

УДК 578.821

# Гуморальный и клеточный иммунный ответ на введение добровольцам вакцины ОртопоксВак

С. Н. Щелкунов\*, Е. Ю. Прудникова, А. А. Шестакова, С. Н. Якубицкий, С. А. Пьянков, А. Е. Нестеров, С. В. Усова, М. П. Богрянцева, Е. А. Нечаева, Т. В. Трегубчак, А. П. Агафонов  
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, 630559  
Россия

\*E-mail: snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.03.2025

Принята к печати 13.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27654

**РЕФЕРАТ** Первая в мире противооспенная вакцина четвертого поколения ОртопоксВак, получившая государственную регистрацию в 2022 году, в процессе клинических исследований, проходивших в течение 6 месяцев, проявила себя как безопасная слабо реактогенная по сравнению с живой оспенной вакциной первого поколения, но сохранившая на том же уровне иммуногенные свойства. В представленной работе анализировали уровни специфического гуморального и Т-клеточного иммунных ответов на внутрикожное введение добровольцам вакцины ОртопоксВак однократно в дозе  $10^7$  ООЕ или двукратно в дозе  $10^6$  ООЕ через 1,5, 3 и 5 лет после вакцинации. Т-хелперный ответ на иммунизацию добровольцев вакциной ОртопоксВак однократно в дозе  $10^7$  ООЕ сохранялся на относительно высоком уровне в течение трех лет, а затем значительно снижался. При иммунизации добровольцев этой же вакциной, но двукратно в дозе  $10^6$  ООЕ, резкое снижение уровня Т-хелперов детектировали после 1,5 лет. После 1,5 лет от момента иммунизации вакциной ОртопоксВак у части пациентов происходило снижение титров вируснейтрализующих антител (ВНА). При этом при иммунизации ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ достоверных различий между группами во временных точках 1,5, 3 и 5 лет не наблюдали, а в группах, вакцинированных двукратно в дозе  $10^6$  ООЕ, уровень титров ВНА после 1,5 лет достоверно снижался. На основании полученных результатов можно заключить, что вакцина ОртопоксВак при внутрикожном одноразовом введении в дозе  $10^7$  ООЕ обеспечивает выраженный специфический гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ в течение, по крайней мере, трех лет.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** натуральная оспа, оспа обезьян, вирус осповакцины, вакцинация, антитела, Т-клетки.  
**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БОЕ – бляшкообразующая единица; ВНА – вируснейтрализующие антитела; ВОВ – вирус осповакцины; ВОЖ – вакцина оспенная живая; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; КИ – клинические исследования; ООЕ – оспообразующая единица; GMT – среднегеометрический титр; РВМС – мононуклеарные клетки периферической крови.

## ВВЕДЕНИЕ

Натуральная оспа – одно из наиболее опасных и смертоносных, высококонтагиозных инфекционных заболеваний человека, а также единственное заболевание человека, которое под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) было ликвидировано в результате глобальной кампании по противооспенной вакцинации и противоэпидемическому надзору. Это достижение остается одним из величайших триумфов медицинской науки [1].

Большая часть противооспенных вакцин первого поколения, применявшихся для массовой вакцинации в рамках программы ликвидации оспы,

была приготовлена из вируса осповакцины (ВОВ), выращенного на коже живых животных, главным образом телят, и в меньшей степени овец, буйволов и кроликов. Один из существенных недостатков этих вакцин – большое число тяжелых поствакцинальных осложнений, особенно среди людей с иммунодефицитом, атопическим дерматитом и у пожилых людей, ранее не вакцинированных против оспы [1, 2].

Примерно у 20–30% привитых вакциной против оспы первого поколения развивается одна или несколько побочных реакций, которые различаются по распространенности и тяжести. Более распро-

страненные побочные реакции включают субфебрильную температуру, головную боль, лимфаденопатию, фолликулит и недомогание, в то время как значительно меньшее число вакцинированных испытывают более серьезные заболевания, включая экзему, генерализованную или прогрессирующую вакцинию, энцефалит и миоперикардит. Серьезные побочные заболевания возникают только у нескольких сотен пациентов на миллион вакцинированных, а смертельный исход может быть у одного-двух пациентов на миллион [1, 3]. Учитывая тяжелые поствакцинальные осложнения при использовании классической живой вакцины и подтверждение ликвидации натуральной оспы в 1980 г., ВОЗ настоятельно рекомендовала всем странам вакцинацию против данной инфекции в дальнейшем не проводить [1, 2].

Следует отметить, что в природных резервуарах находятся близкородственные вирусу натуральной оспы зоонозные ортопоксвирусы, такие как вирус оспы обезьян, вирус оспы коров и другие, способные инфицировать людей [4]. Прекращение противооспенной вакцинации привело к тому, что за прошедшие годы большая часть человечества (прежде всего, в возрасте до 45 лет) не имеет иммунитета против любых ортопоксвирусных инфекций. Многочисленные вспышки зоонозных ортопоксвирусных инфекций среди людей стали регистрироваться в последние годы в разных географических регионах [2, 4]. Особую озабоченность вызывает инфицирование людей вирусом оспы обезьян, которое привело к эпидемии данного ортопоксвирусного заболевания, распространившейся в 2022-2023 годах на все континенты и поразившей население более ста стран [5]. В настоящее время сложная ситуация с распространением оспы обезьян среди людей сохраняется прежде всего в Африке [6]. Это заставляет с новой силой вернуться к рассмотрению вопроса о возможном возврате оспы или подобного опасного заболевания в результате естественной эволюции агентов зоонозных ортопоксвирусных инфекций [7, 8].

Чтобы предотвратить развитие локальных вспышек инфекции в распространенные эпидемии и уменьшить риск возникновения в результате естественной эволюции высокопатогенного для человека ортопоксвируса, усилия исследователей должны быть направлены на создание безопасных живых вакцин новых поколений на основе ВОВ. Все это обуславливает научный и практический интерес и необходимость нового подхода к вакцинопрофилактике инфекций, вызванных ортопоксвирусами.

С развитием методов генетической инженерии стало возможным создавать модифицированные

варианты ВОВ с помощью направленного введения целевых последовательностей в вирусный геном, удаления или нарушения конкретных генов вирулентности самого вируса [9, 10], не затрагивая гены, обеспечивающие функции размножения вируса в культуре клеток. Выключение генов вирулентности способно существенно снизить патогенные свойства ВОВ. Одним из наиболее перспективных направлений таких работ является создание методами генетической инженерии высокоаттенуированных вариантов ВОВ, обладающих иммуногенностью и протективностью, сравнимой с уровнями данных показателей у классической противооспенной вакцины первого поколения, но при этом характеризующихся существенно меньшей патогенностью.

Вариантом такой вакцины является полученная нами вакцина четвертого поколения ОртопоксВак – живая вакцина против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций на основе штамма VACΔ6 с шестью нарушенными генами (*C3L*, *N1L*, *J2R*, *A35R*, *A56R* и *B8R*), выращенного в перевиваемой культуре клеток 4647 [2, 11].

Проведение работ по исследованию длительности поствакцинального иммунного ответа у лиц, иммунизированных вакциной ОртопоксВак, в сравнении с ранее используемой в России «Вакциной оспенной живой» [12] имеет важное значение, так как это позволит определить необходимость и сроки ревакцинации при иммунизации людей вакциной четвертого поколения.

Целью данной работы было выполнение пострегистрационного исследования напряженности и длительности противооспенного гуморального и Т-клеточного иммунитета у лиц, принимавших участие в проведении I и II/III фаз клинических исследований вакцины ОртопоксВак (Вакцина для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций на основе вируса осповакцины живая культуральная).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Общий дизайн исследования

Проведено открытое сравнительное рандомизированное исследование в параллельных группах, в котором приняли участие 76 мужчин и женщин в возрасте от 25 до 40 лет, соответствующих критериям включения и не имеющих критериев невключения, ранее принимавших участие в клинических исследованиях (КИ) вакцины ОртопоксВак I фазы (КИ VACΔ6-01/18) и II/III фаз (КИ VACΔ6-01/20) (рис. 1).

