывают титры выше 1:40 в реакции нейтрализации против вируса оспы обезьян. К 30-м суткам после вакцинации титры понижались, причем более значительно у вакцины LC16m8. Титры, индуцированные вакциной Dryvax, были выше, чем для вакцины LC16m8, однако защитная эффективность против натуральной оспы являлась достаточной для обеих вакцин [32, 33]. Кинетика формирования клеточного иммунного ответа одинакова. Он формировался к 13-м суткам и повышался к 180-м суткам. Обе вакцины стимулировали появление интерферона и формировали длительную иммунологическую память. Следовательно, вакцина LC16m8 безопасна и индуцирует специфический иммунный ответ, достаточный для защиты от натуральной оспы при однократном введении [32].

При оценке эффективности вакцины LC16m8 в Центральном госпитале Сил самообороны Японии с 2002 по 2005 г. в испытании участвовал 3221 волонтер, из которых 47,5 % никогда не вакцинировались оспенной вакциной [34]. На протяжении всего периода наблюдения (30 суток) не зафиксировано ни одной тяжелой побочной реакции, а именно: вакцинной экземы, генерализованной вакцинной, поствакцинального энцефалита и миокардита. Не наблюдалось никаких отклонений от нормы в ЭКГ. Среди незначительных побочных реакций регистрировался отек подмышечных лимфоузлов, который был значительно меньше у ревакцинируемых, чем у первично вакцинируемых. У одного волонтера наблюдался аллергический дерматит, у другого – мультиформная эритема. Все побочные реакции самокупировались в течение нескольких суток. У волонтеров с atopическим дерматитом (наличие сухих и стабильных кожных поражений) не наблюдалось никаких других кожных поражений.

Перед вакцинацией титры нейтрализующих антител были выше у ревакцинированных, чем у первично вакцинированных, что свидетельствует о том, что нейтрализующие антитела сохраняются у лиц, иммунизированных более 30 лет назад. Оценка иммуногенности вакцины выявила, что у первично вакцинированных волонтеров сероконверсия составила 90,2 %, у ревакцинированных – более высокий поствакцинальный титр в реакции нейтрализации наблюдался у лиц с отсутствием сероконверсии. После первичной иммунизации вакциной LC16m8 значительно эффективнее оказалась бустерная вакцинация, характеризовавшаяся существенным повышением титра нейтрализующих антител. Обобщенные

данные о результатах клинических испытаний вакцины LC16m8 представлены в табл. 2.

Согласно способу получения и оценке результатов безопасности и иммуногенности на лабораторных животных и в клинических испытаниях, сохраняемости в лиофилизированном состоянии, вакцина на основе штамма LC16m8 отнесена к вакцинам третьего поколения, а по заключению Стратегической консультативной группы экспертов ВОЗ в ноябре 2013 г. лицензированные вакцины ACAM 2000 (второе поколение) и LC16m8 (третье поколение) рекомендовано использовать как вакцины резерва [34].

Получение и оценка свойств вакцины на основе штамма LC16m8Δ. Дальнейшая оценка стабильности вакцинного штамма LC16m8 при последующих пассажах в культуре клеток PRK показала, что он может спонтанно ревертировать к крупнобляшечному фенотипу, причем при возрастании количества пассажей количество ревертантов увеличивается. Поэтому ген *B5R* был делетирован из генома вакцинного штамма LC16m8, в результате чего получен штамм LC16m8Δ [35]. Он генетически стабилен и не ревертировал к крупнобляшечному фенотипу при многочисленных пассажах в культурах клеток даже в условиях, при которых большинство популяций штамма LC16m8 заменялось ревертантами. Он был не патогенен для модельных животных, даже для иммунодефицитных (SCID) мышей, и в клинических испытаниях [35–37].

Помимо безопасности, определялась способность штамма LC16m8Δ индуцировать иммунный ответ в сравнении с таковыми, вызываемыми вирусом вакцины, штаммами MVA и Dryvax при одних и тех же дозах при интрацеребральном введении мышам. Показано, что уровни иммунного ответа для штаммов LC16m8Δ и Dryvax схожи [38], а ответ на LC16m8Δ превышал более чем в 500 раз таковой, индуцированный штаммом MVA [36, 37]. Вакцинный штамм LC16m8Δ индуцировал иммунный ответ, достаточный для защиты обезьян от заражения летальной дозой вируса оспы обезьян [38].

Учитывая репликативно-компетентный фенотип, данный штамм LC16m8 высоко аттенуирован для лабораторных животных и человека. Его иммуногенность подобна родительскому штамму LC16m8 и вакцине первого поколения Dryvax. Поскольку штамм LC16m8Δ создан с применением генно-инженерных методов, вакцина на его основе может быть отнесена к препаратам четвертого поколения, но на настоящий момент нет лицензированного препарата на основе штамма LC16m8Δ.

