

Научный обзор исследований вируса натуральной оспы, 1999–2010 гг.

Декабрь 2010 г.

ГЛОБАЛЬНОЕ
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И
ОТВЕТНЫЕ ДЕЙСТВИЯ



Всемирная
организация
здравоохранения

Научный обзор исследований вируса натуральной оспы, 1999–2010 гг.

Декабрь 2010 г.



**Всемирная организация
здравоохранения**

Выражение признательности

ВОЗ хотела бы выразить признательность всем тем, кто принял участие в составлении данного документа, а именно:

Редакторам

Ali S. Khan

Центры контроля заболеваний и профилактики, Атланта, Соединенные Штаты Америки

Geoffrey L. Smith

Имперский колледж Лондона, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии

Авторам

Antonio Alcamí, Inger Damon, David Evans, John W. Huggins, Christine Hughes, Peter B. Jahrling, Grant McFadden, Hermann Meyer, Bernard Moss, Sergei Shchelkunov, Evgeni Stavskiy, Nina Tikunova

Секретариату ВОЗ

Pierre Formenty, Daniel Lavanchy

© Всемирная организация здравоохранения, 2011 г.

Все права защищены.

Обозначения, используемые в настоящем издании, и приводимые в нем материалы никоим образом не выражают мнения Всемирной организации здравоохранения относительно юридического статуса какой-либо страны, территории, города или района, их правительства или делимитации их границ. Пунктирными линиями на картах показаны приблизительные границы, в отношении которых пока еще может быть не достигнуто полного согласия.

Упоминание конкретных компаний или продукции некоторых изготовителей не означает, что Всемирная организация здравоохранения отдает им предпочтение по сравнению с другими, которые являются аналогичными, но не упомянуты в тексте, или рекомендует их к использованию. Исключая ошибки и пропуски, наименования патентованной продукции выделяются начальными прописными буквами.

Всемирная организация здравоохранения приняла все разумные меры предосторожности для проверки информации, содержащейся в настоящей публикации. Однако публикуемый материал распространяется без каких-либо гарантий, явно выраженных или подразумеваемых. Ответственность за интерпретацию и использование данного материала возлагается на читателя. Ни при каких обстоятельствах Всемирная организация здравоохранения не несет ответственности за ущерб, возникший в результате его использования.

Только названные выше редакторы и авторы несут ответственность за мнения, выраженные в данной публикации.

Редакторские услуги предоставила компания Biotext, Канберра, Австралия

Напечатано Службой подготовки документов ВОЗ, Женева, Швейцария

Содержание

История вопроса.....	vii
1 Противοоспенные вакцины.....	1
Резюме	2
1.1 Введение	3
1.2 История проведения противοоспенных вакцинаций	3
1.3 Программа ВОЗ глобальной ликвидации натуральной оспы	4
1.4 Происхождение вируса осповакцины	5
1.5 Вакцина, применявшаяся для ликвидации натуральной оспы.....	6
1.6 Тканевые культуры и клональные противοоспенные вакцины.....	7
1.7 Противοоспенные вакцины, ослабленные серией пассажей в тканевой культуре или посредством генетической рекомбинации	8
1.8 Использование белковых субъединиц и ДНК для получения противοоспенных вакцин	9
1.9 Вакцинация после инфицирования вирусом оспы	10
1.10 Проблемы противοоспенной вакцинации, которые предстоит решать в будущем	10
Сокращения.....	12
Справочные материалы	13
2 Лабораторная диагностика оспы (вируса натуральной оспы)	17
Резюме	18
2.1 Введение	19
2.2 Сбор и обработка образцов.....	20
2.3 Выделение вирусов.....	21
2.4 Электронная микроскопия	22
2.5 Диагностические методы, основанные на использовании генома или элементов генома	23
2.5.1 Работа с ДНК вируса натуральной оспы.....	23
2.5.2 Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	23
2.5.3 Полимеразная цепная реакция.....	24
2.5.4 Полимеразная цепная реакция – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	25

2.5.5	PCR в реальном времени	25
2.5.6	Анализ с использованием микрочипов (microarray).....	28
2.5.7	Секвенирование	29
2.6	Диагностические методы, основанные на использовании белков	30
2.7	Серологические методы диагностики	30
2.8	Итоговые размышления	32
	Сокращения.....	33
	Справочные материалы	34
3	Геномика вируса натуральной оспы	37
	Резюме	38
3.1	Геном вируса натуральной оспы.....	39
3.2	Эволюция вируса натуральной оспы	43
3.3	Технологии исследования поксвирусного генома	44
3.4	Рекомендации по контролю исследований геномов вируса натуральной оспы.....	46
	Сокращения.....	50
	Справочные материалы	51
4	Статус репозитория вирус натуральной оспы и нуклеиновых кислот в Сотрудничающих центрах ВОЗ	55
	Резюме	56
4.1	Введение	57
4.2	Статус репозитория штаммов вируса натуральной оспы и нуклеиновых кислот в Сотрудничающем центре ВОЗ в Российской Федерации	57
4.2.1	Состояние коллекции штаммов вируса натуральной оспы и ее репозитория.....	57
4.2.2	Состояние коллекции ДНК вируса натуральной оспы в Центре "Вектор" и ее репозиторий.....	62
4.3	Статус репозитория штаммов вируса натуральной оспы и нуклеиновых кислот в Сотрудничающем центре ВОЗ в Соединенных Штатах Америки	69
	Сокращения.....	85
	Справочные материалы	86

5	Животные модели и патогенез	87
	Резюме	88
5.1	Введение	89
5.2	Животные модели	89
5.3	Заключение	99
	Сокращения.....	100
	Справочные материалы	101
6	Разработка противовирусных лекарств для лечения натуральной оспы – статус низкомолекулярных терапевтических средств	105
	Резюме	106
6.1	Введение	108
6.2	Открытие лекарственных препаратов	110
6.2.1	Тиосемикарбазоны	111
6.2.2	Оценка зарегистрированных и новых исследуемых лекарств.....	111
6.2.3	Ациклические нуклеозидные фосфонаты.....	111
6.2.4	Ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы	112
6.2.5	Ингибиторы S-аденозилгомоцистеингидролазы	112
6.2.6	Ингибиторы оротидин-5'-монофосфатдекарбоксилазы	113
6.2.7	Ингибиторы тимидилатсинтазы.....	113
6.2.8	Соединения, блокирующие определенные стадии сборки вирусов	113
6.2.9	Киназы Abl семейства	114
6.2.10	Иммунобиологические препараты	114
6.2.11	Разнообразные соединения.....	114
6.2.12	Соединения, структура которых не будет установлена до проведения дальнейших разработок.....	115
6.2.13	Основанный на открытиях в молекулярной биологии метод ингибирования репликации вирусов, например с использованием РНК-интерференции	115
6.3	Приматы в качестве животных моделей для изучения возбудителей натуральной оспы и оспы обезьян.....	115
6.4	Необходимость клинических исследований для подтверждения данных, полученных на животных моделях	117
6.5	Внутривенно вводимый цидофовир.....	117
6.6	Пероральный препарат CMX001	119
6.7	Пероральный препарат ST-246.....	120

6.8	Влияние введения противовирусных препаратов на защитное действие вакцин	122
6.8.1	Цидофовир и Dгувах	122
6.8.2	ST-246 (тековиримат) и Dгувах и АСАМ2000	123
6.9	Лекарства, находящиеся в клинической разработке	123
6.10	Время, необходимое для разработки лекарственных препаратов для лечения натуральной оспы.....	125
6.11	Заключительное обсуждение.....	126
	Сокращения.....	128
	Справочные материалы	129

История вопроса

Вопрос об уничтожении запасов вируса натуральной оспы, возбудителя оспы человека, обсуждался на Всемирной ассамблее здравоохранения с 1986 года, после беспрецедентного заявления в 1980 году о ликвидации оспы. Несколько комитетов проводили интенсивные дискуссии, решая вопрос, следует ли сохранять оставшийся живой материал вируса натуральной оспы для дальнейших важных медицинских исследований, а также для определения природы подобных исследований, в которых используется живой вирус. Консультативный комитет Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по исследованию вируса натуральной оспы (ACVVR), который был создан в 1999 году, контролирует все исследования, в которых используется живой вирус натуральной оспы, основываясь на решениях Всемирной ассамблеи здравоохранения, содержащихся в WHA 49.10, WHA 52.10 и WHA 55.15. Санкционированные ВОЗ репозитории живых вирусов натуральной оспы в настоящее время сохраняются только в двух Сотрудничающих центрах ВОЗ: Центрах контроля заболеваний и профилактики, Атланта, Соединенные Штаты Америки, и лаборатории Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор", Новосибирск, Российская Федерация.

В мае 2007 года шестидесятая Всемирная ассамблея здравоохранения в резолюции WHA 60.1 обратилась к Генеральному директору ВОЗ с просьбой представить в 2010 году масштабный обзор по результатам проведенных исследований и исследований, которые осуществляются в настоящее время; кроме того, обзор должен включать планы и требования в отношении последующих важных исследований в рамках достижения глобальных целей в сфере здравоохранения и учитывать рекомендации ACVVR, с тем чтобы на шестьдесят четвертой Всемирной ассамблее здравоохранения можно было достичь всеобщего согласия в отношении сроков уничтожения имеющихся запасов вируса натуральной оспы.

В ноябре 2007 года ACVVR предложил составить письменные резюме исследований, с тем чтобы они были обсуждены Всемирной ассамблеей здравоохранения в 2011 году. В ноябре 2008 года ACVVR принял решение использовать при составлении масштабного обзора следующие методы:

- подготовка всеобъемлющего обзора литературы и неопубликованных данных, касающихся исследований живых вирусов натуральной оспы, в шести главах (подробно излагаемых ниже), учрежденной ACVVR группой ученых, которые представляют все области исследований и разработок, связанных с вирусом натуральной оспы, и важных изысканий, проводившихся с другими ортопоксвирусами;
- обсуждение научного обзора избранными членами ACVVR (декабрь 2009 года – апрель 2010 года);
- обсуждение научного обзора внешней группой независимых экспертов, работающих вне сферы исследований вируса натуральной оспы, а именно Консультативной группой независимых экспертов по обзору программы исследования вируса натуральной оспы (AGIES) (сентябрь – ноябрь 2010 года);
- представление научного обзора и доклада AGIES на окончательное рассмотрение ACVVR (ноябрь 2010 года);

- обсуждение Исполнительным комитетом ВОЗ научного обзора и доклада AGIES, санкционированное резолюцией WHA 60.1, включая рекомендации ACVVR (WHA 60.1 OP4(1)) (январь 2011 года);
- рассмотрение упомянутого доклада и замечаний Исполнительного комитета Всемирной ассамблеей здравоохранения (май 2011 года).

Первая часть данного процесса – составление всеобъемлющего научного обзора и резюме – была инициирована учрежденной членами ACVVR на своем заседании в 2008 году группой ученых, которые представляют все области исследований, посвященных вирусу натуральной оспы. Под надзором ACVVR группа ученых, компетентных в области изучения вируса натуральной оспы или других ортопоксвирусов, приступила к написанию настоящего документа под названием "Научный обзор исследований вируса натуральной оспы, 1999–2010 годы". Документ состоит из шести глав, в которых рассматриваются такие темы, как противооспенные вакцины, лабораторная диагностика, геномика вируса натуральной оспы, статус репозитория ВОЗ, животные как модели и противовирусные лекарственные средства.

В ноябре 2009 года ACVVR рассмотрел и обсудил шесть глав настоящего документа. С ноября 2009 года до октября 2010 года документ редактировался и обсуждался несколько раз.

В октябре 2010 года AGIES проанализировала эти шесть глав и представила независимую оценку потребностей в отношении живых вирусов натуральной оспы.

В целом во всех главах документа и независимом анализе показан огромный прогресс, достигнутый под эгидой ВОЗ, который позволил:

- охарактеризовать ряд различных штаммов вируса натуральной оспы;
- разработать два превосходных потенциальных противовирусных препарата с различными механизмами действия;
- разработать новые, менее реактогенные противооспенные вакцины (как лицензированные, так и нелицензированные);
- разработать диагностические тесты вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов;
- определить животных в качестве моделей для исследований вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов.

Предшествующая версия "Научного обзора исследований вируса натуральной оспы, 1999–2010 годы" от 10 ноября 2010 года была представлена на 12-м заседании ACVVR 17–18 ноября 2010 года. Нынешняя версия (от декабря 2010 года) включает исправления, предложенные AGIES и членами ACVVR.

Ali S Khan and Geoffrey L Smith

Женева, декабрь 2010 года

1 Противооспенные вакцины

Antonio Alcami¹ и Bernard Moss²

¹ Центр молекулярной биологии Северо Очоа (CSIC-UAM), Мадрид, Испания

² Национальный институт аллергии и инфекционных болезней, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэрилонд, Соединенные Штаты Америки

Выражение признательности

Обзор противооспенных вакцин был осуществлен при поддержке Отдела внутренних исследований Национального института аллергии и инфекционных болезней Соединенных Штатов, Национальных институтов здравоохранения Соединенных Штатов и Министерства науки и инноваций Испании.

Резюме

Значение для общественного здравоохранения

Натуральная оспа – единственное заболевание человека, которое было ликвидировано в результате кампании глобальной вакцинации. Это достижение остается одним из величайших триумфов медицинской науки. Противооспенная вакцина, в составе которой живой вирус коровьей оспы, оказалась высокоэффективной. Однако ее применение сопровождалось случаями тяжелых осложнений, особенно у лиц с иммунодефицитом или страдающих от экземы. Кроме того, поскольку вакцина производилась в живых животных в нестерильных условиях, это не соответствовало современным требованиям, предъявляемым к изготовлению вакцин. Таким образом, очевидно, что в интересах общественного здравоохранения необходимо разработать новую, эффективную и безопасную вакцину.

Успехи, достигнутые к настоящему времени

Были получены и лицензированы противооспенные вакцины, изготовленные в клетках тканевой культуры. Однако эти вакцины вызывают побочные эффекты, по-видимому, в той же степени, что и оригинальные вакцины. В связи с этим было применено несколько новых подходов с целью получения более безопасных вакцин. Наибольший успех был достигнут со штаммами vaccinia вируса, которые были более ослабленными, а именно с модифицированными вирусами vaccinia Ankara (MVA) и LC16m8, которые были выделены посредством многократных пассажей в тканевых культурах. Штамм MVA в большей степени аттенуирован, чем LC16m8; его обычно вводят внутримышечно или подкожно, и поэтому он не вызывает типичных кожных поражений, которые являются признаком хорошо принявшейся прививки ("take"). Штамм LC16m8 может быть введен путем нанесения насечек на кожу, подобно традиционной противооспенной вакцине, но при этом кожное проявление положительного результата прививки более мягкое, чем при применении родительского штамма, штамма Lister вируса коровьей оспы. Было показано, что MVA и LC16m8 безопасны для приматов (кроме человека) и обеспечивают хорошую иммуногенность, включая защиту от вируса обезьяньей оспы (monkeypox virus), близкого родственника вируса натуральной оспы. Новое поколение вакцин, состоящих из живого vaccinia вируса со специфическими генными мутациями, ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), кодирующей гены вируса оспы, и очищенных белков, продемонстрировало многообещающие результаты в опытах на животных-моделях, но ни одна из этих вакцин не проходила клинических испытаний.

Результаты и выводы

Лицензирование противооспенных вакцин, выращенных в тканевой культуре, было важным шагом вперед; однако применение этих вакцин по медицинским критериям противопоказано для лиц с иммунодефицитом и определенными кожными заболеваниями. Поскольку натуральная оспа ликвидирована, эффективность вакцин нового поколения должна тестироваться с применением вирусов оспы, родственных вирусу натуральной оспы, в исследованиях по оценке защиты животных и в клинических исследованиях, проводимых с целью оценки безопасности и иммуногенности вакцин. Однако доверие к способности этих вакцин обеспечивать защиту от натуральной оспы возрастет, если будет применяться живой вирус натуральной оспы в *in vitro* тестах нейтрализации и в исследованиях на приматах (кроме человека).

1.1 Введение

В 1980 году было официально объявлено, что натуральная оспа ликвидирована в результате выполнения Глобальной программы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по ликвидации натуральной оспы. В связи с риском преднамеренного высвобождения вируса натуральной оспы вследствие террористического акта глобального характера некоторые страны производили противооспенные вакцины с целью восполнения их запасов. Противооспенная вакцина на основе vaccinia вируса (VACV) – это единственная в настоящее время вакцина, с помощью которой была ликвидирована инфекционная болезнь человека. Однако профиль ее безопасности не соответствует современным стандартам: применение вакцины сопряжено с риском переноса других инфекций (в связи с изготовлением вакцины в живых животных) и вызывает возникновение ряда побочных эффектов. Поэтому в последние годы противооспенные вакцины получали в тканевых культурах; они состоят из очищенных от бляшек или неклональных штаммов VACV, выросших в тканевых культурах или в содержащих эмбрион куриных яйцах. Некоторые из этих противооспенных вакцин основаны на нереплицирующих или очень ослабленных штаммах VACV, которые обеспечивают более высокую безопасность и хорошие иммуногенные свойства.

Информация, полученная в результате исследований VACV, позволяет разрабатывать ослабленные живые вакцины, созданные с применением методов генной инженерии, позволяющих модифицировать гены, которые обуславливают круг хозяев вируса или ускользание от иммунологического надзора. Еще одна стратегия, позволяющая избежать применения инфекционных VACV, – это иммунизация вирусными белками, которые индуцируют защитную иммунную реакцию против инфекции. Вакцины нового поколения можно испытывать на суррогатных животных моделях и сравнивать с применявшимися в целях ликвидации натуральной оспы вакцинами, используя такие характеристики, как нейтрализация вируса или индуцирование специфических иммунных реакций. Вакцины нового поколения более безопасны, чем традиционные противооспенные вакцины – свойство, которое может быть протестировано в клинических испытаниях на человеке, – и сохраняют иммуногенные свойства. Однако поскольку натуральная оспа ликвидирована, основным ограничением в проведении испытаний является невозможность продемонстрировать, что новые противооспенные вакцины индуцируют защитный иммунитет против натуральной оспы у человека.

1.2 История проведения противооспенных вакцинаций

Натуральная оспа – единственная болезнь человека, которая была ликвидирована в результате кампании всеобщей вакцинации, и это достижение остается одним из величайших триумфов современной медицинской науки (Fenner et al., 1988; Smith & McFadden, 2002; Henderson, 2009).

Вариоляция была первой мерой, примененной с целью контроля натуральной оспы. Вирус натуральной оспы (VARV), выделенный из оспенных пустул инфицированного лица, вводили посредством инсуффляции или скарификации лицам, не обладающим иммунитетом. Хотя эта процедура приводила к высокому коэффициенту смертности (0,5–2%), это был благоприятный результат по сравнению с коэффициентом смертности от натуральной оспы, перенесенной воздушно-капельным путем (до 40%). Вариоляция осуществлялась на протяжении нескольких столетий в Индии и Китае, прежде чем была введена в Западной Европе в 1723 году, и была единственным средством защиты от оспы до тех пор, пока Эдвард Дженнер (Edward Jenner) не ввел вакцинацию в 1796 году.

Дженнер, который был врачом в маленьком городке Беркли в Англии, заметил, что руки доярок иногда инфицируются вирусом коровьей оспы (СРХV), и эта локальная инфекция, по-видимому, обеспечивала защиту от натуральной оспы. Дженнер был первым, кто проверил эту гипотезу: он взял материал из кожного поражения у доярки Сары Нелмес и произвел вакцинацию мальчика Джеймса Фиппса. Когда Дженнер впоследствии посредством вариоляции произвел заражение мальчика, он оказался устойчивым к инфекции. После проведения дополнительных исследований Дженнер опубликовал данные ("Inquiry") по результатам своих наблюдений; тем самым было положено начало эре вакцинации.

Хотя были и другие, кто обратил внимание на корреляцию между инфекцией СРХV и резистентностью к натуральной оспе, именно Дженнер продемонстрировал эффективность вакцинации, произведя контрольную прививку VARV; он рекомендовал поддерживать культуру вируса посредством серии пассажей в организме человека и пропагандировал вакцинацию. Таким образом, есть все основания считать, что именно ему принадлежит честь открытия вакцинации. Практика вакцинации быстро вытеснила вариоляцию, и благодаря ее успехам подтвердился прогноз Дженнера, который он дал в 1801 году: "...результатом этой практики должна стать ликвидация оспы, самого страшного бедствия для рода человеческого" (Jenner, 1801).

Открытие было весьма своевременным, поскольку оспа тогда была главным бедствием Европы и всего мира. В течение пяти лет работа Дженнера "Inquiry" была переведена на большинство европейских языков, во многих странах были открыты институты вакцинации, и вакцина была доставлена на все континенты. Однако широкое распространение вакцинации было ограничено из-за технических проблем и недостаточности запасов вакцины. Оспа коров была редким заболеванием в Европе и отсутствовала на Американском континенте. Практиковалась вакцинация от человека к человеку, но она вызывала перенос других патогенов и в конце концов была запрещена.

Впоследствии СРХV и близкородственная вакцина VACV были получены в коже живых животных. Следующим достижением стала разработка лиофилизированной вакцины в 1950 году, что позволяло сохранять, транспортировать и применять вакцину в полевых условиях без охлаждения и без потери активности. Наконец, изобретение игл-вилок позволило даже неопытному персоналу успешно вводить вакцину.

1.3 Программа ВОЗ глобальной ликвидации натуральной оспы

В 1959 году двенадцатая Всемирная ассамблея здравоохранения приняла предложенную Советским Союзом резолюцию, в которой ставилась цель достижения глобальной ликвидации натуральной оспы (Fenner et al., 1988). С 1959 по 1966 год прогресс был более медленным, чем ожидалось, но в 1967 году стартовала Интенсивная программа ликвидации натуральной оспы. В стратегии всемирной вакцинации в рамках принятой программы особое внимание уделялось надзору за распространением оспы и применялся метод кольцевой вакцинации, с тем чтобы предотвратить перенос вируса от человека к человеку и осуществлять эпидемиологический контроль в отношении оспы. Таким образом, выявлялись новые случаи натуральной оспы, и инфекционных больных изолировали, а лиц, находившихся в тесном контакте с инфекционными больными, вакцинировали, и в этих случаях тоже устанавливался карантин. Данная стратегия привела к ликвидации оспы: последний случай естественного заболевания оспой был зафиксирован в Сомали в 1977 году. После проведенного на всех континентах крупномасштабного обследования ВОЗ

в 1979 году подтвердила факт глобальной ликвидации натуральной оспы, а тридцать третья Всемирная ассамблея здравоохранения 8 мая 1980 года объявила, что оспа окончательно ликвидирована.

Ликвидация натуральной оспы на сегодняшний день – это наиболее важное достижение ВОЗ, которое продемонстрировало, что с помощью массовой вакцинации можно добиться ликвидации инфекционных заболеваний. Успех был обусловлен шестью основными свойствами как вакцины, так и болезни:

- Натуральная оспа поражает только человека. В животном мире нет резервуара, в котором вирус мог бы сохраняться и из которого мог повторно интродуцироваться в популяцию людей.
- VARV не может вызывать латентные или персистентные инфекции, поскольку лица, выздоровевшие от этой болезни, свободны от всех вирусов.
- Натуральная оспа была тяжелой болезнью, и ее признаки легко выявлялись. Поэтому инфекционных больных быстро идентифицировали, а лиц, которые могли быть с ними в контакте, вакцинировали.
- Вакцина индуцировала продолжительный защитный иммунитет и была эффективна в отношении всех штаммов VARV.
- Ни один из вариантов VARV не мог избежать защитного иммунитета вследствие антигенного варьирования в связи с высоким сродством к вирусной ДНК-полимеразе и присутствия множественных антигенов.
- Вакцина была легкой в приготовлении, недорогой и сохраняла стабильность без охлаждения, что облегчало ее транспортировку при проведении кампании по глобальной ликвидации болезни.

Примечательно, что ликвидация натуральной оспы была осуществлена до наступления эры молекулярной биологии и при ограниченных знаниях о цикле репликации VACV, о вирусных белках, которые являются мишенями при создании нейтрализующего иммунитета, или об иммунных механизмах защиты.

В целях избежания повторной интродукции натуральной оспы в человеческую популяцию, под руководством ВОЗ все известные запасы VARV в лабораториях всего мира были либо уничтожены, либо отправлены в два репозитория вируса натуральной оспы – в лаборатории, в которых обеспечен высокий уровень безопасности – в Соединенных Штатах и Советском Союзе (ныне Российская Федерация). Эти репозитории вируса натуральной оспы – соответственно в Центрах контроля заболеваний и профилактики в Атланте и в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор" в Кольцово – в настоящее время единственные официальные места, где сохраняются запасы инфекционного VARV. Проводимые с этими образцами исследования тщательно контролируются ВОЗ.

1.4 Происхождение вируса осповакцины

Первоначально для противооспенной вакцинации использовали CPXV. Этот вирус изредка обнаруживается у рогатого скота и вызывает спорадические инфекции у человека и у ряда животных, но его резервуаром в природных условиях, по-видимому, являются дикие грызуны. В 1939 году Downie установил, что современные препараты, применяемые в качестве противооспенных вакцин, содержат другой вирус, который не обнаруживается в природе; после процедуры вакцинации этот вирус получил название VACV (Downie, 1939). С годами VACV вытеснил CPXV в качестве противооспенной

вакцины. После интенсивного использования VACV для вакцинации против натуральной оспы на протяжении всего XX века вирус стал инфицировать домашних животных, например буйволов в Индии и крупный рогатый скот в Бразилии. Эти животные могут, в свою очередь, переносить вирус к человеку. Несмотря на это, VACV не считается природным патогеном человека.

Как показывают анализы последовательностей в геноме вируса, маловероятно, что VACV происходит от CPXV или VARV. Предпочтительная гипотеза происхождения VACV состоит в том, что это вид ортопоксвируса (OPV), ранее инфицировавший животных, в которых он более не эндемичен. В качестве предшественника VACV предлагалось рассматривать вирус оспы лошадей, поскольку первые вакцины также получали запасы вакцин из поксвирусных инфекций лошадей и по меньшей мере один штамм VACV (Ankara) был выделен из лошади (Maуr, Hochstein-Mintzel & Stickl, 1975; Vaxby, 1981). Кроме того, OPV, чьим ближайшим родственником является VACV, был выделен из больных монгольских лошадей (Tulman, 2006). Причины, по которым VACV, а не CPXV становится противооспенной вакциной XX века, не установлены. Возможно, когда создавались вакцины, VACV был более широко распространенным вирусом или вакцины выбирали VACV, поскольку CPXV вызывал более тяжелую реакцию, а VACV обладает более низкой вирулентностью. Хотя происхождение и природный хозяин VACV по-прежнему неизвестны, из всех поксвирусов именно VACV является объектом наиболее интенсивных исследований.

1.5 Вакцина, применявшаяся для ликвидации натуральной оспы

Поскольку применение VACV в качестве вакцины имеет долгую историю, в разных регионах мира использовали самые разнообразные штаммы VACV (Fenner et al., 1988). Штамм Нью-Йоркского городского совета здравоохранения (NYCBH) использовали в Северной Америке и Западной Африке. Лаборатории Wyeth организовали серийное производство вакцины Dryvax, которую готовили из лимфатической жидкости из кожи телят, инфицированных штаммом NYCBH; он был доступен в Соединенных Штатах после завершения кампании по ликвидации оспы. Штамм EM-63 был получен из штамма NYCBH и применялся в России и Индии, в то время как штамм Lister/Elstree, разработанный в Листеровском институте в Соединенном Королевстве, стал самой широко применяемой вакциной во всем мире (Rosenthal et al., 2001). Также широко применялся штамм Temple of Heaven (Небесный храм)/Tian-Tan (Китай). В числе других штаммов VACV, применявшихся в рамках программы ликвидации оспы, были штамм Копенгаген (Дания), штамм Берн (Швейцария), штамм Dairen (Япония), штамм Ankara (Турция), штамм Ташкент (Узбекистан) и штамм Париж (Франция). Большая часть вакцин, применявшихся в рамках программы ликвидации оспы, была выращена на коже живых животных – главным образом телят, но также овец, буйволов и кроликов.

Хотя противооспенная вакцина является единственной вакциной, приведшей к искоренению инфекционной болезни человека, профиль ее безопасности не был совершенен. Получение вакцин в животных было сопряжено с риском переноса других инфекций, а сама вакцинация вызывала ряд побочных эффектов. Случайные заражения возникали, когда вирус переносился с места инокуляции к вакцинируемому лицу, или происходил перенос вируса от лиц, находившихся в контакте с инфекционным больным; наибольшие опасения вызывали глазные и генерализованные инфекции. Серьезным осложнением была тяжелая инфекция у лиц, страдавших экземой, или с иммунодефицитом. Оба заболевания являются противопоказанием к проведению противооспенной вакцинации. Небольшой процент вакцинируемых лиц имели

тяжелые неврологические побочные эффекты, например энцефалит, и эти случаи были непредсказуемыми.

При применении вакцины некоторых штаммов поствакцинальные побочные эффекты возникали чаще, чем при применении других (Lane et al., 1969; Fenner et al., 1988) – имеющиеся ограниченные эпидемиологические данные позволяют предположить, что для штаммов NYCBH и Lister характерна более низкая частота побочных эффектов, тогда как штаммы Копенгаген и Ташкент были более вирулентными. По данным некоторых исследований с применением моделирования, число смертных случаев после вакцинации штаммом NYCBH составляло один на миллион вакцинаций (Holloran et al., 2002; Kaplan et al., 2002; Porco et al., 2004). По данным недавнего исследования, в котором анализировались имеющиеся эпидемиологические данные, число летальных исходов во время кампании массовой вакцинации составляло несколько десятков на миллион при применении штамма NYCBH и достигало двухсот на миллион при применении штамма Lister (Kretzschmar et al., 2006). Во время проведения кампании противооспенной вакцинации в Соединенных Штатах, охватывавшей более 700 тыс. человек, частота связанных с вакцинацией случаев миоперикардита была выше, чем ожидалось, что привело к спорам вокруг программы (Arness et al., 2004; Eckart et al., 2004). Даже в отсутствие серьезных побочных эффектов при вакцинации обычно возникают менее серьезные побочные реакции, например кожные поражения, незначительное повышение температуры и головные боли. По этой причине люди могут неохотно соглашаться на вакцинацию.

1.6 Тканевые культуры и клональные противооспенные вакцины

Получение противооспенных вакцин в живых животных в настоящее время неприемлемо из-за проблем с контролем качества, а именно в связи с возможностью микробного загрязнения. Вакцины следующего поколения готовят в тканевой культуре или в куриных яйцах с развивающимся эмбрионом. Хотя противооспенную вакцину иногда выращивали в куриных яйцах с развивающимся эмбрионом во время кампании по ликвидации оспы, опыт крупномасштабного производства вакцин в культурах тканевой весьма ограничен и эффективность этой вакцины в полевых условиях не имеет достаточных документальных подтверждений.

Установлена и документально подтверждена генетическая гетерогенность вакцин Lister и Dryvax, применявшихся в рамках программы по ликвидации оспы (Li et al., 2006; Osborne et al., 2007; Garcel et al., 2009). Следующее поколение вакцин – это очищенные от бляшек вирусные клоны со свойствами, подобными свойствам исходных родительских штаммов. Хотя полагают, что они так же эффективны, как первые вакцины, применявшиеся при ликвидации оспы, возможно, хотя и маловероятно, что они лишились вирусных клонов, определяющих их эффективность в организме человека.

Неклональная вакцина на основе штамма Lister, выращенная в тканевой культуре, производится Sanofi Pasteur, и в настоящее время проходит клинические испытания. Еще одна клональная противооспенная вакцина, ACAM2000, получила лицензию на применение в Соединенных Штатах в августе 2007 года (Frey et al., 2009). Данная вакцина была получена посредством очистки от бляшек из Dryvax и выращивалась в клеточной линии обезьян Vero. Хотя эти вакцины производятся в соответствии с современными стандартами, они могут вызывать такие же побочные эффекты, как и вакцины Dryvax или Lister, применявшиеся во время кампании по ликвидации оспы; у очень незначительной части населения имеются противопоказания, не позволяющие применять эти вакцины.

Поскольку противооспенные вакцины на основе полностью реплицирующегося VACV вызывают нечастые, но существенные поствакцинальные побочные эффекты, проводились исследования, целью которых была разработка противооспенных вакцин, основанных на нереплицирующихся или сильно ослабленных штаммах VACV с повышенной безопасностью, которые сохраняют хорошие иммуногенные свойства. Обычно применяемый метод ослабления VACV – это многократные пассажи в тканевой культуре, вызывающие генетические изменения, пониженную вирулентность и обуславливающие ограниченный круг хозяев.

1.7 Противооспенные вакцины, ослабленные серией пассажей в тканевой культуре или посредством генетической рекомбинации

Модифицированный vaccinia вирус Ankara (MVA) – это штамм VACV, полученный из хориоаллантаоисного vaccinia вируса Ankara (CVA) в конце 1950-х годов посредством 570 пассажей в фибробластах куриных эмбрионов (Mayr, Hochstein-Mintzel & Stickl, 1975). В результате этих пассажей был получен вирус с ограниченным кругом хозяев, который не способен реплицироваться в клетках человека, но экспрессирует большую часть вирусных белков (Sutter & Moss, 1992; Mayr, 2003). Вирус был лицензирован в качестве вакцины в Германии, и его безопасность была установлена при вакцинации более 100 тыс. человек, но его эффективность в отношении натуральной оспы не тестировалась. У MVA имеются крупные делеции в терминальных участках генома, содержащие несущественные гены, которые часто участвуют в ускользании иммунной реакции хозяина или в сохранении широкого круга хозяев VACV (Antoine et al., 1998). В результате этих делеций MVA хорошо реплицируется в фибробластах куриных эмбрионов и в почечных клетках детенышей хомяков, но репликация в человеческих клетках ограничена (Carroll & Moss, 1997). В большинстве типов клеток MVA продуцирует большую часть вирусных антигенов, но образуются только незрелые вирусные частицы, и распространение от клетки к клетке ограничено. В качестве вакцины MVA считается эффективной, поскольку обеспечивает почти полную дозу антигенов, и безопасной, поскольку не реплицируется полностью в клетках человека и большинства других млекопитающих (как подтверждают исследования на обезьянах с иммунодефицитом [Stittelaar et al., 2001]). Она индуцирует профиль антител, подобный профилю, индуцируемому Dryvax, и защитный иммунитет против вируса оспы обезьян (MPXV) у приматов кроме человека (Earl et al., 2004, 2008). Однако для того чтобы достичь иммунной защиты, обеспечиваемой однократной дозой реплицирующегося VACV, требуется более высокая доза или многократные дозы MVA. Фаза I и фаза II клинических испытаний с применением MVA завершены, и предполагается, что фаза III клинических испытаний начнется в 2011 году (Vollmar et al., 2006; Wilck et al., 2010); в совокупности с соответствующими исследованиями на животных эти клинические испытания позволят получить лицензию на вакцину.

LC16m8 – это штамм VACV, который был получен посредством серии пассажей штамма VACV Lister через первичные эпителиальные клетки почек при низкой температуре (30 °C) и был лицензирован в Японии в 1975 году (Hashizume et al., 1985, Kenner et al., 2006). Степень прививаемости вируса близка к степени прививаемости штамма Lister; он отличается от штамма Lister ограниченностью температурного диапазона, у него ограниченный круг хозяев, и он характеризуется значительно меньшей выраженностью побочных эффектов (как в отношении тяжести побочных эффектов, так и в отношении числа людей, страдающих от побочных эффектов). В геноме LC16m8 нет больших делеций, и большая часть открытых рамок считывания, по-видимому, функциональна. Мелкобляшечный фенотип LC16m8 был обусловлен мутацией в гене B5R, кодирующем

белок, гомологичный комплементарным регуляторным белкам. Этот белок имеет существенное значение для образования внеклеточного имеющего оболочку вируса и является важным антигеном – мишенью для антител, которые нейтрализуют вирион (Putz et al., 2006). Поскольку эта мутация может легко ревертироваться, была разработана стабилизированная версия LC16m8 с делецией всего гена B5R (Kidokoro, Tashiro & Shida, 2005). Другие мутации, ответственные за ограниченность температурного диапазона и *in vivo* ослабление вирулентности, вероятно, происходят в других частях вирусного генома. Было показано, что LC16m8 защищает обезьян от MPXV (Saijo et al., 2006).

Штамм Dairen I (DI) VACV был получен из родительского вакцинного штамма Dairen после 13 пассажей в яйцах (Tagaya, Kitamura & Sano, 1961). У него большая делеция в левом терминальном участке генома, включающая гены, определяющие круг хозяев вируса и резистентность к интерферону (Ishii et al., 2002).

Доступная к настоящему времени информация о MVA, LC16m8 и штамме VACV DI представляется обнадеживающей, и это исследование необходимо продолжать и проводить его в более значительных масштабах.

Методы генной инженерии позволяют осуществлять инсерции, делеции генов или прерывания в специфических участках генома и получать более безопасные и более иммуногенные вакцины (Moss, 1996; Jacobs et al., 2009). Вирусы могут быть ослаблены посредством делеции генов, определяющих иммунную модуляцию, круг хозяев вируса или метаболизм нуклеотидов. Один из наиболее изученных ослабленных мутантов VACV – это NYVAC, у которого произведена делеция 18 открытых рамок считывания (Tartaglia et al., 1992); известен еще один мутант с делецией E3L, который все еще могут прививать путем скарификации (Jentarra et al., 2008). Сильно ослабленный штамм NYVAC характеризуется более низкой иммуногенностью, чем вакцинные штаммы (Midgley et al., 2008), и при введении этого вируса могут потребоваться более высокие дозы. Защитный иммунитет после вакцинации может быть повышен посредством более избирательной инактивации генов, определяющих ускользание от иммунного надзора, или посредством экспрессии цитокинов, которые усиливают специфические аспекты иммунного ответа.