Группа 1 представлена 15 здоровыми добровольцами (7 мужчин и 8 женщин), принимавшими участие в клиническом исследовании VACΔ6-01/20



Рис. 1. Схема распределения добровольцев по группам

и вакцинированными однократно внутривенно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ.

Группа 2 представлена 15 здоровыми добровольцами (6 мужчин и 9 женщин), принимавшими участие в клиническом исследовании VASΔ6-01/20 и вакцинированными двукратно с интервалом 28 дней внутривенно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^6$  ООЕ.

Группа 3 (положительный контроль, ПК) представлена 7 здоровыми добровольцами (4 мужчины и 3 женщины), работавшими с вирусами рода ортопоксвирусов и привитыми двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой (ВОЖ) на основе штамма Л-ИВП ВОВ («Микроген», Россия) как описано [13] (ОспаВир + ВОЖ, 2020 г.).

Группа 4 (отрицательный контроль, ОК) представлена 10 здоровыми добровольцами (6 мужчин и 4 женщины), не вакцинированными ранее противооспенными вакцинами, не имевшими контакта с пациентами, вакцинированными противооспенными вакцинами, и не работавшими с вирусами рода ортопоксвирусов.

Группа 5 представлена 9 здоровыми добровольцами (3 мужчин и 6 женщин), принимавшими участие в клиническом исследовании VASΔ6-01/18 и вакцинированными однократно внутривенно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ.

Группа 6 представлена 10 здоровыми добровольцами (7 мужчин и 3 женщины), принимавшими участие в клиническом исследовании VASΔ6-01/18 и вакцинированными двукратно с интервалом 28

дней внутривенно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^6$  ООЕ.

Группа 7 (ПК) представлена 10 здоровыми добровольцами (5 мужчин и 5 женщин), принимавшими участие в клиническом исследовании VASΔ6-01/18 и вакцинированными двухэтапным методом ОспаВир + ВОЖ.

До выполнения всех процедур данного исследования от каждого пациента было получено письменное информированное согласие на включение в исследование.

#### Вирусы, культура клеток

В работе использовали штаммы Л-ИВП [9] и VASΔ6 ВОВ [11], а также перевиваемую линию клеток почки африканской зеленой марьяшки CV-1 из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

#### Забор образцов крови у добровольцев

Забор крови проводили из локтевой вены в условиях стационара и прививочного кабинета с соблюдением правил асептики и антисептики. За один забор отбирали 30–35 мл крови, использовали вакуумные пробирки (вакутейнеры). Работа проведена на клинической базе Федерального государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Медико-санитарная часть № 163 Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУЗ МСЧ-163 ФМБА России).

Исследование получило одобрение Этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

(выписка из протокола № 10 заседания Этического комитета от 14.02.2024 г.).

Для оценки гуморального иммунитета из образцов крови получали сыворотку путем осаждения форменных элементов с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 1000 *g* и 4°C. Полученные сыворотки выдерживали при температуре 56°C в течение 30 мин и хранили при температуре минус 20°C.

#### **Иммуноферментный анализ сывороток крови**

Титр специфических антител определяли в ИФА с использованием медицинского изделия «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител класса G к антигенам поксвирусов "Вектор ИФА Покс-IgG" по ТУ 21.10.60-096-05664012-2022» как описано [14].

#### **Определение титра вируснейтрализующих антител в сыворотках крови**

Для определения титра вируснейтрализующих антител (ВНА) проводили реакцию подавления бляшкообразования ВОВ штамм Л-ИВП на культуре клеток CV-1. Для анализа готовили четыре последовательных разведения образцов сывороток крови добровольцев с шагом два, начиная с 1:10 – 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80, при уточнении титров ВНА для образцов с нейтрализующей активностью сывороток, выходящей за пределы 1:80, дополнительно использовали двукратные разведения 1:160–1:1280. К полученным разведениям сывороток добавляли равный объем разведения ВОВ с титром около 400 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл (около 40 БОЕ/лунка). Полученные смеси инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Все разведения сывороток и вируса выполняли с использованием поддерживающей питательной среды: питательная среда ДМЕМ/F-12 (1:1) с 2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (ФСР), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Далее 200 мкл смеси разведения сыворотки с ВОВ наносили на 90–100% монослой культуры клеток CV-1, выращенный в 24-луночном культуральном планшете, используя по три лунки на каждое разведение сыворотки. Проводили сорбцию вируса в течение 1 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, после чего добавляли поддерживающую питательную среду (1 мл/лунка) и инкубировали в течение еще 48 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. По окончании периода инкубации культуральную среду удаляли, а клетки фиксировали и окрашивали в течение 15 мин, добавляя раствор 0.2% кристаллического фиолетового в водном растворе 9.6% этанола с 2% формальдегидом (около 0.2 мл/лунка),

после чего краску удаляли, а культуральный планшет высушивали при комнатной температуре.

Подсчитывали количество бляшек (очаги разрушенного монослоя клеток округлой формы в виде белых пятен на синем фоне) в монослое культуры клеток CV-1 и определяли разведения сывороток, подавляющие образование 50% БОЕ по сравнению с количеством БОЕ в лунках с неиммунной сывороткой (группа отрицательного контроля). Расчеты проводили по методу Спирмена–Кербера, результаты выражали в виде 50% бляшкоподавляющего нейтрализующего титра.

#### **Выделение мононуклеаров периферической крови (РВМС)**

Венозную кровь добровольцев отбирали в пробирки с гепарином (10 ЕД/мл). РВМС выделяли в градиенте плотности фиколла (1.077 г/мл). Полученную суспензию клеток трижды отмывали средой ДМЕМ/F12, содержащей 5% ФСР, клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 350 *g* и температуре (10 ± 2)°C. Осадок клеток ресуспендировали в среде ДМЕМ/F12, содержащей 15% ФСР. Далее готовили суспензию клеток с концентрацией 10 млн кл./мл и вносили по 100 мкл суспензии в лунки 96-луночного плоскодонного культурального планшета (1 × 10<sup>6</sup> кл./лунка).

#### **Внутриклеточное окрашивание клеток на цитокины**

Клеточно-опосредованный иммунный ответ оценивали с помощью внутриклеточного окрашивания на цитокины после стимуляции РВМС антигеном. Каждый образец оценивали с помощью нестимулированных клеток (клетки без стимуляции, фоновый контроль), клеток, стимулированных вирусосодержащим материалом (очищенный вирус осповакцины штамм VACΔ6 – 4.0 мкг общего белка), и положительного контроля, клетки после стимуляции форбол-12-миристан-13-ацетатом 50 нг/мл (Sigma-Aldrich, США) и ионофором 0.5 мкг/мл (Calcium Ionophore A23187, Sigma-Aldrich). Клетки инкубировали при температуре 37°C в атмосфере 5.0% CO<sub>2</sub> в течение 8 ч, далее в каждую лунку добавляли GolgiPlug (BD Biosciences, США) согласно рекомендациям производителя и дополнительно инкубировали при 37°C в атмосфере 5.0% CO<sub>2</sub> в течение ночи. После стимуляции клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 2% КРС. Далее клетки окрашивали в течение 40 мин при 4°C красителем Fixable Viability Stain 780 и моноклональными антителами CD3 (клон SK7, BV786), CD4 (клон RPA-T4, PerCP-Cy 5.5), CD8 (клон RPA-T8, Alexa Fluor 700), CD45RA (клон