Проведенный анализ трудного пути создания и изучения вакцины LC16m8 свидетельствует о том, что, несмотря на доказанную безопасность препарата, защитная эффективность этой вакцины против натуральной оспы никогда не была определена в реальных условиях распространения вируса. Тем не менее собранная информация представляет интерес для специалистов, планирующих работы по кон-

Таблица 2 / Table 2

Результаты исследований иммуногенности вакцины LC16m8 в клинических испытаниях
The results of LC16m8 vaccine immunogenicity testing in clinical trials

Место испытания Place setting of the trial	Количество волонтеров Number of volunteers	Возраст волонтеров, лет Age of volunteers, years	Предварительная вакцин- ация ослепной вакциной, Preliminary smallpox vaccination, number of volunteers		Побочные реакции Adverse events	Вакцина сравнения Compared vaccine	Иммуногенность, определенная методом Immunogenicity, determined by method				Источники литературы References
							Иммуноферментный анализ, % волонтеров Enzyme-linked immunosorbent assay, % of volunteers		Реакция нейтрализации, титр Neutralization reaction, titer		
			вакциниро- ванные vaccinated	не вакцини- рованные not vaccinated			вакциниро- ванные vaccinated	не вакциниро- ванные not vaccinated			
Япония Japan	3221	18–55	1692	1529	Аллергический дерматит, мульти- формная эритема, боль в паху, опуха- ние подмышечных узлов, лихорадка Allergic dermatitis, erythema multi- forme, groin pain, swollen axillary lymph nodes, fever	–	60,0	90,2	Нет данных No data	Нет данных No data	[31]
	268	19–52	71	196	Кожные реакции Cutaneous reactions	Нет No	Нет данных No data	84,2	Нет данных No data	Нет данных No data	[22]
США USA	154	18–4	Нет	154	Эритема, припухлость, увеличение подмышечных узлов Erythema, swollen axillary lymph node	Других	Нет данных No data	Нет данных No data	Нет данных No data	>(1:40) против вируса оспы обезьян для обеих вакцин against monkeypox virus for both vaccines	[32]
Япония Japan	3221	18–34	52,5 %	47,5 %	Лимфаденит, аллергический дерматит, мультиформная эритема Lymphadenitis, allergic dermatitis, erythema multiforme	–	Нет данных No data	90,2	Титр выше у волонтеров без сероконвер- сии – для обеих вакцин Titer is higher among volunteers without seroconversion	Нет данных No data	[31]

струированию современных вакцин против оспы, так как LC16m8, как и рекомендуемый ВОЗ препарат IMVAMUNE® [35], отнесены к вакцинам III поколения, но при этом вакцина LC16m8 более иммуногенна и способна индуцировать достаточный уровень иммунного ответа даже при однократной прививке. Современные генно-инженерные возможности открывают перспективы для создания вакцин IV поколения.

Таким образом, анализ многолетних данных по изучению вакцины LC16m8 свидетельствует о том, что данный препарат по показателям эффективности и безопасности превосходит другие аналоги I, II и III поколений. Дальнейшие генно-инженерные работы с этим штаммом, позволившие получить безопасный, но иммуногенный геновариант штамма LC16m8Δ, – наглядный пример продуктивного движения к разработке безопасных и эффективных вакцин IV поколения.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