1.8 Использование белковых субъединиц и ДНК для получения противооспенных вакцин

Очищенные вирусные белки, продуцируемые рекомбинантными организмами, или ДНК, экспрессирующая такие белки, – еще один подход к индуцированию защитного иммунитета против натуральной оспы. В последние годы был достигнут прогресс в идентификации вирусных белков, которые индуцируют защитный иммунитет против OPV (Moss, 2010). Антитела против вирионных белков нейтрализуют инфекционность вируса в тканевой культуре, и в некоторых исследованиях было показано, что животные, иммунизированные комбинациями мембранных белков, включая A33, B5, L1 и H3, защищены от последующего заражения вирулентным вирусом оспы (Fogg et al., 2004; Davies et al., 2005; Heraud et al., 2006; Xiao et al., 2007; Buchman et al., 2010). Иммунизация вирусным белком, связывающим интерферон типа I, также защищала мышей от летальной мышинной оспы; таким образом, иммуномодулирующие белки могут быть еще одним вариантом вакцин, создаваемых на основе белков (Xu et al., 2008).

Вакцины на основе белковых субъединиц более безопасны, чем инфекционный VACV. Однако этот альтернативный подход к вакцинации ограничен, поскольку в настоящее время нет доказательств того, что эти вакцины будут эффективны в случае вспышки натуральной оспы.

1.9 Вакцинация после инфицирования вирусом оспы

Вакцинация после инфицирования вирусом натуральной оспы может быть эффективна в том, что касается сведения к минимуму числа случаев смерти от оспы (Mortimer, 2003). В нескольких исследованиях эта возможность оценивалась на животных-моделях. Большинство исследователей пришли к заключению, что вакцинацию следует проводить не позднее, чем через 1-2 дня после экспозиции к вирулентному вирусу оспы, чтобы не допустить летального исхода (Staib et al., 2006; Samuelsson et al., 2008; Paron et al., 2009). Интересно отметить, что штамм MVA демонстрировал значительно более быструю защитную реакцию, чем штамм NYCBH в модели с заражением обезьян оспой; вероятно, это обусловлено тем, что в испытаниях была применена высокая доза (Earl et al., 2008).

1.10 Проблемы противооспенной вакцинации, которые предстоит решать в будущем

В связи с риском преднамеренного выброса вирусов натуральной оспы, то есть совершения террористического акта, некоторые страны стали производить противооспенные вакцины, чтобы пополнить свои запасы (Rosenthal et al., 2001), и ВОЗ тоже создала запасы противооспенной вакцины. Как правило, эти вакцины готовили в культурах тканей, а не в животных, чтобы следовать современным стандартам производства вакцин. Поскольку они сходны с традиционной противооспенной вакциной, весьма вероятно, что эти изготовленные вакцины обнаружат такую же эффективность и такой же уровень побочных эффектов. Производство вакцининового иммуноглобулина или разработка альтернативных подходов, например использование моноклональных антител против специфических вирусных компонентов, могут сыграть важную роль в лечении любых побочных эффектов вакцинации.

Более безопасные противооспенные вакцины необходимы в связи с неприемлемой частотой поствакцинальных побочных эффектов и в связи с тем, что у значительной части населения имеются противопоказания к противооспенной вакцинации. Сильно и умеренно ослабленные VACV, которых ожидает перспектива лицензирования, такие как MVA и LC16m8, могут продвинуться дальше в деле удовлетворения потребности в более безопасных вакцинах. Кроме того, информация, полученная в исследованиях с применением VACV, может быть использована в целях получения методами генной инженерии штаммов вирусов, рационально аттенюированных, то есть штаммов с пониженной степенью репликации, распространения и модуляции иммунного ответа хозяина. Защитные свойства новых вакцин могут быть испытаны на животных-моделях, а их безопасность и иммуногенность – в клинических испытаниях.

Помимо высокой стоимости основной трудностью для лицензирования является невозможность продемонстрировать, что вновь созданные противооспенные вакцины индуцируют защитный иммунитет против оспы у людей. Поскольку натуральная оспа была ликвидирована, невозможно протестировать эффективность новых вакцин в отношении естественного заболевания. Вместо этого вакцины должны тестироваться и сравниваться с традиционными противооспенными вакцинами на суррогатных моделях натуральной оспы, например мышьяная оспа на мышах или оспа обезьян на приматах.

Еще одним подходом является использование реактивности в отношении VARV-антигенов и нейтрализация инфекционности VARV в тканевых культурах в качестве маркеров (Damon et al., 2009). Наши знания об иммунологических параметрах, которые коррелируют со степенью защиты от вирулентных вирусов оспы, хотя и остаются ограниченными, в последние годы расширились, и эти параметры могут быть использованы в качестве эталонных данных при сравнении традиционных вакцин с противооспенными вакцинами нового поколения (Putz et al., 2006; Kennedy et al., 2009). Однако *in vitro* нейтрализация и исследования живых VARV с участием приматов кроме человека должны повысить степень уверенности в способности этих вакцин обеспечить защиту от натуральной оспы.

Сокращения

CPXV	вирус коровьей оспы
CVA	хориоаллантоисный vaccinia вирус Ankara
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
MPXV	вирус оспы обезьян
MVA	модифицированный vaccinia вирус Ankara
NYCBH	Нью-Йоркский совет по вопросам здравоохранения
ОРV	ортопоксвирус
VACV	вирус осповакцины (vaccinia вирус)
VARV	вирус натуральной оспы
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения

Справочные материалы

- Antoine G et al. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244:365–396.
- Arness MK et al. (2004). Myopericarditis following smallpox vaccination. *American Journal of Epidemiology*, 160:642–651.
- Baxby D (1981). Jenner's smallpox vaccine: the riddle of vaccinia virus and its origin. Heinemann Educational Books, London.
- Buchman GW et al. (2010) A protein-based smallpox vaccine protects non-human primates from a lethal monkeypox virus challenge. *Vaccine*, 28:6627–6636.
- Carroll MW, Moss B (1997). Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, 238:198–211.
- Damon IK et al. (2009). Evaluation of smallpox vaccines using variola neutralization. *The Journal of General Virology*, 90:1962–1966.
- Davies DH et al. (2005). Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice. *Journal of Virology*, 79:11724–11733.
- Downie AW (1939). A study of the lesions produced experimentally by cowpox virus. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 48:361–379.
- Earl PL et al. (2004). Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*, 428:182–185.
- Earl PL et al. (2008). Rapid protection in a monkeypox model by a single injection of a replication-deficient vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:10889–10894.
- Eckart RE et al. (2004). Incidence and follow-up of inflammatory cardiac complications after smallpox vaccination. *Journal of the American College of Cardiology*, 44:201–205.
- Fenner F et al. (1988). *Smallpox and its eradication*. World Health Organization, Geneva.
- Fogg C et al. (2004). Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. *Journal of Virology*, 78:10230–10237.
- Frey SE et al. (2009). Comparison of the safety and immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax in healthy vaccinia-naive adults. *Vaccine*, 27:1637–1644.
- Garcel A et al. (2009). Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine. *Vaccine*, 27:708–717.
- Halloran ME et al. (2002). Containing bioterrorist smallpox. *Science*, 298:1428–1432.
- Hashizume S et al. (1985). Properties of attenuated mutant of vaccinia virus, LC16m8, derived from Lister strain. In: Quinnan GV, ed. *Vaccinia virus as vectors for vaccine antigens*. Elsevier Science Publishing Co Inc, New York, 87–99.
- Henderson DA (2009). *Smallpox – the death of a disease*. Prometheus Books, Amherst, New York.
- Heraud JM et al. (2006). Subunit recombinant vaccine protects against monkeypox. *Journal of Immunology*, 177:2552–2564.

- Ishii K et al. (2002). Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology*, 302:433–444.
- Jacobs BL et al. (2009). Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Research*, 84:1–13.
- Jenner E (1801). The origin of the vaccine inoculation. DN Shury, London.
- Jentarra GM et al. (2008). Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: scarification vaccination. *Vaccine*, 26:2860–2872.
- Kaplan EH, Craft DL, Wein LM (2002). Emergency response to a smallpox attack: the case for mass vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:10935–10940.
- Kennedy RB et al. (2009). The immunology of smallpox vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 21:314–320.
- Kenner J et al. (2006). LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine*, 24:7009–7022.
- Kidokoro M, Tashiro M, Shida H (2005). Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:4152–4157.
- Kretzschmar M et al. (2006). Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Medicine*, 3:e272.
- Lane JM et al. (1969). Complications of smallpox vaccination, 1968. National surveillance in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 281:1201–1208.
- Li G et al. (2006). Genomic sequence and analysis of a vaccinia virus isolate from a patient with a smallpox vaccine-related complication. *Virology Journal*, 3:88.
- Mayr A (2003). Smallpox vaccination and bioterrorism with pox viruses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 26:423–430.
- Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H. (1975). Abstammung, eigenschaftenund Verwendung des attenuierten Vaccinia-stammes MVA [Passage history, properties and applicability of the attenuated vaccinia virus strain MVA]. *Infection*, 3:6–16.
- Midgley CM et al. (2008). Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *Journal of General Virology*, 89:2992–2997.
- Mortimer PP (2003). Can postexposure vaccination against smallpox succeed? *Clinical Infectious Diseases*, 36:622–629.
- Moss B (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:11341–11348.
- Moss B (2010). Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunological Reviews*, 239, in press.
- Osborne JD et al. (2007). Genomic differences of Vaccinia virus clones from Dryvax smallpox vaccine: the Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine*, 25:8807–8832.
- Paran N et al. (2009). Postexposure immunization with modified vaccinia virus Ankara or conventional Lister vaccine provides solid protection in a murine model of human smallpox. *The Journal of Infectious Diseases*, 199:39–48.

- Porco TC et al. (2004). Logistics of community smallpox control through contact tracing and ring vaccination: a stochastic network model. *BMC Public Health*, 4:34.
- Putz MM et al. (2006). Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nature Medicine*, 12:1310–1315.
- Rosenthal SR et al. (2001). Developing new smallpox vaccines. *Emerging Infectious Diseases*, 7:920–926.
- Saijo M et al. (2006). LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *Journal of Virology*, 80:5179–5188.
- Samuelsson C et al. (2008). Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *The Journal of Clinical Investigation*, 118:1776–1784.
- Smith GL, McFadden G (2002). Smallpox: anything to declare? *Nature Reviews Immunology*, 2:521–527.
- Staib C et al. (2006). Short-term, but not post-exposure, protection against lethal orthopoxvirus challenge after immunization with modified vaccinia virus Ankara. *The Journal of General Virology*, 87:2917–2921.
- Stittelaar KJ et al. (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine*, 19:3700–3709.
- Sutter G, Moss B (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:10847–10851.
- Tagaya I, Kitamura T, Sano Y (1961). A new mutant of dermovaccinia virus. *Nature*, 192:381–382.
- Tartaglia J et al. (1992). Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 8:1445–1447.
- Tulman ER et al. (2006). Genome of horsepox virus. *Journal of Virology*, 80:9244–9258.
- Vollmar J et al. (2006). Safety and immunogenicity of IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine. *Vaccine*, 24:2065–2070.
- Wilck MB et al. (2010) Safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara (ACAM3000): effect of dose and route of administration. *The Journal of Infectious Diseases*, 201:1361–1370. Erratum in: *The Journal of Infectious Diseases*, 2010, 202:179.
- Xiao Y et al. (2007). A protein-based smallpox vaccine protects mice from vaccinia and ectromelia virus challenges when given as a prime and single boost. *Vaccine*, 25:1214–1224.
- Xu RH et al. (2008). The orthopoxvirus type I IFN binding protein is essential for virulence and an effective target for vaccination. *Journal of Experimental Medicine*, 205:981–992.

2 Лабораторная диагностика оспы (вируса натуральной оспы)

Inger Damon¹, Hermann Meyer² и Sergei Shchelkunov³

¹ Отдел исследований вирусов оспы и бешенства, Центры контроля заболеваний и профилактики, Атланта, Соединенные Штаты Америки

² Институт микробиологии Бундесвера, Мюнхен, Германия

³ Отдел геномных исследований, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация.

Представленные в этом докладе данные и заключения принадлежат авторам и не обязательно отражают официальную точку зрения Центров контроля заболеваний и профилактики.

Резюме

Значение для общественного здравоохранения

Вирус оспы человека (*variola* вирус) – возбудитель натуральной оспы, болезни, о ликвидации которой Всемирная ассамблея здравоохранения объявила в 1980 году. Этот вирус рассматривается как потенциальное средство ведения биологической войны или как оружие в руках террористов, поскольку он может вызывать высокую заболеваемость и смертность, а также в связи с тем, что значительная часть населения в настоящее время восприимчива к вирусу натуральной оспы, так как рутинная вакцинация против оспы была в основном прекращена в 1970-х годах (Henderson et al., 1999). Учитывая серьезные последствия диагностики натуральной оспы или даже последствия неверно поставленного диагноза, следует признать, что необходимо располагать возможностью идентифицировать натуральную оспу безошибочно, быстро и надежно. Кроме того, важно в равной мере надежно дифференцировать оспу от других подобных нозологических форм. Прогностическая ценность положительного диагностического результата (также называемая "положительной диагностической ценностью") чрезвычайно низка в условиях низкой распространенности болезни; необходимо применять диагностические стратегии, которые повысят прогностическую ценность положительных результатов.

Успехи, достигнутые к настоящему времени

В период 2000–2010 годов были достигнуты значительные успехи, проявившиеся в расширении возможностей клинической и лабораторной диагностики натуральной оспы. В этой главе представлен исторический обзор методов диагностики натуральной оспы и обобщены достижения в области диагностических методов на основе нуклеиновых кислот, серологических анализов и методов обнаружения белков, разрабатывавшихся с 2000 года. Благодаря новым технологиям появились подходы, принятые на вооружение многими исследователями. В частности, в стратегиях обнаружения нуклеиновых кислот все в большей степени используются высокопроизводительные технологии полимеразных цепных реакций в реальном времени и, в некоторых случаях, матричные платформы (array platforms).

Результаты и выводы

Было разработано много методов анализа на основе нуклеиновых кислот, но лишь несколько иммунологических диагностических методов и методов, основанных на обнаружении белков. Все методы анализа вируса натуральной оспы и поксвируса, включая эти новые методы, разработаны в результате проводившихся исследований; ни по одному из них не завершены процедуры регламентирующей проверки и регистрации. В процессе написания обзора обсуждалась возможная необходимость наличия живых вирусов натуральной оспы для регулирующей проверки методов анализа. Одна диагностическая тест-система, основанная на анализе нуклеиновых кислот, коммерчески доступна; однако она предназначена исключительно для исследовательских целей, а не для диагностического применения.

2.1 Введение

В этой главе основное внимание уделяется лабораторным процедурам, применяемым при клинической диагностике натуральной оспы. В данной главе не рассматриваются методы обнаружения в окружающей среде. Здесь изложены методы сбора и обработки образцов, представлен краткий обзор предшествующих диагностических методов, и особое внимание уделено тестам нуклеиновых кислот и серологическим методам анализа. Обсуждение недавно разработанной системы, основанной на матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI), не включено в настоящий обзор; применение этой технологии ограничено очень небольшим числом лабораторий, и в настоящее время она находится в стадии дополнительной разработки.

Вирус натуральной оспы (VARV) – это возбудитель оспы человека. Данный вирус рассматривается как потенциальное средство ведения биологической войны или как оружие в руках террористов, поскольку он может вызывать высокую заболеваемость и смертность, а также в связи с тем, что значительная часть населения в настоящее время восприимчива к вирусу натуральной оспы, так как рутинная вакцинация против оспы была в основном прекращена в 1970-х годах (Henderson et al., 1999). Учитывая серьезные последствия диагностики натуральной оспы или даже последствия неверно поставленного диагноза, следует признать, что необходимо располагать возможностью идентифицировать натуральную оспу безошибочно, быстро и надежно. Также необходимо в равной мере надежно дифференцировать VARV от других подобных нозологических форм. До ликвидации в 1980 году натуральной оспы было относительно легко распознать это заболевание клинически, хотя иногда ее путали с другими экзантематозными болезнями (Damon & Esposito, 2003; Shchelkunov, Marennikova & Moyer, 2005). Например, сыпь при тяжелой ветряной оспе, вызванной вирусом ветряной оспы (VZV), нередко ошибочно диагностировалась как натуральная оспа. В число других болезней, которые путают с везикулярной стадией натуральной оспы, входят оспа обезьян, генерализованная инфекция, вызванная вирусом осповакцины (vaccinia вирус), диссеминированная инфекция, вызванная вирусом опоясывающего лишая (герпес зостер), диссеминированная инфекция, вызванная вирусом герпеса (HSV), неблагоприятные лекарственные реакции (высыпания на коже), эритема многоформная, энтеровирусные инфекции, вторичный сифилис, чесотка, укусы насекомых, импетиго и моллюск контагиозный. В число болезней, которые путают с геморрагической оспой, входят острый лейкоз, менингококкемия и идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура. В качестве меры противодействия этого типа диагностическим ошибкам Сотрудничающий центр Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) – Центры контроля заболеваний и профилактики (ЦКЗП) – вместе с многочисленными другими профессиональными организациями разработал алгоритм для оценки наличия у пациентов натуральной оспы¹.

Положительная диагностическая ценность – пропорция истинно положительных результатов среди тестируемых объектов – варьируется в зависимости от распространенности болезни; в этом состоит отличие от таких показателей, как чувствительность и специфичность, которые не зависят от распространенности болезни, а отражают свойства самого анализа. Поэтому диагностическое подтверждение вызывающих подозрение случаев и прогностическая ценность положительных результатов могут быть усовершенствованы путем тестирования образцов, взятых у

¹ См. сведения об алгоритме и дополнительную информацию по адресу: <http://emergency.cdc.gov/agent/smallpox/diagnosis/riskalgorithm/>.

пациентов с соответствующими симптомами, и путем использования нескольких диагностических методов, для которых характерны независимые источники ошибок и множественные целевые параметры распознавания.

2.2 Сбор и обработка образцов

О случаях подозреваемой натуральной оспы следует немедленно сообщать в местные или государственные службы здравоохранения.

В соответствии с нынешними международными рекомендациями² работа с VARV должна осуществляться с применением санкционированного ВОЗ 4-го уровня безопасности для лабораторий. По состоянию на 2010 год, два Сотрудничающих центра ВОЗ имеют возможность работать с живыми образцами VARV – один в ЦКЗП в Атланте и другой в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор" (ГНЦ ВБ "Вектор") в Кольцово, Российская Федерация. Информация о безопасном сборе образцов и обращении с ними доступна на вебсайте ЦКЗП, в настоящее время располагающемся в рамках "Руководства D – рекомендации по сбору и транспортировке образцов" ("Guide D – specimen collection and transport guidelines") плана получения данных о натуральной оспе³.

По меньшей мере от двух до четырех корок или вещество из везикулярного поражения (или и то и другое) считаются подходящими образцами для лабораторного тестирования. Корки (струнья) могут быть отделены от находящейся под ними интактной кожи скальпелем или иглой 26 калибра, и каждый образец следует хранить в отдельном контейнере, чтобы не допустить перекрестного загрязнения. Были отмечены сопутствующие заболевания, вызывающие образование сыпи, включая ветряную оспу и оспу обезьян. Образцы из мест поражений следует собирать таким образом, чтобы в них была как везикулярная жидкость, так и вышерасположенная кожа. После того как покрывающий слой кожи удален и помещен в контейнер для образцов, основание пузырька следует очень тщательно протереть деревянным аппликатором или вытереть тампоном из полиэстера или ваты. Вязкое вещество можно нанести на чистое микроскопное предметное стекло и высушить на воздухе. "Препарат-отпечаток" можно приготовить, надавливая чистым предметным стеклом на открытое поражение; движение при нажиме должно быть плавным. Если есть возможность, то к поражению можно приложить три сетки для электронной микроскопии (блестящей стороной к открытому пузырьку), последовательно применяя минимальное, умеренное и твердое надавливание (Hazelton & Gelderblom, 2003). Предметные стекла и электронно-микроскопические сетки должны сушиться на воздухе в течение примерно 10 минут, затем их следует поместить в подставку для предметных стекол или в коробку для сеток для транспортировки в лабораторию.

Оценивались альтернативные методы сбора образцов поражений, в том числе хранение образцов на фильтровальной бумаге определенных типов. Хранение образцов в среде для транспортировки (как, например, это делалось при хранении вирусов герпеса) признано неудачным, главным образом потому, что в этой среде происходит разбавление образца. Имеются специальные рекомендации по электронно-микроскопическому отбору образцов и их обработке, с которыми можно ознакомиться⁴.

² <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/SummaryrecommendationsMay08.pdf>.

³ <http://emergency.cdc.gov/agent/smallpox/response-plan/#guided>.

⁴ <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/lab-testing/pdf/em-rash-protocol.pdf>.

Посредством биопсии оспенных поражений можно получить материал, пригодный для прямого исследования вирусов. Можно получить пункционные биопсийные пробы размером 3–4 мм; образец делится пополам, одна половина помещается в формалин для проведения иммуногистохимических тестов, а оставшаяся часть помещается в контейнер для сбора образцов. Мазки крови и мазки из горла, взятые у пациентов с подозрением на оспу во время продромальной фебрильной фазы и в начале фазы высыпаний, тоже являются потенциальным источником вирусов. Кроме того, можно получить пробу сыворотки у пациентов для проведения серологических анализов с целью подтверждения диагноза, то есть наличия вирусного заболевания, или получения ретроспективного диагноза. Во время болезни следует как можно раньше взять пробу сыворотки от пяти до десяти миллилитров, и затем взять повторную пробу спустя три-четыре недели.

Содержащие вирус образцы следует хранить при –20°C или на сухом льду до их транспортировки. Исключения составляют сетки для электронной микроскопии и ткани, помещенные в формалин – их следует хранить при комнатной температуре. При стандартной температуре холодильника (4 °C) допустимо хранение менее семи дней.

Упаковка и транспортировка клинических образцов

Упаковку и транспортировку клинических образцов следует осуществлять в соответствии с международными стандартами упаковки и международными правилами транспортировки инфекционных веществ.

Для транспортировки всех клинических образцов необходимо использовать систему тройных упаковок (ВОЗ, 2008a). Клинические образцы следует рассматривать как инфекционные вещества категории А, и им следует присваивать номер Организации Объединенных Наций UN 2814. Практическое руководство по соблюдению правил при всех видах транспортировки (как на государственном, так и на международном уровне) инфекционных веществ и взятых у пациентов образцов можно найти на веб-сайте ВОЗ⁵.

2.3 Выделение вирусов

Использование куриных эмбрионов для диагностики поксвирусов было впервые описано в 1937 году, и с тех пор этот метод стал ценным диагностическим инструментом. Единственные известные поксвирусы, которые вызывают инфекции у человека и образование оспенных пустул на хориоаллантаоисной мембране (СAM) куриных яиц – это четыре ортопоксвируса (OPV): VARV, вирус оспы обезьян (MPXV), вирус оспы коров (CPXV) и вирус осповакцины (vaccinia вирус) (VACV). Различия в морфологии пустул, обнаруживаемые у 12-дневных эмбрионов, инкубированных при 34,5–35 °C, позволяли дифференцировать виды OPV; по этой причине анализ СAM широко и успешно применялся во время кампании ликвидации натуральной оспы.

Несмотря на доступность новых диагностических методов, золотым стандартом остается выделение вирусов. Кроме того, получение культуры вируса – единственный существующий метод, посредством которого создается запас живых вирусов для дальнейших исследований. Хотя VARV успешно растет в куриных эмбрионах, клеточная

⁵ <http://www.who.int/ihr/biosafety/publications/en/index.html>.

культура, как правило, является более простым вариантом. VARV можно выращивать на разнообразных установленных линиях клеточных культур, включая:

- Vero, BSC-1 и CV-1 (почечные клетки африканских зеленых обезьян)
- LLC-MK2 (почечные клетки макак резус)
- эмбриональные легочные фибробластные клетки человека
- HeLa (раковые клетки яичников человека)
- фибробластные клетки куриных эмбрионов
- MRC-5 (человеческие диплоидные фибробластные клетки).

Цитопатический эффект выявляется в течение одного или двух дней, в зависимости от количества инфекционного материала в первоначальном инокуляте; если количество инфекционного материала незначительно, то отдельные бляшки могут не обнаруживаться визуально в течение трех-четырех дней.

2.4 Электронная микроскопия

Электронная микроскопия рассматривается как первоочередной метод выбора для лабораторной диагностики поксвирусных инфекций, что объясняется типичной морфологией вириона, большим количеством частиц, которые обычно присутствуют в поражениях, индуцированных поксвирусом, и относительной легкостью получения образцов. Затем трансмиссионная электронная микроскопия стала стандартным методом диагностики в вирусологии в 1950-е годы и широко применялась во время кампании ликвидации натуральной оспы. Клиническая диагностика поксвирусной инфекции у человека в настоящее время проводится нечасто, и электронномикроскопические данные могут стать одним из первых ключей к установлению причины неизвестного заболевания, сопровождающегося высыпаниями (Hazelton & Gelderblom, 2003).

Для OPV характерны вирионы, имеющие форму кирпича, которые неравномерно покрыты короткими трубчатыми элементами, напоминающими мелкие обрывки ленты. Размер может варьировать от 250 нм × 290 нм до 280 нм × 350 нм. Хотя между отдельными видами OPV невозможно установить морфологические различия, их легко отличить от вирусов герпеса, что очень важно при дифференциальной диагностике заболевших людей (например, дифференцировать болезнь от ветряной оспы, вызванной VZV). Поскольку поксвирусы плотно связаны с клеточным матриксом, образцы должны быть надлежащим образом приготовлены, чтобы вирус можно было изучать с помощью электронного микроскопа. В прошлом применялось растирание мазков или измельчение материала из поражений в ступке со стерильным песком или пульверизация образца после сверхбыстрого замораживания в жидком азоте. В настоящее время коммерчески доступные механизмы разрушения клеток (tube systems) (с использованием гранул lysing matrices в комбинации с измельчителями bead beater или смесительными вальцами) более предпочтительны, поскольку позволяют стандартизовать процедуру и избежать перекрестного загрязнения. Два цикла замораживания-оттаивания или обработка ультразвуком (или оба метода) упрощают процесс разрушения клеток в закрытом механизме разрушения клеток (tube system). Использование имеющего форму cup-horn ультразвукового дезинтегратора позволяет выделить даже большее количество вирионов из клеточного матрикса. Для успешной диагностики посредством визуализации вирионов необходима концентрация 10^5 вирусных частиц/мл.

Для подготовки и исследования образцов необходимы терпение и опыт. Даже если частицы поксвирусов, имеющие форму кирпича, обнаруживаются довольно быстро, целесообразно провести дальнейшее сканирование образца, так как возможно присутствие и других вирусов. В зависимости от количества частиц исследование образца может занять 30 минут, таким образом, для получения результатов с помощью электронной микроскопии после получения образцов может потребоваться до двух часов. Описания методов негативного контрастирования и иллюстрации частиц, обнаруженных методом негативного контрастирования, можно найти в Интернете⁶.

2.5 Диагностические методы, основанные на использовании генома или элементов генома

Благодаря бурному развитию исследований нуклеиновых кислот в последние годы появилось много возможностей для разработки методов обнаружения, основанных на использовании ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты). Методы нуклеотидного секвенирования стали автоматизированными и доступными, и это означает, что применение таких методов, как полимеразная цепная реакция (PCR), PCR в реальном времени, микрочипы и, в меньшей степени, секвенирование генома, больше не ограничиваются несколькими специализированными лабораториями.

2.5.1 Работа с ДНК вируса натуральной оспы

Распределение, синтез и манипуляции с ДНК VARV регламентируются рядом правил (WHO, 2008b). Всем организациям, кроме двух Сотрудничающих центров ВОЗ по изучению натуральной оспы и других поксвирусных инфекций, строго запрещено хранить клоны, содержащие более 20% генома VARV в любой период времени. Запрос на работу с ДНК VARV более, чем 500 нуклеотидов в длину, должен быть представлен в штаб-квартиру ВОЗ, и лаборатория, получившая такое разрешение, не может распределять ДНК VARV третьим сторонам. Кроме того, ДНК VARV не может использоваться для инсерции в VACV или другие поксвирусы, и ни с одним другим OPV нельзя работать в лабораторных помещениях, в которых присутствует ДНК VARV. Однако ДНК VARV, в которых не более 500 пар оснований, могут использоваться в качестве положительного контроля в диагностических PCR комплектах без получения предварительного разрешения, хотя в этих случаях желательно уведомлять ВОЗ. Аналогичным образом, получение ДНК-микрочипов, на которых олигонуклеотиды (менее 80 пар оснований) ковалентно связаны и поэтому трудно поддаются вторичной сборке посредством лигирования, может быть осуществлено без разрешения ВОЗ. Эти олигонуклеотиды могут в совокупности охватывать целый геном.

2.5.2 Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

В основе метода определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP) лежит тот факт, что геномы даже близкородственных патогенов определяются по различиям в нуклеотидной последовательности. На практике метод RFLP заключается в выделении вируса-мишени, экстрагировании ДНК и затем в расщеплении ДНК под воздействием фермента рестрикционной эндонуклеазы или группы из нескольких рестрикционных эндонуклеаз. Затем фрагменты ДНК разделяются по размерам с помощью гель-электрофореза и визуализируются. В идеале каждый штамм должен обнаруживать свою особенную характеристику или фингерпринт. Для подготовки новой

⁶ <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/lab-testing/pdf/em-rash-protocol.pdf>.

регламентированной процедуры можно использовать много различных рестрикционных ферментов. В результате образуется несколько молекулярных отпечатков (фингерпринтов), которые можно анализировать, и, таким образом, определяется наилучшая комбинация ферментов, позволяющая дифференцировать штаммы или изоляты.

RFLP, полученные с помощью рестрикционного фермента HindIII, использовали для дифференцирования видов OPV (Mackett & Archard, 1979; Esposito & Knight, 1985); однако для методологии RFLP необходима достаточно протяженная культура вируса, позволяющая получить достаточное количество ДНК высокого качества.

2.5.3 Полимеразная цепная реакция

В результате PCR образуются большие количества желаемых последовательностей ДНК из сложной смеси гетерогенных последовательностей. Любой образовавшийся продукт PCR имеет, по определению, характерный размер; его идентичность обычно подтверждается с помощью гибридизационных ДНК-зондов или расщеплением под воздействием рестрикционной эндонуклеазы или более распространенным методом – прямым секвенированием. Чувствительность PCR реакции может быть повышена путем использования второго набора праймеров для амплификации субфрагмента первого PCR-продукта; однако этот PCR-метод требует больших временных затрат и может привести к получению ложноположительных результатов, таким образом, его следует избегать при проведении рутинной диагностики.

PCR не позволяет дифференцировать живые и неживые вирусы или полные и неполные фрагменты геномной ДНК, что может усложнить интерпретацию результатов. Кроме того, при применении PCR важно использовать как положительный, так и отрицательный контроль для подтверждения достоверности PCR-результатов. Использование положительного контроля поможет избежать получения ложноотрицательных результатов (то есть если сама PCR-реакция в целом не действует должным образом), а использование отрицательного контроля поможет избежать получения ложноположительных результатов (то есть если все образцы оказываются загрязненными вирусной ДНК или матрицей). Соблюдение этих предосторожностей позволяет PCR стать реальным методом выбора для специалиста-диагноста. Его преимущества в отношении скорости, чувствительности и специфичности в настоящее время значительно перевешивают затраты на необходимое оборудование, и существуют методики, позволяющие избежать загрязнений, которые приводят к получению ложноположительных результатов. В последнее время PCR – это метод выбора в диагностической идентификации VARV.

Доступны методические предписания по PCR, позволяющие идентифицировать и дифференцировать виды OPV, в их основе последовательности гемагглютинина (HA) (Ropp et al., 1995), модификатор В реакции цитокинов (CrmB) (Loparev et al., 2001) и гены включения белков А-типа (Meyer, Ropp & Esposito, 1997). В этих анализах PCR осуществляется с использованием праймеров (затравок), предназначенных для амплификации сегмента ДНК, который должен присутствовать в любом OPV. PCR-ампликон расщепляется под воздействием соответствующей рестрикционной эндонуклеазы и затем отделяется с помощью гель-электрофореза – с тем, чтобы дифференцировать вид посредством сравнения профилей фрагмента с референтными профилями RFLP вируса. Однако когда анализировалась большая серия изолятов вида OPV, гетерогенность типов образовавшихся рестрикционных фрагментов стала очевидной, что сделало интерпретацию результатов довольно неоднозначной (Meyer et al., 1999).

Для того чтобы отличить вид OPV в одноэтапном анализе, недавно был разработан мультиплексный PCR-анализ. В этом методе используются уникальные олигонуклеотидные праймеры для идентификации OPV на уровне вида. Были использованы четыре пары праймеров (три пары для VARV, MPXV и CPXV соответственно и одна пара, специфичная для рода), при этом были получены ампликоны различной длины, специфичные для каждого вида OPV (Shchelkunov, Gavrilova & Babkin, 2005). Пара, специфичная для рода, служит в качестве внутреннего PCR-контроля присутствия в образце ДНК OPV. Для оценки специфичности и чувствительности этого метода использовали ДНК 57 штаммов OPV, включая ДНК, полученные из струпьев кожных поражений больных, инфицированных натуральной оспой в 1970–1975 годы; эти образцы хранятся в коллекции VARV в России.

2.5.4 Полимеразная цепная реакция – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

Для получения общих сведений о целом вирусном геноме без полного секвенирования применяли модифицированный метод RFLP. PCR применяется как предварительный этап для амплификации участков, охватывающих геном. Ампликоны затем используются в качестве матрицы ДНК при применении метода RFLP. Этот модифицированный метод, известный как PCR-RFLP, демонстрирует более высокую чувствительность при идентификации патогенов. PCR-RFLP применяли для выявления различий между несколькими видами OPV, включая VARV (Li et al., 2007). Анализ PCR-RFLP был применен к 45 VARV из ЦКЗП и к 21 VARV из ГНЦ ВБ "Вектор" (Babkina et al., 2004a, b; Li et al., 2007), при отборе VARV учитывали различия в географическом распределении и годы, в которые были выделены вирусы. 20 согласованных пар праймеров использовали для получения 20 перекрывающихся ампликонов, охватывающих 99,9% генома VARV. Комбинированная дендрограмма профилей RFLP всех ампликонов позволяет дифференцировать основные штаммы VARV от второстепенных, при этом штаммы обычно группируются в соответствии с их географической локализацией или эпидемиологической историей (либо в соответствии с обоими факторами). Несмотря на впечатляющие успехи, достигнутые в разработке методов RFLP, быстрый прогресс в совершенствовании метода ДНК-секвенирования может поставить под сомнение их пригодность в ближайшем будущем.

2.5.5 PCR в реальном времени

Традиционные PCR-методы в настоящее время заменяются анализами PCR в реальном времени. В отличие от традиционной PCR метод PCR в реальном времени объединяет амплификацию и обнаружение ДНК-мишени, в результате исключаются требующие затрат времени пост-PCR процедуры и уменьшается риск перекрестного загрязнения. Кроме того, PCR в реальном времени позволяет получить количественную информацию. Недавняя разработка портативных приборов для PCR-анализа в реальном времени и лиофилизированные реактивы (Aitichou et al., 2008) открывают волнующие перспективы: быстрая диагностика (то есть установление диагноза менее чем за два часа) вспышек заболевания в полевых условиях может стать реальностью.

Благодаря многим преимуществам метод PCR в реальном времени нашел применение в диагностике вирусов оспы в полевых условиях, где он может быть использован для быстрой и точной диагностики натуральной оспы и для дифференцирования ее от других болезней, вызывающих сыпь. Однако для того, чтобы продемонстрировать полезность анализов, разработанных с помощью этих методов, и установить их функциональные характеристики, целесообразно провести скрининг больших

коллекций штаммов OPV. Обычно в одном анализе отбирают менее 0,1% генома для получения результата. В одном сообщении отмечалось, что ошибочные спаривания оснований в пробах давали возможность дифференцировать VARV от других OPV с помощью анализа кривых температур плавления (Espy et al., 2002), но с добавлением новых OPV последовательностей в GenBank зонды продемонстрировали идентичность вируса оспы верблюдов (CMLV) и некоторых штаммов CPXV, а это означает, что надежная идентификация VARV невозможна. По мере поступления дополнительной информации о последовательностях в родственных вирусах было бы важно, чтобы различные PCR-праймеры и зонды периодически проверялись – путем скрининга *in silico*, если не посредством практического лабораторного тестирования – с целью оценки их истинной специфичности и чувствительности.