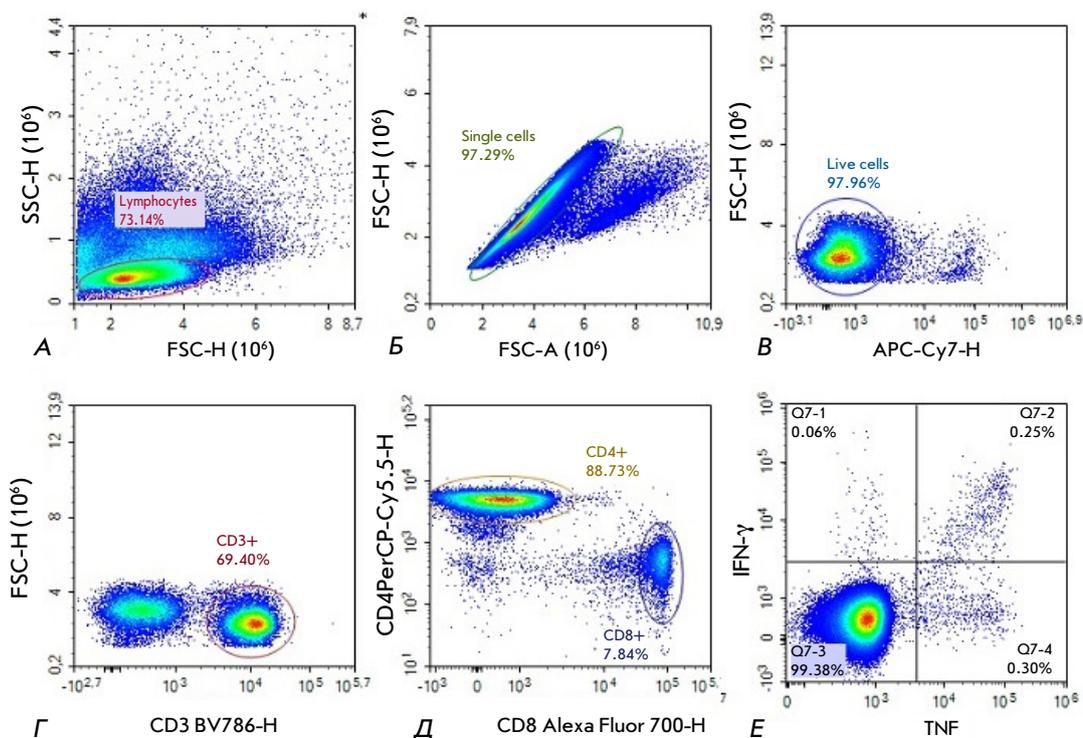


Рис. 2. Тактика гейтирования для идентификации основных популяций Т-клеток (см. пояснения в тексте)

HI100, BV510), CCR7 (CD197) (клон 3D12, PE-Cy7) (BD Biosciences). Затем клетки трижды промывали 2% фосфатно-солевым буферным раствором и инкубировали в течение 20 мин со 100 мкл раствора для фиксации и пермеабилзации клеток (Fixation/Permeabilization solution, BD Biosciences). По окончании инкубации трижды промывали 1× промывочным буфером (BD Perm/Wash™ Buffer, BD Biosciences) и в течение 40 мин окрашивали моноклональными антителами к интерлейкину-2 (IL-2, клон MQ1 17H12, APC), фактору некроза опухоли (TNF, клон MAb11, PE), интерферону-γ (IFN-γ, клон B27, BV421, BD Biosciences). Клетки трижды промывали 1× промывочным буфером и фиксировали в 300 мкл 1× буфера (BD CellFix, BD Biosciences). Фиксированные клетки анализировали на проточном цитометре ACEA NOVOCite Quanteon 4025 (Agilent Technologies, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения NovoExpress версия 1.5.0.

При выполнении цитометрического анализа использовали следующий порядок гейтирования (рис. 2). В координатах прямого и бокового светорассеяния выделяли лимфоцитарную фракцию (рис. 2А), далее отделяли синглеты (одиночные клетки): по оси абсцисс – интегральный сигнал прямого светорассеяния, по оси ординат – пиковый сигнал прямого светорассеяния (рис. 2Б). Из одиночных клеток выделяли живые клетки, негатив-

ные по APC-Cy7 (рис. 2В). По уровню экспрессии CD3 гейтировали Т-клетки, позитивные по BV786 (рис. 2Г). Дифференциацию цитотоксических Т-лимфоцитов (фенотип CD3+CD8+) от Т-хелперов (фенотип CD3+CD4+) проводили согласно гистограмме на рис. 2Д. На графике рис. 2Е указаны Т-хелперы, позитивные по цитокинам TNF и IFN-γ.

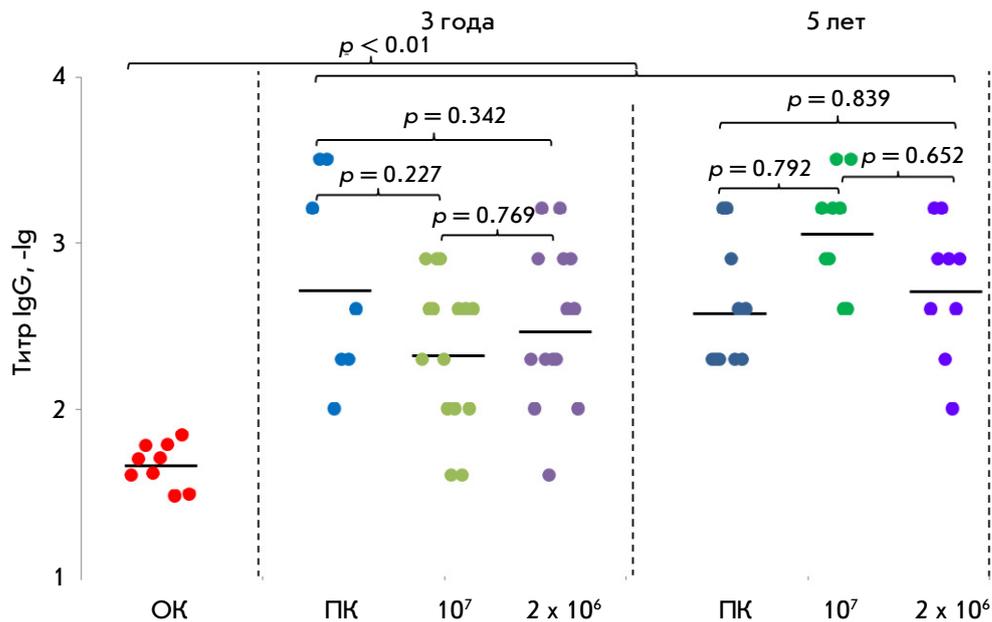
### Статистический анализ данных

Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для трех и более групп. Сравнение между двумя группами проводили при помощи F-критерия. Различия в полученных результатах считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Определение в ИФА антител, специфичных к ВОВ

Надежным критерием эффективности вакцинации является использование в качестве сравнительного эталона титров антител в образцах контрольных групп: в группе образцов отрицательного контроля (ОК), полученных от добровольцев, не вакцинированных оспенными вакцинами, не имевших контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавших с вирусами рода ортопоксвирусов; в группе образцов положительного



**Рис. 3.** Логарифмы титров ИФА специфических IgG к антигенам ВОВ в сыворотках крови добровольцев, участвующих в клинических испытаниях вакцины ОртопоксВак. ОК – группа сравнения (отрицательный контроль) – добровольцы, не вакцинированные оспенными вакцинами, не имевшие контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавшие с вирусами рода ортопоксвирусов; ПК – группа положительного контроля – группа добровольцев, привитых двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой на основе штамма Л-ИВП ВОВ (Микроген);  $10^7$  – группа добровольцев, привитых однократно внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ/0.2 мл;  $2 \times 10^6$  – группа добровольцев, привитых двукратно с интервалом 28 дней внутрикожно в дозе  $10^6$  ООЕ/0.2 мл. Значимость различий между группами определяли по F-критерию. Каждая точка соответствует одному добровольцу. Горизонтальные линии – значения GMT каждой группы

контроля (ПК), полученных от добровольцев, вакцинированных препаратом первого поколения, через 3 года и 5 лет после вакцинации.

В опытных группах КИ II/III фаз через 3 года после вакцинации число добровольцев с титрами ИФА  $\geq 1:100$  составило 86.7% при однократной вакцинации ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ и 92.8% – при двукратной вакцинации в дозе  $10^6$  ООЕ. Через 5 лет в группах добровольцев КИ I фазы образцов сывороток с титрами ниже 1:100 не выявлено.