References / Список литературы

- Duggan A.T., Klunk J., Porter A.F., Dhody A.N., Hicks R., Smith G.L., Humphreys M., McCollum A.M., Davidson W.B., Wilkins K., Li Y., Burke A., Polasky H., Flanders L., Poinar D., Raphenya A.R., Lau T.T.Y., Alcock B., McArthur A.G., Golding G.B., Holmes E.C., Poinar H.N. The origins and genomic diversity of American Civil War Era smallpox vaccine strains. *Genome Biol.* 2020; 21(1):175. DOI: 10.1186/s13059-020-02079-z.
- Esparza J., Schrick L., Damaso C.D., Nitsche A. Equination (inoculation of horsepox): An early alternative to vaccination (inoculation of cowpox) and the potential role of horsepox virus in the origin of the smallpox vaccine. *Vaccine.* 2017; 35(52):7222–30. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.11.003.
- Nalca A., Zumbum E.E. Acam2000: the new small vaccine for United States Strategic National Stockpile. *Drug Des. Devel. Ther.* 2010; 4:71–9. DOI: 10.2147/dddt.s3687.
- Melamed S., Israely T., Paran N. Challenges and achievements in prevention and treatment of smallpox. *Vaccines.* 2018; 6(1):8. DOI: 10.3390/vaccines6010008.
- Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res.* 2009; 84(1):1–13. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
- Yamaguchi M., Kimura M., Hirayama M. Vaccination research group research report: Ministry of Health and Welfare special research: postvaccination side effects and research regarding treatment of complications. *Rinsho to Uirusu [Clin Virus]*. 1975; 3:269–79.
- Marennikova S.S., Chimishkyan K.L., Maltseva N.N., Shelukhina E.M., Fedopov V.V. Characteristics of virus strains for production of smallpox vaccines. In: Gusic B., editor. Proceedings of the Symposium on Smallpox. Zagreb: Yugoslav Academy of Sciences and Arts; 1969. P. 65–79.
- Kimura M., Sakai H. Vaccination in Japan. *Rinsho to Uirusu [Clin. Virus]*. 1996; 24:30–40.
- McCurdy L.H., Larkin B.D., Martin J.E., Graham B.S. Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38(12):1749–53. DOI: 10.1086/421266.
- Tint H. The rationale for elective prevaccination with attenuated vaccinia (CVI-78) in preventing some vaccination complications. *Proceedings of the Symposia Series in Immunobiological Standardization.* 1973; 19:281–92.
- Hashizume S. Chiba Serum Institute. Special edition future of vaccination: everything about attenuated vaccines. Basics of new attenuated vaccine strain LC16m8. *Clin. Virus.* 1975; 3:229–35.
- Hashizume S., Yoshizawa N., Morita M., Suzuki K. Properties of attenuated mutant of vaccinia virus, LC16m8, derived

from Lister strain. In: Quinnan G., editor. *Vaccinia Virus as Vectors for Vaccine Antigens.* New York: Elsevier Science Publishing; 1985. P. 87–99.

- Morita M., Suzuki K., Yasuda A., Kojima A., Sugimoto M., Watanabe K., Kobayashi H., Kajima K., Hashizume S. Recombinant vaccinia virus LC16m0 or LC16m8 that expresses hepatitis B surface antigen while preserving the attenuation of the parental virus strain. *Vaccine.* 1987; 5(1):65–70. DOI: 10.1016/0264-410x(87)90012-0.
- Takeuchi K., Kawakami K., Akagi N., Kawanishi K. Results of experimental inoculation of attenuated LC16m8 reducing effect of LC16m8 strain pre-treatment. *Shonika Shinryo [Pediatr. Diagn.]*. 1976; 39:1208–19. [Translated from Japanese].
- Kenner J., Cameron F., Empig C., Jobes D.V., Gurwith M. LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine.* 2006; 24(47–48):7009–22. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.03.087.
- Saijo M., Ami Y., Suzuki Y., Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushima S., Mizutani T., Sata T., Kurata T., Kurane I., Morikawa S. LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *J. Virol.* 2006; 80(11):5179–88. DOI: 10.1128/JVI.02642-05.
- Morikawa S., Sakiyama T., Hasegawa H., Saijo M., Maeda A., Kurane I., Maeno G., Kimura J., Hirama C., Yoshida T., Asahi-Ozaki Y., Sata T., Kurata T., Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protections. *J. Virol.* 2005; 79(18):11873–91. DOI: 10.1128/JVI.79.18.11873-11891.2005.
- Silva N.I.O., de Oliveira J.S., Kroon E.G., Trindade G.S., Drumond B.P. Here, there, and everywhere: the wide host range and geographic distribution of zoonotic orthopoxviruses. *Viruses.* 2021; 13(1):43. DOI: 10.3390/v13010043.
- Takahashi-Nishimaki F., Funahashi S., Miki K., Hashizume S., Sugimoto M. Regulation of plaque size and host range by a vaccinia virus gene related to complement system proteins. *Virology.* 1991; 181(1):158–64. DOI: 10.1016/0042-6822(91)90480-y.
- Meseda C.A., Mayer A.E., Kumar A., Garcia A.D., Campbell J., Listrani P., Manischewitz J., King L.R., Golding H., Merchinsky M., Weir J.P. Comparative evaluation of the immune responses and protection engendered by LC16m8 and Dryvax smallpox vaccines in a mouse model. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16(9):1261–71. DOI: 10.1128/CI.00040-09.
- Moss B. Smallpox vaccine: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1):8–26. DOI: 10.1111/j.1600-065-X.2010.00975.x.
- Eto A., Saito T., Yokote H., Kurane I., Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine.* 2015; 33(45):6106–11. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.07.111.
- Iizuka I., Ami Y., Suzuki Y., Nagata N., Fukushima S., Ogata M., Morikawa S., Hasegawa H., Mizuguchi M., Kurane I., Saijo M. A single vaccination of nonhuman primates with highly attenuated smallpox vaccine, LC16m8, provides long-term protection against monkeypox. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2017; 70(4):408–15. DOI: 10.7883/joken.JIID.2016.417.
- Gordon S.N., Cecchinato V., Andresen V., Heraud J.M., Hryniewicz A., Parks R.W., Venzon D., Chung H.K., Karpova T., McNally J., Silvera P., Reimann K.A., Matsui H., Kanehara T., Shinmura Y., Yokote H., Franchini G. Smallpox vaccine safety is dependent on T cells and not B cells. *Infect. Dis.* 2011; 203(8):1043–53. DOI: 10.1093/infdis/jig162.
- Tagaya I., Kitamura T., Sano Y. A new mutant of dermo-vaccinia virus. *Nature.* 1961; 192:381–2. DOI: 10.1038/192381a0.
- Ishii K., Ueda Y., Matsuo K., Matsuura Y., Kitamura T., Kato K., Izumi Y., Someya K., Ohsu T., Honda M., Miyamura T. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology.* 2002; 302(2):433–44. DOI: 10.1006/viro.2002.1622.
- Yokote H., Shinmura Y., Kanehara T., Maruno S., Kuranaga M., Matsui H., Hashizume S. Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene keeps strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice. *Vaccine.* 2015; 33(45):6112–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.07.076.
- Yokote H., Shinmura Y., Kanehara T., Maruno S., Kuranaga M., Matsui H., Hashizume S. Safety of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in immunodeficient mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(9):1261–6. DOI: 10.1128/CI.00199-14.
- Eto A., Fujita M., Nishiyama Y., Saito T., Molina D.M., Morikawa S., Saijo M., Shinmura Y., Kanatani Y. Profiling of the antibody response to attenuated LC16m8 smallpox vaccine using protein array analysis. *Vaccine.* 2019; 37(44):6588–93. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.09.006.
- Eto A., Yamamoto N., Kanatani Y. Effect of serial passage on the pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus LC16m8 strain. *Biology (Basel).* 2021; 10(11):1158. DOI: 10.3390/biology10111158.
- Saito T., Fujii T., Kanatani Y., Saijo M., Morikawa S., Yokote H., Takeuchi T., Kuwabara N. Clinical and immunological