Для идентификации VARV-ДНК был разработан метод скрининга с использованием LightCycler PCR в реальном времени, который включили в диагностическую тест-систему с соблюдением требований надлежащей производственной практики, с применением стандартизованных реагентов (Olson et al., 2004). Единственное ошибочное спаривание оснований в нуклеотиде, вызвавшее единственную в своем роде замену аминокислоты во всех 64 штаммах VARV, было использовано для создания пары гибридационных зондов со специфическим сенсорным зондом, что позволило дифференцировать VARV от других OPV посредством анализа кривых температур плавления. Применимость этого метода была продемонстрирована путем амплификации 180 штаммов, относящихся к различным видам OPV (VARV, MPXV, VZV, VZCV, CMLV и вирус экстремелии мышей [ECTV]), и температура плавления VARV значительно отличалась от температуры плавления других штаммов OPV. В пиковых выборках донорской крови (Schmidt et al., 2005) анализ с порогом обнаружения 11 копий ДНК на процедуру дает возможность осуществить надежное выявление OPV ДНК в вирусных образцах. Таким образом, при раннем обнаружении VARV чувствительность этого метода может помочь предотвратить распространение возбудителя вирусного заболевания при переливании крови после акта биотерроризма.

Есть еще один высокочувствительный и специфичный метод быстрого обнаружения VARV-ДНК, в котором используются такие платформы, как SmartCycler и LightCycler (Kulesh et al., 2004). В основе анализа лежит метод TaqMan, а ген HA OPV используется в качестве целевой последовательности. Анализ оценивали в слепом исследовании с 322 закодированными образцами, которые включали геномные ДНК из 48 различных изолятов VARV и 25 различных штаммов помимо VARV. Еще в одном методе (Nitsche, Ellerbrok & Pauli, 2003) применяют одновременное обнаружение ортопоксвируса родового и variola-специфичных геномных областей, что может быть полезно при анализе смесей вирусов, включающих VARV. В этом анализе VARV демонстрирует самую высокую температуру плавления, а любые другие варианты обнаруживают более низкую температуру плавления. Опубликованы сообщения о новых PCR-анализах в реальном времени, и другие анализы находятся в стадии разработки в различных международных лабораториях. Следует отметить, что может произойти ингибирование PCR, которое вызывает получение ложноотрицательных результатов; однако это можно предотвратить с помощью надлежащего внутреннего контроля. Обобщенные данные об опубликованных в последнее время PCR-анализах VARV в реальном времени и сведения, подтверждающие достоверность результатов, представлены в таблице 2.1.

Необходимо подчеркнуть, что положительный PCR-результат по VARV должен быть подтвержден амплификацией других частей генома. Применение многократных анализов, направленных на разные участки генома, – в дополнение к обнаружению

ненуклеиновых кислот и диагностических анализов – должно повысить степень уверенности в достоверности диагностики натуральной оспы, основанной на лабораторных данных. Это особенно справедливо в настоящее время, в отсутствие естественно возникающих случаев заболеваний, когда прогностическая значимость положительных результатов неизбежно близка к нулю.

Таблица 2.1 Анализы PCR в реальном времени для обнаружения вируса натуральной оспы

Ссылка	Таргетный ген (VACV – Копенгаген)	Метод	Подтверждение достоверности с геномной VARV?	Примечания
Espy et al., 2002	HA/A56R	LightCycler с гибридационными зондами; анализ кривых температур плавления выявил отличие VARV от других ортопоксвирусов	Нет Для подтверждения используется клонированный фрагмент VARV-ДНК	У нескольких штаммов CPXV и CMLV температуры плавления идентичны температурам плавления VARV
Ibrahim et al., 2003	HA/A56R	TaqMan, VARV-специфичное расщепление зонда	Да	–
Panning et al., 2004	HA/A56R	LightCycler с гибридационными зондами; анализ кривых температур плавления выявил отличие VARV от других ортопоксвирусов	Нет Использовалась искусственная конструкция	У нескольких штаммов CPXV температуры плавления идентичны температурам плавления VARV
Nitsche, Ellerbrok & Pauli, 2004	Анализ 1: Rpo 18 Анализ 2: VETF Анализ 3: A13L (VARV) Анализ 4: A13L (nVAR-OPX)	LightCycler с гибридационными зондами; анализ кривых температур плавления выявил отличие VARV от других ортопоксвирусов	Да Однако в представленных данных используются искусственно синтезированные фрагменты VARV	–
Kulesh et al., 2004	Анализ 1: B10R Анализ 2: B9R Анализ 3: HA/A56R	TaqMan, VARV-специфичные зонды	Да	Анализы 1 и 2: некоторые штаммы CPXV амплифицированы. Анализ 3: таргетная нуклеиновая кислота такая же, как в анализе, описанном Ibrahim et al. (2003), но с несколько укороченным зондом
Olson et al., 2004	14kD/A27L	LightCycler с гибридационными зондами; анализ кривых температур плавления выявил отличие VARV от других ортопоксвирусов	Да	Анализ коммерчески доступен: RealArt Orthopoxvirus LC Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
Carletti et al., 2005	CrnB	LightCycler с гибридационными зондами; анализ кривых температур плавления выявил различия между ортопоксвирусами и вирусами герпеса	Да Однако в представленных данных используются синтезированные фрагменты VARV	Необходимо провести специальную идентификацию VARV посредством рестрикционного анализа ампликонов PCR

Таблица 2.1 **Анализы PCR в реальном времени для обнаружения вируса натуральной оспы**
(продолжение)

Ссылка	Таргетный ген (VACV – Копенгаген)	Метод	Подтверждение достоверности с геномной VARV?	Примечания
Fedele et al., 2006	СrmB	Два TaqMan зонда; один зонд VARV-специфичен	Нет Использовалась искусственная конструкция	–
Scaramozzino et al., 2007	14 kDa/A27L	Два TaqMan зонда; один зонд VARV-специфичен	Да	
Aitichou et al., 2008	HA/A56R	Два TaqMan зонда; один зонд VARV-специфичен	Нет Для подтверждения используется клонированный фрагмент VARV-ДНК	–
Putkuri et al., 2009	HA/A56R	LightCycler с гибридными зондами; анализ кривых температур плавления выявил отличие VARV от других ортопоксвирусов	Нет Для подтверждения использованы искусственно полученные фрагменты VARV-ДНК	–
Loveless et al., 2009	B9R/B10R	LightCycler с гибридными зондами; анализ кривых температур плавления выявил отличие VARV от вируса натуральной оспы	Нет Для подтверждения использованы искусственно полученные фрагменты VARV- ДНК	–

CMLV – вирус оспы верблюдов; CPXV – вирус коровьей оспы; СrmB – модификатор В реакции цитокинов; HA – гемагглютинин; nVAR-OPX – ортопоксвирус, не относящийся к variola; PCR – полимеразная цепная реакция; VACV – вирус осповакцины (vaccinia вирус); VETF – фактор ранней транскрипции в вирусах.

2.5.6 Анализ с использованием микрочипов (microarray)

Многие из ранее упоминавшихся проблем, которые возникают при обнаружении вирусов на уровне вида, могут быть решены посредством гибридизации молекул ДНК на олигонуклеотидных микрочипах. В основе первого метода лежит гибридизация флуоресцентно меченных амплифицированных образцов ДНК с олигонуклеотидными ДНК-зондами, иммобилизованными на трехмерном полиакриламидногелевом микрочипе (микрочипы иммобилизованных в геле соединений [MAGIChip]). Зонды идентифицируют видоспецифичные сайты в вирусном гене СrmB. Всего было проанализировано 59 образцов OPV-ДНК, представляющих шесть различных видов, и не было никаких расхождений между результатами, полученными методом гибридизации и традиционными методами идентификации (Lara et al., 2002).

Альтернативный олигонуклеотидный микрочип был разработан с использованием обычных предметных стекол и штамма VARV India. Таргетный ген – G3R, который кодирует chemokine-связывающий белок (Laassri et al., 2003). Этот основанный на использовании микрочипов метод одновременно обнаруживает и проводит разграничение между четырьмя видами OPV, патогенными для человека, и позволяет отличить их от VZV. Авторы протестировали 49 известных и закодированных образцов OPV-ДНК, представляющих разные виды OPV и два штамма VZV. С помощью

олигонуклеотидных микрочипов все образцы были идентифицированы правильно и надежно.

Чтобы обеспечить резервирование и робастность (устойчивость), микрочип содержит несколько уникальных олигонуклеотидных зондов, специфичных для каждого вида вирусов. Эта новая процедура занимает всего три часа, и она может быть использована для параллельного анализа многих образцов. Одновременный анализ многих генов может еще больше повысить надежность метода.

Был разработан еще один основанный на использовании микрочипов метод для одновременного обнаружения и идентификации шести видов OPV (VARV, MPXV, CPXV, CMLV, VACV и ECTV), который тоже дает возможность дифференцировать виды OPV от VZV, HSV-1 и HSV-2 (Ryabinin et al., 2006). Последовательности генов B29R и B19R из штамма Копенгаген VACV были использованы для идентификации соответствующих генов в различных штаммах OPV. Последние были затем использованы для получения видоспецифичных олигонуклеотидных зондов с использованием микрочипов. B29R, кодирующий CC-chemokine-связывающий белок, был идентифицирован в 86 штаммах OPV. B19R, кодирующий белок, связывающий интерферон типа 1, был идентифицирован в 72 штаммах OPV. Микрочип содержал также несколько олигонуклеотидов для идентификации VZV, HSV-1 и HSV-2.

2.5.7 Секвенирование

Секвенирование различных PCR-ампликонов при установлении диагноза дает возможность соотнести образец с известными родственниками после сравнения с соответствующей базой данных. Доступны последовательности гена HA более чем 200 OPV, которые оказались полезны для филогенетических исследований. Эти исследования подтверждают современную концепцию установившегося вида OPV, который исторически основывается на различных фенотипах соответствующего вида.

Всего с 1940 года по 1977 год были секвенированы 45 эпидемиологически различающихся изолятов VARV (Esposito et al., 2006). Геном – это линейная ДНК, состоящая примерно из 186 тысяч пар оснований с ковалентно замкнутыми концами. Низкая степень разнообразия последовательностей позволяет предположить, что, вероятно, существуют очень незначительные различия в содержании у изолятов функциональных генов. Это повышает вероятность того, что методы обнаружения, основанные на анализе последовательностей, позволят эффективно идентифицировать повторно появившийся штамм VARV. Кроме того, незначительное разнообразие последовательностей является определенной гарантией и имеет важное значение с точки зрения перспектив биологической защиты, поскольку оно предполагает высокую вероятность идентификации VARV-инфекций, если прослеживаются единичные или многоисточниковые вспышки болезни. Возможность отследить вирус может стать сдерживающим фактором и воспрепятствовать преднамеренному использованию возбудителя болезни по своему усмотрению. Помимо описанных выше методов для обнаружения патогенов, включая VARV, был разработан метод bio-barcode, в котором используются технологии секвенирования; этот метод оценивался с использованием синтезированного фрагмента VARV длиной в 30 нуклеотидов (He et al., 2008).

Существует обеспокоенность в связи с тем, что биотехнология дает возможность конструировать опасные патогены из генетического материала организмов, встречающихся в природе. Как показывает сравнение нуклеотидных последовательностей, CMLV и вирус оспы африканских гололапых песчанок (татер)

являются ближайшими родственниками VARV, и несколько тысяч мутаций могут преобразовать OPV-ДНК в VARV-ДНК (Sanchez-Seco et al., 2006).

Нуклеотидные последовательности геномов вирусов оспы см. в Интернете⁷. Представлены все восемь родов подсемейства *chordopoxvirinae*, включая 49 последовательностей VARV.

Благодаря успехам в методах секвенирования последние безусловно станут ценным инструментом в судебно-медицинских исследованиях в случае повторного появления натуральной оспы, поскольку секвенирование позволяет с достоверностью определить штамм вируса. При интерпретации результатов таких судебно-медицинских анализов, в которых используются технологии секвенирования, необходимо учитывать мутации, которые могут накапливаться вследствие применения различных методов размножения вирусов (например, выращивание в животных, САМ или использование тканевых культур).

2.6 Диагностические методы, основанные на использовании белков

Хотя в ряде лабораторий производится оценка различных препаратов антител, предназначенных для обнаружения OPV посредством метода "антигенной ловушки" (Czerny, Meyer & Mahnel, 1989), ЦКЗП разработал одно моноклональное антитело, которое, по-видимому, специфично для VARV. В настоящее время только один диагностический метод, основанный на использовании белков, в котором применяется поликлональная анти-VACV сыворотка, доступен в качестве средства для обнаружения OPV. Информация о характеристиках метода ограничена, но он может представлять интерес с точки зрения использования и оценки OPV-инфекций в полевых условиях, с тем чтобы можно было оценить его клиническую чувствительность и специфичность.

Представители рода OPV – единственные поксвирусы, образующие антиген НА, который обнаруживается методами гемадсорбции или гемагглютинации, с использованием подходящих куриных эритроцитов. Ингибирование (торможение) гемагглютинации и гемадсорбции сывороткой пациента – показатель OPV-инфекции. Эти методы наряду с методом диффузии в геле и реакцией фиксации комплемента были классическими компонентами методологий, применявшихся для диагностики натуральной оспы в предликвидационную эру (то есть до 1970-х годов). Эти методологии не находят широкого или повседневного применения в настоящее время, но могут быть ценным дополнением при проведении повторных оценок.

2.7 Серологические методы диагностики

Если образцы вируса недоступны, оценка антител с помощью теста реакции нейтрализации (NT) или других методов может быть единственным путем определения этиологии болезни. Еще один тип тестирования, потребность в котором часто возникает в связи с необходимостью осознанного реагирования в случаях биотерроризма, нужен для оценки остаточного иммунитета после предшествующей вакцинации. Однако не существует единственного рутинного иммунологического теста, который позволяет определить степень защищенности индивидуума от вирусной инфекции. Для обеспечения иммунитета необходима согласованность клеточно-опосредованных и

⁷ <http://www.poxvirus.org>.

гуморальных иммунных реакций. Присутствие нейтрализующих антител обычно свидетельствует о выздоровлении от инфекции, но это не всегда означает длительную защиту от будущих инфекций.

Нейтрализующие антитела против VARV, MPXV, CPXV или VACV могут быть обнаружены уже через шесть дней после инфекции или вакцинации; эффективность NT с использованием сывороток инфицированных животных или людей варьирует в пределах от 50% до 95%. Нейтрализующие антитела обнаруживались более чем через 20 лет после вакцинации вирусом vaccinia или после естественного инфицирования другими OPV человека (Putz et al., 2005). При проведении NT четырехкратное повышение титра антител за период между отбором проб сыворотки в острой фазе болезни и в фазе выздоровления обычно рассматривается как диагностический показатель поксвирусной инфекции. В последнее время нейтрализующие эффекты антител против двух инфекционных форм вируса были изучены более полно. Две формы инфекционного вируса (зрелый вирус – MV и внеклеточный вирус – EV) обладают разными структурами оболочек и разными белками в поверхности оболочек, которые распознаются иммунной системой. Описаны нейтрализующие реакции на ряд белков MV; в то же время известен только один белок EV (B5), распознаваемый нейтрализующей реакцией антитела.

Применяемые в настоящее время для обнаружения антител серологические методы включают анализы антител против человеческих OPV. В число этих анализов входят NT вируса, метод торможения гемагглютинации, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и метод вестерн-блоттинга (Putz et al., 2006). Недавно описанный анализ иммуноглобулина M (IgM) OPV может повысить эффективность исследований вспышек OPV, часто полуретроспективно (Karem et al., 2005). Преимущество этого метода состоит в том, что он позволяет измерить уровень недавней инфекции или заболевания OPV. Его чувствительность и специфичность при диагностике недавней OPV инфекции (по данным оценок во время вспышки оспы обезьян в США) составили примерно 95%, если анализы проводились между 4 и 56 днями после появления сыпи. При надлежащем эпидемиологическом надзоре эти анализы могут быть важным инструментом оценки степени заболеваемости; однако в связи с перекрестными реакциями антител среди представителей каждого рода поксвирусов данные серологических исследований оказываются неспецифичными для данного вида вирусов (Trojan et al., 2007). Для серологической оценки реакций нейтрализации вируса также разработаны дополнительные методы, а именно, основанные на использовании тканевых культур иммуноферментные анализы, реакция подавления образования микробляшек, а также целломика (cellomics) и анализы, основанные на сортировке клеток с возбужденной флуоресценцией (FACS) (Eyal et al., 2005; Earl, Americo & Moss 2003; Borges et al., 2008; Johnson et al., 2008).

Хотя клеточно-опосредованные иммунные реакции играют важную роль в поксвирусных инфекциях и предполагается, что они имеют важное значение, обеспечивая долговременный иммунитет, современное рутинное тестирование T-клеточной реакции не отличается ни надежностью, ни достаточной воспроизводимостью. Недавно разработанный анализ PCR в реальном времени, с помощью которого оценивается CD8+ T-клеточная реакция после VACV-вакцинации, может стать дополнительным способом измерения уровня инфицирования вирусом натуральной оспы. Однако в настоящее время этот анализ не является специфичным даже для OPV, поскольку он просто измеряет реакцию гамма-интерферона.

2.8 Итоговые размышления

Отмечается чрезвычайный рост числа диагностических методов, применяемых для идентификации OPV, включая VARV, в основе которых лежит использование нуклеиновых кислот, и в то же время очень ограниченное увеличение числа диагностических методов, основанных на иммунологических анализах, анализах белков или целых вирусов. Все методы, разработанные к настоящему времени, основаны на данных исследований; ни по одному из них не завершена регламентирующая проверка и ни по одному не завершена процедура утверждения (регистрации). В настоящее время обсуждается вопрос о возможной необходимости живых VARV для проведения регулирующих проверок разрабатываемых анализов. Одна диагностическая тест-система, основанная на использовании нуклеиновых кислот, коммерчески доступна; однако она предназначена исключительно для исследовательских целей, а не для практической диагностики. Также только для исследовательских целей был разработан коммерчески доступный комплект для диагностики родового OPV на основе метода "антигенной ловушки". В число исследовательских инструментов входят стандартные PCR-анализы, за ними следует идентификация вида OPV посредством секвенирования или RFLP. Все серологические методы, с помощью которых оцениваются гуморальные иммунные реакции (IgG, IgM, нейтрализация и др.), основаны на данных исследований, и реактивы не могут быть широко доступны. Определенное число Сотрудничающих центров ВОЗ, владеющих коллекциями поксвирусов и вируса натуральной оспы, и другие специализированные лаборатории (академические и государственные) могут в настоящее время располагать различными возможностями и опытом для диагностики поксвирусов и идентификации натуральной оспы.

Желательна тщательнейшая сравнительная проверка разработанных аналитических подходов. Анализы необходимо проверять до того, как они обретут клинический диагностический статус. Для оценки чувствительности и специфичности тестов на основе нуклеиновых кислот необходима нуклеиновая кислота из VARV, особенно в связи с тем, что современные диагностические платформы устаревают. Для этой цели необходимо провести оценку самого лучшего материала (например, полный геном, ампликоны, плазмиды). Для проверки и разработки клинических диагностических средств потребуются исследования с инфекционными вирусами, с тем чтобы можно было определить наилучшие методы подготовки и экстрагирования (особенно в случае метода "антигенной ловушки" и тестов нуклеиновых кислот); некоторые из этих исследований могут быть проведены с другими инфекционными OPV.

Сокращения

CAM	хориоаллантаисная мембрана
ЦКЗП	Центры контроля заболеваний и профилактики
CMLV	вирус оспы верблюдов
CPXV	вирус коровьей оспы
CrnB	модификатор В реакции цитокинов
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ECTV	вирус оспы мышей
HA	гемагглютинин
HSV	вирус герпеса
MPXV	вирус оспы обезьян
NT	реакция нейтрализации
OPV	ортопоксвирус
PCR	полимеразная цепная реакция
RFLP	полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
ГНЦ ВБ "Вектор"	Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"
VACV	вирус осповакцины (vaccinia вирус)
VARV	вирус натуральной оспы
VZV	вирус ветряной оспы
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения

Справочные материалы

- Aitichou M et al. (2008). Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents. *Journal of Virological Methods*, 153:190–195.
- Babkina IN et al. (2004a). [Comparative restriction enzyme analysis of the genome in variola virus strains from the Russian collection]. *Molekuliarnaia biologii*, 38:429–436.
- Babkina IN et al. (2004b). Phylogenetic comparison of the genomes of different strains of variola virus. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 398:316–319.
- Borges MB et al. (2008). Accuracy and repeatability of a micro plaque reduction neutralization test for vaccinia antibodies. *Biologicals*, 36:105–110.
- Carletti F et al. (2005). Rapid, differential diagnosis of orthopox- and herpesviruses based upon real-time PCR product melting temperature and restriction enzyme analysis of amplicons. *Journal of Virological Methods*, 129:97–100.
- Czerny CP, Meyer H, Mahnel H (1989). Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*. 36:537–546.
- Damon IK, Esposito JJ (2003). Poxviruses that infect humans. In: Murray PR, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, MH Tenover, eds. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC, 1583–1591.
- Earl PL, Americo JL, Moss B (2003). Development and use of a vaccinia virus neutralization assay based on flow cytometric detection of green fluorescent protein. *Journal of Virology*, 77:10684–10688.
- Esposito JJ, Knight JC (1985). Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*, 143:230–251.
- Esposito JJ et al. (2006). Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science*, 313:807–812.
- Espy MJ et al. (2002). Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:1985–1988.
- Eyal O et al. (2005). Development of a tissue-culture-based enzyme-immunoassay method for the quantitation of anti-vaccinia-neutralizing antibodies in human sera. *Journal of Virological Methods*, 130:15–21.
- Fedele CG et al. (2006). Use of internally controlled real-time genome amplification for detection of variola virus and other orthopoxviruses infecting humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:4464–4470.
- Hazelton PR, Gelderblom HR (2003). Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerging Infectious Diseases*, 9:294–303.
- He M et al. (2008). Rapid bio-barcode assay for multiplex DNA detection based on capillary DNA Analyzer. *Journal of Virological Methods*, 151:126–131.
- Henderson DA et al. (1999). Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Journal of the American Medical Association*, 281:2127–2137.
- Ibrahim MS et al. (2003). Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *Journal of Clinical Microbiology* 41:3835–3839.

- Johnson MC et al. (2008). A rapid, high-throughput vaccinia virus neutralization assay for testing smallpox vaccine efficacy based on detection of green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods*, 150:14–20.
- Karem KL et al. (2005). Characterization of acute-phase humoral immunity to monkeypox: use of immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay for detection of monkeypox infection during the 2003 North American outbreak. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12:867–872.
- Kulesh DA et al. (2004). Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the roche LightCycler and the Cepheid smart Cycler platforms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:601–609.
- Laassri M et al. (2003). Detection and discrimination of orthopoxviruses using microarrays of immobilized oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 112:67–78.
- Lapa S et al. (2002). Species-level identification of orthopoxviruses with an oligonucleotide microchip. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:753–757.
- Li Y et al. (2007). Orthopoxvirus pan-genomic DNA assay. *Journal of Virological Methods*, 141:154–165.
- Loparev VN et al. (2001). Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region. *Journal of Clinical Microbiology*, 39:94–100.
- Loveless BM et al. (2009). Differentiation of Variola major and Variola minor variants by MGB-Eclipse probe melt curves and genotyping analysis. *Molecular and Cellular Probes*, 23:166–170.
- Mackett M, Archard LC (1979). Conservation and variation in orthopoxvirus genome structure. *The Journal of General Virology*, 45:683–701.
- Meyer H, Ropp SL, Esposito JJ (1997). Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *Journal of Virological Methods*, 64:217–221.
- Meyer H et al. (1999). Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. *Archives of Virology*, 144:491–501.
- Nitsche A, Ellerbrok H, Pauli G (2004). Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:1207–1213.
- Olson VA et al. (2004). Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:1940–1946.
- Panning M et al. (2004). Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopox viruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clinical Chemistry*, 50:702–708.
- Putkuri N et al. (2009). Detection of human orthopoxvirus infections and differentiation of smallpox virus with real-time PCR. *Journal of Medical Virology*, 81:146–152.
- Putz MM et al. (2005). Prevalence of antibodies to vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *The Journal of General Virology*, 86:2955–2960.

- Putz MM et al. (2006). Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nature Medicine*, 12:1310–1315.
- Ropp SL et al. (1995). PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:2069–2076.
- Ryabinin VA et al. (2006). Microarray assay for detection and discrimination of orthopoxvirus species. *Journal of Medical Virology*, 78:1325–1340.
- Sanchez-Seco MP et al. (2006). Detection and identification of orthopoxviruses using a generic nested PCR followed by sequencing. *British Journal of Biomedical Science*, 63:79–85.
- Scaramozzino N et al. (2007). Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses. *Clinical Chemistry*, 53:606–613.
- Schmidt M et al. (2005). Nucleic acid test screening of blood donors for orthopoxviruses can potentially prevent dispersion of viral agents in case of bioterrorism. *Transfusion*, 45:399–403.
- Shchelkunov SN, Gavrilova EV, Babkin IV (2005). Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans. *Molecular and Cellular Probes*, 19:1–8.
- Shchelkunov SN, Marennikova SS, Moyer RW (2005). *Orthopoxviruses pathogenic for humans*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Trojan A et al. (2007). Real time PCR for the assessment of CD8+ T cellular immune response after prophylactic vaccinia vaccination. *Journal of Clinical Virology*, 40:80–83.
- ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения) (2008а). "Рекомендации по правилам перевозки инфекционных материалов, 2009–2010 годы". Женева, Всемирная организация здравоохранения (WHO/HSE/EPR/2008.10).
- WHO (World Health Organization) (2008b). WHO recommendations concerning the distribution, handling and synthesis of variola virus DNA, May 2008. *Weekly Epidemiological Record*, 83:393–395.

3 Геномика вируса натуральной оспы

Grant McFadden¹, David Evans², Sergei Shchelkunov³ и Inger Damon⁴

¹ Отдел молекулярной генетики и микробиологии, Медицинский колледж, Университет штата Флорида, Гейнсвилл, Соединенные Штаты Америки

² Школа клинических и лабораторных наук, Факультет медицины и стоматологии, Университет Альберты, Эдмонтон, Альберта, Канада

³ Отдел геномных исследований, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

⁴ Отдел исследований вирусов оспы и бешенства, Центры контроля заболеваний и профилактики, Атланта, Соединенные Штаты Америки

Представленные в этом докладе данные и заключения принадлежат авторам и не обязательно отражают официальную точку зрения Центров контроля заболеваний и профилактики.

Значение для общественного здравоохранения

Новые технологии радикально расширили наши представления о геномике вируса натуральной оспы. В результате были разработаны новые способы обнаружения и диагностики натуральной оспы, повысилось понимание эволюционной истории инфекций натуральной оспы и причин их тяжести. Однако новые технологии в синтетической биологии также создали непредвиденные проблемы, касающиеся контроля доступа к генетическим материалам, связанным с вирусом натуральной оспы. В этой главе представлен общий обзор последних открытий в геномике вируса натуральной оспы, а также обсуждается вопрос о том, каким образом новые технологии в синтезе генома могут помешать реализации существующих стратегий по сдерживанию распространения вируса.

Успехи, достигнутые к настоящему времени

Полная последовательность ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) геномов двух близкородственных вирусов натуральной оспы была впервые опубликована в начале 1990-х годов. В результате реализации интенсивной программы исследований натуральной оспы, которая была одобрена Секретариатом Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и начала осуществляться в 2000 году, в настоящее время стала широко доступной почти полная информация о геномах 48 изолятов вируса натуральной оспы из разных географических регионов. Эти данные могут быть использованы для лучшего понимания эволюции вируса натуральной оспы, для разработки более совершенных диагностических методов, а также (в совокупности с биоструктурными исследованиями) для более глубокого изучения проблемы чувствительности к определенным лекарствам. Работая с клонированными генами вируса натуральной оспы, исследователи также расширили свои представления о взаимодействиях и активности индивидуальных белков вируса натуральной оспы. Это позволяет еще лучше понять, каким образом вирус вызывает заболевание человека.

В этой главе обобщена имеющаяся информация о геномах вируса натуральной оспы и показано, каким образом она применяется для изучения родства этого вируса с другими поксвирусами животных, для изучения эволюции вируса во время эпидемических заболеваний людей и для разработки диагностических тестов. В данной главе обсуждается проблема будущего применения геномного материала вируса натуральной оспы в свете новых технологий получения синтезированных ДНК.

Результаты и выводы

Имеющаяся в открытом доступе информация о геномах использовалась многими учеными разных стран для разработки высокочувствительных методов диагностики вирусов. Новая информация о взаимосвязи между вирусом натуральной оспы и другими ортопоксвирусами также важна в целях понимания значимости и ограничений в использовании животных моделей для изучения оспы человека. Благодаря чрезвычайному подъему в развитии технологий синтеза, секвенирования и клонирования ДНК в настоящее время стало технически возможным осуществить синтез целого генома вируса натуральной оспы из материала царапины, используя только открытую информацию о последовательности, и воссоздать инфекционный вирус, используя доступные в настоящее время методы молекулярной биологии.

В будущие стратегии биозащиты необходимо включать новые концепции, позволяющие решить вопрос о том, как наилучшим образом контролировать применение этих технологий биологического синтеза.

3.1 Геном вируса натуральной оспы

Полная последовательность ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) геномов двух близкородственных вирусов натуральной оспы (VARV) была опубликована в начале 1990-х годов. В 2006 году было проведено систематическое исследование, в котором сравнивали полные геномные последовательности из ряда географически разделенных изолятов VARV, собранных со всего мира (Esposito et al., 2006). Общие свойства родового VARV-генома иллюстрируются на рисунке 3.1, а анализ взаимосвязей кладов между секвенированными изолятами представлен на рисунке 3.2. Технически геном только одного штамма VARV (Bangladesh-1975) был секвенирован полностью; это единственный штамм, о терминальных последовательностях которого на концах VARV генома было официальное сообщение (Massung et al., 1994). Терминальные последовательности, имеющие конфигурацию шпилек, очень близки к петлевым ортологичным последовательностям вируса осповакцины (VACV). Мы называем "полными VARV-геномными последовательностями" такие последовательности, которые включают весь геном, кроме штаммовых различий, которые могут быть ассоциированы с терминальными петлями и примыкающей последовательностью. Хотя это никогда не было официально продемонстрировано, предполагается, что одна опубликованная VARV-терминальная петлевая последовательность или идентична, или может полностью заменить терминальные последовательности в других штаммах VARV.

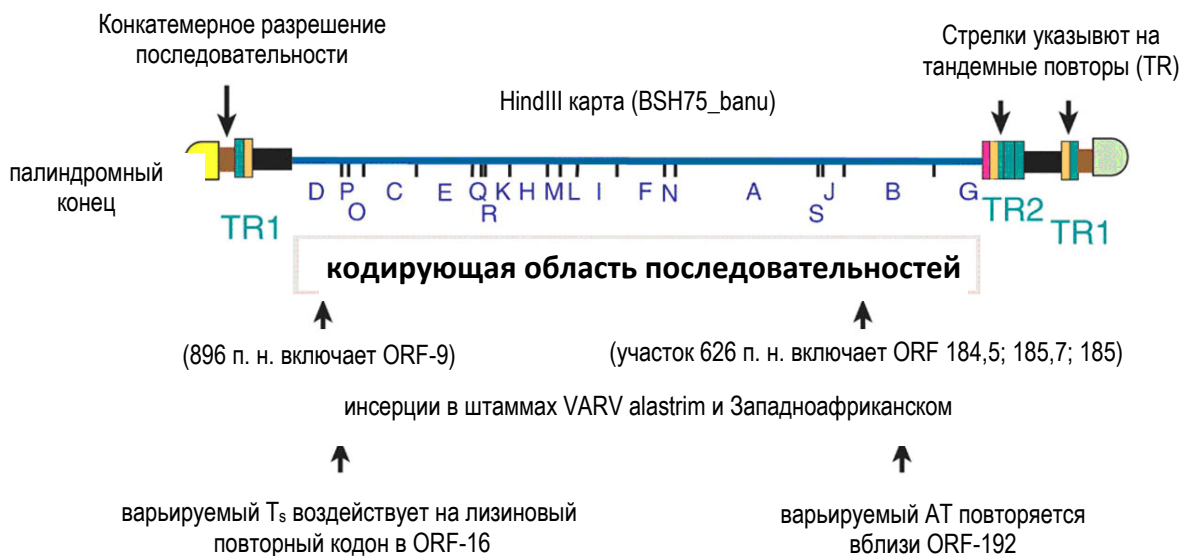


Рисунок 3.1 Геном вируса натуральной оспы

п. н. (bp) – пары нуклеотидов (пары оснований); ORF – открытая рамка считывания; VARV – вирус натуральной оспы; Источник: Esposito J.J. et al. (2006). Воспроизводится с разрешения авторов.

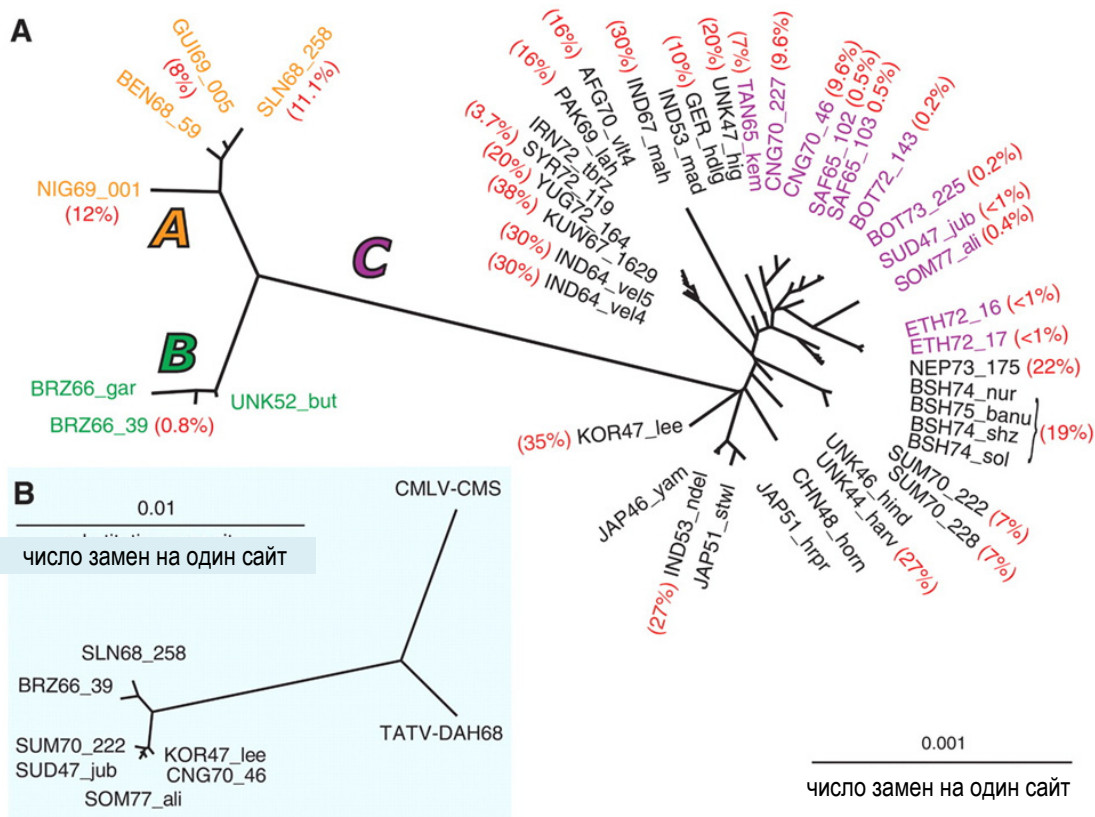


Рисунок 3.2 Взаимосвязи кладов секвенированных изолятов вируса натуральной оспы

Филогенетические взаимосвязи между секвенированными изолятами VARV. А) Бескорневая (unrooted) консенсусная филограмма на основании анализа 65 тыс. пар оснований средней кодирующей области последовательностей 45 VARV обнаруживает три клада высокого уровня, которые представляют кластеры изолятов из Западной Африки (клад А, оранжевый цвет), Южной Америки (клад В, зеленый цвет) и Азии (клад С, пурпурный цвет). Азиатский клад включает подгруппу африканских вариантов не из Западной Африки (фиолетовый цвет), которые дивергировали в вирусные типы, характеризующиеся низким или средним уровнем вызываемой летальности. Указаны коэффициенты летальности (случай заболевания – смертность) (красный цвет), ассоциируемые с некоторыми изолятами, и некоторые из них обсуждаются в сопровождающем тексте. В) Укорененное (rooted) консенсусное древо с использованием средних кодирующих областей последовательностей CMLV (вирус оспы верблюдов) – CMS70 и TATV (вирус оспы татер)-DAH68, смыкается с подгруппой изолятов VARV, представляющих древо в А. Источник: Esposito J. J. et al. (2006). Воспроизводится с разрешения авторов.

База данных о геномных последовательностях VARV быстро расширилась за последнее десятилетие благодаря продолжающимся технологическим успехам в ДНК-секвенировании и биоинформатике. Одна из первых двух опубликованных геномных последовательностей VARV была определена методом химического секвенирования по Максаму-Гилберту (Shchelkunov, Blinov & Sandakhchiev, 1993a, b; Shchelkunov et al., 1993), но все другие последовательности определяли автоматизированным методом Сэнгера – секвенирование методом дробовика ("shotgun") (Massung et al., 1993, 1994) или с помощью метода "прогулка по хромосоме" (Esposito et al., 2006). Генные чипы (GeneChips) тоже могут быть полезным инструментом для быстрого ресеквенирования и идентификации штаммов VARV (Sulaiman et al., 2007; Sulaiman, Sammons & Wohlhueter, 2008). Эти технологические достижения значительно повысили точность и скорость секвенирования и резко снизили стоимость соответствующих процедур. Например, с помощью современных технологий любой геном может быть секвенирован примерно с 25-кратным резервированием за несколько дней при стоимости процедуры менее 1000 долл. США.