Установлено, что величина среднегеометрического титра (GMT) выявляемых методом ИФА специфических IgG составила 46 в группе ОК с диапазоном погрешности от 36 до 58 для 95% доверительного интервала.

Аналогичные величины в остальных контрольных и экспериментальных группах значительно отличались и имели намного большие диапазоны погрешности. Так, через 3 года от момента вакцинации значения GMT составили 212 (от 121 до 372), 292 (от 155 до 555) и 518 (от 137 до 1952) в группах  $10^7$ ,  $2 \times 10^6$  и ПК соответственно. Через 5 лет после вакцинации величины GMT составили в таких же группах соот-

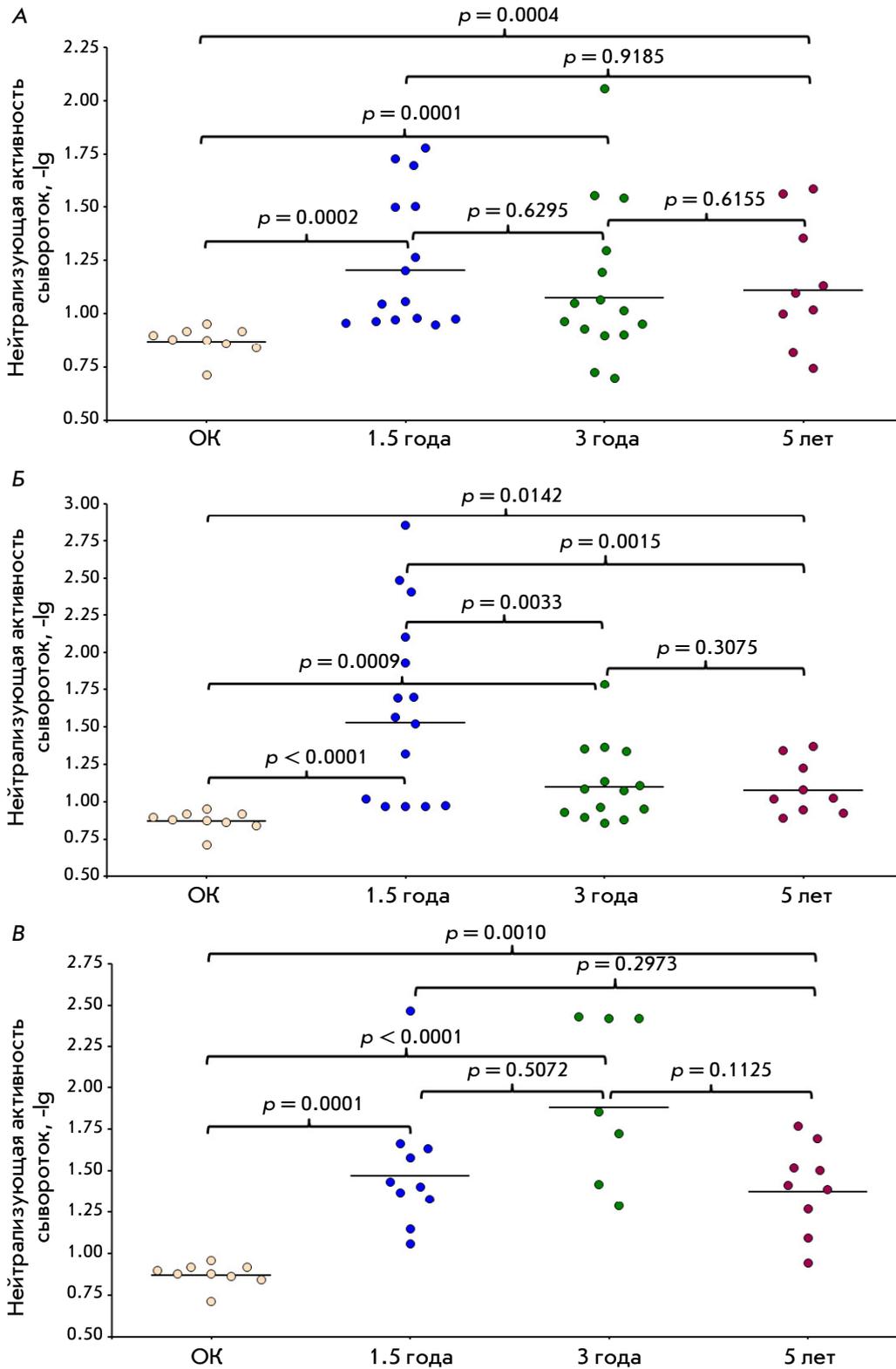
ветственно 1131 (от 619 до 2065), 510 (от 251 до 1038) и 379 (от 204 до 704). Логарифмическая интерпретация полученных данных приведена на рис. 3.

Достоверные отличия выявлены только в группе ОК по отношению к другим трем группам через 3 года и через 5 лет после вакцинации (рис. 3). В остальных парах групп отличия недостоверны.

### Определение титров вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации ВОВ

Важную роль в формировании протективного иммунитета против оспы и других ортопоксвирусных инфекций играют вируснейтрализующие антитела [15, 16]. Определяемая величина титров ВНА может зависеть от пары вирус–культура клеток и особенностей используемой методики. Поэтому надежным критерием эффективности вакцинации по данному показателю является использование вакцины первого поколения в качестве контрольной, эффективность которой против натуральной оспы была показана ранее.

Выполненные нами исследования показали (рис. 4), что через 1.5 года после иммунизации



**Рис. 4.** Нейтрализующая активность сывороток крови добровольцев, вакцинированных в рамках I и II/III фаз клинических исследований вакцины ОртопоксВак. Титры вируснейтрализующих антител определены с помощью реакции подавления бляшкообразования ВОВ (штамм Л-ИВП) на культуре клеток CV-1. Данные представлены в виде -lg; каждая точка соответствует одному добровольцу; горизонтальные линии – уровни GMT антител в группах; значимость различий между группами определяли по F-критерию. Представлены данные по титрам ВНА через 1,5, 3 и 5 лет для: А – группа добровольцев, привитых однократно внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ/0,2 мл; Б – группа добровольцев, привитых двукратно с интервалом 28 дней внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^6$  ООЕ/0,2 мл; В – группа положительного контроля (добровольцы, привитые двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой); ОК – группа сравнения (отрицательный контроль) – добровольцы, не вакцинированные оспенными вакцинами, не имевшие контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавшие с вирусами рода ортопоксвирусов



этапным методом Вакциной оспенной инактивированной, а затем ВОЖ, через 1.5, 3 года и 5 лет (рис. 4В).

### Оценка Т-клеточного противооспенного иммунитета

Клеточно-опосредованный иммунный ответ определяли, используя протокол внутриклеточного окрашивания цитокинов, который выявляет специфические Т-клетки благодаря их способности продуцировать цитокины, включая IFN- $\gamma$ , TNF и IL-2, после костимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) штаммом VAC $\Delta$ 6 ВОВ *ex vivo* (см. раздел «Экспериментальная часть»).

Через 1.5 года после вакцинации в образцах РВМС цитометрически выявили присутствие специфических для ВОВ клеток – как Т-хелперов (CD4+), так и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). После 20-часовой стимуляции РВМС штаммом VAC $\Delta$ 6 ВОВ наблюдали увеличение количества CD4+IFN- $\gamma$ + и CD8+IFN- $\gamma$ + Т-клеток. При этом до 80–90% антигенспецифических клеток приходилось на клетки с тройной (CD4+IFN- $\gamma$ +TNF+IL-2+) или двойной (CD8+IFN- $\gamma$ +TNF+) экспрессией цитокинов.