response to attenuated tissue-cultured mallpox vaccine LC16m8. *JAMA*. 2009; 301(10):1025–33. DOI: 10.1001/jama.2009.289.

32. Kennedy J.S., Gurwith M., Dekker C.L., Frey S.E., Edwards K.M., Kenner J., Lock M., Empig C., Morikawa S., Saijo M., Yokote H., Karem K., Damon I., Perloth M., Greenberg R.N. Safety and immunogenicity of LC16m8, an attenuated smallpox vaccine in vaccinia-naïve adults. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(9):1395–402. DOI: 10.1093/infdis/jir527.

33. Sarkar J.K., Mitra A.C., Mukherjee M.K. The minimum protective level of antibodies in smallpox. *Bull. World Health Organ.* 1975; 52(3):307–11.

34. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, November 2013 – conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2014; 89(1):1–19. PMID: 24466571.

35. Kidokoro M., Tashiro M., Shida H. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine train constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(11):4152–7. DOI: 10.1073/pnas.0406671102.

36. Kidokoro M., Shida H. Vaccinia virus LC16m8Δ as a vaccine vector for clinical applications. *Vaccines (Basel)*. 2014; 2(4):755–71. DOI: 10.3390/vaccines2040755.

37. Empig C., Kenner J.R., Perret-Gentil M., Youree B.E., Bell E., Chen A., Gurwith M., Higgins K., Lock M., Rice A.D., Schriewer J., Sinangil F., White E., Buller R.M., Dermody T.S., Isaacs S.N.,

Moyer R.W. Highly attenuated smallpox vaccine protects rabbits and mice against pathogenic orthopoxvirus challenge. *Vaccine*. 2006; 24(17):3686–94. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.03.029.

38. Kidokoro M.S.S., Ami Y., Suzaki Y., Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushi H., Mizutani T., Shida H. Protective effects of improved smallpox vaccine LC16m8Δ against a lethal monkeypox challenge in cynomolgus monkeys. In: Proceedings of the 54th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Nagoya, Japan, 19–21 November 2006.

Authors:

Stovba L.F., Chukhraya O.V., Petrov A.A., Mel'nikov S.A., Pavel'ev D.I., Borisevich S.V. 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Possad-6, Moscow Region, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru.

Об авторах:

Стовба Л.Ф., Чухряя О.В., Петров А.А., Мельников С.А., Павельев Д.И., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны РФ. Российская Федерация, 141306, Московская обл., Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11. E-mail: 48cnii@mil.ru.