Эти геномные последовательности являются богатым источником новых возможностей углубленного понимания генетики VARV, их эволюции, взаимосвязей с другими ортопоксвирусами (OPV) и коэволюционных взаимодействий с человеком-хозяином (Gubser et al., 2004; Shchelkunov, Marennikova & Moyer, 2005). Они также использовались для разработки диагностических инструментов для дифференцирования VARV от других OPV, которые могут быть обнаружены в биологических образцах (Li et al., 2007b; Sulaiman et al., 2007; Sulaiman, Sammons & Wohlhueter, 2008). Эти последовательности в совокупности с последовательностями генов и данными о чувствительности других OPV к лекарствам свидетельствуют о том, что все штаммы VARV должны быть чувствительны к таким средствам лекарственной терапии, как ST-246 и производное цидофовира CMX001. Данные о достижениях в разработке диагностических методов и противовирусных препаратов представлены в главе 6 настоящего доклада.

В результате последних замечательных разработок методов секвенирования ДНК, клонирования и синтеза генов в настоящее время технически возможно, как отмечалось выше, синтезировать весь геном VARV из материала кожного поражения, используя лишь имеющуюся в открытом доступе информацию, и воссоздать инфекционный VARV с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Таким образом, больше нет возможности ликвидировать угрозу вторичного появления живого VARV как биологической единицы, даже если существующие запасы вируса в Сотрудничающих центрах Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в США и в Российской Федерации будут уничтожены.

Геномы всех изолятов VARV, которые были секвенированы к настоящему времени, очень сходны между собой, частично потому, что у поксвирусов эволюционные изменения происходят медленнее, чем во многих других вирусах (особенно РНК- [рибонуклеиновая кислота] содержащих вирусах, таких как вирус иммунодефицита человека и вирус гриппа). Все секвенированные VARV-геномы, которые составляют примерно 185 тыс. пар нуклеотидов в длину, содержат около 200 открытых рамок считывания (ORF). Эти ORF экспрессируют белки с различной степенью сходства с белками, экспрессированными другими OPV, такими как вирус оспы верблюдов (CMLV), вирус оспы татар (GBLV), вирус оспы обезьян (MPXV), вирус коровьей оспы (CPXV) и VACV (вакцина, применявшаяся для ликвидации натуральной оспы). Подобно всем поксвирусам, вирусный геном – это двухцепочечная ДНК с концами в виде петли (шпильки) и терминальными последовательностями обращенных повторов (TIR). В отличие от большинства других поксвирусов TIR-последовательности VARV не кодируют никаких вирусных белков, и, таким образом, все VARV ORF присутствуют в единственной копии. Предполагается, что функция петлевых концов определенно связана с репликацией генома, обеспечивающей полный синтез всех вирусных ДНК-последовательностей на протяжении жизненного цикла вируса. Таким образом, петлевые концы разных поксвирусов, по-видимому, функционально взаимозаменяемы.

В пределах центральной области генома VARV сгруппировано примерно 90 высококонсервативных генов, которые являются ортологами генов, обнаруживаемых в других геномах хордопоксвирусов (Gubser et al., 2004). Полагают, что эти консервативные гены кодируют существенные элементы репликации поксвирусов, экспрессию генов и морфогенез вирионов. Гены, которые кодируют особые аспекты биологии VARV, такие как вирулентность, антииммунные детерминанты и маркеры патогенеза болезни, группируются преимущественно ближе к концам генома. Наибольшее варьирование в ДНК-последовательностях у штаммов VARV с различными показателями летальности отмечается в геномных областях,

наиболее близких к TIR-последовательностям (Shchelkunov, Massung & Esposito et al., 1995; Massung et al., 1996; Shchelkunov et al., 2000; Esposito et al., 2006). Примерно у 90% генов VARV имеются четко определенные ортологи в геномах других поксвирусов, тогда как усеченные (процессированные) варианты остальных можно найти по меньшей мере в одном из других OPV. Генетически два OPV, наиболее близко родственные с VARV (примерно с 98-процентной идентичностью нуклеотидов в центральной области геномов в 110 тыс. п. н.) – это CMLV и вирус африканской гололапой песчанки (татеры) GBLV. Генетические расстояния между VARV и MPXV, CPXV и VACV значительно больше (Shchelkunov et al., 2001; Gubser et al., 2004; Meyer et al., 2005; Shchelkunov, Marennikova & Moyer, 2005).

Среди 48 изолятов VARV, которые были секвенированы и зарегистрированы в открытых базах данных⁸, у индивидуальных пар геномов VARV могут различаться до 700 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) (SNP) и до 90 инсерций/делеций (indels). Документально зафиксировано, что полный спектр геномного варьирования VARV – более 1700 SNP и 4800 инсерций/делеций; в целом, однако, для последовательностей весьма характерно их близкое сходство. Эти секвенированные изоляты (один из которых был секвенирован дважды, общее число записей в базе данных – 49) перечисляются в конце настоящей главы (таблица 3.1).

Изоляты VARV для геномного секвенирования отбирались таким образом, чтобы был представлен широкий поперечный разрез архивированных штаммов, различающихся по географическому происхождению и по клиническим свойствам. Если будут секвенированы остальные изоляты VARV, находящиеся в хранилищах, вероятно, будут открыты дополнительные генетические вариации; примерно 550 таких изолятов хранятся в Центрах контроля заболеваний и профилактики в США и в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор" в Российской Федерации. Эта дополнительная информация о вариациях последовательностей может быть полезна при проведении более тонких молекулярных, эпидемиологических или "судебно-медицинских" исследований вируса. Однако маловероятно, что такое дополнительное секвенирование будет представлять ценность для разработок специфических вакцин или диагностических методов. Если последовательности специфических вирусных белков, которые являются мишенями для разрабатываемых в настоящее время лекарств и терапевтических средств, более разнообразны, чем имеющиеся в современной базе данных, дополнительная информация о последовательностях могла бы указать на возможность существования резистентных к лекарствам полиморфизмов в запасах VARV, которые еще не были секвенированы. Однако разработка лекарств нацелена главным образом на вирусные гены, которые сравнительно хорошо сохраняются в VARV и других OPV, и, таким образом, дополнительная информация о последовательностях, вероятно, будет иметь лишь скромную чисто научную ценность.

Исследование индивидуально экспрессированных белков VARV, основанное на информации о ДНК-последовательностях, привело к еще более глубокому пониманию биологии VARV (Dunlop et al., 2003). Например, белки, кодируемые несколькими генами VARV, которые были экспрессированы или синтезированы в лаборатории, взаимодействуют со специфическими элементами иммунной системы человека, такими как сывороточный комплемент, интерлейкин-18, гамма-интерферон, фактор некроза опухолей, хемокины и различные пути передачи сигнала в клетках (Seregin et al., 1996; Rosengard et al., 2002; Esteban, Nuara & Buller, 2004; Kim et al., 2004; Alejo et al.,

⁸ <http://www.poxvirus.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>.

2006; Gileva et al., 2006; Liszewski et al., 2008; Yadav et al., 2008). Совсем недавно для получения ответа на вопрос, каким образом много различных белков VARV могут физически взаимодействовать с полным набором белков человека, исследователи использовали дрожжевую двугибридную систему для систематического скрининга всех уникальных белков VARV, которые не обнаруживаются в VACV, в сопоставлении с полным протеомом человека. Это исследование выявило много новых взаимодействий между белками человека и VARV, включая новое семейство VARV-ингибиторов важного воспалительного сигнального каскада, который опосредован ядерным фактором каппа В (Mohamed et al., 2009). Весьма вероятно, что дальнейшее изучение индивидуально экспрессированных белков VARV даст возможность еще глубже понять фундаментальные процессы естественной передачи сигналов иммунного ответа в клетках человека и приведет к открытию дополнительных взаимодействий с хозяином.

3.2 Эволюция вируса натуральной оспы

Все поксвирусы продолжают дивергировать под воздействием генетических механизмов, в число которых входят точечные мутации, инсерции (вставки), делеции, различные рекомбинационные события и утрата или приобретение целых генов (Smith, Chan & Howard, 1991; Shchelkunov & Totmenin, 1995; McLysaght, Baldi & Gaut, 2003; Gubser et al., 2004; Babkin & Shchelkunov, 2008). Доступные данные геномного секвенирования выявляют несколько четко различающихся групп VARV. В зависимости от метода анализа эти группы могут рассматриваться либо как три различных клада, либо как два крупных клада, в один из которых входят две подгруппы (Esposito et al., 2006; Li et al., 2007a). Представители первой группы включают изоляты *variola major* (большая оспа) из Азии, которые вызывают высокую смертность, и изоляты из Африки (особенно Восточной, Центральной и южной части Африки), которые характеризуются варьирующими показателями смертности. Во вторую группу входит *variola minor* (alastrim) из Южной Америки, для которой характерен более низкий показатель смертности. Входящие в третью группу близкородственные изоляты происходят из Западной Африки и характеризуются промежуточными уровнями тяжести заболевания. Эти исследования секвенирования являются важным источником информации о распространении натуральной оспы в мире и о том, каким образом *variola major* и *variola minor* начали дивергировать до тех пор, пока не были ликвидированы в результате кампании вакцинации ВОЗ в 1977 году.

В соответствии с тем, как информация о последовательностях коррелирует с данными исследований отдельных случаев заболевания и с историческими записями, было рассчитано, что VARV дивергировал от анцестрального поксвируса, природными резервуарами которого, вероятно, являются грызуны в Африке, в период между 16 тыс. и 68 тыс. лет тому назад (Li et al., 2007a). Клинические случаи были впервые зафиксированы в Китае и, возможно, в Индии. Позднее болезнь распространилась в страны средиземноморского бассейна и в Европу, затем в XVI веке достигла Нового Света. Поскольку исторические записи не содержат сведений о точных датах первых вспышек натуральной оспы в человеческих популяциях, был применен аналитический подход к изучению эволюции VARV, с тем чтобы установить время появления VARV, используя случаи заболеваний, по которым документально зафиксированы даты и места возникновения болезни (Babkin & Shchelkunov, 2006; Shchelkunov, 2009). При применении этого подхода анализировали протяженную центральную консервативную область генома OPV (около 102 тыс. п. н.) вместе с восемью генами мультисубъединиц РНК-полимеразы различных родов *Poxviridae*. На основании известной датировки интродуцирования натуральной оспы из Западной Африки в Южную Америку (XVI–XVIII века) и данных о близких филогенетических взаимосвязях между современными

западноафриканскими и южноамериканскими изолятами VARV было рассчитано, что средняя скорость накопления мутаций в этих ДНК-содержащих вирусах составляла 10^{-6} замен нуклеотидов на один сайт в год. Если исходить из предположения, что эта скорость была относительно постоянной на протяжении определенного времени, OPV дивергировали от анцестрального вируса до родов, распознаваемых в настоящее время, 130 тыс. лет тому назад. В соответствии с этим расчетом VARV начал свою независимую эволюцию 3400 (± 800) лет тому назад, вероятнее всего примерно в то время, когда он совершил первый "прыжок" из неизвестного хозяина-грызуна в человека (Babkin & Shchelkunov, 2008).

Первоначальный анцестральный вирус, который был эволюционным родителем современных OPV, остается неизвестным. Имеются убедительные доказательства, свидетельствующие о том, что существующие штаммы CPXV более тесно связаны с первоначальным вирусом-предком, от которого предположительно происходят современные OPV, так как CPXV содержит самое большое количество вариабельных генов, часть из которых очень близки к ортологам в VARV (Shchelkunov et al., 1998). Интересно также, что все другие известные геномы OPV, включая VARV, содержат ряд генов, которые были фрагментированы или инактивированы по сравнению с более крупным геномом CPXV. Был ли первый штамм VARV, появившийся в человеческих популяциях, *variola major* или *variola minor*, неизвестно, но очевидно, что ко времени ликвидации натуральной оспы эти штаммы в процессе эволюции были отделены один от другого (Esposito et al., 2006; Li et al., 2007a).

Эволюция поксвирусов характеризуется значительно более низкими темпами, чем эволюция многих других вирусов; вероятно, это обусловлено высокой точностью воспроизведения поксвирусной ДНК-полимеразы, ответственной за копирование вирусной генетической информации в течение репликационного цикла. В целом РНК-содержащие вирусы эволюционируют быстрее, поскольку их мутационные частоты значительно выше, чем у ДНК-содержащих вирусов или у эукариотических организмов, и у них отсутствует эндонуклеазная активность, проявляющаяся в исправлении ошибок копирования. Однако расчеты скоростей генетического дрейфа VARV на протяжении какого-то времени затруднительны, и сегодня мы в большей степени полагаемся на филогенетические взаимосвязи, определяемые на основании сходства между последовательностями нуклеиновых кислот и аминокислот у вирусов, которые были выделены на протяжении XX века. Мы все еще плохо понимаем, каким образом VARV эволюционировал в патоген, специфичный для человека. Его ближайшие генетические родственники, GBLV и CMLV, тоже характеризуются узким кругом хозяев, в то время как у поксвирусов с самыми большими геномами (подобных CPXV) отмечается склонность к самым широким спектрам хозяев в природе.

3.3 Технологии исследования поксвирусного генома

Хотя сравнения геномов значительно углубляют наши представления о том, каким образом поксвирус-кодированные генные продукты могут потенциально обуславливать вирулентность VARV, эти исследования сами по себе не могут объяснить причины заболевания натуральной оспой. Новейшие технологии генных манипуляций и синтеза генов способствуют более глубокому пониманию биологических свойств VARV и VARV-кодированных генных продуктов. Например, малые регуляторные белки комплемента VACV и VARV различаются всего на 11 аминокислотных остатков; это достаточно маленькое различие, чтобы осуществить превращение гена VACV в его VARV-аналог посредством сайт-направленного мутагенеза (Rosengard et al., 2002). Однако это более трудоемкий подход, чем химический синтез гена VARV, который

доступен для любой лаборатории, способной заплатить скромное вознаграждение. Особое преимущество синтеза генов состоит в том, что ДНК-последовательность может быть изменена любым желаемым образом; наиболее распространенное изменение – это оптимизация выбора кодона в изменяемом гене с целью повышения эффективности экспрессии рекомбинантных белков в обычно используемых системах экспрессии. Эта деятельность сопряжена с непредвиденным последствием – созданием клонов ДНК, которые могут оказаться вне сферы действия национальных регулирующих норм, касающихся владения и манипулирования VARV-ДНК. Это обусловлено тем, что, поскольку эти гены все еще кодируют белок VARV, ДНК формально (и, вероятно, также легально) не является VARV-ДНК.

Стоимость синтеза генов продолжает быстро снижаться, что связано с неуклонным совершенствованием возможностей собирать протяженные безошибочные конструкции (Czar et al., 2009). По некоторым оценкам, стоимость снижается наполовину, а достигаемая длина удваивается каждые два-три года. Синтез генов использовали, например, для синтеза инфекционного полиовируса *de novo* и для воссоздания пандемического в 1918 году штамма вируса гриппа (Cello, Paul & Wimmer, 2002; Tumpey et al., 2005). Способность синтезировать любой ген по заказу вызывает тревогу, поскольку любой опытный специалист, владеющий методами синтеза ДНК, может реконструировать живой OPV, используя те же подходы. Это должна быть не такая простая задача, как это было в случае полиовируса (который обладает геномом, содержащим однонитевую позитивно-смысловую РНК), поскольку "оголенная" (депротеинизированная) поксвирусная ДНК неинфекционна, и OPV-геномы примерно в 25 раз больше; однако существуют все необходимые технические методы для синтеза интактного поксвирусного генома, и, используя этот геном, можно создать живой вирус. В 2002 году инфекционный VACV был воссоздан из полного вирусного генома, клонированного в бактериальную искусственную хромосому (Domi & Moss, 2002). Кроме того, было возможно собрать и реактивировать VACV, используя смеси фрагментов ДНК, трансфецированные в клетки, которые ранее были инфицированы лепорипоксвирусом (вирусом оспы зайцев) – хелпером (Yao & Evans, 2003). В последнем исследовании ДНК включала смесь фрагментов, образовавшихся с помощью полимеразной цепной реакции, и рестрикционные фрагменты VACV; однако, несмотря на то, что несколько технических проблем осложняют эти эксперименты (особенно случайные мутации), нет никаких убедительных причин полагать, что для воссоздания живого VARV не могут быть использованы полностью синтезированные фрагменты. Рассчитанная стоимость синтеза всех необходимых клонов в настоящее время должна составлять менее 200 тыс. долл. США, и в будущем эта стоимость, вероятно, снизится.

Синтез интактного VARV *de novo* – не единственный путь, которым может быть создан VARV или вирус, подобный VARV. Хотя современные рекомендации ВОЗ запрещают генетическую инженерию VARV, нет никаких сомнений, что многие методы, применяемые для генетической модификации поксвирусов, могут быть использованы для изменения вирулентности любого OPV, включая VARV. Например, OPV-геномы легко изменяются посредством гомологичной рекомбинации, а маркеры устойчивости к лекарствам легко интродуцируются в штаммы, которые в норме восприимчивы к лекарствам. Аналогичным образом, инсерция иммунорегуляторных генов хозяина может изменить поксвирусную вирулентность или чувствительность инфекции к предшествующей вакцинации. Гибридные вирусы тоже представляют потенциальную угрозу, и их значительно легче собрать в структуру, чем дикие (исходные) штаммы VARV. Почти 50 лет назад было показано, что рекомбинантные OPV жизнеспособны и что рекомбинант может быть продуцирован совместно инфицирующими клетками с

VARV и вирусом оспы кроликов (штамм VACV) (Bedson & Dumbell, 1964a) или CPXV (Bedson & Dumbell, 1964b). Будут ли эти лабораторные гибриды патогенными для человека, неизвестно и не может быть проверено. Злокачественный вирус кролика, рекомбинант между безопасными (фиброма Шоупа) и вирулентными (миксома) лепорипоксвирусами (вирусами заячьей оспы), сохраняет значительную часть вирулентности миксомного родительского вируса (Oggenorth et al., 1992). Один анализ, в сущности, позволяет предположить, что штамм VARV alastrim мог быть природным гибридом, образовавшимся в результате рекомбинации между западноафриканским и азиатским штаммами VARV (Esposito et al., 2006). Никакие явные технические или биологические барьеры не должны помешать замене одного OPV-гена на другой, включению гена, характерного только для патогенных OPV, в VACV, замещению гомологичных частей одного генома с синтетическими сегментами, скопированными с другого вируса, или образованию гибридных вирусов (например, гибрида MPXV и CMLV) с потенциально новыми типами вирулентности, которые могут имитировать типы вирулентности VARV. Конечно, возможность перемешивать и подбирать гены вирусов в рекомбинантных OPV – это отрезвляющая мысль, особенно если аллели устойчивости к лекарствам генов-мишеней будут встроены в реконструированный вирус.

3.4 Рекомендации по контролю исследований геномов вируса натуральной оспы

Обсуждавшиеся выше достижения в области геномных технологий требуют переоценки современных стратегий сдерживания распространения VARV и приведения их в соответствие с новыми данными. Эти стратегии были разработаны в 1980-е годы и с тех пор часто пересматривались. Возможность того, что поксвирусы могут быть воссозданы из клонированных ДНК с помощью методов реактивации, является причиной, по которой ни одной лаборатории (кроме двух Сотрудничающих центров ВОЗ) не разрешается сохранять более 20% генома VARV, и по той же причине любые манипуляции с VARV-ДНК должны быть географически изолированы от работы, сопряженной с хранением или размножением других поксвирусов. В существующих методах контроля вполне разумно основное внимание обращено на физический и административный контроль доступа к живым вирусам или к клонированным фрагментам генома вируса натуральной оспы; эти методы безусловно сохраняют свою значимость, и их применение по-прежнему необходимо, наряду с запретом на такие виды деятельности, как намеренное интродуцирование генов VARV в другие поксвирусы. Однако когда эти процедуры и директивы разрабатывались, никто не предвидел, что спустя 25 лет благодаря успехам в секвенировании генома и в синтезе генов значительные части VARV окажутся доступными для любого, кто подключен к Интернету и имеет доступ к ДНК-синтезатору. Этот "любой" человек может быть даже исследователем, имеющим благие намерения, но не знающим о натуральной оспе и не имеющим представления об особых правилах, регулирующих доступ к генам VARV.

Данная проблема обсуждалась рядом авторов и прежде всего исследователями, работающими в области "синтетической биологии". В 2007 году были описаны многие из проблем, связанных с успехами в технологиях синтеза ДНК, и были изложены предложения по контролю биологической безопасности (Bügl et al., 2007). Насколько известно авторам настоящей главы, эти предложения не были приняты странами-членами в качестве официальной политики; однако они были приняты в качестве оперативных принципов некоторыми участвующими в этой деятельности коммерческими компаниями. Например, GENERAT, промышленный лидер в области крупномасштабного синтеза генов, использует поисковые системы BLAST для того,

чтобы отфильтровывать все запросы на свои услуги в соответствии со списками контролируемых патогенов – включая VARV и MPXV, – которые были идентифицированы Австралийской группой⁹. Заказчики, обращающиеся в службы синтеза с запросами, которые соответствуют этим спискам, обязаны представить данные о своей идентификации, а также необходимые документы по импорту и экспорту.

Авторы настоящей главы настоятельно рекомендуют компаниям и организациям, предлагающим такие услуги, следовать рекомендациям по осуществлению надзора в этой сфере деятельности. Однако подобный вид надзора не охватывает ученых, осуществляющих синтез генов на своем собственном оборудовании. Вероятно, целесообразно изучить возможность использования аппаратных средств в коммерческих устройствах для синтеза генов, чтобы воспрепятствовать такой деятельности; подобно тому, как во многих современных копировально-множительных устройствах установлены предохранительные чипы, которые не допускают репродуцирования банкнот.

Наконец, геномные технологии значительно изменили наши представления об эволюционных взаимосвязях среди OPV, возникло понимание необходимости сдерживания распространения вирусов, близкородственных с VARV. Большинство аспектов современных стратегий сдерживания распространения вирусов разрабатывалось в окружающей среде, в которой генетические взаимосвязи между VARV и другими зоонозными поксвирусами (подобными MPXV) все еще были неопределенными и представляли, главным образом, практический интерес для служб здравоохранения. MPXV долгое время считали зоонозным патогеном человека, заслуживающим особого внимания регулирующих органов; однако теперь известно, что GBLV и CMLV в действительности самые близкие из существующих родственники VARV, и геномика позволяет осуществить точное определение генных различий. Например, VARV (штамм Конго) кодирует примерно 8 генов, не обнаруживаемых в CMLV, а CMLV кодирует примерно 16 генов, не обнаруживаемых в VARV. Существует мало данных, по которым можно сделать вывод, что дикого типа (исходные) GBLV и CMLV представляют большую опасность для здоровья человека сами по себе (*per se*); однако поскольку продолжающиеся исследования позволяют все глубже понимать функции этих генов, в будущем было бы целесообразно представить обзор данных о биологическом сдерживании распространения вирусов и исследовательских стратегиях, касающихся OPV, близкородственных VARV.

⁹ <http://www.australiagroup.net>.

Таблица 3.1 Геномные последовательности штаммов вируса натуральной оспы в открытых базах данных

Вирус натуральной оспы	Описание репозитория	Год выделения штамма	Происхождение образца	Число определенных последовательностей	Последовательности в кодирующей области	Предполагаемые ORF	Номер доступа в GenBank
BEN68_59	V68-59, Дагомея	1968	Бенин	187 070	185 591	205	DQ441416
BOT72_143	V72-143	1972	Ботсвана	185 931	184 186	203	DQ441417
BOT73_225	V73-225	1973	Ботсвана	185 931	184 126	201	DQ441418
CNG70_46	V70-46 Киншаса	1970	Регион Конго	186 553	184 140	203	DQ437583
CNG70_227	V74-227 Gispem Конго 9	1970	Регион Конго	186 652	184 093	200	DQ441423
ETH72_16	Eth16 R14-1X-72 Addis	1972	Эфиопия	186 648	184 152	202	DQ441424
ETH72_17	Eth17 R14-1X-72 Addis	1972	Эфиопия	186 648	184 152	201	DQ441425
GUI69_005	V69-005 Гвинея	1969	Гвинея	186 883	185 579	204	DQ441426
NIG69_001	Импорт из Нигерии	1969	Нигер	186 942	185 707	205	DQ441434
SAF65_102	102 Natal, Ingwavuma	1965	Южная Африка	186 050	184 315	200	DQ441435
SAF65_103	103 T'vaal, Nelspruit	1965	Южная Африка	185 881	184 148	202	DQ441436
SLN68_258	V68-258	1969	Сьерра-Леоне	187 014	185 763	204	DQ441437
SOM77_ali	V77-2479 последний случай	1977	Сомали	186 231	184 155	202	DQ437590
SOM77_1252	V77-1252	1977	Сомали	184 191	—	—	DQ441438
SOM77_1605	V77-1605	1977	Сомали	184 170	—	—	DQ441439
SUD47_jub	Juba (фенотип alastrim)	1947	Судан	186 284	184 208	201	DQ441440
SUD47_rum	Rumbec	1947	Судан	186 415	—	—	DQ441441
TAN65_kem	Kembula	1965	Танзания ^a	185 826	184 085	198	DQ441443
AFG70_vlt4	Variolator-4	1970	Афганистан	185 855	184 062	203	DQ437580
BSH74_nur	Nur Islam	1974	Бангладеш	186 293	183 534	196	DQ441420
BSH74_shz	Shahzaman	1974	Бангладеш	186 293	183 534	197	DQ441421
BSH74_sol	Solaiman	1974	Бангладеш	186 293	183 534	197	DQ441422
BSH75_banu	V75-550 re-sequence	1975	Бангладеш	185 976	183 562	201	DQ437581
CHN48_horn	China Horn Sabin lab	1948	Китай	186 668	184 188	204	DQ437582
IND53_mad	Kali-Muthu-Madras	1953	Индия	186 108	184 173	201	DQ441427
IND53_ndel	New Delhi	1953	Индия	186 662	184 178	201	DQ441428
IND64_vel4	7124 Vellore	1964	Индия	186 677	184 051	205	DQ437585
IND64_vel5	7125 Vellore	1964	Индия	186 127	184 058	202	DQ437586
IND67_mah	Vector Maharastra E6	1967	Индия	185 578	184 151	198	NC_001611

Таблица 3.1 Геномные последовательности штаммов вируса натуральной оспы в открытых базах данных (продолжение)

Вирус натуральной оспы	Описание репозитория	Год выделения штамма	Происхождение образца	Число определенных последовательностей	Последовательности в кодирующей области	Предполагаемые ORF	Номер доступа в GenBank
JAP46_yam	Yamada MS-2A Токио	1946	Япония	186 662	184 178	203	DQ441429
JAP51_hrpr	Harper Исходный вакцинный вирус	1951	Япония	186 180	184 179	202	DQ441430
JAP51_stwl	Stillwell Исходный вакцинный вирус	1951	Япония	186 115	184 798	201	DQ441431
KOR47_lee	Lee Исходный вакцинный вирус	1947	Корея ^b	186 383	184 102	203	DQ441432
KUW67_1629	K1629	1967	Кувейт	185 853	184 060	199	DQ441433
NEP73_175	V73-175	1973	Непал	185 654	183 517	202	DQ437588
PAK69_lah	Rafiq Lahore	1969	Пакистан	185 865	184 072	203	DQ437589
SUM70_222	V70-222	1970	Суматра	185 449	184 197	202	DQ437591
SUM70_228	V70-228	1970	Суматра	185 405	184 564	199	DQ441442
SYR72_119	V72-119	1972	Сирия ^c	185 853	184 060	203	DQ437592
GER58_hdlg	Heidelberg, из Индии	1958	Германия	184 900	184 168	201	DQ437584
UNK44_harv	Harvey Middlesex	1944	Соединенное Королевство	185 771	184 184	203	DQ441444
UNK46_hind	Hinden	1946	Соединенное Королевство	186 096	184 093	198	DQ441445
UNK47_hig	Higgins Staffordshire	1947	Соединенное Королевство	185 026	184 225	200	DQ441446
UNK52_but	Butler alastrim	1952	Соединенное Королевство	188 251	185 845	207	DQ441447
YUG72_164	Yugoslavia from Iraq	1972	Югославия ^a	185 851	184 058	201	DQ441448
BRZ66_39	V66-39 alastrim	1966	Бразилия	188 062	185 725	207	DQ441419
BRZ66_gar	Garcia alastrim	1966	Бразилия	186 986	185 846	207	Y16780

ORF – открытая рамка считывания.

^a Теперь Объединенная Республика Танзания.

^b Современное название страны неизвестно.

^c Теперь Сирийская Арабская Республика.

Сокращения

CMLV	вирус оспы верблюдов
CPXV	вирус коровьей оспы
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
GBLV	вирус оспы африканских гололапых песчанок (вирус оспы татар)
indels	инсерции/делеции
MPXV	вирус оспы обезьян
OPV	ортопоксвирус
ORF	открытая рамка считывания
РНК	рибонуклеиновая кислота
SNP	однонуклеотидный полиморфизм
TIR	терминальная последовательность обращенных повторов
VACV	вирус осповакцины (vaccinia вирус)
VARV	вирус натуральной оспы
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения

Справочные материалы

- Alejo A et al. (2006). A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:5995–6000.
- Babkin IV, Shchelkunov SN (2006). [The time scale in poxvirus evolution]. *Molekuliarnaia biologiya*, 40:20–24.
- Babkin IV, Shchelkunov SN (2008). [Molecular evolution of poxviruses]. *Genetika*, 44:1029–1044.
- Bedson HS, Dumbell KR (1964a). Hybrids derived from the viruses of alastrim and rabbit pox. *The Journal of Hygiene*, 62:141–146.
- Bedson HS, Dumbell KR (1964b). Hybrids derived from the viruses of variola major and cowpox. *The Journal of Hygiene*, 62:147–158.
- Bügl H et al. (2007). DNA synthesis and biological security. *Nature Biotechnology*, 25:627–629.
- Cello J, Paul AV, Wimmer E (2002). Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 297:1016–1018.
- Czar MJ et al. (2009). Gene synthesis demystified. *Trends in Biotechnology*, 27:63–72.
- Domi A, Moss B (2002). Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:12415–12420.
- Dunlop LR et al. (2003). Variola virus immune evasion proteins. *Microbes and Infection*, 5:1049–1056.
- Esposito JJ et al. (2006). Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science*, 313:807–812.
- Esteban DJ, Nuara AA, Buller RM (2004). Interleukin-18 and glycosaminoglycan binding by a protein encoded by variola virus. *The Journal of General Virology*, 85:1291–1299.
- Gileva IP et al. (2006). Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764:1710–1718.
- Gubser C et al. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *The Journal of General Virology*, 85:105–117.
- Kim M et al. (2004). Biochemical and functional analysis of smallpox growth factor (SPGF) and anti-SPGF monoclonal antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:25838–25848.
- Li Y et al. (2007a). On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:15787–15792.
- Li Y et al. (2007b). Orthopoxvirus pan-genomic DNA assay. *Journal of Virological Methods*, 141:154–165.
- Liszewski MK et al. (2008). Smallpox inhibitor of complement enzymes (SPICE): regulation of complement activation on cells and mechanism of its cellular attachment. *Journal of Immunology*, 181:4199–4207.

- Massung RF et al. (1993). Potential virulence determinants in terminal regions of variola smallpox virus genome. *Nature*, 236:748–751.
- Massung RF et al. (1994). Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. *Virology*, 201:215–240.
- Massung RF et al. (1996). Terminal region sequence variations in variola virus DNA. *Virology*, 221:291–300.
- McLysaght A, Baldi PF, Gaut BS (2003). Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:15655–15660.
- Meyer H et al. (2005). Variola and camelpox virus-specific sequences are part of a single large open reading frame identified in two German cowpox virus strains. *Virus Research*, 108:39–43.
- Mohamed MR et al. (2009). Proteomic screening of variola virus reveals a unique NF-kappaB inhibitor that is highly conserved among pathogenic orthopoxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:9045–9050.
- Opgenorth A et al. (1992). Deletion of the growth factor gene related to EGF and TGF alpha reduces virulence of malignant rabbit fibroma virus. *Virology*, 186:175–191.
- Rosengard AM et al. (2002). Variola virus immune evasion design: expression of a highly efficient inhibitor of human complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:8808–8813.
- Seregin SV et al. (1996). Comparative studies of gamma-interferon receptor-like proteins of variola major and variola minor viruses. *FEBS Letters*, 382:79–83.
- Shchelkunov SN (2009). How long ago did smallpox virus emerge? *Archives of Virology*, 154:1865–1871.
- Shchelkunov SN, Blinov VM, Sandakhchiev LS (1993a). Genes of variola and vaccinia viruses necessary to overcome the host protective mechanisms. *FEBS Letters*, 319:80–83.
- Shchelkunov SN, Blinov VM, Sandakhchiev LS (1993b). Ankyrin-like proteins of variola and vaccinia viruses. *FEBS Letters*, 319:163–165.
- Shchelkunov SN, Marennikova SS, Moyer RW (2005). *Orthopoxviruses pathogenic for humans*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Shchelkunov SN, Massung RF, Esposito JJ (1995). Comparison of the genome DNA sequences of Bangladesh-1975 and India-1967 variola viruses. *Virus Research*, 36:107–118.
- Shchelkunov SN, Totmenin AV (1995). Two types of deletions in orthopoxvirus genomes. *Virus Genes*, 9:231–245.
- Shchelkunov SN et al. (1993). Comparison of the genetic maps of variola and vaccinia viruses. *FEBS Letters*, 327:321–324.
- Shchelkunov SN et al. (1998). The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology*, 243:432–460.
- Shchelkunov SN et al. (2000). Alastrim smallpox variola minor virus genome DNA sequences. *Virology*, 266:361–386.
- Shchelkunov SN et al. (2001). Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison. *FEBS Letters*, 509:66–70.

- Smith GL, Chan YS, Howard ST (1991). Nucleotide sequence of 42 kbp of vaccinia virus strain WR from near the right inverted terminal repeat. *The Journal of General Virology*, 72:1349–1376.
- Sulaiman IM, Sammons SA, Wohlhueter RM (2008). Smallpox virus resequencing GeneChips can also rapidly ascertain species status for some zoonotic non-variola orthopoxviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:1507–1509.
- Sulaiman IM et al. (2007). GeneChip resequencing of the smallpox virus genome can identify novel strains: a biodefense application. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:358–363.
- Tumpey TM et al. (2005). Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 310:77–80.
- Yadav VN et al. (2008). Identification of hot spots in the variola virus complement inhibitor (SPICE) for human complement regulation. *Journal of Virology*, 82:3283–3294.
- Yao XD, Evans DH (2003). High-frequency genetic recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected cells. *Journal of Virology*, 77:7281–7290.

4 Статус репозиторий в вируса натуральной оспы и нуклеиновых кислот в Сотрудничающих центрах ВОЗ

Evgeny Stavskiy¹, Christine Hughes² и Inger Damon²

¹ Отдел геномных исследований, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

² Отдел исследований вирусов оспы и бешенства, Центры контроля заболеваний и профилактики, Атланта, Джорджия, Соединенные Штаты Америки

Представленные в этом докладе данные и заключения принадлежат авторам и не обязательно отражают официальную точку зрения Центров контроля заболеваний и профилактики.

Резюме

В данной главе обобщены данные о статусе (по состоянию на январь 2010 года) запасов живого вируса натуральной оспы (VARV) и запасов VARV-ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты), а также – там, где это уместно – данные об использовании и распределении фрагментов генов VARV, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

Поскольку кампания по ликвидации натуральной оспы проходила с нарастающим успехом, в 1976 году Отдел ВОЗ по ликвидации натуральной оспы инициировал попытки уменьшить запасы VARV, хранящиеся в лабораториях. В результате число лабораторий, докладывавших о запасах VARV в Комиссию по глобальной ликвидации натуральной оспы, снизилось с 75 до 7 к декабрю 1979 года и впоследствии до 4 к 1981 году. Оставшиеся запасы были локализованы в Российской Федерации, Южной Африке, Соединенном Королевстве и Соединенных Штатах.

В 1982 году запасы VARV из Портон-Дауна в Соединенном Королевстве были переправлены в Соединенные Штаты, в Центры контроля заболеваний и профилактики (ЦКЗП) в Атланте, штат Джорджия. Запасы вируса в Южной Африке, хранившиеся в Национальном институте вирусологии в Сандригеме, были уничтожены в 1983 году (хотя Южная Африка все еще сохраняет клонированные, неинфекционные фрагменты VARV).

В мае 1996 года своей резолюцией WHA 33.4 Всемирная Ассамблея здравоохранения одобрила рекомендации, предложенные в связи с завершением ликвидации натуральной оспы. В резолюции четко указано, что оставшиеся репозитории VARV должны находиться в ограниченном количестве мест. Коллекция с тех пор уменьшилась, и в настоящее время ограничена двумя лабораториями: Сотрудничающий центр ВОЗ по изучению натуральной оспы и других поксвирусных инфекций в ЦКЗП и Сотрудничающий центр ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных заболеваний и репозиторий штаммов вируса натуральной оспы и ДНК в Российском государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор" в Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация.

Ежегодные отчеты из этих двух лабораторий представляются в Секретариат ВОЗ. Отчеты содержат данные об использовании живых VARV и статусе репозитория. С 2000 года эти отчеты также представляются лично на ежегодных заседаниях Консультативного комитета ВОЗ по исследованию вируса натуральной оспы, которые созываются с целью проверки работы, которая проводится с живыми VARV. Резюме этих выступлений доступны в режиме онлайн, на веб-сайте ВОЗ¹⁰.

¹⁰ <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/research/en/index.html>.