У большинства добровольцев групп, вакцинированных ОртопоксВак (как однократно в дозе  $10^7$  ООЕ, так и двукратно в дозе  $10^6$  ООЕ), выявляли специфические к ВОВ CD8+ Т-клетки. При этом до 90% клеток популяции CD8+IFN- $\gamma$ +TNF+ были отрицательными по маркеру CD57, что свидетельствует о том, что эти Т-клетки не достигли состояния терминальной дифференцировки/истощения. В обеих группах добровольцев, иммунизированных ОртопоксВак, уровень клеток CD8+IFN- $\gamma$ +TNF+ достоверно превосходил аналогичные показатели для группы положительного контроля – добровольцев, иммунизированных противооспенной вакциной первого поколения (рис. 5).

Через 1.5 года уровень Т-хелперов CD4+IFN- $\gamma$ +TNF+IL-2+ в обеих группах добровольцев, привитых ОртопоксВак, не имел достоверных отличий от группы, иммунизированной Вакциной оспенной живой первого поколения (рис. 6).

Дополнительно анализировали экспрессию маркеров памяти CCR7 (CD197) и CD45RA в специфических к ВОВ CD4+ и CD8+ Т-клетках. В популяции ВОВ-специфических CD4+ Т-клеток доля эффекторных клеток памяти T<sub>EM</sub> (CCR7-CD45RA-) составляла в основном 80–90%, клеток центральной памяти T<sub>CM</sub> (CCR7+CD45RA-) – 5–10%, терминально дифференцированных эффекторных клеток памяти T<sub>EMRA</sub> (CCR7-CD45RA+) – 2–5% и до 1% популяции представлена наивными Т-клетками (CCR7+CD45RA+) (табл. 1).

В популяции ВОВ-специфических CD8+ Т-клеток доля T<sub>EM</sub> (CCR7-CD45RA-) составляла около 20%, а T<sub>EMRA</sub> (CCR7-CD45RA+) – до 80%.

Через 3 года и 5 лет после иммунизации как ВОЖ, так и вакциной ОртопоксВак в препаратах РВМС добровольцев после костимуляции ВОВ уровень специфических CD8+ Т-клеток был ниже предела обнаружения в используемом методе.

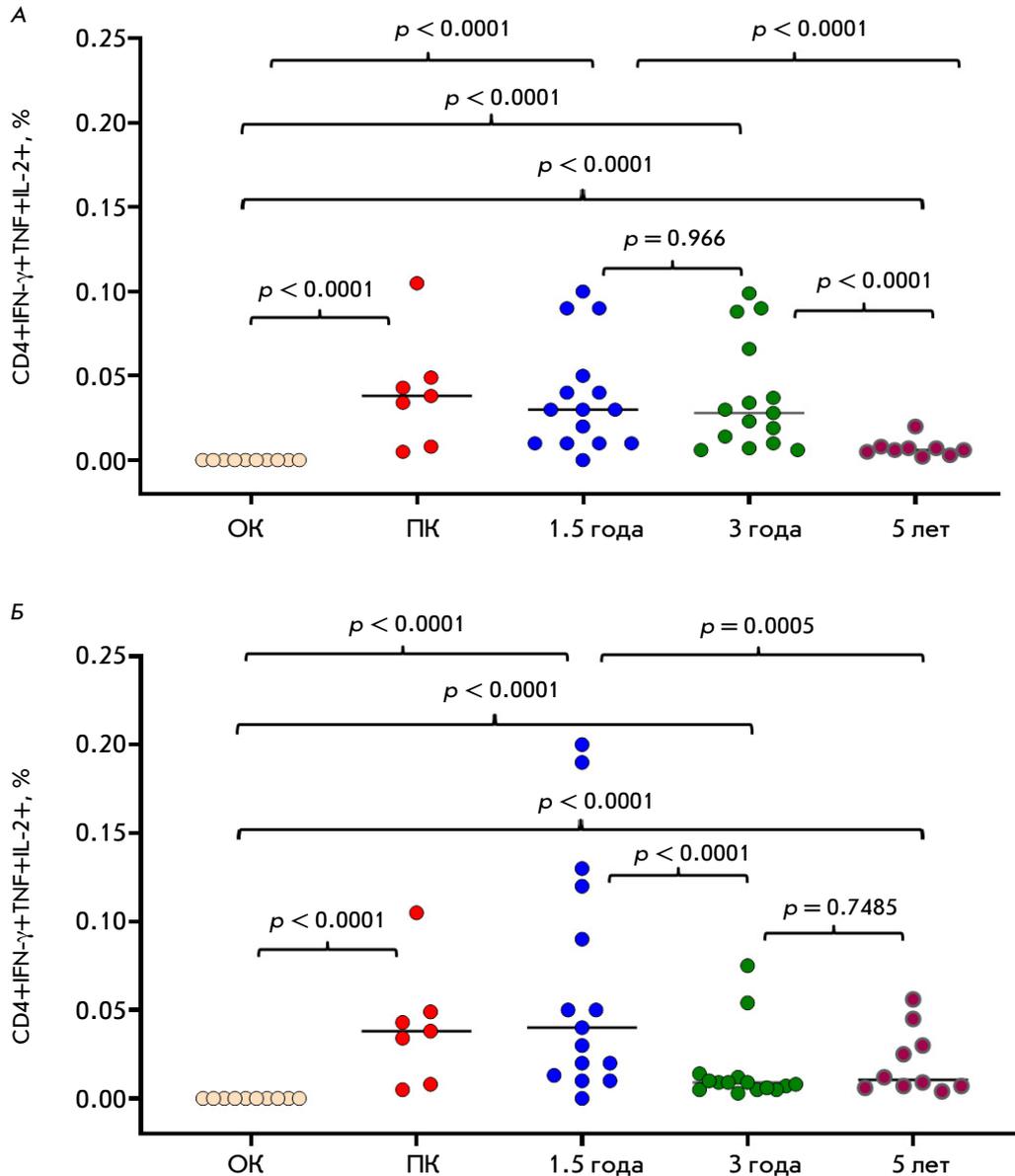
У пациентов, иммунизированных ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ, через 3 года продукция Т-хелперов CD4+IFN- $\gamma$ +TNF+IL-2+ сохранялась на прежнем уровне, но через 5 лет значительно снизилась (рис. 6А). У добровольцев, привитых двукратно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^6$  ООЕ, уже к третьему году после вакцинации уровень ВОВ-специфических Т-хелперов существенно снизился и сохранялся на низком уровне до 5 лет (рис. 6Б).

Через 3 года после иммунизации во всех группах добровольцев в популяции ВОВ-специфических CD4+ Т-клеток доля эффекторных клеток памяти T<sub>EM</sub> (CCR7-CD45RA-) в основном составляла 80–90%, клеток центральной памяти T<sub>CM</sub> (CCR7+CD45RA-) – 5–10%, T<sub>EMRA</sub> (CCR7-CD45RA+) – 2–10% и до 1% – наивных Т-клеток (CCR7+CD45RA+) (табл. 2). Такое распределение клеток по маркерам памяти CCR7 (CD197) и CD45RA характерно как для добровольцев, иммунизированных вакциной четвертого поколения ОртопоксВак, так и для добровольцев, вакцинированных двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной и затем ВОЖ первого поколения.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Сложность получения новой безопасной оспенной вакцины заключается в необходимости снижения вирулентности вакцинного штамма ВОВ при одновременной индукции достаточного и долговременного уровня гуморального и клеточного иммунного ответа. Критерии оценки уровня иммунитета, развившегося у человека в ответ на противооспенную вакцинацию и обеспечивающего полную защиту от ортопоксвирусных инфекций, до сих пор не установлены. Имеются лишь единичные разрозненные работы, в которых сделана попытка выявить такие критерии.