4.1 Введение

В 1976 году, когда становилась все более очевидной успешность мер по ликвидации натуральной оспы, Группа по ликвидации натуральной оспы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) инициировала попытки уменьшить количество запасов вируса натуральной оспы (VARV), хранившихся в разных лабораториях. Число лабораторий, представляющих отчеты о запасах VARV в Глобальную комиссию, уменьшилось с 75 в 1976 году до 7 в декабре 1979 года. Эти оставшиеся запасы хранились в Российской Федерации, Южной Африке, Соединенном Королевстве и Соединенных Штатах.

В 1982 году запасы VARV из Портон-Дауна в Соединенном Королевстве были переправлены в Сотрудничающий центр ВОЗ по изучению натуральной оспы и других поксвирусных инфекций в США, в Центры контроля заболеваний и профилактики (ЦКЗП) в Атланте, Джорджия.

В 1983 году запасы VARV, хранившиеся в Национальном институте вирусологии в Сандригеме, Южная Африка, были уничтожены (хотя Южная Африка все еще сохраняет клонированные, неинфекционные фрагменты VARV).

В мае 1996 года своей резолюцией WHA 33.4 Всемирная ассамблея здравоохранения одобрила рекомендации, предложенные по окончании кампании ликвидации натуральной оспы. В рекомендациях указано, что оставшиеся репозитории VARV должны находиться в ограниченном количестве мест. Коллекция VARV с тех пор уменьшилась, и в настоящее время ограничена двумя репозиториями:

- Сотрудничающий центр ВОЗ по изучению натуральной оспы и других поксвирусных инфекций в ЦКЗП в Атланте, Джорджия, Соединенные Штаты;
- Сотрудничающий центр ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных заболеваний и репозиторий штаммов вируса натуральной оспы и ДНК в Российском государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор" (ГНЦ ВБ "Вектор"; обозначаемый здесь как "Вектор") в Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация.

4.2 Статус репозитория штаммов вируса натуральной оспы и нуклеиновых кислот в Сотрудничающем центре ВОЗ в Российской Федерации

4.2.1 Состояние коллекции штаммов вируса натуральной оспы и ее репозитория

Коллекция VARV в Российской Федерации начала создаваться в середине 1950-х годов в Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток имени Мечникова в Москве. Создание коллекции продолжилось в Научно-исследовательском институте вирусных препаратов (НИИВП), где в 1967 году начал работать Сотрудничающий центр ВОЗ по изучению натуральной оспы и близких к ней инфекций. Коллекция использовалась для диагностических исследований в рамках Программы глобальной ликвидации натуральной оспы все время ее существования. С 1960 по 1975 год более половины из имеющихся в коллекции 120 штаммов и изолятов VARV были исследованы с применением классических биологических маркеров; остальные штаммы и изоляты были идентифицированы как VARV при выделении, но не были исследованы детально.

Перемещение коллекции штаммов VARV из НИИВП в "Вектор" было организовано и осуществлено в соответствии с совместным приказом Министерства здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации, Министерства образования и науки Российской Федерации, Государственного комитета по санитарному и эпидемиологическому надзору (Госкомсанэпиднадзор) Российской Федерации и РАМН № 187/123/105/71 от 8 сентября 1994 года. Это решение было подтверждено Совместным заявлением о перемещении коллекции вирусов натуральной оспы из Научно-исследовательского института вирусных препаратов РАМН в ГНЦ НПО "Вектор" в Российской Федерации от 27 сентября 1994 года. В соответствии с Указом правительства Российской Федерации № 725-47 от 24 июня 1996 года хранящаяся в "Векторе" коллекция микроорганизмов, включающая коллекцию штаммов VARV, была внесена в список официальных коллекций Российской Федерации. Эти решения были подтверждены приказом Управления Министерства здравоохранения и медицинской промышленности № 33 от 21 августа 1996 года.

19 июня 1997 года ВОЗ официально зарегистрировала учреждение Сотрудничающего центра ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных заболеваний и репозитория штаммов вируса натуральной оспы и ДНК в центре "Вектор" (письмо ВОЗ от 19 июня 1997 года, исходящий № LTS 52/180/4, LTS 52/286/3). В Российской Федерации эта акция была осуществлена на национальном уровне приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 300 от 9 октября 1997 года. Впоследствии это было подтверждено решением российской Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) № 772 от 16 ноября 2005 года. На международном уровне право хранить коллекцию штаммов VARV в "Векторе" было признано решением WHA 49.10 и подтверждено последующими решениями WHA 52.10, 55.15 и 60.1.

Организация и экспериментирование с коллекцией VARV в Сотрудничающем центре ВОЗ согласуются с национальными и международными требованиями и с рекомендациями Глобальной комиссии ВОЗ. Инструкции, регламентирующие научные исследования, а также все процедуры хранения и контроля разработаны на основе документов, перечисленных выше. Были разработаны планы антиэпидемических мероприятий и планы реагирования при несчастных случаях, также были созданы группы экстренного реагирования, задача которых – активно действовать при несчастных случаях и возникновении экстренных ситуаций.

В период между 1995 и 2009 годами эксперты ВОЗ совершили шесть инспекционных поездок в "Вектор" в целях оценки условий, обеспечивающих биологическую и физическую безопасность работы с VARV. Эксперты подтвердили, что условия соответствуют международным требованиям.

Должностные лица, ответственные за коллекцию VARV в "Векторе", были назначены генеральным директором "Вектора". Передача ответственности за коллекцию при замене одного должностного лица "Вектора" другим (вследствие каких-либо изменений в руководстве) производится с участием комиссии по инвентаризации в соответствии с Положениями о передаче полномочий, утвержденными генеральным директором. Во время подготовки обзора в 2010 году коллекция VARV включала 120 штаммов (таблица 4.1), местами их происхождения являются Азия, Африка, Американский континент, страны Восточного Средиземноморья и Европа.

Таблица 4.1 Географическое распределение происхождения штаммов вируса натуральной оспы, хранящихся в центре "Вектор"

Географическое распределение мест выделения штаммов в соответствии с регионами ВОЗ	Страна, в которой был выделен штамм ^а	Число штаммов
Юго-Восточная Азия	Бангладеш	3
	Индия	13
	Индонезия	10
	Непал	8
	Пакистан	14
Африка	Ботсвана	7
	Бурунди	1
	Конго	6
	Эфиопия	12
	Кения	4
	Руанда	6
	Сомали	3
	Судан	1
	Танзания ^б	8
Заир ^с	1	
Американский континент	Бразилия	8
Восточное Средиземноморье	Кувейт	3
	Оман	4
Европа	СССР ^д	7
	Великобритания	1
Итого		120

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения.

^а Указаны названия стран, которые использовались во время выделения штамма.

^б Теперь Объединенная Республика Танзания.

^с Теперь Демократическая Республика Конго.

^д Теперь Российская Федерация.

"Вектор" проводит исследования с живыми вирусами VARV в специализированном лабораторном помещении – обособленном четырехэтажном здании с общей площадью 6330 кв. м. Здание располагается на охраняемой территории, доступ к которой круглосуточно контролируется вооруженной охраной, дежурным персоналом и техническими системами безопасности. Коллекция VARV постоянно находится в охраняемом репозитории здания, предназначенном специально для работы с VARV. Доступ в репозиторий ограничен специальными инструкциями и правилами, которые предписывают обязательное постоянное присутствие двух сотрудников из числа персонала. Репозиторий и морозильные камеры (–70°C), в которых хранится коллекция, находятся под постоянным контролем и оборудованы соответствующими аварийными сигнальными системами; уровни резервирования встроены в системы и оборудование.

Культуры штаммов VARV хранятся в различных формах:

- замороженные
 - куриные яйца с развивающимся эмбрионом (ECE) на хориоаллантаоидной мембране (CAM)

- ECE CAM гомогенаты
- клеточные лизаты, инфицированные вирусом VARV
- лиофилизированные
- стружья (корки) больных оспой

Герметичные пробирки с замороженными штаммами, герметичные ампулы с лиофилизированными культурами и герметичные пробирки с корками кожных поражений, взятыми у больных оспой – все они хранятся в герметичных металлических контейнерах, которые находятся в морозильных камерах при температуре -70°C . Вся работа с VARV проводится в здании, предназначенном для этой цели, в помещениях с четвертым уровнем биологической безопасности. В 2009 году в целях повышения степени безопасности условий работы количество содержащих VARV стеклянных сосудов было сведено к минимуму, а содержимое этих сосудов было перенесено в полипропиленовые криофлаконы.

Коллекция Российской Федерации включает 120 штаммов. Был проведен анализ жизнеспособности 59 штаммов VARV из этой коллекции, из них 32 оказались жизнеспособными (см. таблицу 4.2). Предложено провести анализ остального 61 изолята VARV. Кроме того, здесь хранятся полноразмерные ДНК (дезоксирибонуклеиновые кислоты) из 39 штаммов – из 32 жизнеспособных штаммов и из 6 нежизнеспособных (см. таблицу 4.2), а также из дополнительного штамма (Ind-70). ДНК из штамма Ind-70 экстрагировали из материала, хранившегося в замороженном состоянии, без предварительной регенерации вируса на ECE CAM (см. таблицу 4.3).

VARV выделяли из хранившихся культур разбавлением материала в питательной среде, готовилась серия 10-кратных разведений, которыми инокулировали CAM 12-дневных ECE. После трех дней инкубации при $34,5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) ECE открывали и подсчитывали число специфических поражений (оспепных пустул) на ECE CAM, для того чтобы определить биологическую активность (титр) культуры.

Ни одного жизнеспособного VARV не было обнаружено после инфицирования ECE материалом, приготовленным из гомогенизированных CAM, хранившихся в Российской коллекции VARV в замороженном состоянии. Была сделана попытка выполнить кумулятивные пассажи на монослой клеточной культуры Vero. Однако не было обнаружено никаких жизнеспособных VARV даже после трех последовательных "слепых" пассажей с последующим посевом гомогенатов этих клеточных культур на ECE CAM. Тем не менее исходные и рабочие материалы коллекции хранили для использования в дальнейших исследованиях (например, с применением методов молекулярной генетики). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что некоторые хранившиеся в замороженном состоянии культуры могли потерять свою биологическую активность (то есть инфекционность).

Жизнеспособные VARV были обнаружены во всех лиофилизированных материалах (см. таблицу 4.2). Эти культуры штаммов получали в монослое клеточной культуры Vero, с тем чтобы получить материал VARV, необходимый для последующей работы по выделению ДНК. В этой процедуре использовались материалы из предшествующих пассажей, хранившихся в коллекции, чтобы избежать дополнительных пассажей VARV.

Таблица 4.2 Жизнеспособность штаммов вируса натуральной оспы, хранящихся в центре "Вектор"

№	Штамм вируса натуральной оспы	Форма хранения материала ^a	Титр (пустулообразующие единицы/мл)
1	M-Abr-60	Лиофилизированные	$1,5 \times 10^6$
2	Aziz	Лиофилизированные	$0,9 \times 10^6$
3	M-Sok-60	Лиофилизированные	$1,2 \times 10^6$
4	M-Sur-60	Лиофилизированные	$2,5 \times 10^6$
5	Semat	Лиофилизированные	$1,0 \times 10^6$
6	12/62	Лиофилизированные	$9,6 \times 10^5$
7	Ind-4a	Лиофилизированные	$1,5 \times 10^7$
8	Helder	Лиофилизированные	$1,8 \times 10^6$
9	Rw-18	Лиофилизированные	$1,3 \times 10^5$
10	M-N-60	Лиофилизированные	$8,1 \times 10^4$
11	22/62	Лиофилизированные	$3,0 \times 10^6$
12	Mary	Лиофилизированные	$2,0 \times 10^6$
13	M-A-60	Лиофилизированные	$1,0 \times 10^3$
14	M-BI-60	Лиофилизированные	$3,0 \times 10^6$
15	Butler	Лиофилизированные	$8,0 \times 10^5$
16	6-58	Лиофилизированные	$7,0 \times 10^5$
17	Ngami	Лиофилизированные	$6,1 \times 10^7$
18	Kuw-5	Лиофилизированные	$2,9 \times 10^6$
19	Ind-3a	Лиофилизированные	$7,2 \times 10^7$
20	Congo-2 ^b	Лиофилизированные	$8,8 \times 10^7$
21	Congo-9 ^b	Лиофилизированные	$8,7 \times 10^7$
22	Taj Barin	Лиофилизированные	$5,5 \times 10^5$
23	Wsim Ahmed	Лиофилизированные	$4,4 \times 10^5$
24	13/62	Лиофилизированные	$1,3 \times 10^6$
25	M-Gavr-60	Лиофилизированные	$9,6 \times 10^5$
26	India 378	Стружья	$0,8 \times 10^{3c}$
27	Khateen	Стружья	$5-10^c$
28	India 71	Стружья	$5-10^c$
29	Brazil 128	Стружья	$5-10^c$
30	Brazil 131	Стружья	$5-10^c$
31	Aslam	Стружья	$1,5 \times 10^{3c}$
32	Zaire 1028	Стружья	Материал, выделенный во втором пассаже в клеточной культуре Vero
33	Dub-1	Замороженная САМ	Материал не выделен
34	Dub-3	Замороженная САМ	Материал не выделен
35	Dub-4	Замороженная САМ	Материал не выделен
36	Dub-5	Замороженная САМ	Материал не выделен
37	Kuw-28	Замороженная САМ	Материал не выделен
38	Kuw-29	Замороженная САМ	Материал не выделен
39	Indon-1	Замороженная САМ	Материал не выделен
40	Indon-2	Замороженная САМ	Материал не выделен
41	Indon-3	Замороженная САМ	Материал не выделен
42	Indon-4	Замороженная САМ	Материал не выделен
43	Indon-5	Замороженная САМ	Материал не выделен
44	Indon-6	Замороженная САМ	Материал не выделен
45	Indon-7	Замороженная САМ	Материал не выделен
46	Indon-8	Замороженная САМ	Материал не выделен
47	Indon-9	Замороженная САМ	Материал не выделен
48	Indon-10	Замороженная САМ	Материал не выделен

Таблица 4.2 Жизнеспособность штаммов вируса натуральной оспы, хранящихся в центре "Вектор" (продолжение)

№	Штамм вируса натуральной оспы	Форма хранения материала ^а	Титр (пустулообразующие единицы / мл)
49	Nepal 21	Струпья	Материал не выделен
50	India 164	Струпья	Материал не выделен
51	India 294	Струпья	Материал не выделен
52	Nepal 89	Струпья	Материал не выделен
53	Rais	Струпья	Материал не выделен
54	Ethiopia 142	Струпья	Материал не выделен
55	Ethiopia 182	Струпья	Материал не выделен
56	Abd. Jalil	Замороженная САМ	Материал не выделен
57	Abid	Гомогенат САМ	Материал не выделен
58	Nep-67	Замороженная САМ	Материал не выделен
59	Nepal-53	Замороженная САМ	Материал не выделен

САМ – хориоаллантаическая мембрана.

^а Все материалы, независимо от формы их хранения, содержатся в герметичных контейнерах при -70°C .

^б Культура была приготовлена в 1996 году после первого пассажа вируса, выделенного из струпьев больных на ЕСЕ САМ.

^с Биологическая концентрация дана в пустулообразующих единицах/мг.

Несмотря на то что все первичные изоляты, выделенные у больных (струпья), хранились в эквивалентных условиях при -70°C , жизнеспособный вирус был выделен только из 7 из 14 исследованных изолятов. В отличие от лиофилизированных материалов кумулятивные пассажи нескольких штаммов были выполнены в монослое клеточной культуры Vero с целью выделения материала из струпьев. Струпья мацерировали в течение 12 часов в 0,5 мл среды RPMI-1640 при температуре 4°C и измельчали. Полученный таким образом гомогенат использовали для инфицирования клеточного монослоя. Инфицированные монослои инкубировали при $34,5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) до тех пор, пока не появлялись признаки цитопатического эффекта (CPE), характерного для VARV. CPE обычно развивается на второй день после инфицирования. На третий день клетки соскабливали, ресуспендировали в небольшом количестве среды, разрушали методом замораживания-оттаивания, затем добавляли 10-процентный раствор глицерина и замораживали. В результате этой процедуры получали необходимое количество материала VARV, и из 27 штаммов VARV были выделены препараты ДНК в количествах, достаточных для проведения протяженной полимеразной цепной реакции, или PCR длинных фрагментов (LPCR).

Таким образом, хранение коллекции VARV и работа со штаммами VARV в центре "Вектор" соответствовали национальным и международным требованиям и рекомендациям ВОЗ. Итак, в Сотрудничающем центре ВОЗ проводилось исследование жизнеспособности 59 из 120 штаммов VARV, и 32 штамма оказались жизнеспособными. Оценка жизнеспособности остального 61 штамма VARV еще не проводилась. Контролируемое хранение и работа с коллекцией VARV, одобренные ВОЗ, осуществляются в здании, специально предназначенном для работы с VARV.

4.2.2 Состояние коллекции ДНК вируса натуральной оспы в центре "Вектор" и ее репозиторий

Работа по изучению структурной и функциональной организации геномов ортопоксвируса проводилась в центре "Вектор" с 1991 года. Секвенирование полного генома (за исключением терминальных петель) India-1967, высоковирулентного штамма VARV, было завершено в 1992 году. Впервые было закончено составление генетической карты VARV и проведен тщательный анализ структуры генома. Между

1993 и 1995 годами в центре "Вектор" в сотрудничестве с ЦКЗП секвенировали геном Garcia-1966 низковирулентного штамма VARV. Работа по выделению геномной ДНК VARV, основанная на использовании коллекции штаммов VARV, предпринималась с 2001 года. В последние годы в центре "Вектор" была создана коллекция из 39 препаратов ДНК различных штаммов VARV.

В 1986 году на четвертом заседании Комитета ВОЗ по ортопоксвирусным инфекциям было принято решение об уничтожении всех коллекций штаммов VARV и их геномных ДНК. Однако затем было необходимо законсервировать генетический материал различных изолятов VARV в надежной и биологически безопасной форме, поскольку они чрезвычайно важны для будущих исследований. В настоящее время репозиторий ДНК VARV состоит из трех репозиториях:

- геномная ДНК VARV;
- коллекция ампликонов (каждый из которых соответствует индивидуальному штамму VARV, каждому ампликону присвоено короткое кодовое название с серийным номером);
- коллекция рекомбинантных плазмид (каждой из которых присвоено кодовое название с серийным номером).

Учетной единицей ДНК VARV в международном репозитории "Вектор" является снабженный этикеткой пластиковый микрофлакон.

Репозиторий располагается в охраняемом здании, предназначенном для работы с VARV, в здании имеются защитные устройства, система автоматического регулирования температуры и система аварийной сигнализации. В этом репозитории хранятся 5438 флаконов, включая:

- 197 флаконов с полноразмерной геномной ДНК VARV (39 разных штаммов VARV) в виде раствора, хранящегося при +4 °C;
- 1446 флаконов, составляющих 17 индивидуальных коллекций ампликонов с фрагментами ДНК VARV, хранящихся при –70 °C; каждая коллекция содержит ампликоны с геномными фрагментами одного штамма VARV в виде трех повторяющихся серий:
 - первая серия в виде спиртового преципитата,
 - вторая серия в виде спиртового преципитата,
 - третья серия в виде раствора в смеси LPCR;
- 3795 флаконов, составляющих 16 индивидуальных коллекций рекомбинантных плазмид с фрагментами ДНК VARV, хранящихся при –70 °C; каждая коллекция содержит рекомбинантные плазмиды с геномными фрагментами одного штамма VARV в виде трех повторяющихся серий:
 - первая серия в виде раствора в буфере Трис-ЭДТА (ТЭ),
 - вторая серия в виде спиртового преципитата,
 - третья серия в виде спиртового преципитата.

Фрагменты ДНК VARV не передавались никаким посторонним организациям.

Выделение ДНК вируса натуральной оспы, выращенного в клеточной культуре

Препараты полноразмерной ДНК VARV хранятся при +4 °C в репозитории центра "Вектор" в снабженных этикетками микрофлаконах. В настоящее время препараты ДНК

39 штаммов VARV из разных географических регионов хранятся в 197 флаконах, как можно видеть по данным, представленным в таблице 4.3.

Таблица 4.3 Инвентарная опись полноразмерных ДНК вируса натуральной оспы

№	Штамм	Распределение в соответствии с регионами ВОЗ	Страна происхождения штамма ^а	Год выделения
1	Brazil 128	AMP	Бразилия	Неизвестно
2	Brazil 131	AMP	Бразилия	Неизвестно
3	Congo-2	АФР	Конго	1970
4	Congo-9	АФР	Конго	1970
5	Butler	ЕВР	Великобритания ^б	1952
6	Ind-4a	ЮВА	Индия	1967
7	Ind-3a	ЮВА	Индия	1967
8	Ind-70	ЮВА	Индия	1975
9	India 164	ЮВА	Индия	1975
10	India 71	ЮВА	Индия	1975
11	India 378	ЮВА	Индия	1975
12	Indon-3	ЮВА	Индонезия	1971
13	Indon-9	ЮВА	Индонезия	1971
14	Kuw-29	ВСР	Кувейт	1967
15	Kuw-5	ВСР	Кувейт	1967
16	Nepal 89	ЮВА	Непал	Неизвестно
17	6-58	ВСР	Пакистан	1958
18	Wsim Ahmed	ВСР	Пакистан	1970
19	Rais	ВСР	Пакистан	1970
20	Khateen	ВСР	Пакистан	1970
21	Taj Barin	ВСР	Пакистан	1970
22	Aslam	ВСР	Пакистан	1970
23	Aziz	ВСР	Пакистан	1970
24	Rw-18	АФР	Руанда	1970
25	Mary	АФР	Танзания ^с	1962
26	13/62	АФР	Танзания ^с	1962
27	Helder	АФР	Танзания ^с	1962
28	22/62	АФР	Танзания ^с	1962
29	12/62	АФР	Танзания ^с	1962
30	Semat	АФР	Танзания ^с	1962
31	Ngami	АФР	Танзания ^с	1962
32	M-Gavr-60	ЕВР	СССР ^д	1960
33	M-BI-60	ЕВР	СССР ^д	1960
34	M-Sok-60	ЕВР	СССР ^д	1960
35	M-Abr-60	ЕВР	СССР ^д	1960
36	M-N-60	ЕВР	СССР ^д	1960
37	M-Sur-60	ЕВР	СССР ^д	1960
38	M-A-60	ЕВР	СССР ^д	1960
39	Zaire 1028	АФР	Заир ^е	Неизвестно

Регионы ВОЗ: АФР – Африка; AMP – Американский континент; ВСР – Восточное Средиземноморье; ЕВР – Европа; ЮВА – Юго-Восточная Азия.

^а Указаны названия стран, применявшиеся во время выделения штамма.

^б Теперь Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии.

^с Теперь Объединенная Республика Танзания.

^д Теперь Российская Федерация.

^е Теперь Демократическая Республика Конго.

Консервация генетического материала различных штаммов вируса натуральной оспы из коллекции Российской Федерации

Репозиторий коллекций ДНК ампликонов вируса натуральной оспы

Метод LPCR (PCR длинных фрагментов) позволил создать репозиторий ампликонов полных геномов VARV и коллекцию гибридных плазмид, несущих фрагменты ДНК VARV. Этот метод использовали для консервации генетического материала VARV.

Последовательности геномов VARV, перечисленные в таблице 4.3, могут в течение долгого времени храниться в биологически безопасной форме. Это дает возможность изучать генетическую организацию штаммов VARV и разрабатывать современные методы быстрой диагностики VARV и других OPV.

Сертифицированные коллекции ДНК ампликонов VARV в настоящее время включают препараты 17 штаммов VARV (см. таблицу 4.4). Данные о количестве флаконов (контейнеров) в коллекциях ДНК ампликонов VARV обобщены в таблице 4.5. Разложение ДНК в коллекциях ампликонов не изучалось.

Таблица 4.4 ДНК вируса натуральной оспы, которые использовали для создания коллекций ампликонов

Географический регион, в котором был выделен штамм	Страна, в которой был выделен штамм ^а	Штамм	Год выделения	№ в коллекции репозитория	Эпидемиологический тип вируса
АФР	Руанда	Rw-18	1970	МА 13	Variola major
АФР	Танзания ^б	13/62	1962	МА 9	Variola major
АФР	Танзания ^б	12/62	1962	МА 10	Variola major
АФР	Танзания ^б	Helder	1962	МА 12	Variola major
АФР	Танзания ^б	Mary	1962	МА 15	Variola major
АФР	Танзания ^б	Ngami	1962	МА 16	Variola major
АМР	Бразилия	Brazil 131	Неизвестно	МА 6	Variola minor alastrim
ВСР	Пакистан	Aziz	1970	МА 8	Variola major
ВСР	Пакистан	6–58	1958	МА 11	Variola major
ВСР	Пакистан	Taj Barin	1970	МА 14	Variola major
ВСР	Пакистан	Wsim Ahmed	1970	МА 17	Variola major
ЕВР	СССР ^с	M-A-60	1960	МА 1	Variola major
ЕВР	СССР ^с	M-Abr-60	1960	МА 2	Variola major
ЕВР	СССР ^с	M-BI-60	1960	МА 3	Variola major
ЕВР	СССР ^с	M-Gavr-60	1960	МА 4	Variola major
ЕВР	СССР ^с	M-N-60	1960	МА 5	Variola major
ЮВА	Индия	India 71	1975	МА 7	Variola major

Регионы ВОЗ: АФР – Африка; АМР – Американский континент; ВСР – Восточное Средиземноморье; ЕВР – Европа; ЮВА – Юго-Восточная Азия.

^а Указаны названия стран, применявшиеся во время выделения штамма.

^б Теперь Объединенная Республика Танзания.

^с Теперь Российская Федерация.

Создание библиотек клонов фрагментов полной геномной ДНК штаммов вируса натуральной оспы

К числу недостатков хранения генетической информации в виде коллекции ампликонов следует отнести возможный риск разложения LCPR продуктов при продолжительном хранении и невозможность поддержания коллекции ампликонов в полном объеме в отсутствие геномной VARV-ДНК. Для решения этих проблем генетическую информацию можно хранить в форме коллекций рекомбинантных плазмид, содержащих фрагменты VARV-ДНК, которые в настоящем документе именуется "библиотеками клонов".

Была предложена схема, включающая расщепление LCPR-ампликонов определенными рестрикционными эндонуклеазами и последующее клонирование образовавшихся фрагментов ДНК в *Escherichia coli* внутри плазмидных векторов. Это даст возможность создать библиотеки клонов фрагментов VARV-ДНК, в которых любая плазмидная конструкция может легко и быстро продуцироваться в необходимых количествах. Использование штаммов *E. coli* с дефективной системой репарации сводит к минимуму накопление ошибок в процессе репликации ДНК. Хотя такой подход является более трудоемким, чем традиционные методы, он обеспечивает безопасное и надежное длительное хранение фрагментов VARV-ДНК. Геномные последовательности VARV могут затем храниться в виде рекомбинантных плазмид в биологически безопасной форме в течение неопределенного времени. Кроме того, как разъяснялось выше, это даст возможность исследовать генетическую организацию штаммов VARV и разрабатывать современные методы быстрой диагностики VARV. В настоящее время сертифицированные коллекции плазмид, содержащих фрагменты ДНК, включают ДНК 16 штаммов VARV (см. таблицу 4.6). Данные о количестве контейнеров (флаконов) в коллекциях представлены в таблице 4.5.

Таблица 4.5 Описание штаммов вируса натуральной оспы, ДНК которых были использованы для консервации генетического материала

Штамм	Географический регион, в котором был выделен штамм	Страна, в которой был выделен штамм ^а	Год выделения	Эпидемиологический тип вируса	Репозиторий ампликонов, количество флаконов	Репозиторий библиотек клонов фрагментов, количество флаконов
Congo-2	АФР	Конго	1970	Variola major		261
Rw-18	АФР	Руанда	1970	Variola major	84	288
12/62	АФР	Танзания ^б	1962	Variola major	84	
13/62	АФР	Танзания ^б	1962	Variola major	84	273
Helder	АФР	Танзания ^б	1962	Variola major	84	
Mary	АФР	Танзания ^б	1962	Variola major	99	
Ngami	АФР	Танзания ^б	1962	Variola major	87	231
Brazil 128	АМР	Бразилия	Неизвестно	Variola minor alastrim		285
Brazil 131	АМР	Бразилия	Неизвестно	Variola minor alastrim	84	
Garcia-1966	АМР	Бразилия	1966	Variola minor alastrim		45
6-58	ВСП	Пакистан	1958	Variola major	84	282
Aziz	ВСП	Пакистан	1970	Variola major	84	
Taj Barin	ВСП	Пакистан	1970	Variola major	84	288
Wsim Ahmed	ВСП	Пакистан	1970	Variola major	84	213
Butler	ЕВР	Великобритания ^с	1952	Variola minor alastrim		213
M-A-60	ЕВР	СССР ^д	1960	Variola major	84	246
M-Abr-60	ЕВР	СССР ^д	1960	Variola major	84	
M-BI-60	ЕВР	СССР ^д	1960	Variola major	84	288
M-Gavr-60	ЕВР	СССР ^д	1960	Variola major	84	276
M-Sur-60	ЕВР	СССР ^д	1960	Variola major		279
M-N-60	ЕВР	СССР ^д	1960	Variola major	84	
Ind-3a	ЮВА	Индия	1967	Variola major		222
India 71	ЮВА	Индия	1975	Variola major	84	
India-1967	ЮВА	Индия	1967	Variola major		105

Регионы ВОЗ: АФР – Африка; АМР – Американский континент; ВСП – Восточное Средиземноморье; ЕВР – Европа; ЮВА – Юго-Восточная Азия.

^а Указаны названия стран, применявшиеся во время выделения штамма.

^б Теперь Объединенная Республика Танзания.

^с Теперь Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии.

^д Теперь Российская Федерация.

Таблица 4.6 Описание ДНК вируса натуральной оспы, которые использовали для создания репозитория рекомбинантных плазмид

Географический регион, в котором был выделен вирус натуральной оспы	Страна, в которой был выделен вирус натуральной оспы	Штамм вируса натуральной оспы	Год выделения	№ в репозитории коллекции	Эпидемиологический тип вируса
АФР	Танзания ^б	Ngami	1962	P 1	Variola major
АФР	Конго	Congo-2	1970	P 7	Variola major
АФР	Руанда	Rw-18	1970	P 11	Variola major
АФР	Танзания ^б	13/62	1962	P 16	Variola major
АМР	Бразилия	Brazil 128	Не определен	P 4	Variola minor alastrim
АМР	Бразилия	Garsia - 1966	1966	P 10	Variola minor alastrim
ВСР	Пакистан	Taj Barin	1970	P 3	Variola major
ВСР	Пакистан	Wsim Ahmed	1970	P 6	Variola major
ВСР	Пакистан	6-58	1958	P 13	Variola major
ЕВР	Великобритания ^с	Butler	1952	P 8	Variola minor alastrim
ЕВР	СССР ^д	M-Sur-60	1960	P 2	Variola major
ЕВР	СССР ^д	M-BI-60	1960	P 12	Variola major
ЕВР	СССР ^д	M-A-60	1960	P 14	Variola major
ЕВР	СССР ^д	M-Gavr-60	1960	P 15	Variola major
ЮВА	Индия	Ind-3a	1967	P 5	Variola major
ЮВА	Индия	India - 1967	1967	P 9	Variola major

Регионы ВОЗ: АФР – Африка; АМР – Американский континент; ВСР – Восточное Средиземноморье; ЕВР – Европа; ЮВА – Юго-Восточная Азия.

^а Указаны названия стран, применявшиеся во время выделения штамма.

^б Теперь Объединенная Республика Танзания.

^с Теперь Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии.

^д Теперь Российская Федерация.

В результате этой работы был создан репозиторий, включающий репозитории:

- препаратов геномной ДНК из 39 штаммов VARV;
- коллекций ампликонов VARV-ДНК 17 штаммов;
- коллекций плазмид, содержащих полные геномные фрагменты ДНК 16 штаммов VARV из коллекции Российской Федерации, относящихся к двум эпидемиологическим типам и выделенных в разных географических регионах.

Авторы настоящей главы полагают, что каждая коллекция плазмид и ампликонов должна представлять по меньшей мере 6 штаммов VARV разных биологических подтипов (по 6 штаммов variola major, variola minor и variola minor alastrim, то есть всего 18 штаммов), чтобы обеспечить репрезентативность и охват биологического разнообразия VARV. Также было бы целесообразно иметь оригинальные полноразмерные или частичные образцы ДНК всех штаммов VARV из коллекции. Им можно было бы обеспечить надежное хранение в банке генетического материала VARV. Разумность такого подхода состоит в том, что репозитории и в Российской Федерации, и в Соединенных Штатах включают культуры VARV природного происхождения, и их синтетические аналоги, вероятно, не способны полностью воспроизвести весь спектр свойств исходных вирусов.

Сертифицированные коллекции были помещены в Международный репозиторий ДНК вируса натуральной оспы в центре "Вектор". "Вектор" проводит ежегодную инвентаризацию штаммов VARV и ДНК и представляет ежегодную опись штаммов VARV и ДНК в ВОЗ в согласованном с ВОЗ формате. "Вектор" также участвует в составлении ежегодных докладов Сотрудничающего центра ВОЗ, которые представляются в ВОЗ. Эти доклады включают разделы, касающиеся работы с коллекциями штаммов VARV и ДНК.

В рамках всей работы с коллекциями штаммов VARV и ДНК используются следующие методы:

- регулярное представление предложений в целях получения разрешения работать с коллекциями в научные подкомитеты Консультативного комитета ВОЗ по исследованию вируса натуральной оспы;
- выполнение предложенной работы, одобренной научными подкомитетами Консультативного комитета ВОЗ по исследованию вируса натуральной оспы;
- представление ежегодного доклада по выполненной работе в форме устного сообщения на ежегодных заседаниях Консультативного комитета ВОЗ по исследованию вируса натуральной оспы;
- представление в Секретариат ВОЗ ежегодного письменного доклада по выполненной работе.

4.3 Статус репозитория штаммов вируса натуральной оспы и нуклеиновых кислот в Сотрудничающем центре ВОЗ в Соединенных Штатах

Поддерживаемый Соединенным Штатам репозиторий Сотрудничающего центра ВОЗ в ЦКЗП содержит коллекции VARV из лабораторий Японии, Нидерландов, Соединенного Королевства и Института медицинских исследований и инфекционных заболеваний армии Соединенных Штатов. Он также включает коллекции, ранее хранившиеся в ЦКЗП и в Американской коллекции типовых культур вирусов. Имеющиеся в наличии 451 образец изолятов или препаратов поддерживаются в их первоначальной форме в безопасных и надежно защищенных местах. Предполагается, что все материалы были собраны в пределах 50-летнего периода перед ликвидацией натуральной оспы.

Охватываемый описью материал включает, главным образом, изоляты, выделенные у больных людей, и повторяющиеся образцы эталонных штаммов VARV. Однако репозиторий также содержит несколько экспериментально полученных "гибридных" вирусов, сконструированных с использованием вируса коровьей оспы, а также VARV или вируса оспы кроликов и VARV-рекомбинации, а также не-VARV материалы, переданные в дар посторонними лабораториями, в том числе образцы иммуноглобулина vaccinia.

В 2000 году была создана электронная база данных с целью связать воедино такую информацию, как год и географическая локализация открытия изолята VARV, клиническую и эпидемиологическую информацию о пациенте, а также информацию о вспышке болезни, в результате которой был выделен изолят. Кроме того, база данных включает информацию об истории пассирования образца, а также название образца на этикетке контейнера; это дает возможность производить отбор различных изолятов для дальнейших исследований. В целях сбора этой информации были использованы следующие источники:

- Обзор
 - письменной информации, предоставляемой с образцами;
 - предшествующих представленных в ВОЗ докладов о статусе этих материалов;
 - архивных документов ВОЗ в Женеве;
 - публикаций.
- Запросы на получение информации от страновой лаборатории, передающей материалы в дар.

В конечном счете стала доступной информация примерно о 360 неидентичных материалах VARV, полученных из различных оригинальных коллекций. Всего 142 образца можно было связать со страной выделения и годом выделения, информация также включала историю пассирования материалов; 8 образцов можно было связать со страной и годом выделения (но отсутствовала информация об истории пассирования предоставленного материала); и 163 не могли быть связаны ни со страной, ни с годом выделения. Этот последний материал включал 19 первичных оспенных кожных поражений (струпьев) от отдельных больных и 3 вариоляционные линии.

С 2000 года после одобрения, полученного от Научно-технического консультативного комитета ВОЗ по исследованию вируса натуральной оспы, проводился дальнейший анализ подгруппы материалов из репозитория ЦКЗП, а именно полный геномный анализ. 46 изолятов были выбраны для геномного секвенирования; они включали образцы из мест тех же или эпидемиологически связанных вспышек болезни, в дополнение к явно "несвязанным" вспышкам (Esposito et al., 2006; Li et al., 2007). Эти особые образцы были секвенированы, поскольку они, как полагают, представляют собой богатейший источник разнообразия вирусов (в отношении страны и года выделения и недостаточной истории пассирования) в пределах коллекции ЦКЗП. Секвенированный материал включал изоляты, выделенные у больных и клинически или эпидемиологически описываемые как "major" или "minor" и биологически или эпидемиологически описываемые как *alastrim*. Большая часть секвенированного материала была из изолятов, описываемых как VARV major. Генетическая вариабельность среди этих изолятов коррелировала с географической локализацией изолята, но не обнаруживала временной корреляции. Например, образцы, выделенные с 30-летним интервалом в Африканском Роге, группировались с изолятами незападноафриканского происхождения. Два гибридных вируса были секвенированы с целью оценки возможности идентификации рекомбинационных событий с помощью методов LPCR/полиморфизма длины рестриционных фрагментов (RFLP). Впоследствии было осуществлено дополнительное описание биологических свойств изолятов VARV (Olson et al., 2009), позволившее получить важную генетическую и биологическую информацию для проведения научного анализа и оценки потенциальных противовирусных терапевтических средств или профилактических мероприятий.

VARV-запасы ЦКЗП – не более одного пассажа из секвенированных исходных вакцинных вирусов – это запасы, которые использовались с 2000 года в соответствии с одобренными ВОЗ предложениями по проведению важных для общественного здравоохранения исследований с использованием живых VARV.

Таблица 4.7 Географическое распределение происхождения штаммов вируса натуральной оспы, хранящихся в ЦКЗП

Географический регион, в котором был выделен штамм	Страна, в которой был выделен штамм ^a	Число штаммов
Африка	Ботсвана	6
	Центральная Африка (без указания страны)	2
	Дагомея ^b	2
	Джибути	1
	Эфиопия	11
	Габон	1
	Гана	2
	Гвинея	1
	Кения	12
	Мали	3
	Нигер	2
	Нигерия	5
	Сьерра-Леоне	4
	Сомали	7
	Южная Африка	9
	Судан	2
	Танзания	10
	Того	2
	Уганда	2
	Верхняя Вольта ^c	1
Западная Африка (без указания страны)	1	
Заир ^d	9	
Азия	Бангладеш	20
	Китай	4
	Индия	25
	Индонезия	12
	Япония	3
	Корея ^e	3
	Непал	5
	Пакистан	12
Северная Америка	Соединенные Штаты	1
Южная Америка	Бразилия	15
Европа	Германия	1
	Нидерланды	2
	Италия	1
	Соединенное Королевство	30
	Югославия ^e	1
Ближний Восток	Иран	3
	Кувейт	3
	Сирия ^f	1
Неизвестен		214
Всего		451

^a Указаны названия стран, применявшиеся во время выделения штамма.

^b Теперь Бенин.

^c Теперь Буркина-Фасо.

^d Теперь Демократическая Республика Конго.

^e Современное название страны неизвестно.

^f Теперь Сирийская Арабская Республика.

Для экспериментальной работы использовалась незначительная часть материала, хранящегося в репозитории. В таблице 4.8 представлен перечень штаммов VARV, которые использовались в исследованиях и поэтому выращивались в тканевой культуре. Большая часть исследованного материала оказалась жизнеспособной, хотя для некоторых штаммов потребовалось "слепое" пассирование в целях спасения жизнеспособных VARV. До 2000 года большая часть экспериментальной работы проводилась с четырьмя штаммами, эти штаммы размножались с целью получения посевных материалов (линий), рабочих материалов и нуклеиновых кислот с целью скрининга противовирусных средств и проведения исследований по секвенированию. В 2010 году число хранящихся посевных материалов, рабочих материалов и частиц бляшек (измеряемое в количествах "пробирок") увеличилось в 22 раза по сравнению с 2000 годом. Эти материалы использовались или используются для *in vitro* скрининга противовирусных препаратов, исследований контрольного заражения животных, вспомогательных *in vitro* исследований эффективности вакцин и секвенирования. Кроме того, в ЦКЗП хранятся 4209 образцов, полученных в рамках шести исследований с применением контрольного заражения животных VARV, предназначенных для оценки противовирусной эффективности. Эти образцы будут сохраняться до тех пор, пока на все надлежащие вопросы и проявления обеспокоенности со стороны регулирующих ведомств (например, Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов Соединенных Штатов) не будут получены удовлетворительные ответы. 46% из 22-кратного увеличения количества сохраняемых посевных материалов, рабочих материалов и частиц бляшек приходится на получение однократно используемых аликвотов для скрининга противовирусных препаратов или проведения исследований по оценке эффективности вакцин. Эти одноразовые, с низким титром, аликвоты позволяют повысить однородность экспериментов и ограничить число повторяющихся циклов замораживания-оттаивания вирусов.

Доступ к этим материалам разрешен только ряду отобранных сотрудников, каждый из которых прошел специальную подготовку в области обеспечения биологической безопасности и биологической защиты. Доступ к репозиторию имеет дополнительные ограничения. Ежегодно проводится инвентаризация материалов, после которой, в соответствии с современной практикой, материалы хранятся в запечатанных боксах.

Таблица 4.8 Отбор рабочих материалов ЦКЗП: идентификация жизнеспособности штаммов вируса натуральной оспы

Изолят	Первоначальная лаборатория	Дата выделения штамма	Страна ^а	Регион	История исходного пассирования	Современный статус
Minnesota 124	USAMPIID	5 февраля 1939 года	Соединенные Штаты	Северная Америка	123 CAM (Nelson), Deterick 1 CAM = 124 CAM (26 марта 1958 года)	Посевной материал (E124; BSC40p2)
Yamada MS-2(A) Токуо штамм	USAMPIID	1946 год	Япония	Азия	2 CAM (Hahon), Detrick 2 CAM = 4 CAM (3 ноября 1958 года)	Посевной материал (E4; BSC40p2)
Kim E-316 (2), исходный вакцинный вирус	USAMPIID	1946 год	Корея ^б	Азия	2 CAM (Kempe), Detrick 1 CAM = 3 CAM (18 февраля 1958 года)	Нежизнеспособны
Hinden	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1946 год	Соединенное Королевство	Европа	E2	Посевной материал (E2; BSC40p2)
Harvey	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1946 год	Соединенное Королевство, импортирован	Европа	E1	Посевной материал (E1; BSC40p2)
Lee, исходный вакцинный вирус	USAMPIID	1947 год	Корея ^б	Азия	2 CAM (Kempe), Detrick 2 CAM = 4 CAM (15 сентября 1958 года)	Посевной материал (E4; BSC40p2)
Juba	Портон-Даун, Соединенное Королевство	7 октября 1947 года	Судан	Африка	E8	Посевной материал (E8; BSC40p2)
Rumbec	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1947 год	Судан	Африка	E7	Посевной материал (E7; BSC40p2)
Higgins	Портон-Даун, Соединенное Королевство	5 апреля 1947 года	Стаффордшир, Соединенное Королевство	Европа	Неизвестна	Посевной материал (?; BSC40p2)
Horn (Sabin Lab)	USAMPIID	до 1948 года	Китай	Азия	2 (?) CAM (Shabel), Detrick 2 CAM = 4 CAM (4 июня 1959 года)	Посевной материал (E4; BSC40p2)

Таблица 4.8 Отбор рабочих материалов ЦКЗП: идентификация жизнеспособности штаммов вируса натуральной оспы (продолжение)

Изолят	Первоначальная лаборатория	Дата выделения штамма	Страна ^a	Регион	История исходного пассирования	Современный статус
Harper, исходный вакцинный вирус	USAMPIID	до 1951 года	Япония	Азия	3 CAM (Hahon) , 2 CAM Detrick = 5 CAM (25 июля 1958 года)	Посевной материал (E5; BSC40p2)
Stillwell, исходный вакцинный вирус	USAMPIID	до 1951 года	Япония	Азия	6CAM (Hahon)	Посевной материал (E6; BSC40p2)
BUT (Butler)	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1952 год	Соединенное Королевство	Европа	E8	Посевной материал (E8; BSC40p2)
Kali-Muthu M 50	USAMPIID	5 сентября 1953 года	Индия	Азия	#2228 исходный материал в Locke's 13 января 1958 года гомогенат струпьев	Посевной материал (BSC40p3)
New Delhi	USAMPIID	1953 год	Индия	Азия	2 CAM (Kempe), Detrick 3 CAM= 5 CAM (23 июня 1959 года)	Посевной материал (E5; BSC40p2)
Nigeria – Kudano	Портон-Даун, Соединенное Королевство	Июнь 1961 года	Нигерия	Африка	Струпья	Нежизнеспособны
696 Madras DJB	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1963 год	Индия	Азия	Струпья	Нежизнеспособны
7125	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1964 год	Индия	Азия	E4	Посевной материал (E4; BSC40p2)
7124	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1964 год	Индия	Азия	E4	Посевной материал (E4; BSC40p2)
102	Портон-Даун, Соединенное Королевство	12 апреля 1965 года	Южная Африка	Африка	E1	Посевной материал (E1; BSC40p2)

Таблица 4.8 Отбор рабочих материалов ЦКЗП: идентификация жизнеспособности штаммов вируса натуральной оспы (продолжение)

Изолят	Первоначальная лаборатория	Дата выделения штамма	Страна ^а	Регион	История исходного пассирования	Современный статус
103	Портон-Даун, Соединенное Королевство	14 апреля 1965 года	Южная Африка	Африка	E1	Посевной материал (E1; BSC40p2)
Kembula	Портон-Даун, Соединенное Королевство	сентябрь 1965 года	Танзания ^с	Африка	Струпья	Посевной материал (BSC40p2)
Garcia, Brazil (Minor)	ЦКЗП	1966 год	Бразилия	Южная Америка	E3 1.00E-01	Посевной материал (E3; BSC40p3)
v66–39	ЦКЗП	5 июня 1966 года	Бразилия	Южная Америка	E1 из S Silva/J Noble выдел. день 4 сыпь	Посевной материал (E1; BSC40p2)
K1629	Портон-Даун, Соединенное Королевство	6 мая 1967 года	Кувейт	Ближний Восток	E5	Посевной материал (E5; BSC40p2)
V68–59	ЦКЗП	10 апреля 1968 года	Дагомея ^д	Африка	E1	Посевной материал (E1; BSC40p2)
Rafiq Lahore	Портон-Даун, Соединенное Королевство	3 марта 1969 года	Пакистан	Азия	Струпья	Посевной материал (BSC40p3)
V68–258	ЦКЗП	2 января 1969 года	Сьерра-Леоне	Африка	E4 1.00E-01	Посевной материал (E4; BSC40p2)
Congo V70–46	ЦКЗП	12 марта 1970 года	Заир ^е	Африка	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p3)
Afghan Variolator 4	Портон-Даун, Соединенное Королевство	18 марта 1970 года	Афганистан	Ближний Восток	Струпья	Посевной материал (BSC40p2)
V70–222	ЦКЗП	17 октября 1970 года	Индонезия	Азия	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p2)
V70–228	ЦКЗП	26 октября 1970 года	Индонезия	Азия	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p2)

Таблица 4.8 Отбор рабочих материалов ЦКЗП: идентификация жизнеспособности штаммов вируса натуральной оспы (продолжение)

Изолят	Первоначальная лаборатория	Дата выделения штамма	Страна ^a	Регион	История исходного пассирования	Современный статус
V72–119	ЦКЗП	6 апреля 1972 года	Сирия ^f	Ближний Восток	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p2)
V72–143	ЦКЗП	26 апреля 1972 года	Ботсвана	Африка	E1 1.00E-01	Посевной материал (E4; BSC40p2)
Eth16 R14–1X-72	Портон-Даун, Соединенное Королевство	29 августа 1972 года	Эфиопия	Африка	Струпья	Посевной материал (BSC40p3)
Eth17 R14–1X-72	Портон-Даун, Соединенное Королевство	29 августа 1972 года	Эфиопия	Африка	Струпья	Посевной материал (BSC40p3)
V73–225	ЦКЗП	8 октября 1973 года	Ботсвана	Африка	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p2)
V73–175	ЦКЗП	26 июля 1973 года	Непал	Азия	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p2)
Nur Islam	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1974 год	Бангладеш	Азия	Струпья	Посевной материал (BSC40p2)
Shahzaman	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1974 год	Бангладеш	Азия	Струпья	Посевной материал (BSC40p3)
Solaiman	Портон-Даун, Соединенное Королевство	1974 год	Бангладеш	Азия	Струпья	Посевной материал (BSC40p2)
BSH V75–550 'Bangladesh'	ЦКЗП	24 ноября 1975 года	Бангладеш	Азия	E1 1.00E-01	Рабочий материал (BSC40p6)
V77–1252	ЦКЗП	19 мая 1977 года	Сомали	Африка	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p2)
V77–1605	ЦКЗП	9 августа 1977 года	Сомали	Африка	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p2)

Таблица 4.8 Отбор рабочих материалов ЦКЗП: идентификация жизнеспособности штаммов вируса натуральной оспы (продолжение)

Изолят	Первоначальная лаборатория	Дата выделения штамма	Страна ^a	Регион	История исходного пассирования	Современный статус
V77–2479 (Ali Maow Maalin) 'Somalia'	ЦКЗП	10 ноября 1977 года	Сомали	Африка	E2 1.00E-02	Рабочий материал (E2; BSC40p3)
AR1, рекомбинант alastrim/rabbitpox	Портон-Даун, Соединенное Королевство	Данные опубликованы в 1964 году	Лабораторный штамм	НП	Неизвестна	Экстракты нуклеиновых кислот
VC13, рекомбинант var /cowpox	Портон-Даун, Соединенное Королевство	Данные опубликованы в 1964 году	Лабораторный штамм	НП	Неизвестна	Экстракты нуклеиновых кислот
Heidelberg	USAMPIID	Неизвестно	Германия	Европа	Detrick ISOL стружья, 1 CAM линия дата: 24 мая 1960 года	Посевной материал (E1; BSC40p2)
Congo 9 (Gispen) V74–227	ЦКЗП	1974 год	Заир ^e	Африка	E1 1.00E-01	Посевной материал (E1; BSC40p2)
Northern Indian, исходный вакцинный вирус	USAMPIID	Неизвестно	Северная Индия	Азия	30 CAM (Nelson), Detrick 3 CAM = 33 CAM (14 июля 1958 года)	Нежизнеспособны
Iran 2602	Портон-Даун, Соединенное Королевство	Неизвестно	Иран	Ближний Восток	E5	Посевной материал (E5; BSC40p2)

CAM – хориоаллантоисная мембрана; ЦКЗП – Центры контроля заболеваний и профилактики, Атланта, Джорджия; НП – неприменимо; USAMPIID – Институт медицинских исследований и инфекционных болезней армии Соединенных Штатов.

^a Указаны названия стран, применявшиеся во время выделения штамма.

^b Нынешнее название страны неизвестно.

^c Теперь Объединенная Республика Танзания.

^d Теперь Бенин.

^e Теперь Демократическая Республика Конго.

^f Теперь Сирийская Арабская Республика.

В ЦКЗП в настоящее время сохраняются нуклеиновые кислоты VARV, которые представляют секвенированные геномы и несколько других вирусов. Материал, описываемый в таблицах 4.9 и 4.10, поддерживается в виде полноразмерного геномного материала, а также включает штаммы VARV, используемые для получения коллекций плазмид или LСPR-ампликонов. Информация об этом материале введена в надежную базу данных, защищенную паролем, и доступ к материалу имеют только несколько участников программы. В настоящее время плазмиды или LСPR-ампликоны, представляющие девять секвенированных штаммов из коллекции находящегося в Соединенных Штатах Сотрудничающего центра ВОЗ, хранятся в архиве. Следует отметить, что все 47 секвенированных вирусов в коллекции были использованы для подтверждения достоверности диагностических методов, основанных на использовании нуклеиновых кислот. Может возникнуть необходимость в дополнительных плазмидных, LСPR или других геномных фрагментах, представляющих геномы, в связи с опасностью уничтожения запасов вирусов оспы и интактных геномных ДНК. При обсуждении наилучших способов сохранения этого материала в архиве следует принимать во внимание частоту мутаций, обусловленную введением стратегий PCR, стабильность различных подходов к архивированию геномов и работу, сопряженную с применением возможных подходов.

Таблица 4.9 Опись ЦКЗП полноразмерных ДНК вируса натуральной оспы

№	Штамм	Регион	Страна происхождения ^а	Год выделения
1	102	Африка	Натал, Ингвавума, Южная Африка	1965
2	103	Африка	Трансвааль, Нелспрейт, Южная Африка	1965
3	66–39	Южная Америка	Бразилия	1966
4	68–59	Африка	Дагомея ^б	1968
5	68–258	Африка	Сьерра-Леоне	1969
6	69–1	Африка	Нигер	1969
7	69–5	Африка	Гвинея	1969
8	70–222	Азия	Индонезия	1970
9	70–228	Азия	Индонезия	1970
10	7124	Азия	Индия	1964
11	7125	Азия	Индия	1964
12	72–119	Ближний Восток	Сирия ^с	1972
13	72–143	Африка	Ботсвана	1972
14	72–164	Европа	Югославия ^д	1972
15	73–175	Азия	Непал	1973
16	73–225	Африка	Ботсвана	1973
17	74–227	Африка	Заир ^е	1974
18	77–1252	Африка	Сомали	1977
19	77–1605	Африка	Сомали	1977
20	Afghan Variolator 4	Ближний Восток	Афганистан	1970
21	AR1	НП	Лабораторный штамм	Опубликовано в 1964 году
22	Ashiq	Азия	Пакистан	1969
23	Aslam	Азия	Пакистан	1969
24	BSH	Азия	Бангладеш	1975
25	Bombay	Азия	Индия	1958

Таблица 4.9 Описание ЦКЗП полноразмерных ДНК вируса натуральной оспы (продолжение)

№	Штамм	Регион	Страна происхождения ^а	Год выделения
26	Brazil Garcia	Южная Америка	Бразилия	1966
27	Butler	Европа	Соединенное Королевство	1952
28	Congo V70–46	Африка	Заир ^е	1970
29	Djib	Африка	Джибути	1971
30	ETH 16	Африка	Эфиопия	1972
31	ETH 17	Африка	Эфиопия	1972
32	Farid	Азия	Пакистан	1969
33	Harper	Азия	Япония	1951
34	Harvey	Европа	Соединенное Королевство	1946
35	Heidelberg	Европа	Германия	Неизвестен
36	Higgins	Европа	Соединенное Королевство	1947
37	Hinden	Европа	Соединенное Королевство	1947
38	Horn	Азия	Китай	до 1948 года
39	Iran 2602	Ближний Восток	Иран	Неизвестен
40	Juba	Африка	Судан	1947
41	Kembula	Африка	Танзания ^г	1965
42	K1629	Ближний Восток	Кувейт	1967
43	Kali Mathu	Азия	Индия	1953
44	A. Mannan	Азия	Бангладеш	1974
45	Minnesota 124	Северная Америка	Соединенные Штаты	1939
46	Misba	Азия	Пакистан	1970
47	M.S. Lee	Азия	Корея ^д	1947
48	New Delhi	Азия	Индия	1953
49	Nigeria Kudano	Африка	Нигерия	1961
50	Nur Islam	Азия	Бангладеш	1974
51	Parker	Европа	Соединенное Королевство	1978
52	Parvin	Азия	Бангладеш	1974
53	Rafiq Lahore	Азия	Пакистан	1969
54	Ramjan	Азия	Пакистан	1970
55	Rafiq	Азия	Пакистан	1969
56	Shahzaman	Азия	Бангладеш	1974
57	Solomain	Азия	Бангладеш	1974
58	Somalia	Африка	Сомали	1977
59	Stillwell	Азия	Япония	1951
60	VC13	НП	Лабораторный штамм	Опубликовано в 1964 году
61	Yamada	Азия	Япония	1946

НП – неприменимо.

^а Указаны названия стран, применявшиеся во время выделения штамма.

^б Теперь Бенин.

^в Теперь Сирийская Арабская Республика.

^д Нынешнее название страны неизвестно.

^е Теперь Демократическая Республика Конго.

^г Теперь Объединенная Республика Танзания.

Таблица 4.10 Описание ЦКЗП штаммов вируса натуральной оспы, которые использовались для создания коллекций ампликонов и плазмид

Географический регион, в котором был выделен штамм	Страна, в которой был выделен штамм	Штамм	Год выделения штамма	Эпидемиологический тип	Тип коллекции	Число контейнеров
Азия	Бангладеш	BSH	1974	Variola major	Плазмиды	250
Европа	Соединенное Королевство	Butler	1952	Variola minor alastrim	Плазмиды	110
Африка	Демократическая Республика Конго	Congo	1970	Variola major	Плазмиды	180
Южная Америка	Бразилия	Brazil Garcia	1966	Variola minor alastrim	Плазмиды	135
Европа	Соединенное Королевство	Harvey	1946	Variola major	Плазмиды	100
Азия	Китай	Horn	до 1948 года	Variola major	Ампликоны	48
Азия	Индия	7124	1964	Variola major	Ампликоны	134
Азия	Непал	73–175	1973	Variola major	Ампликоны	127
Африка	Сомали	Somalia	1977	Variola major	Плазмиды	100

ЦКЗП предоставлял фрагменты VARV ряду исследователей из других организаций на основе утвержденных протоколов ВОЗ и ЦКЗП/Министерства здравоохранения и социальных служб Соединенных Штатов, которые касаются распределения нуклеиновых кислот VARV, а также следуя рекомендациям ВОЗ по их использованию¹¹. Эти мероприятия нашли отражение в данных таблицы 4.11.

¹¹ <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/research/en/index.html>.

Таблица 4.11 Фрагменты вируса натуральной оспы, предоставленные исследователям из других организаций

Институт, страна	Одобрение ВОЗ (Да/Нет)	Штамм	Ген (гены)	Дата запроса	Выполнено полностью	Груз отправлен
Корнелльский университет, Соединенные Штаты	Да	BSh75 Horn Heidelberg V73–175 102 Nur Islam Shahzaman Solaiman	RAP94 RPO147	20 января 2008 года	15 мая 2008 года	НД
Университет штата Флорида, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	G1R	24 апреля 2007 года	10 января 2008 года	24 июня 2008 года
Университет медицины и стоматологии Нью-Джерси, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	D9R	12 июля 2006 года	НД	30 января 2008 года
Калифорнийский университет	Да	Bangladesh	D1L E7L A27L A39L B2L B3L B4L B9R B10R B14R B19R B20R B22R	3 августа 2006 года	октябрь 2006 года	23 октября 2006 года
Национальный университет здравоохранения (NIH), Соединенные Штаты	Да		A24R	20 апреля 2005 года	16 августа 2005 года	НД
Кантональный институт микробиологии, Швейцария	Да	Bangladesh	J9R B10R B11R	29 апреля 2005 года	1 июня 2006 года	26 июля 2006 года
USAMPIID, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh Garcia	M1R B6R A36R A31L	2 августа 2004 года	1 июня 2006 года	август 2006 года

Таблица 4.11 Фрагменты вируса натуральной оспы, предоставленные исследователям из других организаций (продолжение)

Институт, страна	Одобрение ВОЗ (Да/Нет)	Штамм	Ген (гены)	Дата запроса	Выполнено полностью	Груз отправлен
Пенсильванский университет, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	A31L A18L A36R B6R F8L I3L M1R C13L	26 января 2005 года	НД	НД
Myriad Genetics, Inc, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	B8L C18L A27L A39L B4L B9R B11R:B10R B12R:B11R B14L B22R:B19R C13L:B20R B22R G3R:G1R, G2R	8 декабря 2004 года	июнь 2006 года	23 октября 2006 года
Национальный центр биотехнологии, Испания	Да	Bangladesh	B8R B17R D7L G2R G3R A44L P1L D4R D15L A41L	23 июля 2003 года	22 сентября 2004 года	20 июля 2006 года
Финляндия	Да	Bangladesh	D12R B7R	7 сентября 2001 года	НД	НД
AFIP, Вашингтон, округ Колумбия, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	L2R B8R G2R J7R E9L L6R A25R	ноябрь 2001 года	19 февраля 2002 года	НД

Таблица 4.11 Фрагменты вируса натуральной оспы, предоставленные исследователям из других организаций (продолжение)

Институт, страна	Одобрение ВОЗ (Да/Нет)	Штамм	Ген (гены)	Дата запроса	Выполнено полностью	Груз отправлен	
USAMPIID, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	D8L-D10L	8 января 2002 года	22 февраля 2002 года	НД	
			D16L-D18L	январь 2005 года	июнь 2006 года	август 2006 года	
		Bangladesh Garcia	C7L				
			M1R				
			I5R				
			F8L				
			A14L				
			A26L-A28L				
			A34R				
			A36R-A37R				
			A40R				
			A47-A48L				
			J6R-J7R				
			B3L				
			B9L-B10L				
			B19L-B20L				
B22R							
G1R							
G3R-G4R							
B6R							
L2R							
B8R							
G2R							
J7R							
E9L							
L6R							
A25R							
A31L							
Институт рака Дана-Фарбера, Гарвардская медицинская школа, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	D4R C9L A46R J7R B6R	ноябрь 2001 года	январь 2002 года	НД	
Государственный университет Сан-Хосе, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	A41-A44	15 августа 1996 года	август 1997 года	НД	
AFIP, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	J7R E9L G1R	январь 1999 года	февраль 1999 года	НД	
(DSTL) Портон-Даун, Соединенное Королевство	Да	V74-227 (Congo) Solaiman Butler	P1L (BSH гомолог) C3L (BSH гомолог) A14L (BSH гомолог) A36R A38R B6R B17R	октябрь 2001 года	НД	29 апреля 2003 года	

Таблица 4.11 Фрагменты вируса натуральной оспы, предоставленные исследователям из других организаций (продолжение)

Институт, страна	Одобрение ВОЗ (Да/Нет)	Штамм	Ген (гены)	Дата запроса	Выполнено полностью	Груз отправлен
Гарвардская медицинская школа, Соединенные Штаты	Да	Bangladesh	TK ген	январь 2003 года	НД	8 мая 2003 года
INSERM, Франция	Да	Bangladesh	SacI фрагмент BstEII D фрагмент	апрель 2003 года	август 2004 года	27 августа 2004 года
CRSSA Emile Pardé, Франция	Да	Bangladesh Garcia	A31L K9R C9L	июль 2003 года	октябрь 2003 года	февраль 2004 года
Университет Альберты, Канада	Да	Bangladesh	E9L	май 2004 года	май 2004 года	24 августа 2004 года
23 лаборатории в Соединенных Штатах	Да	Bangladesh	2 <500 нуклеотидные вставки	НД	НД	НД

AFIP – Институт патологии Вооруженных сил; DSTL – Лаборатория оборонных исследований и технологий; INSERM – Национальный институт здравоохранения и медицинских исследований; НД – нет данных; NIH – Национальный институт здоровья; USAMRIID – Институт медицинских исследований и инфекционных болезней армии Соединенных Штатов.

Официальные доклады, касающиеся репозитория, их использования и статуса, были представлены в ВОЗ в письменном виде в июне 1997 года (доклад используется для работы с 1979 по 1997 год) и в 1998 году. По данным за 1999 год, эти доклады регулярно представляли в форме рефератов, в виде электронных баз данных и в виде ежегодных устных презентаций на специальных заседаниях ВОЗ по ортопоксвирусам (1999 год) и впоследствии на ежегодных заседаниях Научно-технического консультативного комитета ВОЗ по исследованию вируса натуральной оспы (2000–2008). Более современные конспективные доклады см. на веб-сайте ВОЗ¹².

Вся работа с живыми VARV в ЦКЗП проводится в помещении, в котором обеспечен четвертый уровень биологической безопасности и которое регулярно инспектируется местными и федеральными регламентирующими ведомствами (в соответствии с осуществляемой на федеральном уровне Министерством здравоохранения и социальных служб программой отобранных этиологических агентов и токсинов, а также международными (ВОЗ) структурами, с тем чтобы обеспечить наивысшие стандарты практики биологической безопасности и биологической защиты.

¹² <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/research/en/index.html>.

Сокращения

CAM	хориоаллантаисная мембрана
ЦКЗП	Центры контроля заболеваний и профилактики, Атланта, Джорджия
CPE	цитопатический эффект
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ECE	куриное яйцо с развивающимся эмбрионом
LPCR	полимеразная цепная реакция длинных фрагментов
ORV	ортопоксвирус
НИИВП	Научно-исследовательский институт вирусных препаратов
VARV	вирус натуральной оспы
ГНЦ ВБ "Вектор"	Российский государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения

Справочные материалы

- Esposito JJ et al. (2006). Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science*, 313:807–812.
- Li Y et al. (2007). On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:15787–15792.
- Olson VA et al. (2009). Smallpox virus plaque phenotypes: genetic, geographical and case fatality relationships. *The Journal of General Virology*, 90:792–798.

5 Животные модели и патогенез

Peter B Jahrling¹

¹ Объединенный научно-исследовательский центр, Национальный институт аллергии и инфекционных болезней, Национальные институты здравоохранения, Фредерик, Соединенные Штаты Америки

Значение для общественного здравоохранения

Возможность использования вируса натуральной оспы террористами в качестве биологического оружия общеизвестна. Кроме того, повторное появление оспы обезьян в Демократической Республике Конго, ставшее угрозой для общественного здравоохранения, в еще большей степени способствовало осознанию необходимости экстренной разработки усовершенствованных мер противодействия ортопоксвирусам, включая использование таких средств, как вакцины и противовирусные лекарства. Поскольку является общепризнанным, что для доказательства эффективности этих мер противодействия необходимы животные модели, в настоящей главе основное внимание уделено животным моделям, оказавшимся удобными для изучения мер борьбы с ортопоксвирусными болезнями.

Успехи, достигнутые к настоящему времени

Мелкие животные модели, применявшиеся в экспериментах с вирусом экстремелии (возбудителем оспы мышей), вирусом оспы коров, вирусом оспы кроликов и vaccinia вирусом, содействовали более глубокому пониманию патогенеза и иммунологии поксвирусных инфекций; эти знания были использованы для организации очень важных исследований с участием приматов. Приматы в качестве моделей в экспериментах с вирусом натуральной оспы или вирусами оспы обезьян в наибольшей степени подходят для разработки безопасных и эффективных средств борьбы с натуральной оспой человека.

Современные проблемы

С помощью различных комбинаций доз вируса натуральной оспы и путей экспозиции приматов (обезьян *супотолгус*) получают прогнозируемые типы болезней, которые воспроизводят некоторые, но не все характерные признаки натуральной оспы человека. Хотя модели требуют дальнейшего усовершенствования, они адекватно продемонстрировали эффективность нескольких противовирусных лекарств-кандидатов, включая цидофовир и ST-246. Возможно, ни одна отдельно взятая комбинация условий не позволит выявить модель, которая одновременно удовлетворяла бы всем критериям, предусмотренным "animal rule" (Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных) Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов Соединенных Штатов (US 21CFR 310.610); для различных показаний могут потребоваться разные модели. Дальнейшее усовершенствование приматов в качестве моделей может включать патофизиологические данные, полученные в исследованиях с использованием телеметрии и методов медицинской визуализации. Особое внимание следует уделять выявлению образцов биомаркеров, которые могли бы быть использованы в клинических испытаниях в качестве сигналов (пусковых механизмов) к раннему вмешательству, тем самым повышается вероятность успешного вмешательства и упрощается лицензирование мер противодействия ортопоксвирусным заболеваниям. Хотя многие из этих разработок могут быть осуществлены с использованием суррогатных ортопоксвирусов в экспериментах на грызунах и приматах, более достоверные данные о средствах борьбы с вирусом натуральной оспы могут быть получены только путем оценки их эффективности на приматах в качестве моделей с использованием вируса натуральной оспы.

5.1 Введение

Несмотря на ликвидацию натуральной оспы вирус натуральной оспы (VARV) остается проблемой для общественного здравоохранения, поскольку есть вероятность, что нелегальные запасы VARV могут находиться в руках биотеррористов (Henderson et al., 1999). Воздействие вспышки VARV в человеческой популяции в настоящее время должно стать даже более катастрофическим, чем оно было на протяжении предшествующего столетия: программы вакцинации были отозваны во всем мире примерно в 1976 году, преобладают популяции с подавленным иммунитетом, а повышенная мобильность населения (включая межконтинентальные авиаперелеты) повысила скорость распространения вируса по планете. В связи с этим крупные инвестиции вкладываются в разработку усовершенствованных мер борьбы с натуральной оспой, включая новые вакцины и противовирусные лекарства (LeDuc & Jahrling, 2001).

Разработка и лицензирование таких мер противодействия болезни будет зависеть от животных моделей, с помощью которых демонстрируется их защитная эффективность. Эти животные модели должны с наибольшей точностью соответствовать болезни человека, и в идеале нужно использовать истинный этиологический агент (VARV), а не суррогат. Хотя многие из этих разработок могут быть осуществлены с использованием ортопоксвирусов (OPV) в экспериментах на грызунах и приматах, более достоверные данные о средствах борьбы с вирусом натуральной оспы могут быть получены только путем оценки их эффективности на приматах в качестве моделей с использованием VARV.

5.2 Животные модели

Тот факт, что VARV в естественных условиях инфицирует только людей, делает невозможным создание животных моделей для натуральной оспы с использованием VARV. VARV может инфицировать разнообразных лабораторных животных в экспериментальных условиях, но это не приводит к развитию летального системного заболевания (Fenner et al., 1988), за исключением недавних исследований, проводившихся на обезьянах (Jahrling et al., 2004). Желательно дальнейшее совершенствование приматов-моделей для изучения VARV, включая природный аэрогенный путь экспозиции (USFDA, 2009).

В данной главе основное внимание сосредоточено на животных моделях для исследования OPV болезней, которые в перспективе должны способствовать разработке средств борьбы с натуральной оспой. Приматы в качестве моделей с использованием VARV или вируса оспы обезьян (MPXV) наиболее пригодны для этой цели и, кроме того, могут содействовать более глубокому пониманию патофизиологии натуральной оспы у человека; однако исследования приматов требуют больших затрат, а использование VARV требует обеспечения наивысшего уровня биологической безопасности (уровень 4, BSL-4) и биологической защиты. Локализация вируса ограничена двумя важнейшими Сотрудничающими центрами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ): Центры контроля и заболеваний и профилактики (ЦКЗП) в Атланте, Соединенные Штаты, и Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" в Российской Федерации. Несмотря на то что работа с MPXV сопряжена с меньшими ограничениями, этот вирус требует обеспечения биобезопасности уровня 3 (BSL-3) с целью сдерживания его распространения, и MPXV является специально отобранным этиологическим агентом (Министерство здравоохранения и социальных служб США, 2005 год); это означает, что его

применение сопряжено с определенными ограничениями. В связи с этими ограничениями мелкие животные модели в исследованиях OPV заболеваний с применением вируса экстремелии (ECTV), вируса коровьей оспы (CPXV), вируса оспы кроликов (RPXV) и вируса осповакцины (vaccinia вируса) (VACV) используются для решения задачи, касающейся понимания и разработки мер противодействия патогенам человека.

При использовании животных моделей в исследованиях OPV-болезней необходимо обращать внимание на имеющий очень важное значение баланс между прямым взаимодействием вирусов с клетками-мишенями хозяина и защитным иммунным ответом. Поксвирусы более, чем большинство других вирусных патогенов, экспрессируют самые разнообразные иммуномодулирующие белки и ингибиторы апоптоза, которые могут сдвинуть баланс в направлении вирулентности. Некоторые из этих взаимодействий вирус – хозяин могут быть видоспецифичными, и их нельзя надежно экстраполировать на модели других видов.

Значительная часть информации о патогенезе VARV получена в результате исследований с ECTV в опытах на мышах (Buller & Palumbo, 1991). ECTV – это природный патоген мышей, и после того, как он был открыт в 1930-е годы, Феннер использовал эту модель для разъяснения концепции первичной и вторичной виремии, которая сопоставима с экзантематозным заболеванием человека (Fenner, 1948). В 1970-х годах модели ECTV-мыши использовались для демонстрации роли Т-клеток и макрофагов в клеточно-опосредованном иммунитете и выздоровлении после острой болезни. В 1980-х годах ECTV-инфекции инбредных линий мышей использовали для идентификации генетических детерминант резистентности и восприимчивости (Buller, 1985; Buller & Palumbo, 1991). В более позднее время доступность различных нокаутных линий инбредных мышей облегчила исследование взаимосвязей вирус – хозяин.

Детальное описание иммунобиологии OPV-инфекций выходит за пределы круга тем, рассматриваемых в настоящей главе.

Восприимчивость к ECTV генетически предопределена, и генетические механизмы весьма сложны. Линия мышей C57BL/6 относительно устойчива; величина LD₅₀ составляет 10⁶ бляшкообразующих единиц (PFU, или БОЕ) при инокуляции в подушечку на лапе. Напротив, LD₅₀ для мышей A/J – менее 0,01 PFU (Buller, 1985). Генетическая резистентность частично связана с гранулоэозиноцитозным путем эффекторных Т-клеток (Müllbacher et al., 1999). Мыши линий BALB/c и DBA/2, подобно мышам A/J, отличаются высокой восприимчивостью как при чрескожном, так и аэрозольном способах инфицирования. Резистентность и восприимчивость также могут варьировать в зависимости от штамма ECTV.

ECTV-инфекции у восприимчивых мышей начинаются с абразии кожи. Происходит локальное размножение вируса, затем он мигрирует во внутренние органы через афферентные лимфатические сосуды и дренирующие лимфатические узлы и кровоток (первичная виремия). Вирус размножается в основных органах, прежде всего в печени и селезенке, что приводит к вторичной виремии в течение 4–5 дней. В зависимости от линии мышей размножение вируса в коже может вызвать экзантему всего через 6 дней после экспозиции. У мышей линии A/J смерть наступает до развития экзантемы, вследствие тяжелого некроза печени. Аэрозольная экспозиция вызывает тяжелую первичную пневмонию.