Исторически первым критерием оценки иммунного ответа на инфекцию ВНО или вакцинацию ВОВ было определение уровня ВНА в сыворотках крови пациентов. Маск и соавт. [17] показали, что люди с титром ВНА к ВОВ <1:32 более чувствительны к инфицированию при контакте с больными (20% контактных пациентов заболели) по сравнению с теми, у кого титр ВНА был  $\geq$ 1:32 (заболел 1% контактных пациентов). Показано также, что во вре-



**Рис. 6.** Процентное содержание ВОВ-специфичных CD4+ Т-клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$ , TNF и IL-2, в образцах РВМС от добровольцев, вакцинированных противооспенной вакциной в рамках клинических исследований. А – группы добровольцев, привитых однократно внутримышечно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ/0.2 мл; Б – группы добровольцев, привитых двукратно с интервалом 28 дней внутримышечно вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^6$  ООЕ/0.2 мл. ОК – группа сравнения (отрицательный контроль) – добровольцы, не вакцинированные оспенными вакцинами, не имевшие контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавшие с вирусами рода ортопоксвирусов; ПК – группа положительного контроля – группа добровольцев, привитых двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой на основе штамма Л-ИВП ВОВ (Микроген). Значимость различий между группами определяли по F-критерию. Каждая точка соответствует одному добровольцу

мя эпидемии оспой заболели 14% контактных, ранее не вакцинированных пациентов с титром ВНА к ВОВ  $<1:20$ , в то время как пациенты с титром ВНА  $\geq 1:20$  оспой не заразились [18]. При этом следует отметить, что все вакцинированные ранее па-

циенты, в том числе с титром ВНА  $<1:10$ , не заражались оспой при контакте с больными. Защитный эффект инъекционного препарата противооспенного иммуноглобулина (vaccinia immune globulin) позволил сделать вывод о том, что даже низкий уровень

Таблица 1. Распределение специфичных к вирусу осповакцины полифункциональных CD4+ Т-клеток по экспрессии маркеров CCR7 (CD197) и CD45RA через 1.5 года после вакцинации противооспенными вакцинами

Группы	№ сыворотки крови	T <sub>CM</sub> – клетки центральной памяти CCR7+CD45RA-	Наивные Т-клетки CCR7+CD45RA+	T <sub>EM</sub> – клетки эффекторной памяти CCR7-CD45RA-	T <sub>EMRA</sub> CCR7-CD45RA+
Группа «ОртопоксВак, 10 <sup>7</sup> однократно»	0-4-12	6.8±3.6	нд*	89.4±4.1	3.8±0.6
	0-4-17	7.5±0.5	1.7±0.8	28.0±1.0	62.8±1.8
	0-4-8	14.7±6.4	нд	85.3±6.4	нд
	0-4-15	8.2±0.3	нд	87.0±0.3	4.7±0.6
	0-4-3	5.3±0.2	0.6±0.8	85.2±3.1	8.9±4.1
	0-4-16	7.2±0.1	нд	92.5±0.7	нд
	0-4-10	5.9±2.6	нд	90.0±3.3	4.2±5.9
	0-4-11	6.0±2.9	нд	92.1±2.9	2.0±0.1
	0-4-13	9.1±0.5	нд	88.7±0.1	2.2±0.3
	0-4-14	4.2±5.9	нд	92.0±0.5	3.8±0.4
	0-4-1	6.1±2.1	0.5±0.7	88.1±0.3	5.3±1.1
	0-4-2	7.8±4.6	нд	89.9±1.4	2.3±3.2
	0-4-5	4.4±1.2	нд	91.2±4.1	4.4±2.9
	0-4-9	13.8±3.2	нд	84.2±3.2	2.0±0.1
Группа «ОртопоксВак, 10 <sup>6</sup> двукратно»	0-5-3	5.6±0.9	нд	88.8±1.8	5.6±0.9
	0-5-16	4.9±0.9	нд	85.3±2.2	9.8±1.1
	0-5-4	14.0±2.2	нд	84.9±3.7	1.1±0.1
	0-5-5	8.2±2.5	1.4±2.0	80.8±17.3	8.6±1.6
	0-5-6	3.8±1.4	нд	95.7±4.7	нд
	0-5-8	5.3±0.8	2.9±4.2	81.1±6.5	10.6±1.1
	0-5-9	8.8±2.3	0.3±0.4	87.3±2.1	3.6±2.1
	0-5-11	6.1±3.4	0.6±0.3	90.1±2.0	3.2±0.3
	0-5-12	7.6±6.4	нд	90.9±8.6	1.5±1.1
	0-5-17	12.7±0.8	1.3±1.9	84.8±2.3	1.1±0.1
	0-5-18	10.4±2.0	3.3±0.1	75.8±0.8	10.5±1.1
	0-5-1	6.8±0.8	нд	86.2±3.5	7.0±2.7
	0-5-2	7.3±0.4	1.0±0.1	91.2±0.4	0.5±0.7
	0-5-10	6.3±0.1	0.8±0.4	92.4±0.3	0.5±1.1
0-5-7	9.5±2.1	0.4±2.1	86.0±1.5	2.0±2.8	
Группа «положительный контроль»	0-2-34	6.3±1.3	5.3±0.9	77.1±3.2	11.4±1.2
	0-2-32	1.9±0.8	нд	93.1±1.1	5.1±2.3
	0-2-2	12.2±0.2	1.2±0.1	72.5±2.8	14.1±2.1
	0-2-3	9.0±2.7	2.2±0.1	59.6±1.6	29.3±3.3
	0-2-30	7.3±2.8	нд	90.9±5.4	1.9±0.6
	0-2-36	4.2±1.2	1.7±0.2	79.6±4.4	14.6±3.1

\*Примечание: нд – не детектировали (ниже уровня чувствительности метода).

ВНА может обеспечивать достаточную степень защиты против оспы [19].

Протективный иммунитет к оспе обеспечивается не только ВНА, важную роль в защите от данной инфекции играет также клеточный иммунный ответ [15, 19–21]. Однако в период проведения мероприятий по ликвидации оспы методы анализа клеточно-

опосредованного иммунного ответа еще не были достаточно развиты, поэтому критерии протективного уровня Т-клеточного ответа на противооспенную вакцинацию до сих пор не определены [16, 22].

Т-клетки участвуют в ранней идентификации и подавлении вирусных инфекций, а также поддерживают выработку антител В-клетками. Эта

Таблица 2. Распределение специфичных к вирусу осповакцины полифункциональных CD4+ Т-клеток по экспрессии маркеров CCR7 (CD197) и CD45RA через 3 года после вакцинации противооспенными вакцинами

Группы	№ сыворотки крови	T <sub>CM</sub> – клетки центральной памяти CCR7+CD45RA-	Наивные Т-клетки CCR7+CD45RA+	T <sub>EM</sub> – клетки эффекторной памяти CCR7-CD45RA-	T <sub>EMRA</sub> CCR7-CD45RA+
Группа «ОртопоксВак. 10 <sup>7</sup> однократно»	155	6.6±2.2	0.5±0.1	87.2±0.9	5.8±0.7
	158	5.8±3.0	нд*	91.6±6.7	2.6±0.6
	164	12.9±4.1	нд	87.1±4.1	нд
	166	7.5±1.0	нд	82.8±4.7	6.7±1.7
	199	7.0±0.2	0.6±0.2	86.9±0.1	5.6±0.1
	206	11.3±5.2	нд	86.8±6.1	1.9±0.9
	209	10.2±0.5	нд	86.4±1.5	1.3±1.8
	216	10.9±2.7	0.7±0.1	85.4±2.4	3.1±0.4
	222	10.8±2.2	нд	86.1±0.8	3.1±3.0
	223	14.2±1.9	1.7±0.6	82.3±4.0	1.8±2.5
	229	7.7±0.1	нд	54.6±0.5	36.7±0.4
	246	8.8±2.9	нд	87.9±7.5	3.3±1.6
	249	7.6±1.5	1.1±0.3	85.7±0.9	5.6±2.1
	246	11.0±1.0	0.8±1.1	85.6±5.4	2.7±0.5
	259	8.0±0.6	нд	89.7±1.4	2.3±0.7
Группа «ОртопоксВак. 10 <sup>6</sup> двукратно»	059	9.2±3.1	2.2±1.1	82.6±3.8	6.0±0.2
	089	3.5±4.9	нд	88.8±3.6	7.8±2.5
	095	6.1±1.2	2.6±0.7	89.6±0.1	1.7±0.3
	098	7.1±0.1	нд	92.4±9.4	0.1±0.1
	108	3.8±1.7	0.6±0.3	85.8±2.1	9.8±2.1
	106	8.0±0.2	нд	88.2±2.5	3.8±1.2
	105	6.0±1.3	1.1±0.4	90.6±1.2	2.3±0.1
	104	7.1±1.2	0.6±0.2	88.4±1.2	3.9±0.2
	103	9.0±2.8	нд	81.2±1.7	9.8±2.9
	178	4.1±3.2	0.9±0.3	87.6±4.9	7.4±2.4
	177	9.6±1.3	нд	90.8±9.3	2.6±0.1
	109	6.7±0.1	нд	86.4±1.8	6.8±1.8
	255	6.5±0.7	нд	90.5±0.7	3.0±0.1
	256	7.3±0.4	нд	91.8±0.4	2.0±0.1
	257	6.0±1.4	нд	93.9±7.1	2.5±1.3
Группа «положительный контроль»	BLV	7.1±1.6	0.5±0.7	90.5±3.9	1.9±0.5
	DGV	5.9±0.8	0.7±0.1	75.7±0.6	17.7±1.3
	RAS	5.0±0.1	0.4±0.5	79.3±2.9	15.3±2.4
	GTA	13.0±2.6	0.3±0.4	83.6±3.4	3.2±0.8
	FEN	7.7±2.9	нд	68.3±9.5	24.0±1.4
	NIN	9.8±1.6	2.9±1.2	87.2±1.4	нд
	LMP	7.9±1.7	3.7±0.1	67.1±1.6	21.3±3.4

\*Примечание: нд – не детектировали (ниже уровня чувствительности метода).

центральная роль Т-клеток делает их важной мишенью для оценки иммунного ответа на инфекцию или вакцинацию.

Вакцина против оспы индуцирует устойчивые клеточно-опосредованные иммунные ответы со стороны CD4+ и CD8+ Т-клеток, популяции которых

достигают максимума через две–четыре недели после иммунизации, а затем сокращаются, сохраняя стабильные Т-клетки памяти [23, 24]. Следует отметить, что популяция CD8+ Т-клеток памяти снижается быстрее, чем популяция CD4+ Т-клеток памяти [25]. Потребность в CD4+ Т-клетках для за-

щиты очевидна, поскольку антитела, специфичные к ВОВ, не формируются у животных, лишенных CD4+ Т-клеток [26, 27]. Также CD4+ Т-клетки необходимы для оптимальной функции цитотоксических Т-лимфоцитов и формирования иммунологической памяти [28].

Основной трудностью доказательства эффективности 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 новые вакцины в клинических испытаниях должны тестироваться по доступным параметрам и сравниваться с ранее используемыми в период ликвидации оспы противооспенными вакцинами первого поколения [16, 23].

11 ноября 2022 года Министерство здравоохранения Российской Федерации зарегистрировало первую в мире противооспенную аттенуированную вакцину четвертого поколения ОртопоксВак (Вакцина для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций на основе вируса осповакцины живая культуральная). Эта вакцина получена с использованием штамма Л-ИВП ВОВ, применяемого в России в качестве противооспенной вакцины первого поколения (Вакцина оспенная живая) [2, 11], в геноме которого методами генетической инженерии направленно инактивированы гены, кодирующие гамма-интерферонсвязывающий белок (*B8R*), комплементсвязывающий белок (*C3L*), Vsl-2-подобный ингибитор апоптоза (*N1L*), гемагглютинин (*A56R*), тимидинкиназу (*J2R*) и ген *A35R*, белковый продукт которого ингибирует представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II, иммунное праймирование Т-лимфоцитов и последующий синтез хемокинов и цитокинов. Созданный штамм ВОВ получил название VACΔ6 [11]. При проведении комплекса доклинических испытаний [29], а затем КИ фаз I и II/III было показано, что вакцина ОртопоксВак является слабо реактогенным и безопасным препаратом, иммунологическая активность которого сопоставима с активностью используемой в России противооспенной вакцины первого поколения.

Значения GMT ВНА в сыворотках крови добровольцев на 60, 90 и 180 сутки после двукратной иммунизации вакциной ОртопоксВак в дозе  $10^6$  ООЕ составили 79.4, 75.9 и 69.2. После однократного введения ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ данные показатели были 138.0, 31.7 и 31.6 соответственно. Значения GMT ВНА в сыворотках крови добро-

вольцев, привитых двухэтапным методом вакциной первого поколения, составляли в те же временные периоды 104.7, 52.5 и 63.1.

Как видим, постепенное снижение титров ВНА наблюдалось в течение 6 месяцев во всех изученных группах вакцинированных добровольцев.

Следует отметить, что ОртопоксВак имеет более высокую иммуногенность по сравнению с получившей широкое распространение в последние годы противооспенной вакциной третьего поколения MVA [30]. Эта аттенуированная вакцина является реплицирующейся в организме человека и поэтому для достижения удовлетворительного иммунного ответа вводится двукратно в высокой дозе. В клиническом исследовании было показано, что в сыворотках крови двух групп добровольцев после двукратной иммунизации препаратами жидкой или лиофильно высушенной форм MVA на 14 сут после второй инъекции значения GMT ВНА составили 45.2 и 77.6 соответственно, а на 180 сут снизились до 10.2 и 11.7 соответственно [31].

Согласно действующим в России методическим указаниям «Проведение вакцинопрофилактики натуральной оспы. МУ 3.3.1.2044-06» очередную ревакцинацию вакциной первого поколения людей из групп риска, кроме непосредственно работающих с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян, проводят через 5 лет. Работающих с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян ревакцинируют через 3 года.

Учитывая измененную генетическую программу штамма ВОВ VACΔ6 по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП, важное значение имело изучение длительности и напряженности поствакцинального иммунного ответа у лиц, иммунизированных вакциной ОртопоксВак. В процессе выполненных ранее КИ развитие гуморального иммунного ответа оценивали лишь в течение 6 месяцев после вакцинации, продукцию ВОВ-специфичных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при этом не измеряли. Нами оценены уровни гуморального и Т-клеточного ответа на внутрикожное введение ОртопоксВак через 1.5 и 3 года у добровольцев II/III фаз КИ и через 5 лет у добровольцев I фазы КИ в сравнении с лицами, привитыми оспенной вакциной первого поколения.

Для оценки гуморального иммунного ответа использовали общепринятые методики: определение титра специфических антител в ИФА и в реакции нейтрализации ВОВ на культуре клеток.

Оценка титров ВОВ-специфичных антител в ИФА (рис. 3) выявила значительные индивидуальные различия между добровольцами в каждой из сравниваемых групп, что соответствует опубликованным данным и может быть обусловлено поли-

морфизмом генов, связанных с функционированием иммунной системы пациентов [13, 32, 33]. Важно отметить, что выраженный ВОВ-специфичный гуморальный ответ регистрировался и через 3 года и через 5 лет после иммунизации как вакциной первого поколения, так и созданной вакциной четвертого поколения ОртопоксВак. При этом достоверных различий между сравниваемыми группами не выявлено.

После 1.5 лет от момента иммунизации вакциной ОртопоксВак у части пациентов происходило снижение титров ВНА (рис. 4А,Б). При этом следует отметить, что при иммунизации ОртопоксВак в дозе  $10^7$  ООЕ достоверных различий между группами во временных точках 1.5, 3 года и 5 лет не наблюдали (рис. 4А), а в группах, вакцинированных двукратно в дозе  $10^6$  ООЕ, уровень титров ВНА после 1.5 лет достоверно снижался (рис. 4Б).

Различия в проценте добровольцев с титром ВНА  $>1:10$  в точках 3 года и 5 лет после вакцинации обусловлены тем, что в эти группы входят разные добровольцы, принявшие участие в КИ II/III фаз и I фазы соответственно.

Цитометрические исследования препаратов РВМС вакцинированных добровольцев через 1.5 года после иммунизации показали наличие специфичных к ВОВ Т-клеток как Т-хелперов (CD4+), так и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). При этом клеточно-опосредованный иммунный ответ Т-хелперов был более выражен, чем цитотоксических Т-лимфоцитов. Уровни CD8+ клеток в обеих группах добровольцев, иммунизированных ОртопоксВак, достоверно превышали показатели в группе положительного контроля (рис. 5), что, по-видимому, обусловлено различиями в генетических программах рекомбинантного VACΔ6 и исходного штамма Л-ИВП ВОВ.