Модель, комбинирующую ECTV и мышей линии A/J, недавно использовали для оценки

различных аналогов противовирусного лекарства цидофовира с точки зрения их эффективности в отношении летальной инфекции (Buller et al., 2004). В этом исследовании октадецилоксиэтиловое производное цидофовира, вводимое перорально, защищало 100% мышей, экспериментально зараженных аэрозольным путем летальной дозой $2,3 \times 10^4$ PFU, и полностью блокировало репликацию вирусов в селезенке и печени. Немодифицированный цидофовир в таких же условиях был неэффективен.

VACV тоже инфицирует мышей; исход зависит от генетики мыши, от штаммов VACV, доз и способов экспозиции. Инфицирование мышей C57BL/6 штаммом VACV Western Reserve (WR) посредством интраназальной экспозиции с применением доз, превышающих 10^4 PFU, является летальным (Brandt & Jacobs, 2001). С помощью этой модели было показано, что ген VACV *E3L*, обуславливающий резистентность интерферона (IFN) *in vitro*, необходим для патогенеза интактных животных. Мыши линии BALB/c несколько более резистентны к VACV, хотя сообщений о попарных (head-to-head) сравнениях не было. Летальность мышей BALB/c зависима от дозы: в одном исследовании доза 10^7 PFU штамма WR VACV вызвала 100-процентную летальность, тогда как доза 10^4 PFU вызвала 20-процентную летальность мышей (Alcami & Smith, 1992). Мышей BALB/c также использовали для классификации штаммов VACV по степени вирулентности. Штамм NYC6H (Совет по здравоохранению города Нью-Йорка) с LD_{50} при интраназальной экспозиции $10^{4,0}$ PFU был более вирулентен, чем штаммы WR- CLD_{50} $10^{4,8}$ PFU. Ни один из штаммов не был летален при инфицировании посредством скарификации (нанесения насечек) хвоста, а также при подкожной или пероральной экспозиции (Lee et al., 1992). VACV, полученный из вакцины Wyeth, был менее вирулентен при интраназальной экспозиции ($LD_{50} > 10^7$ PFU).

Безволосых мышей SKH-1 использовали для индуцирования кожных инфекций с применением VACV. Число кожных повреждений свидетельствует о тяжести системной инфекции. Эта модель была использована для демонстрации эффективности применявшегося локально 5-процентного цидофовира как в уменьшении числа кожных поражений, так и в снижении вирусных нагрузок в легких, почках и селезенке (Quenelle, Collins & Kern, 2004).

Интраназальное инфицирование мышей BALB/c штаммом VACV WR вызывает пневмонию, снижение веса и смерть. Введение цидофовира (100 мг/кг интраперитонеально [IP]), начиная с первого дня после интраназальной экспозиции, обеспечило защиту всем подопытным мышам; напротив, в контрольной группе, получавшей плацебо, все мыши умерли в пределах 8-дневного срока после экспозиции. Цидофовир вызвал значительное улучшение показателей консолидации (уплотнения) легких и способствовал снижению вирусных нагрузок в печени, селезенке и головном мозге; максимальные титры были в 30–1000 раз ниже, чем в контрольной плацебо-группе (Smee, Bailey & Sidwell, 2001).

Аналогичные исследования проводились со штаммом CPXV Brighton Red, который летален для мышей BALB/c в определенных условиях (Bray et al., 2000). Характер заболевания и летальность после аэрозольной или интраназальной экспозиции варьируют в зависимости от возраста и веса мышей: инфицирование дозой 2×10^6 PFU вызвало 100-процентную гибель 4-недельных мышей (среднее время до смерти составило 8 дней), в то время как в группе 7-недельных мышей погибли только 50% животных. Инфицированные мыши умирали от двустороннего вирусного пневмонита и с вирусными нагрузками, превышавшими 10^9 PFU/g в легких. Эту модель использовали для тестирования эффективности различных лечебных средств защиты от системного

заболевания. Мыши, которым вводили однократную дозу цидофовира интраперитонеально (100 мг/кг), получали 100-процентную защиту от интраназального заражения ($2-5 \times 10^6$ PFU), если лекарство применялось за 4 дня до экспозиции и даже через 4 дня после экспозиции. Через 5 или большее число дней после экспозиции цидофовир был менее эффективен (Robbins et al., 2005). Напротив, вакциниевый иммуноглобулин был полностью неэффективен в плане снижения смертности. IFN- α V/D (5×10^7 ед./кг) был эффективен при применении до экспозиции и в течение одного дня после экспозиции, но не позднее. Когда мыши были вакцинированы путем скарификации хвоста, они были защищены, если процедура начиналась за 8 дней до заражения; вакцинация была менее эффективна, если этот интервал уменьшали, и неэффективна, если она начиналась через 2 дня после заражения. Это наблюдение противоречит эпидемиологическим данным, согласно которым вакцина сохраняет эффективность до 4 дней после экспозиции человека. Различие может быть обусловлено более высокой дозой, применяемой при заражении животных моделей, кроме того, оно свидетельствует об опасности экстраполирования полученных на грызунах-моделях данных на человека.

Несмотря на то, что мышинные модели в очень большой степени способствуют пониманию явлений вирулентности и защитных иммунных ответов, механизмы взаимодействия вирус – хозяин необходимо оценивать индивидуально и не следует прибегать к обобщениям (Müllbacher et al., 2004). Например, ECTV и VACV различаются в своих потребностях в IFN- γ после инфекции. У ECTV-инфицированных мышей перенос иммунных спленоцитов от IFN- γ нокаутных мышей высокоэффективен с точки зрения снижения титра вируса в легких и селезенке; в аналогичном эксперименте VACV-иммунные спленоциты неэффективны (Müllbacher & Blanden, 2004). Таким образом, несмотря на очевидное сходство этих двух моделей OPV-инфекций, выздоровление предполагает разные и в какой-то мере непредсказуемые иммунные реакции хозяина. Цитолитические функции Т-клеток могут быть благоприятными, наносящими вред или нейтральными (Müllbacher et al., 2004), и этот баланс уникален для каждой системы вирус – хозяин. Очень важно принимать во внимание трудности такого рода, когда специализированные патогены, подобные OPV, исследуются вне своих природных хозяев.

У кроликов, подвергшихся аэрозольной экспозиции к RPXV, развивается синдром, подобный натуральной оспе человека (Lancaster et al., 1966; Westwood et al., 1966). В этих исследованиях штамм Utrecht RPXV был несколько более вирулентен, чем штамм Рокфеллеровского института. Штамм Utrecht вызывал летальную инфекцию у новозеландских белых кроликов, причем смерть животных наступала через 7–12 дней после экспозиции; более высокие дозы вызывали более бурное течение болезни, но для того, чтобы вызвать инфекцию, достаточно лишь немногим более одной RPXV-частицы. Кролики обычно оставались здоровыми в течение 4–6-дневного инкубационного периода, после которого следовали лихорадка, слабость, быстрая потеря веса и профузные гнойные выделения из глаз и носа. На губах и языке появлялась выраженная эритема, совпадающая с генерализованной кожной сыпью, с количеством поражений от немногочисленных до сливающихся. В некоторых случаях смерть наступала до появления сыпи. Вначале поражения представляли собой красные папулы, превращающиеся в псевдопустулы с творожистым содержимым. Смерть обычно наступала до того, как могли образоваться истинные струпья (корки), и ей предшествовало быстрое снижение температуры тела. Высокие RPXV-нагрузки обнаруживались во всех висцеральных тканях, достигая максимума между днями 5 и 8, с титрами 10^8 PFU/g (10^8 БОЕ/г) в легких и 10^7 БОЕ/г в селезенке и надпочечниках. В некоторых случаях раннее наступление смерти у кроликов коррелировало с дефектом

коагуляции крови (Boutler, Maber & Bowen, 1961) – аналогично геморрагической форме натуральной оспы человека (Martin, 2002). Также есть некоторые доказательства того, что инфицированные кролики становятся контагиозными только на поздних стадиях болезни, несмотря на присутствие вируса в назофарингеальных жидкостях на ранних стадиях, как было описано в случае натуральной оспы человека.

В более поздних исследованиях внутрикожная инокуляция кроликов вызывала заболевание аналогичного типа (Adams, Rice & Moyer, 2007). Доза вируса 1×10^2 PFU (БОЕ), вводимая внутрикожно, вызывала системную инфекцию, но для летального исхода требовалась более высокая доза (5×10^3 PFU). Сначала место инфекции опухает, затем через 5 дней после инфекции развивается некроз. К дню 3 начинается лихорадка, затем к дню 4 отмечается учащенное дыхание. Вторичные поражения, включая выделения из глаз и носа, сопровождаемые потерей веса, наблюдаются к дню 7. Незадолго до смерти частота дыхания снижается и повышается частота сердечных сокращений, и к дню 7 или 8 у животного развивается респираторный дистресс-синдром. RPXV-инфекция у кроликов во многом подобна натуральной оспе человека.

Отсутствие реактивов и инбредных линий кроликов препятствует проведению сложного анализа этих иммунологических событий; по этим причинам при проведении исследований в качестве животных моделей предпочитают использовать мышей. Однако в настоящее время гены вирулентности могут быть оценены посредством генетических манипуляций RPXV и тестированием этих модифицированных штаммов на кроликах (McFadden, 2005a). Кроме того, возможно дальнейшее усовершенствование модели RPXV-кролики, и эта модель может быть использована для тестирования лекарств-кандидатов и вакцин против натуральной оспы человека, и это может стать ступенькой к приоритетному тестированию этих агентов на доступных приматах-моделях.

Важно проводить различие между RPXV, который является штаммом VACV, относящимся к роду *Orthopoxvirus*, и вирусом миксомы, относящимся к другому роду – *Lepovipoxvirus*. Хотя вирус миксомы вызывает летальное заболевание у новозеландских белых кроликов, которое во многом подобно заболеванию, вызываемому RPXV, вирус миксомы более далек от патогенов человека и поэтому менее пригоден для исследований натуральной оспы человека, чем животные модели OPV-болезней, обсуждаемые в настоящей главе.

MPXV – важный патоген человека, который вызывает многие признаки и симптомы натуральной оспы, хотя обладает меньшим потенциалом для переноса от человека к человеку (Fine et al., 1988; Jezek et al., 1988). Есть данные, свидетельствующие о том, что штаммы MPXV западноафриканского происхождения менее вирулентны, чем штаммы, которые спорадически появляются в Центральной Африке, в частности в Демократической Республике Конго (McFadden, 2005b). Использование названия "оспа обезьян", по-видимому, ошибочно, поскольку природными резервуарами этого вируса являются грызуны, в том числе белки (Khodakevich, Jezek & Kinzanzka, 1986; Charatan, 2003). В 2003 году MPXV был случайно импортирован в Соединенные Штаты на корабле, прибывшем из Республики Гана, на котором оказались грызуны, в том числе инфекционная гигантская Gambian крыса (Perkins, 2003; Ligon, 2004). Крыса инфицировала несколько луговых собачек, содержащихся в одном помещении, и последовала цепь переносчиков инфекции, включавшая сотни луговых собачек, и затем инфекция распространилась на людей – более 75 случаев заболеваний в 11 штатах. Эта вспышка оспы обезьян вновь возбудила интерес к MPXV не только как к суррогату натуральной оспы, но и как к самостоятельной нозологической единице.

Сообщалось, что экспериментальное инфицирование сусликов штаммом MPXV Соединенных Штатов вызвало гибель всех сусликов, подвергшихся экспозиции к дозе $10^{5,1}$ PFU, введенной IP-путем (интраперитонеально), или к дозе $10^{6,1}$ PFU, введенной интраназально, в пределах 6–9 дней (Tesh et al., 2004). Сообщалось о системных инфекциях с высокими вирусными нагрузками; основные гистологические данные включали центродолевой некроз печени, некроз селезенки и интерстициальное воспаление легких. Есть вероятность, что MPXV-инфицирование сусликов можно было бы использовать для разработки модели на животном, подходящей для тестирования мер борьбы с оспой обезьян и натуральной оспой человека. У луговых собачек, заболевших во время вспышки MPXV в Соединенных Штатах, были выявлены легочные уплотнения, увеличенные лимфатические узлы и многоочаговые бляшки в стенках желудочно-кишечного тракта (Langohr et al., 2004). Сообщалось о недавних успехах в разработке моделей с использованием луговых собачек, предназначенных для изучения оспы обезьян, поражающей человека (Knight, 2003; Hutson et al., 2009), также разрабатываются альтернативные грызуны-модели, в том числе африканские сони (*Graphiurus sp.*) (Schultz et al., 2009).

Коммерческая доступность линий мышей еще больше расширила возможности тестирования мер борьбы с оспой. Недавно появилось сообщение о том, что STAT1-недостаточные мыши C57BL/6 подверглись воздействию низких доз MPXV путем интраназальной экспозиции, и эти мыши оказались моделями для демонстрации эффективности двух противовирусных лекарств – CMX001 (или HDP-цидофовир) и ST-246, вводимых в день инфекции (Stabenow et al., 2010). И совсем недавно было показано, что коммерчески доступные инбредные мыши линии CAST/EiJ восприимчивы к инфекции MPXV при интраназальной экспозиции, с LD_{50} 680 PFU (Americo, Moss & Earl, 2010). Эти мыши были даже более чувствительны (LD_{50} 14 PFU) при инокуляции интраперитонеальным путем. Мыши CAST/EiJ иммунологически компетентны и обладают значительными преимуществами как модель для тестирования потенциальных мер противодействия OPV-инфекциям – они генетически гомогенны и коммерчески доступны, кроме того, доступны иммунные реактивы, необходимые для оценки иммунного ответа хозяина.

Приматы были инфицированы MPXV посредством аэрозольной (Zaucha et al., 2001), внутримышечной (Wenner et al., 1969), интратрахеальной, интрабронхиальной и внутривенной (ВВ) экспозиции (Stittelaar et al., 2006). В большей части ранних исследований в качестве модели использовались макаки *супомолгус* – *Macaca iris* или *M. fascicularis* (Напон, 1961), хотя подходящими моделями могут также быть макаки резус (*M. mulatta*) (Ноорер et al., 2004). Аэрозольные пути инфицирования в высшей степени пригодны для моделирования первичных экспозиций после атак биологических войн. Перенос MPXV (и VARV) в природе, вероятно, происходит посредством комбинации аэрозольной (воздушно-капельной) экспозиции, переноса через предметы и экспозиции слизистых оболочек. Аэрозольная экспозиция требует применения уровня BSL-4 биологического сдерживания распространения вируса в камере Класса III и контролируется менее жестко, чем ВВ-экспозиция.

Экспериментальное MPXV-инфицирование обезьян *супомолгус* аэрозольным путем (расчетная ингаляционная доза 3×10^4 PFU) вызвало гибель пяти обезьян из шести (под одному случаю смерти в дни 9, 11 и 12 и два случая смерти в день 10), среднее время до смерти – 10,4 дня. У обезьян был сильный жар (>39 °C), легкая экзантема, кашель и лейкоцитоз с абсолютным и относительным моноцитозом (Jahrling, Zaucha & Huggins, 2000). Вирус был выделен из клеток лейкоцитарной пленки фебрильных животных, а при аутопсии высокие титры вируса ($>10^6$ БОЕ/г) были выделены из легких и селезенки

(Zaucha et al., 2001). Гистопатологические исследования показали, что причиной смерти стала тяжелая фибринонекротическая бронхопневмония; иммуногистохимический анализ выявил наличие большого количества МРХВ-антигенов в образцах эпителия пораженных дыхательных путей и в образцах окружающей интерстициальной ткани. Клинические параметры, измерявшиеся у обезьян, которые подверглись аэрозольной МРХВ-экспозиции, выявлялись в последовательности, аналогичной той, которая наблюдалась у людей, но с более высокой скоростью (Bremner & Henderson, 2002).

Внутривенная (ВВ) экспозиция обезьян *супомолгус* к МРХВ тоже вызывала однородную системную инфекцию; тяжесть болезни зависела от дозы (Stittelaar et al., 2006; Huggins & Jahrling, неопубликованные данные). У обезьян *супомолгус*, инфицированных ВВ-путем дозой 1×10^7 PFU МРХВ (штамм Zaire-79, CDC V79-I-005), начиная с дня 3 отмечалась незначительная лихорадка, а в дни с 4 до 5 появлялись оспенные кожные поражения. Животные умирали с дня 8, среднее время до смерти составляло 12 дней, то есть через 4–8 дней после появления сыпи. Это меньше, чем 10–14-дневный период, наблюдаемый у людей, инфицированных оспой обезьян. Смерть наступала у 11 из 12 инфицированных обезьян (92%), тогда как у людей смертность составляла 10%. Оспенные кожные поражения были обнаружены у всех животных и были классифицированы как "тяжелые" по системе оценок ВОЗ (более 250 поражений). Кисти рук, ступни, полость рта и мягкое небо были полностью покрыты сыпью. У всех обезьян наблюдалась типичная картина прогрессирования через все стадии развития поражений, и у животных, которые жили достаточно долго, в конце концов происходило образование струпьев (корок). У всех животных снижался вес тела. Лабораторные показатели были в основном ничем не примечательны, за исключением увеличения уровня азота мочевины в крови и повышения уровня креатинина незадолго до смерти.

Как показала аутопсия, органы были серьезно поражены и значительными патологическими повреждениями, и репликацией вирусов. Титры вируса в легких, печени и селезенке были выше 10^8 БОЕ/г, а содержание вируса в крови составляло 10^5 БОЕ/мл, что было ассоциировано с кровяными клетками. Плазма была свободна от инфекционных вирусов. Титры вируса в почках были несколько выше, чем в крови, это позволяет предположить, что почка является местом репликации вирусов; в головном мозге не было обнаружено значительных вирусных нагрузок (превышающих содержание в крови).

Для того чтобы определить воздействие дозы на течение болезни, оценивали пониженные дозы, а именно 10^5 и 10^6 PFU. Более низкие дозы не вызывали смерть, но у всех животных было болезненное состояние и появлялись кожные поражения. Число поражений, в соответствии с системой оценок ВОЗ, зависело от дозы и варьировало от легкой степени (10^5 PFU) через умеренную (10^6 PFU) до тяжелой (10^7 PFU). У инфицированных животных отмечалось значительное повышение числа белых кровяных телец, но этот показатель не зависел от дозы. Наблюдалось зависимое от дозы снижение числа тромбоцитов, самый низкий показатель отмечался в дни 2–8, но затем число тромбоцитов восстанавливалось до нормального уровня. При более низких дозах вируса легочная функция нарушалась незначительно. У всех животных был несильный жар ($<38,3$ °C) к дням 3–4. Поксвирусные поражения вначале обнаруживались между днями 4 и 5, затем их размер увеличивался до дней 10–12, и впоследствии у выживших животных они исчезали в течение двух недель. У животных, инфицированных летальными дозами (10^7 PFU или выше), было более 1500 поражений. Вирусные нагрузки в крови, измерявшиеся в геномах на миллилитр цельной крови методом количественной полимеразной цепной реакции (PCR), можно было

обнаружить через 24 часа после инфицирования, и они увеличивались до уровня, превышающего 10^7 геномов/мл, перед смертью. Вирусные нагрузки у выживших животных – у животных, которым давали пониженные инфекционные дозы, или у животных, которых успешно лечили противовирусными химиотерапевтическими средствами или вакцинацией, – никогда не превышали уровня 10^6 геномов/мл. Отмечено снижение уровня альбумина, степень снижения зависела от дозы, уровень альбумина падал до 15 мг/мл у обезьян, инфицированных дозой 10^7 PFU, в то время как общий сывороточный белок оставался в пределах нормы.

Модель ВВ-заражения МРХВ использовали для оценки эффективности вакцины-кандидата против натуральной оспы, приготовленной на основе сильно ослабленного модифицированного vaccinia вируса Ankara (MVA). В этом исследовании вакцину MVA сравнивали и использовали в комбинации с лицензированной вакциной Dryvax (Earl et al., 2004). Обезьян вакцинировали MVA или Dryvax. Во время недели 8 MVA-иммунизованных обезьян повторно вакцинировали MVA или Dryvax и затем, во время недели 16, внутривенно заражали МРХВ. В контрольной плацебо-группе у животных образовалось более 500 оспенных поражений и они тяжело заболели; две обезьяны из шести умерли. В то же время ни одна из обезьян, получивших Dryvax или MVA/Dryvax, не заболела; обезьяны в MVA/MVA группе оставались здоровыми, но у них в среднем образовалось по 16 кожных поражений. Ни у одной из вакцинированных обезьян не развилась значительная виремия, что было установлено методом количественной PCR (Kulesh et al., 2004), в отличие от контрольной плацебо-группы, в которой титры вируса в крови животных были выше 10^8 геномов/мл. Когда обезьян иммунизовали, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа было установлено, что MVA индуцировал более высокие титры в течение 10 дней после иммунизации, чем Dryvax. Для того чтобы определить, является ли иммунный ответ на MVA достаточным, чтобы обеспечить защиту в такие ранние сроки, обезьяны были иммунизованы однократной дозой MVA или Dryvax и заражены на 10 день. В отличие от контрольной группы, в которой животные тяжело заболели и у каждого из них было более 500 кожных поражений, ни один из реципиентов MVA или Dryvax не заболел; в обеих группах образовались изолированные поражения (от трех до шести на животное). Как MVA, так и Dryvax ограничили вирусную репликацию до титров, более низких, чем искусственная виремия, создаваемая внутривенным инфицированием МРХВ. Как показали исследования по оценке эффективности вакцин, в которых Dryvax сравнивали с VACV, полученным из клеточной культуры, Dryvax обеспечил надежную защиту от аэрозольного заражения МРХВ (Jahrling, 2002). Позднее было показано, что MVA обеспечил надежную защиту от летальных МРХВ-заражений, осуществлявшихся по респираторному пути, макакам *cynomolgus* (Stittelaar et al., 2005).

Обезьян резус использовали в аналогичных моделях ВВ-заражения в целях оценки стратегии ДНК-вакцин в комбинации с четырьмя генами VACV (*L1R*, *A27L*, *A33R* и *B5R*); результаты оказались многообещающими (Hooper et al., 2004). Недавно эти гены были экспрессированы в альфавирусном репликоне, и также были получены многообещающие результаты (Hooper et al., 2009).

Модели ВВ-заражения были восприняты довольно неохотно на том основании, что заражение должно происходить по "естественному" пути. Контраргумент, который выдвигается в связи с высказанными опасениями, состоит в том, что защита против чрезмерной ВВ-дозы является очень точным критерием и может прогнозировать эффективность противодействия инфекции посредством использования периферических путей. Однако в связи с этими опасениями, а также в связи с тем, что ВВ-заражение устанавливает слишком высокий барьер для оценок противовирусных

лекарств, изучаются альтернативные модели экспозиции, в том числе интратрахеальные пути. Поскольку кривая доза-ответ очень крутая, преимущество ВВ-введения вируса в том, что оно позволяет калибровать дозу инокулята. Для аэрогенного и мукозного путей экспозиции требуются большие количества животных.

Несмотря на эти ограничения, ВВ-модель МРХV использовали для демонстрации эффективности ряда противовирусных лекарств-кандидатов, включая цидофовир (Wei et al., 2009) и ST-246 (Jordan et al., 2009); эти исследования выходят за пределы круга тем, рассматриваемых в настоящей главе.

В последнее время исследовались альтернативные приматы-модели с использованием других способов ОРV-заражения. Одним из многообещающих подходов является СРХV инфицирование игрунок (*Callithrix jacchus*) (Kramski et al., 2010). Игрунки летально инфицируются такими низкими дозами СРХV, как 5×10^2 PFU, путем интраназального введения, и у них происходит прогрессирование признаков, напоминающих натуральную оспу. Несмотря на то что игрушки более отдалены от человека, чем макаки, а необходимые иммунные реактивы пока недостаточно доступны, этот вид весьма перспективен и может быть использован для разработок моделей в будущем.

Для того чтобы убедительно продемонстрировать защитную эффективность вакцин и противовирусных лекарств для лечения натуральной оспы, необходимы животные модели, в которых VARV вызывает болезнь, подобную натуральной оспе человека (USFDA, 2002, 2008, 2009). Если принять во внимание видовую специфичность VARV, неудивительно, что попытки инфицировать и вызвать болезнь с применением VARV у грызунов и кроликов были безуспешными (Marennikova, 1979). Действительно, даже у приматов ранние эксперименты с VARV вызвали легкие, но самокупирующиеся инфекции. У макак *супомолгус*, подвергшихся воздействию аэрозолей, содержащих 2×10^8 пустилообразующих единиц, появлялась сыпь после 6-дневного инкубационного периода; вирус реплицировался в легких, а до виремии вторичные участки репликации были выявлены в лимфатических узлах (Hahn, 1961). В том же исследовании (Westwood et al., 1966) экспозиции подверглись 109 обезьян резус; у всех возник жар к дню 5, а между днями 7 и 11 появилась сыпь, но только две обезьяны умерли. Макаки Bonnet (*Macaca radiata*) тоже были резистентны к болезни после инфицирования (Rao et al., 1968); ни один из 14 не умер. Однако те же авторы установили, что после лечения кортизоном обезьяны становятся восприимчивыми к болезни; 14 из 16 животных умерли, в том числе одна нелечившаяся, но беременная обезьяна. В человеческих популяциях после инфицирования натуральной оспой у беременных женщин отмечались наивысшие показатели смертности (Rao et al., 1963).

Таким образом, исторические данные позволяют сделать вывод, что для патогенеза VARV у человека нет подходящих моделей (US Institute of Medicine, 1999). Однако известно, что инфицирование макак вызывает кожные поражения и признаки системной инфекции, а примат-модель была использована для лицензирования MVA в Германии в 1960-е годы (Hochstein – Mintzel et al., 1975). Таким образом, целесообразно было провести тестирование других штаммов VARV с применением более высоких доз и разных способов экспозиции, с тем чтобы попытаться найти модель для летальной натуральной оспы. Аэрозольная экспозиция обезьян *супомолгус* к штаммам VARV Yamada или Lee ($10^{8.5}$ PFU) вызвала инфекцию, но не серьезное заболевание (LeDuc & Jahrling, 2001); однако когда обезьяны подверглись экспозиции к штаммам VARV Harper или India 7124 посредством внутривенного инфицирования, это привело к острой летальности (Jahrling et al., 2004). Дозы, более низкие, чем 10^9 PFU,

вызывали более низкую летальность, и количественные параметры, характеризующие тяжесть болезни, с уменьшением дозы тоже снижались.

У обезьян, умирающих после VARV-инфекции, поражения в конечной стадии были сходны с терминальной фазой человеческой натуральной оспы. Наши представления о патофизиологии натуральной оспы человека неточны, поскольку болезнь была ликвидирована до разработки современных инструментов вирусологии и иммунологии. Однако приматы в качестве моделей могут побудить к проведению повторных исследований архивных видов с использованием современных методов, таких как иммуногистохимическое исследование и цДНК-микрочип, которые применялись в исследованиях с приматами в качестве моделей (Jahrling et al., 2004; Rubins et al., 2004). Недавний обзор всех сообщений по патологии, опубликованных на английском языке за прошедшие 200 лет (Martin, 2002), позволяет сделать вывод, что в большинстве случаев здоровые в других отношениях пациенты, умершие от натуральной оспы, погибали из-за почечной недостаточности, шока, вызванного истощением объема жидкости, и затруднений с оксигенацией (насыщением кислородом) и вентиляцией, обусловленных вирусной пневмонией и дыхательной недостаточностью соответственно. Дегенерация гепатоцитов могла до некоторой степени ослабить здоровье, но печеночная недостаточность обычно не являлась причиной смерти.

Поражения, появляющиеся в последней стадии болезни у обезьян, инокулированных VARV, очень сходны с соответствующей патологией человека (Jahrling et al., 2004). После экспериментального заражения ряд параметров можно было оценивать в промежуточных временных точках до наступления смерти. У обезьян, инокулированных внутривенно, отмечалась выраженная искусственная виремия сразу после инокуляции. После продолжавшейся несколько дней эклипс-фазы вирус в крови был связан только с моноцитарными клетками. У умерших животных были выявлены глубокий лейкоцитоз, тромбоцитопения и повышенные уровни сывороточного креатинина. Высокие вирусные нагрузки в тканях-мишенях были сопряжены с дисфункцией органов и мультисистемной недостаточностью. Распределение вирусных антигенов (определявшееся методами иммуногистохимии) коррелировало с присутствием реплицирующих вирусных частиц (определение с помощью электронной микроскопии) и с патологией в лимфоидных тканях, коже, слизистой оболочке полости рта, желудочно-кишечном тракте, репродуктивной системе и печени. Гистологические данные, свидетельствовавшие о тенденции к кровоточивости, подтверждались повышенными уровнями D-димеров. В лимфоидной ткани происходил апоптоз T-клеток, вероятно, вызванный репликацией вирусов в макрофагах и сопутствующим увеличением концентрации цитокинов. "Токсемия", описываемая клиницистами как заключительное событие в развитии натуральной оспы человека, вероятно, является следствием сверхстимуляции врожденного иммунного ответа, с включением интерлейкина-6 и IFN- γ – так же, как это происходит при прямом вирусном поражении тканей-мишеней.

Образцы периферической крови обезьян анализировали с помощью цДНК-микрочипов, предназначенных для исследования типов генной экспрессии у человека (Rubins et al., 2004). VARV демонстрировал ярко выраженные и скоординированные во времени типы генной экспрессии (особенности, характерные для IFN-ответа), пролиферацию клеток и иммуноглобулиновую экспрессию, которые коррелировали с дозой вируса и модуляцией иммунного ответа хозяина. Удивительно, но ответ "фактор некроза опухоли – α – ядерный фактор каппа В (NF- κ B)" фактически отсутствовал; можно предположить, что генные продукты VARV могут нейтрализовать этот ответ.

Взаимодействие VARV с иммунной системой человека можно только приближенно (аппроксимативно) изучать на обезьянах-моделях, но экстраполяция от приматов к человеку менее сомнительна, чем экстраполяция от грызунов к человеку. Вопрос о том, является ли MPXV в обезьянах лучшей моделью для натуральной оспы человека, чем VARV в обезьянах, находится в центре внимания интенсивного исследования. Использование обеих примат-моделей может способствовать углубленной разработке диагностических, профилактических и терапевтических стратегий.

5.3 Заключение

Общепризнанно, что приматы в качестве моделей как для MPXV, так и для VARV воспроизводят некоторые, но не все характерные признаки болезни человека. ВВ-инфицирование этими вирусами вызывает последовательность клинических проявлений болезни, которая сходна с течением болезни у человека (Bremm & Henderson, 2002), хотя у обезьян болезнь протекает быстрее в связи с отсутствием продромального периода. Как и у человека, после вторичной вирусемии повышение температуры тела сопровождается появлением пятен, папул, везикул, пустул и, наконец, корок, если пациент не умирает от болезни. Течение экспериментальной болезни может быть продлено снижением дозы ВВ-инокулята; 10-кратное уменьшение дозы снижает летальность со 100% до примерно 33% и увеличивает среднее время дожития до смерти. Хотя 33-процентная смертность от VARV является показателем, более приближенным к ситуации с заболеванием человека, использование этой модели для оценок эффективности должно опираться на суррогатные конечные показатели, а не на снижение смертности. В настоящее время суррогатные конечные показатели включают снижение вирусемии и числа оспенных поражений, которые являются приближенной мерой тяжести болезни. Необходимо дополнительное время для разработки панели суррогатных конечных показателей, которые будут более точно отражать патофизиологию болезни и процесс выздоровления. В числе таковых могут быть панели биомаркеров и паттерны белковой экспрессии геномного размера в сочетании с методами медицинской визуализации, включая магнитно-резонансную томографию, позитрон-эмиссионную томографию, однофотонно-эмиссионную компьютерную томографию и компьютерную томографию.

Дополнительные инвестиции в усовершенствованные приматы-модели следует начинать вкладывать после того, как будут тщательно проанализированы данные предшествующих экспериментов. В число последних входят эксперименты, проводившиеся с пониженными дозами вируса, который вводили альтернативными путями, а именно посредством аэрозольной, интрабронхиальной, интратрахеальной и капельной экспозиции.

Вероятно, ни одна комбинация условий не приведет к получению модели, которая будет одновременно отвечать всем критериям идеальной модели инфекции натуральной оспы. Могут потребоваться различные модели для оценки разных показаний. Следует проанализировать значимость патофизиологических данных, полученных в исследованиях с применением телеметрии и методов медицинской визуализации. Если будет установлена целесообразность дополнительных вложений в конкретные модели, особое внимание следует уделить уточнению типов биомаркеров, которые могли бы быть использованы в клинических условиях в качестве сигналов (пусковых механизмов) для раннего вмешательства, таким образом, повысив вероятность успешного вмешательства.

Сокращения

CPXV	вирус оспы коров
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ECTV	вирус эктромелии
IFN	интерферон
IP	интраперитонеальный
BB	внутривенный
MPXV	вирус оспы обезьян
MVA	модифицированный vaccinia вирус Ankara
OPV	ортопоксвирус
PCR	полимеразная цепная реакция
PFU	бляшкообразующая единица
RPXV	вирус оспы кроликов
VACV	вирус осповакцины (vaccinia вирус)
VARV	вирус натуральной оспы
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
WR	Western Reserve – штамм VACV

Справочные материалы

- Adams MM, Rice AD, Moyer RW (2007). Rabbitpox virus and vaccinia virus infection of rabbits as a model for human smallpox. *Journal of Virology*, 81:11084–11095.
- Alcami A, Smith GL (1992). A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell*, 71:153–167.
- Americo JL, Moss B, Earl PL (2010). Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models. *Journal of Virology*, 84:8172–8180.
- Boulter EA, Maber HB, Bowen ET (1961). Studies on the physiological disturbances occurring in experimental rabbit pox: an approach to rational therapy. *British Journal of Experimental Pathology*, 42:433–444.
- Brandt TA, Jacobs BL (2001). Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *Journal of Virology*, 75:850–856.
- Bray M et al. (2000). Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *The Journal of Infectious Diseases*, 181:10–19.
- Breman JG, Henderson DA (2002). Diagnosis and management of smallpox. *The New England Journal of Medicine*, 346:1300–1308.
- Buller RM (1985). The BALB/c mouse as a model to study orthopoxviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 122:148–153.
- Buller RM, Palumbo GJ (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiological Reviews*, 55:80–122.
- Buller RM et al. (2004). Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in a lethal mousepox model. *Virology*, 318:474–481.
- Charatan F (2003). US doctors investigate more than 50 possible cases of monkeypox. *British Medical Journal*, 326:1350.
- Earl PL et al. (2004). Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*, 428:182–185.
- Fenner F (1948). The clinical features and pathogenesis of mousepox (infectious ectromelia of mice). *Journal of Pathology and Bacteriology*, 60:529–552.
- Fenner F et al. (1988). *Smallpox and its eradication*. World Health Organization, Geneva.
- Fine PE et al. (1988). The transmission potential of monkeypox virus in human populations. *International Journal of Epidemiology*, 17:643–650.
- Hahon N (1961). Smallpox and related poxvirus infections in the simian host. *Bacteriological Reviews*, 25:459–476.
- Henderson DA et al. (1999). Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *The Journal of the American Medical Association*, 281:2127–2137.
- Hochstein-Mintzel V et al. (1975). [An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 230:283–297.
- Hooper JW et al. (2004). Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. *Journal of Virology*, 78:4433–4443.

- Hooper JW et al. (2009). Molecular smallpox vaccine delivered by alphavirus replicons elicits protective immunity in mice and non-human primates. *Vaccine*, 28:494–511.
- Hutson CL et al. (2009). A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus. *The Journal of General Virology*, 90:323–333.
- Jahrling P (2002). Medical countermeasures against the re-emergence of smallpox virus. In: Knobler SL, Mahmoud AAF, AM, LA Pray, eds. *Biological threats and terrorism: assessing the science and response capabilities*. National Academy Press, Washington, 50–53.
- Jahrling PB, Zaucha GM, Huggins JW (2000). Countermeasures to the reemergence of smallpox virus as an agent of bioterrorism. ASM Press, Washington, DC.
- Jahrling PB et al. (2004). Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:15196–15200.
- Jezeq Z et al. (1988). Human monkeypox: secondary attack rates. *Bulletin of the World Health Organization*, 66:465–470.
- Jordan R, et al. (2009). ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:1817–1822.
- Khodakevich L, Jezeq Z, Kinzanzka K (1986). Isolation of monkeypox virus from wild squirrel infected in nature. *Lancet*, 1:98–99.
- Knight J (2003). Prairie-dog model offers hope of tackling monkeypox virus. *Nature*, 423:674.
- Kramski M et al. (2010). A novel highly reproducible and lethal nonhuman primate model for orthopox virus infection. *PLoS One*, 5:e10412.
- Kulesh DA et al. (2004). Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the roche LightCycler and the Cepheid smart Cycler platforms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:601–609.
- Lancaster MC et al. (1966). Experimental respiratory infection with poxviruses. II. Pathological studies. *British Journal of Experimental Pathology*, 47:466–471.
- Langohr IM et al. (2004). Extensive lesions of monkeypox in a prairie dog (*Cynomys* sp). *Veterinary Pathology*, 41:702–707.
- LeDuc JW, Jahrling PB (2001). Strengthening national preparedness for smallpox: an update. *Emerging Infectious Diseases*, 7:155–157.
- Lee MS et al. (1992) Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *Journal of Virology*, 66:2617–2630.
- Ligon BL (2004). Monkeypox: a review of the history and emergence in the Western hemisphere. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15:280–287.
- Marennikova SS (1979). Field and experimental studies of poxvirus infections in rodents. *Bulletin of the World Health Organization*, 57:461–464.
- Martin DB (2002). The cause of death in smallpox: an examination of the pathology record. *Military Medicine*, 167:546–551.
- McFadden G (2005a). Gleevec casts a pox on poxviruses. *Nature Medicine*, 11:711–712.
- McFadden G (2005b). Poxvirus tropism. *Nature Reviews Microbiology*, 3:201–213.