Вакцина ОртопоксВак через 1.5 года после вакцинации индуцировала эффективный Т-хелперный клеточный иммунный ответ к ортопоксвирусам независимо от дозы и схемы применения (рис. 6).

При изучении внутриклеточных цитокинов после костимуляции аттенуированным штаммом VACΔ6 ВОВ препаратов РВМС добровольцев, привитых

как вакциной первого поколения, так и вакциной четвертого поколения, через 3 года выявили специфичные к вирусу Т-клеточные иммунные ответы только со стороны Т-хелперов. Специфичные к ВОВ цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+) детектировали только у одного добровольца после двукратно применения ОртопоксВак в дозе  $10^6$  ООЕ.

Специфичные к ВОВ Т-хелперы детектировали как через 3 года, так и через 5 лет после вакцинации ОртопоксВак, однако интенсивность клеточно-опосредованного иммунного ответа варьировала в зависимости от дозы и схемы применения. Т-хелперный ответ на иммунизацию добровольцев вакциной ОртопоксВак однократно в дозе  $10^7$  ООЕ сохранялся на относительно высоком уровне в течение 3 лет, а затем значительно снижался. При иммунизации пациентов этой же вакциной, но двукратно в дозе  $10^6$  ООЕ резкое снижение уровня Т-хелперов детектировали после 1.5 лет (рис. 6). Специфичные Т-клетки в основном имели фенотип эффекторных клеток памяти (табл. 1, 2), что указывает на активное взаимодействие с антигеном.

Процент добровольцев с клеточно-опосредованным иммунным ответом к ВОВ после применения противооспенной вакцины четвертого поколения ОртопоксВак составил 100% как через 3 года, так и через 5 лет независимо от использованной дозы и схемы применения.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что вакцина ОртопоксВак при ее внутрикожном одноразовом введении в дозе  $10^7$  ООЕ обеспечивает выраженный специфичный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ в течение не менее 3 лет. Для выбора схемы ревакцинации вакциной ОртопоксВак с целью достижения более продолжительного протективного иммунитета против ортопоксвирусных инфекций необходимы дополнительные клинические исследования. ●

*Работа выполнена в рамках государственного задания ГЗ-1/24 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (номер государственного учета НИР Рег. № 124030100120-8).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
- Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // Viruses. 2023. V. 15. P. 103. <https://doi.org/10.3390/v15010103>
- Simon W.L., Salk H.M., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., Poland G.A. // Immunotherapy. 2014. V. 6(10). P. 1097–1112. <https://doi.org/10.2217/imt.14.72>
- Shchelkunov S.N. // PLoS Pathog. 2013. V. 9. e1003756. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
- Zhu M., Ji J., Shi D., Lu X., Wang B., Wu N., Wu J., Yao H., Li L. // Front. Med. 2022. V. 16. P. 507–517. <https://doi.org/10.1007/s11684-022-0952-z>
- Kumar S., Guruparan D., Karuppanan K., Kumar K.J.S. // Pathogens. 2024. V. 14. P. 1. <https://doi.org/10.3390/pathogens14010001>
- Shchelkunov S.N. // Vaccine. 2011. V. 29 (Suppl. 4). P. D49–

- D53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.037>
8. Olson V.A., Shchelkunov S.N. // *Viruses*. 2017. V. 9. P. e242. <https://doi.org/10.3390/v9090242>
  9. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. P. 113–121.
  10. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A., Shulgina I.S., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Kisev D.N., Karpenko L.I., Shchelkunova G.A., Sergeev A.A. // *Acta Naturae*. 2024. V. 16. P. 82–89. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27384>
  11. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 35–38. <https://doi.org/10.1134/S1607672916010105>
  12. Perekrest V.V., Movsesyants A.A., Mukhacheva A.V., Shevtsov V.A., Shvedov D.V., Borisevich I.V. // *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2013. № 2. P. 4–13.
  13. Ермилова О.С., Гинько З.И., Белявская В.А., Кузубов В.И., Сергеев А.А., Горбатовская Д.О., Азаев М.Ш., Агафонов А.П., Воевода М.И., Сергеев А.Н. // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015. № 1. С. 75–78. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-1-75-78>
  14. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. // *Viruses*. 2020. V. 12(8). P. 795. <https://doi.org/10.3390/v12080795>
  15. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12(1). P. 33–41. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10935>
  16. Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x>
  17. Mack T.M., Noble J.Jr., Thomas D.B. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1972. V. 21(2). P. 214–218. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1972.21.214>
  18. Sarkar J., Mitra A., Mukherjee M. // *Bull. World Health Organ.* 1975. V. 52(3). P. 307–311.
  19. Hammarlund E., Lewis M.W., Hansen S.G., Strelow L.I., Nelson J.A., Sexton G.J., Hanifin J.M., Slifka M.K. // *Nat. Med.* 2003. V. 9. P. 1131–1137. <https://doi.org/10.1038/nm917>
  20. Hammarlund E., Lewis M.W., Hanifin J.M., Mori M., Koudelka C.W., Slifka M.K. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 12754–12760. <https://doi.org/10.1128/JVI.01763-10>
  21. Kunasekaran M.P., Chen X., Costantino V., Chughtai A.A., MacIntyre C.R. // *Mil. Med.* 2019. V. 184. P. e668. <https://doi.org/10.1093/milmed/usz181>
  22. Francis A. Ennis, John Cruz, Walter E. Demkowicz, Jr., Alan L. Rothman, David J. McClain // *J. Infect. Dis.* 2002. V. 185. P. 1657–1659. <https://doi.org/10.1086/340517>
  23. 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. // *Antiviral Res.* 2009. V. 84. P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.06.006>
  24. Amanna I.J., Slifka M.K., Crotty S. // *Immunol. Rev.* 2006. V. 211. P. 320–337. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00392.x>
  25. Amara R.R., Nigam P., Sharma S., Liu J., Bostik V. // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 3811–3816. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.8.3811-3816.2004>
  26. Xu R., Johnson A.J., Liggitt D., Bevan M.J. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. P. 6265–6271. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6265>
  27. Edghill-Smith Y., Bray M., Whitehouse C.A., Miller D., Mucker E., Manischewitz J., King L.R., Robert-Guroff M., Hryniewicz A., Venzon D., et al. // *J. Infect. Dis.* 2005. V. 191. P. 372–381. <https://doi.org/10.1086/427265>
  28. Sun J.C., Bevan M.J. // *Science*. 2003. V. 300. P. 339–342. <https://doi.org/10.1126/science.1083317>
  29. Щелкунов С.Н., Якубицкий С.Н., Нестеров А.Е., Колосова И.В., Сергеев А.А., Зайковская А.В., Кабанов А.С., Нечаева Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В. и др. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022. Т. 21(6). С. 34–47. <https://doi.org/10.31631/2073-346-2022-21-6-34-47>
  30. Volz A., Sutter G. // *Adv. Virus Res.* 2017. V. 97. P. 187–243. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.07.001>
  31. Frey S.E., Wald A., Edupuganti S., Jackson L.A., Stapleton J.T., El Sahly H., El-Kamary S.S., Edwards K., Keyserling H., Winokur P., et al. // *Vaccine*. 2015. V. 33. P. 5225–5234. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.075>
  32. Benhnia M.R., McCausland M.M., Su H., Singh K., Hoffmann J., Davies D.H., Felgner P.L., Head S., Sette A., Garboczi D.N., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 3751–3768. <https://doi.org/10.1128/jvi.02244-07>
  33. Moutafsi M., Tschärke D.C., Vaughan K., Koelle D.M., Stern L., Calvo-Calle M., Ennis F., Terajima M., Sutter G., Crotty S., et al. // *Future Microbiol.* 2010. V. 5. P. 221–239. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.110>