- Müllbacher A, Blanden RV (2004). T-cell-mediated control of poxvirus infection in mice. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 36:39–55.
- Müllbacher A et al. (1999). Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:13950–13955.
- Müllbacher A et al. (2004). Can we really learn from model pathogens? *Trends in Immunology*, 25:524–528.
- Perkins S (2003). Monkeypox in the United States. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 42:70, 72.
- Quenelle DC, Collins DJ, Kern ER (2004). Cutaneous infections of mice with vaccinia or cowpox viruses and efficacy of cidofovir. *Antiviral Research*, 63:33–40.
- Rao AR et al. (1963). Pregnancy and smallpox. *Journal of the Indian Medical Association*, 40:353–363.
- Rao AR et al. (1968). Experimental variola in monkeys. I. Studies on disease enhancing property of cortisone in smallpox. A preliminary report. *The Indian Journal of Medical Research*, 56:1855–1865.
- Robbins SJ et al. (2005). The efficacy of cidofovir treatment of mice infected with ectromelia (mousepox) virus encoding interleukin-4. *Antiviral Research*, 66:1–7.
- Rubins KH et al. (2004). The host response to smallpox: analysis of the gene expression program in peripheral blood cells in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:15190–15195.
- Schultz DA et al. (2009). Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus. *Virology*, 383:86–92.
- Smee DF, Bailey KW, Sidwell RW (2001). Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 12:71–76.
- Stabenow J et al. (2010). A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus. *Journal of Virology*, 84:3909–3920.
- Stittelaar KJ et al. (2005). Modified vaccinia virus Ankara protects macaques against respiratory challenge with monkeypox virus. *Journal of Virology*, 79:7845–7851.
- Stittelaar KJ et al. (2006). Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection. *Nature*, 439:745–748.
- Tesh RB et al. (2004). Experimental infection of ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) with monkeypox virus. *Emerging Infectious Diseases*, 10:1563–1567.
- US Department of Health and Human Services (2005). *Possession, transfer, and use of select agents and toxins*. 42 CFR Parts 72 and 73. Federal Register, Volume 70, No.52:13294–13325.
- USFDA (United States of America Department of Health and Human Services Food and Drug Administration) (2002). Guidance for industry. Recommendations for deferral of donors and quarantine and retrieval of blood and blood products in recent recipients of smallpox vaccine (vaccinia virus) and certain contacts of smallpox vaccine recipients. Washington, DC.

- USFDA (United States of America Department of Health and Human Services Food and Drug Administration) (2008). *Animal models — essential elements to address efficacy under the animal rule*. Concept Paper. Washington, DC (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072214.pdf>, last accessed November 2010).
- USFDA (United States of America Department of Health and Human Services Food and Drug Administration) (2009). *Guidance for industry. Animal models – essential elements to address efficacy under the animal rule*.
- US Institute of Medicine (1999). Summary and conclusions. In: *Assessment of future scientific needs for live variola virus*. National Academies Press, Washington, DC, 79–86.
- Wei H et al. (2009). Coadministration of cidofovir and smallpox vaccine reduced vaccination side effects but interfered with vaccine-elicited immune responses and immunity to monkeypox. *Journal of Virology*, 83:1115–1125.
- Wenner HA et al. (1969). Studies on the pathogenesis of monkey pox. II. Dose-response and virus dispersion. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 27:166–178.
- Westwood JC et al. (1966). Experimental respiratory infection with poxviruses. I. Clinical virological and epidemiological studies. *British Journal of Experimental Pathology*, 47:453–465.
- Zaucha GM et al. (2001). The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Laboratory Investigation* 81:1581–1600.

6 Разработка противовирусных лекарств для лечения натуральной оспы – статус низкомолекулярных терапевтических средств

John W Huggins¹ and Nina Tikunova²

¹ Институт медицинских исследований инфекционных заболеваний армии Соединенных Штатов, Форт-Детрик, Соединенные Штаты Америки

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

Представленные оценки, толкования, заключения и рекомендации принадлежат авторам и не обязательно отражают официальную точку зрения Института медицинских исследований инфекционных заболеваний армии Соединенных Штатов, или Отдела оборонных исследований, или Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор".

Резюме

Значение для общественного здравоохранения

Крайне маловероятно, что крупномасштабная вакцинация против натуральной оспы будет проводиться прежде, чем произойдет первая вспышка эпидемии натуральной оспы, поскольку с существующими противооспенными вакцинами сопряжены серьезные, а иногда и летальные случаи заболеваний. Поэтому, если натуральная оспа возникнет повторно, вероятно, будет необходимо лечить большое число больных противовирусными лекарствами, поскольку пройдет некоторое время, прежде чем кампании массовой вакцинации обеспечат населению адекватный защитный иммунитет.

Ранее при осуществлении мер контроля натуральной оспы приходилось полагаться исключительно на вакцинацию и поддерживающее лечение инфицированных больных, вероятность смерти у которых могла составлять 30%. Однако опыт борьбы с недавней эпидемией гриппа H1N1 показал, что и вакцины, и противовирусные лекарства могут играть важную роль в мероприятиях служб общественного здравоохранения, обеспечивая как контроль эпидемии, так и снижение смертности инфицированных больных.

Описываемый в настоящей главе проект был разработан в целях получения двух разрешенных к применению пероральных противовирусных лекарств с различными механизмами действия для лечения клинических случаев натуральной оспы. Необходимо, чтобы эти лекарства получили одобрение ведомств, регулирующих производство и применение лекарственных средств, если их придется использовать во время вспышки эпидемии. Санционирование регулирующих ведомств предоставляет также убедительные доказательства эффективности лекарств, которые необходимы должностным лицам, разрабатывающим стратегии контроля. Поскольку оспа, вызываемая вирусом натуральной оспы, была ликвидирована в результате массовой вакцинации, эффективность этих лекарств может быть продемонстрирована только с помощью животных моделей, а именно, моделей вирус натуральной оспы – инфицированные приматы (кроме человека).

Успехи, достигнутые к настоящему времени

Разработка любых противовирусных терапевтических средств – это долгий и трудоемкий процесс, который оказывался безуспешным в борьбе со многими вирусными инфекциями, включая обычную простуду. Что касается натуральной оспы, то значительный успех был достигнут в начальной стадии открытия лекарств, и для ряда лекарств – потенциальных кандидатов необходима оценка с применением животных моделей.

Три соединения – цидофовир, ST-246 и CMX001, которые ингибируют репликацию вируса натуральной оспы в клеточной культуре и во многих животных моделях (суррогатные ортопоксвирусные модели), получили от Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов Соединенных Штатов (USFDA) статус нового исследуемого препарата, разрешенного к применению в клинических исследованиях (IND); лекарства предназначены для лечения ортопоксвирусных инфекций. Проводятся начальные исследования на человеке. Два из этих соединений (цидофовир и ST-246) продемонстрировали активность в летальной модели приматы – вирус натуральной оспы, а третье соединение является

пролекарством цидофовира, которое можно принимать перорально. Разработка ST-246 и CMX001 продвигается, и продолжаются клинические испытания.

Дополнительная работа, которую необходимо выполнить с живым вирусом натуральной оспы, в целях получения разрешенных к применению противовирусных лекарств для лечения натуральной оспы

Несмотря на то, что к настоящему времени получены многообещающие результаты, обширный опыт промышленного производства лекарственных препаратов позволяет сделать вывод, что менее 35% соединений, с которыми проводятся расширенные испытания по оценке безопасности (USFDA, фаза II), будут лицензированы. Процесс продвижения от стадии IND до применения нового лекарства занимает в среднем от пяти до семи лет.

Поскольку вирус натуральной оспы был ликвидирован в человеческой популяции, традиционные клинические испытания эффективности неосуществимы. Кроме того, невозможно проводить клинические испытания на людях по этическим соображениям, таким образом, для демонстрации эффективности необходимо следовать Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (далее Правила) USFDA (US21CRF310.610). Учитывая неопределенности в Правилах, а также тот факт, что ни одно из противовирусных лекарств в настоящее время не получило одобрения по какому-либо из типов показаний натуральной оспы (лечение или химиопрофилактика), трудно определить, какие понадобятся сроки и какие данные потребуются для регистрации лекарств; ожидается, что необходимые данные должны включать (но не ограничиваться этим) работу с вирусом натуральной оспы. Тщательность проверки данных и уровень критического научного анализа при проведении исследований с использованием животных моделей, которые, как предполагается, призваны подтвердить соответствие критериям Правил, должны быть такими же, как при проведении клинических испытаний на человеке, цель которых – содействовать получению одобрения продуктов по другим типам показаний, с использованием других путей санкционирования.

Получению одобрения в других странах, кроме Соединенных Штатов, сопутствует по меньшей мере такая же неопределенность.

Можно утверждать, что работа с живым вирусом натуральной оспы должна оставаться вариантом выбора до тех пор, пока адекватное количество лекарств с различными механизмами действия не будет зарегистрировано регулирующими ведомствами и не появится возможность их повсеместного применения для борьбы со вспышками эпидемии натуральной оспы.

В заключительной части доклада Института медицины национальных академий под названием "Рассмотрение вопроса о необходимости продолжать исследования живых вирусов натуральной оспы" отмечается, что "наиболее убедительная причина необходимости долговременного сохранения запасов живых вирусов натуральной оспы – это их важнейшая роль в идентификации и разработке противовирусных лекарственных средств, предназначенных для применения в случае крупномасштабной вспышки эпидемии натуральной оспы".

6.1 Введение

Возникающая в естественных условиях натуральная оспа была ликвидирована в результате массовой вакцинации в то время, когда противовирусная терапия переживала "период младенчества". Доступные в то время лекарства, в том числе тиосемикарбазоны метисазон (Марборан) и близкий к нему препарат M&B7714, были неактивны в терапевтических и профилактических испытаниях (Rao, McFadzean & Squires, 1965; Rao, McFadzean & Kamalakshi, 1966; Rao et al., 1966). Эти лекарства были сняты с продажи. Цитозин-арабинозид (ara-C) (Dennis et al., 1974) и аденозин-арабинозид (ara-A) (Koplan et al., 1975) тоже не способствовали снижению смертности. Результаты тех исследований были обобщены в обзоре (Smee & Sidwell, 2003).

Разработка лекарств против натуральной оспы – сложный, длительный и дорогостоящий процесс. Наибольшие успехи в открытии лекарств к настоящему времени достигнуты в университетах, государственных лабораториях и в нескольких небольших фармацевтических компаниях. Разработка терапевтического препарата начинается с открытия соединения, которое избирательно подавляет репликацию вируса в клеточной культуре. На основании этого открытия химики-органики синтезируют аналогичные химические структуры в целях идентификации наиболее активного соединения этого класса. Нередко за этим следует применение методов клинической биохимии, с помощью которых структура соединения подвергается серии последовательных модификаций и оценивается их противовирусная активность, с тем чтобы выявить наиболее сильнодействующее соединение, так называемое лидирующее соединение. В большей части опубликованных работ описываются именно эти начальные этапы.

Лидирующее соединение часто не обладает всеми свойствами желаемого лекарства, такими как низкая токсичность, возможность перорального приема, резистентность к метаболической инактивации, адекватная растворимость и многие другие свойства, которые в совокупности определяют успех лечения. В процессе разработки лекарства клиницист-биохимик должен попытаться модифицировать структуру соединения, чтобы усовершенствовать желательные свойства, например растворимость, устраняя при этом нежелательные свойства, например токсичность, нередко идя на компромисс, принося в жертву действенность лекарства. При проведении комплексных multidisciplinary исследований на животных, осуществлявшихся в соответствии со стандартами надлежащей лабораторной практики (GLP), требовалось понимать метаболизм соединения, фармакокинетику, распределение в тканях и токсичность. Эти свойства должны оцениваться на многих видах с применением серии довольно стандартных тестов, а также в специально заказанных исследованиях, цель которых установить, будет ли соединение безопасным при первоначальном введении в организм человека.

В это время обширная серия оценок, обозначаемая как "микробиологический разрез", должна проводиться на клеточных культурах и животных моделях. Эти оценки позволяют получить информацию о способности соединения ингибировать репликацию вирусов, а также предварительную информацию о способности соединения снижать заболеваемость и смертность, вызываемые болезнью. В совокупности с информацией, полученной в фармакокинетических исследованиях с теми же видами животных, эти исследования позволяют определить минимальную концентрацию, необходимую для проявления активности лекарства, а в сочетании с данными фазы I клинических испытаний на человеке с применением нового

исследуемого препарата (IND) появляется возможность первоначальных оценок соответствующей таргетной дозы для человека.

В Соединенных Штатах для любого введения потенциального лекарства человеку с целью клинической оценки требуется представление заявки на статус IND, которая включает официальное представление описанных выше исследований, плюс предоставление информации о методологии синтеза и о процедурах контроля качества. Осуществление требуемых для получения статуса IND исследований занимает несколько лет и должно завершиться до того, как соединение будет испытываться на человеке. Менее чем на 10–25% соединений, получивших статус IND, в конце концов выдается разрешение на продажу.

Фаза I клинических испытаний на человеке начинается с небольшого количества объектов и концентрации соединения, значительно (по меньшей мере в 10 раз) более низкой, чем концентрация, которая прогнозируется как могущая вызвать токсичность. Концентрацию соединения медленно повышают, в это время производится определение фармакокинетики и распределения лекарства в тканях, и на основании данных доклинических исследований устанавливается адекватный уровень лекарства. Если лекарство-кандидат безопасно в концентрациях, которые прогнозировались как терапевтические, проводится расширенное исследование по оценке безопасности с большим количеством объектов. Наконец, к участию в этих исследованиях привлекаются особые популяции, которые являются кандидатами на проведение лечения, в том числе лица с осложненными соматическими заболеваниями. В случае натуральной оспы, когда было бы нежелательно исключать какую-либо из популяций, в исследовании принимают участие дети, подростки, взрослые и гериатрические популяции, а также лица с заболеваниями, например с болезнями почек или печени, в связи с которыми может быть изменена доза лекарства. В конечном счете для оценки безопасности лекарства потребуется участие сотен объектов (при проведении испытаний на 600 объектах побочный эффект обнаруживается на уровне 1%).

Исторически сложилось так, что данные по эффективности, которые требовало представлять Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов Соединенных Штатов (USFDA) для регистрации лекарства, получали в "хорошо контролируемых" опорных клинических испытаниях на людях. Это требование не может быть удовлетворено в случае лекарств, предназначенных для лечения высокопатогенной болезни, какой является натуральная оспа. Чтобы решить эту проблему, USFDA опубликовало документ, который обычно называют Правила (USFDA, 2009). Эти Правила разрешают демонстрировать эффективность лекарства, используя животную модель (или модели), которая адекватно воспроизводит важнейшие аспекты болезни и в которой аналогичное снижение тяжести заболевания у человека будет сопровождаться снижением заболеваемости и/или смертности. Однако это создает несколько дополнительных проблем при разработке лекарства. Установление эквивалентной целевой дозы лекарства для человека и вида животного, используемого для оценки эффективности, становится более ответственным, поскольку это определяет выбор дозы для человека. Экстраполяция терапевтического окна между человеком и используемыми в последнее время моделями вирус натуральной оспы (VARV) – приматы тоже затруднительна, и при применении существующих моделей возможно занижение последнего срока, когда может быть начато лечение, что обусловлено сложностью модели.

Что касается натуральной оспы, то целью эффективного терапевтического лечения является снижение смертности, если лечение началось после появления кожных

поражений (единственный практически применяемый диагностический признак в период крупных эпидемий). Это исключает лекарства, которые снижают только заболеваемость, а особенности существующих моделей VARV-инфицирования диктуют необходимость предъявления более жестких требований к разрабатываемым лекарствам.

Помимо ограниченных исследований в двух Сотрудничающих центрах Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (Центры контроля заболеваний и профилактики в Соединенных Штатах и Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" в Российской Федерации) разработка лекарств против VARV проводится на суррогатных вирусах в связи с ограниченным доступом к VARV и трудностями, возникающими при проведении таких исследований в условиях, требующих обеспечения биобезопасности уровня 4 (BSL-4). Большая часть работы проводилась с близкородственными суррогатными вирусами – вирусом vaccinia (VACV) и вирусом оспы коров (CPXV), также проводился дополнительный скрининг с применением вируса эктромелии (ECTV) и вируса оспы кроликов (RPXV). Эти вирусы характеризуются более низкой биологической опасностью, и с ECTV и RPXV можно работать в условиях BSL-2. Высокоактивные соединения оцениваются затем в экспериментах с вирусом оспы обезьян (MPXV), и значительно меньше число оценивается в экспериментах с VARV.

Многие лаборатории внесли свой вклад в попытки открыть противовирусные соединения, активные в отношении ортопоксвирусов (OPV). В 2009 году поиск в PubMed по терминам "ортопоксвирусы (OPV)" и "противовирусный" выявил 1041 публикацию. В большинстве из них речь идет о предварительных попытках выявления лекарственных соединений – во многих при предварительном *in vitro* скрининге использовали VACV (De Clercq, 2001). Другие группы традиционно включают CPXV; в результате исследования, проводившегося в Институте медицинских исследований инфекционных заболеваний армии Соединенных Штатов (USAMRIID), в ходе которого прошли испытание более 500 соединений, был сделан вывод, что среди вирусов, с которыми можно работать в условиях BSL-2, CPXV позволяет наиболее точно прогнозировать активность VARV (Huggins, неопубликованное наблюдение, 2003). Многие опубликованные данные были проанализированы рядом авторов в обзорах (Goebel et al., 1982; Bray et al., 2000; De Clercq, 2001; Baker, Bray & Hugins, 2003; Keith et al., 2003; Kern, 2003; Smee & Sidwell, 2003; De Clercq et al., 2005; Smee, 2008), и читателям рекомендуется обратиться к этим обзорам для получения подробных сведений о конкретных соединениях. Эти авторы обращают внимание на активность ряда классов соединений, часто группируя их по предполагаемым механизмам действия.

6.2 Открытие лекарственных препаратов

OPV – это крупные линейные вирусы с двухцепочечной ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислотой), которые реплицируются исключительно в цитоплазме с участием ряда кодируемых вирусами ферментов, осуществляющих репликацию ДНК. Сложный механизм репликации OPV позволяет использовать его в качестве ряда мишеней для терапевтического вмешательства. В геноме OPV высококонсервативная центральная часть кодирует механизмы, необходимые для репликации вирусов; два конца, отличающиеся большей вариабельностью, кодируют белки, которые влияют на вирулентность и круг хозяев. Геном VARV, вируса, вызывающего натуральную оспу, кодирует большое количество белков, которые подавляют способность хозяина распознавать инфекцию и индуцировать механизмы, обычно позволяющие человеку бороться с инфекцией. Механизмы, участвующие в репликации вирусов – наиболее

часто используемая мишень при разработке противовирусных лекарств, и они очень консервативны среди OPV, что позволяет использовать суррогатные вирусы, например VACV и CPXV при начальном скрининге лекарственных средств. Кроме того, вирусная ДНК-полимераза демонстрирует значительное сходство последовательностей в активном участке с другими ДНК-содержащими вирусами, включая вирус герпеса.

6.2.1 Тиосемикарбазоны

Тиосемикарбазоны были первым классом лекарств, обнаруживших активность в отношении OPV (Baier, 1955); применение метисазона для лечения натуральной оспы обсуждается в разделе 6.1. Метисазон демонстрировал умеренную противовирусную активность в отношении VARV в анализах, основанных на оценке 50-процентного ингибирования (Baker, Bray & Huggins, 2003), но был способен вызвать 80-процентное ингибирование репликации только в наибольшей переносимой концентрации (Huggins, неопубликованное наблюдение, 2003). Была проведена оценка большого количества близких соединений *in vitro*, и несколько соединений испытывались на мышинных моделях, обнаружив при этом умеренную активность, но ни одно из этих соединений не было отобрано для последующих испытаний на приматах.

6.2.2 Оценка зарегистрированных и новых исследуемых лекарств

Активность лекарств, зарегистрированных в последнее время Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов Соединенных Штатов, систематически оценивалась *in vitro* в опытах с VACV и CPXV (Kern, 2003). В их число входят лекарства, активные в отношении вирусов герпеса, вируса гепатита В (ДНК-содержащие вирусы) и в отношении вируса иммунодефицита человека (РНК- [рибонуклеиновая кислота] содержащий вирус); нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы и ингибиторы протеазы; и несколько соединений со статусом IND. Многие активные соединения также оценивались в экспериментах с VARV и MPXV (Goebel et al., 1982; Baker, Bray & Huggins, 2003). Kern et al. (2002) идентифицировали несколько соединений с релевантной активностью, включая ранее известные цидофовир и адефовир-дипивоксил (bis-POМ PMEА); однако Baker, Bray & Huggins (2003) установили, что последнее соединение менее активно. Два лекарства местного применения, идоксуридин и трифлуридин, были активны, но их нельзя было принимать перорально из-за их токсичности. Библиотека соединений, включающая большую часть зарегистрированных лекарств, оценивалась без идентификации дополнительных лекарств-кандидатов (Huggins, неопубликованные данные из программы скрининга USARMIID, 2005).

6.2.3 Ациклические нуклеозидные фосфонаты

Ациклические нуклеозидные ингибиторы ДНК-полимеразы, такие как ацикловир, пенцикловир и ганцикловир и их пероральные пролекарства, были впервые разработаны для борьбы с вирусами герпеса. Они должны пройти этап фосфорилирования кодируемыми вирусами тимидинкиназой или протеинкиназой, и затем следует фосфорилирование внутриклеточными киназами с образованием активного трифосфатного противовирусного соединения. Тимидинкиназа цитомегаловируса человека (HCMV) была неспособна фосфорилировать эти соединения, в связи с этим был разработан класс ациклических нуклеозидных фосфонатов. Они были эквивалентны нуклеозидным монофосфатам, но демонстрировали свойства химически резистентных фосфонатов, которые не

распознавались фосфатазами, ферментами, обычно удаляющими монофосфаты, циркулирующие в кровотоке. Ключом к решению проблем стало замещение Р-С фосфонатной связи, не расщепляемой внутриклеточными гидролазами, лабильной Р-О-С связью (De Clercq, 2003; Helliot et al., 2003; Keith et al., 2003). Что касается HCMV, OPV-тимидинкиназа не фосфорилирует ациклические нуклеозиды, но цидофовир (HPMPC) и его циклический аналог циклический HPMPC были активны *in vitro* в отношении всех испытанных OPV, включая VARV (Baker, Bray & Huggins, 2003). Цидофовир был первым соединением, продемонстрировавшим защитные свойства в модели VARV-инфицирования приматов, а также в многочисленных моделях с мелкими животными (см. перечень в таблице 3 в работе Smeets, 2008). Внутривенный (VV) цидофовир (Вистид) разрешено применять для лечения HCMV-ретинита, применяемая доза – 5 мг/кг один раз в неделю; его современный статус обсуждается в разделах 6.5 и 6.9.

Проблемы потребления цидофовира, который поглощается посредством пиноцитоза и требует болюсного введения доз, сопряженного с риском нефротоксичности, были решены когда Hostetler и его коллеги синтезировали липидные производные цидофовира (Painter & Hostetler, 2004). Липидные аналоги использовали хиломикронный путь для эффективного поглощения и были биологически доступны при пероральном приеме (Kern et al., 2002; Keith et al., 2004; Painter & Hostetler, 2004; Beadle et al., 2006; Lebeau et al., 2006). Оценивались большие серии липидных аналогов, и гексадецилоксипропил-цидофовир, позднее переименованный в CMX001, был отобран для проведения дальнейших испытаний на более высоком уровне (см. Таблицу 4 в публикации Smeets, 2008, в которой представлен неполный перечень опубликованных результатов оценок). Данные о CMX001 рассматриваются отдельно в разделах 6.6 и 6.9.

6.2.4 Ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы

В число ингибиторов инозинмонофосфатдегидрогеназы входит рибавирин, первый нуклеозидный аналог широкого спектра действия (Sidwell et al., 1972). Рибавирин наряду с несколькими другими представителями этого класса соединений активен *in vitro* в отношении VACV в опытах на мышах и RPXV в опытах на кроликах. Однако рибавирин не обеспечивал никакой защиты в моделях инфицирования приматов MPXV (Huggins, неопубликованные наблюдения, 2001), когда его вводили профилактически с применением дозы, способов и графика введения препарата, которые обеспечивали приматам защиту против инфицирования вирусами Junin (McKee et al., 1988) и Lassa (Jahrling et al., 1980; Stephen & Jahrling, 1979). Новейшие аналоги – FICAR, EICAR, тиазофурин (активен в отношении VARV *in vitro*) и селаназол – продемонстрировали активность в отношении CPXV, которым инфицировали мышей (Huggins, неопубликованное наблюдение, 2003), но их не испытывали на приматах (применение рибавирина в опытах с приматами оказалось безуспешным), и их эффективность, по-видимому, представляется маловероятной.

6.2.5 Ингибиторы S-аденозилгомоцистеингидролазы

Предполагается, что ингибиторы S-аденозилгомоцистеингидролазы подавляют OPV, блокируя специфический этап в кэп-метилировании (кэппирование м-РНК под воздействием фермента), необходимый для репликации вируса (см. рисунок 4 [De Clercq, 2001], структурные формулы). Два представителя этого класса – 3-деазанепланоцин А и карбоциклический 3-деазанепланоцин-А – были в числе наиболее активных ингибиторов VARV (Baker, Bray & Huggins, 2003) и

продемонстрировали активность в отношении интраназальной CPXV-инфекции (Baker, Bray & Huggins, 2003). Несмотря на то, что в этой инфекционной модели была установлена умеренная активность обоих соединений (Huggins, неопубликованные данные, 2003), их дальнейшая оценка не проводилась.

6.2.6 Ингибиторы оротидин-5'-монофосфатдекарбоксилазы

Пиразофурин, прототип ингибиторов оротидин-5'-монофосфатдекарбоксилазы – одно из наиболее активных противовирусных соединений *in vitro*, однако он токсичен для животных. Многочисленные попытки специалистов в области клинической биохимии отделить противовирусную часть молекулы от токсической части оказались безуспешными. В итоге это соединение следует рассматривать как противораковое лекарство, но обладающее высокой токсичностью (Huggins, неопубликованные данные из программы скрининга USAMRIID, 2001).

6.2.7 Ингибиторы тимидилатсинтазы

Хотя VACV не кодирует тимидилатсинтазу, ингибиторы тимидилатсинтазы, а именно 5-замещенные 2'-дезоксинуридиновые соединения (см. рисунок 9 [De Clerck, 2001], структурные формулы и таблицу 1 [De Clerck, 2001], данные по *in vitro* активности), продемонстрировали активность в отношении VACV-инфицирования мышей, осуществленного скарификацией хвоста. Быстрый катаболизм с образованием неактивных метаболитов ограничивает потенциал 5-иоддезоксинуридина и близких к нему соединений. Однако недавно полученный 4'-тиоаналог (SRI-21950) решил проблему метаболической нестабильности и оказался превосходным средством защиты мышей от инфекций VACV и CPXV (Kern et al., 2009).

6.2.8 Соединения, блокирующие определенные стадии сборки вирусов

В число соединений, блокирующих определенные стадии сборки OPV, входят рифампин и N₁-изоникотиноил-N₂-3-метил-4-хлорбензоилгидразин (IMCBH). Рифампин взаимодействует с полипептидом в 65 килодальтон, кодируемым геном VACV *D13L* (Sodeik et al., 1994), а IMCBH воздействует на белок в 37 килодальтон, кодируемый геном VACV *F13L*, который является компонентом внешней оболочки внеклеточных оболочечных вирусов (EEV) или внеклеточных вирусов (Schmutz et al., 1991). Рифампин действует, блокируя образование первой инфекционной формы вируса, называемой внутриклеточным зрелым вирусом (IMV), или зрелым вирусом, таким образом, что никакого инфекционного потомства не образуется. Напротив, IMCBH действует, предотвращая заключение IMV-частиц в двухслойную клеточную мембрану, образовавшуюся либо из сети транс-Гольджи, либо из ранних эндосом, которые были модифицированы инсерцией нескольких вирусных белков. Несмотря на то что блокирующий вирусный морфогенез на этой стадии не предотвращает образование инфекционных IMV-частиц, он препятствует транспорту вируса из клетки и в значительной степени уменьшает распространение, которое обусловлено EEV или внеклеточными вирусами.

ViroPharma и USAMRIID использовали очень простой метод отбора с высокой пропускной способностью для скрининга одной трети из миллиона соединений в их библиотеке соединений, идентифицировав несколько классов активных агентов. Активные соединения оценивались в отношении MPXV. В конце концов благодаря интенсивным исследованиям специалистов в области клинической биохимии (Bailey et al., 2007) было отобрано ограниченное число кандидатов, среди которых был проведен скрининг соединений, активных в отношении VARV (Yang et al., 2005). Для разработки

на более высоком уровне был отобран ST-246. Неполный список животных моделей, в которых ST-246 продемонстрировал защитные свойства, представлен в обзоре Smees (см. таблицу 4 в Smees, 2008). Дальнейшие успехи в разработке этого соединения описаны в разделах 6.7 и 6.9.

6.2.9 Киназы Abl семейства

Гливек (gleevec), зарегистрированный в качестве средства для лечения хронического миелогенного лейкоза человека, блокирует регресс (выход) OPV из клеток. После инфицирования мышей дозой VACV, индуцирующей 70-процентную смертность, этот препарат обеспечивал защиту от инфекции и вызывал снижение титра VACV в яичниках в 100 тыс. раз. Хотя это не является строгим тестом на противовирусную активность, полученные данные позволяют предположить, что целесообразно провести дополнительную оценку гливека и близких к нему соединений (McFadden, 2005; Reeves et al., 2005).

6.2.10 Иммунобиологические препараты

Выделенный из организма человека vaccinia-иммунный иммуноглобулин применяется для профилактики и лечения ряда поствакцинальных осложнений. Однако поскольку он обладает всеми недостатками препарата, полученного из донорской крови, предпочтительнее использовать специфические человеческие анти-OPV рекомбинантные антитела, особенно полностью человеческие рекомбинантные (или моноклональные) антитела. В целях их получения переменные домены человеческих антител, обладающих требуемой активностью, комбинируются с постоянными доменами человеческих иммуноглобулинов необходимого изотипа. Решающий этап в разработке полностью человеческих рекомбинантных антител – это отбор переменных доменов, ответственных за специфичность антител, сродство и биологические свойства. Один из способов получить их – это отбор переменных доменов из входящих в объединенную библиотеку фагов миниантител с использованием штаммов VARV Ind3a и Butler. В дальнейших исследованиях 34 антитела, сконструированных в центре "Вектор", были тестированы на способность нейтрализовать инфекционность штаммов VARV Ind3a и Butler, и было установлено, что пять scFv-антител способны нейтрализовать VARV (Tikunova, неопубликованные данные, 2006). Также было установлено, что полностью человеческие антитела, сконструированные на основе переменных доменов четырех scFv-антител, связывают VARV и другие OPV и нейтрализуют VARV в клеточной культуре. Необходимо провести оценку этих антител на животных моделях с VARV-инфекцией.

6.2.11 Разнообразные соединения

Серия аналогов аденозин-N1-оксида с активностью в отношении VACV – как *in vitro*, так и при последующем инфицировании мышей посредством скарификации хвоста (Kwong et al., 1998) – оценивалась в экспериментах с VARV и VACV *in vitro* (Huggins, неопубликованные данные, 2002). Корреляция между активностью в отношении VACV и активностью в отношении VARV была низкой. Если при отборе соединения для дальнейшей разработки использовать только его активность в отношении VACV, следует отобрать соединение, которое в 40 раз менее активно, чем соединение, которое наиболее активно в отношении VARV. Это яркий пример того, насколько рискованно с излишней уверенностью полагаться на данные экспериментов с суррогатными вирусами, если только не установлено, что мишени идентичны.

6.2.12 Соединения, структура которых не будет установлена до проведения дальнейших разработок

В начальных этапах идентификации соединений с активностью в отношении OPV участвовали ряд финансируемых государством лабораторий (Национальные институты аллергии и инфекционных болезней, USAMRIID и "Вектор"), осуществляя скрининг больших количеств соединений в отношении суррогатных OPV, и оба Сотрудничающих центра ВОЗ провели скрининг нескольких тысяч соединений, активных в отношении VARV, используя *in vitro* анализ, базирующийся на использовании клеточных культур. О результатах скрининговых анализов сообщали в Консультативный комитет ВОЗ по исследованию вируса натуральной оспы во время ежегодных заседаний (ВОЗ, 2001, 2002). Большая часть соединений не обнаруживала значительной активности, и их дальнейшая оценка не проводилась. Многие соединения, активность которых в отношении VARV оценивалась вначале, были обозначены по идентификационному номеру поставщика, а не описывались как принадлежащие к определенному химическому классу. Структуры всех соединений, изучавшихся на животных моделях с VARV, были установлены, в том числе структуры всех трех соединений, которые находятся в клинической разработке. Хотя патентная защита в каждой стране имеет свои отличия, как правило, она длится только на протяжении фиксированного количества лет, и в некоторых странах отсчет времени начинается с первого публичного раскрытия структуры соединения. Это может привести к нежелательным последствиям, например к трудностям в разработке соединения, которое не имеет отчетливой патентной защиты. Подобные опасения иногда приводят к тому, что в практике промышленного производства структура соединений, находящихся в стадии разработки, не раскрывается вплоть до самого начала клинических испытаний на человеке (Huggins, неопубликованные данные; Институт медицины США, 2009).

6.2.13 Основанный на открытиях в молекулярной биологии метод ингибирования репликации вирусов, например с использованием РНК-интерференции

РНК-интерференция – это механизм, который клетка обычно использует для регулирования экспрессии гена, включая супрессию чужеродной РНК (Fire et al., 1998). Практическое применение этого механизма для ингибирования репликации вирусов станет осуществимым только после разработки систем доставки, которые сделают возможной РНК-интерференцию, и короткие интерферирующие РНК не будут инактивированы в кровотоке в процессе доставки к клеткам-мишеням (Nguyen et al., 2008). Недавно Alkhalil et al. (2009) описали ингибирование MPXV посредством РНК-интерференции. Эта новая область исследований быстро расширяется и, по всей вероятности, обеспечит создание следующего поколения противовирусных лекарств.

6.3 Приматы в качестве животных моделей для изучения возбудителей натуральной оспы и оспы обезьян

Разработка приматов-моделей для VARV-инфицирования оказалась затруднительной. В ранних исследованиях в 1960-е годы не были получены приемлемые модели (Hahon & Wilson, 1960; Hahon, 1961; Hahon & McGavran, 1961; Lancaster et al., 1966; Westwood et al., 1966), вероятно, это обусловлено тем, что в естественных условиях VARV инфицирует только человека. Нет никаких свидетельств инфицирования приматов кроме человека в природных условиях, и экспериментальные модели с приматами кроме человека могли быть разработаны только посредством ВВ (внутривенной) инокуляции дозой, в 100 тыс. раз превышающей расчетную дозу для человека.

Для изучения развития натуральной оспы у животных были разработаны две модели ВВ-инфицирования обезьян сунпомолгус штаммами VARV. У людей степень (число кожных поражений) образования сыпи, характерной для натуральной оспы и оспы обезьян, коррелирует с тяжестью болезни. Система оценок ВОЗ распределяет тяжесть заболевания по категориям на основании количества оспенных поражений – стандартизованная категория "тяжелая" степень заболевания ассоциируется с высокой смертностью, тогда как "легкая" или "умеренная" категории обычно ассоциируются с нелетальным заболеванием (Jahrling & Huggins, 2005). Посредством ВВ-инфицирования дозой, превышающей 10^7 бляшкообразующих единиц (PFU) MPXV, была получена летальная модель, которая с достаточной точностью воспроизводила характеристики заболеваний, протекающих с кожными высыпаниями – натуральной оспы и оспы обезьян. В аналогичных исследованиях инфицирование дозой 10^8 PFU (2×10^9 геномов) штамма VARV Harper вызвало сходное заболевание с высыпаниями у обезьян сунпомолгус – с образованием более 1000 поражений (тяжелая категория по системе оценок ВОЗ) и 33-процентной смертностью (дни 11 и 13) – такую же смертность вызывала натуральная оспа человека. Увеличение дозы заражения VARV в 10 раз (до 1×10^9 PFU, или 2×10^9 геномов) вызывало 100-процентное острое летальное заболевание (среднее время до смерти 4 дня), которое более точно имитирует геморрагическую натуральную оспу. Титры вирусов в органах во время смерти были в 1000–10 000 раз выше, чем у обезьян, инфицированных в 10 раз более низкой дозой вирусов (Jahrling et al., 2004; Rubins et al., 2004). Смертность в обеих моделях зависит от дозы инфекционного вируса, которая коррелирует с общим числом кожных поражений. Авторы настоящей главы полагают, что ВВ-инфекция вызывает искусственную вторичную виремию, которая обходит инкубационный период, что приводит к быстрому образованию высоких титров вируса и к быстрому началу развития болезни.

Общественное здравоохранение заинтересовано в том, чтобы для определения времени терапевтического вмешательства использовались реальные диагностические критерии, принимаемые во внимание при лечении большого числа больных. В связи с этим время начала лечения, осуществляемого на основании клинических симптомов, устанавливается по таким показателям, как появление сыпи, начало заболевания и появление кожных поражений. Однако на этой стадии, когда лечение уже началось, то есть на четвертый день после инфицирования, все органы уже имеют существенную вирусную нагрузку, превышающую 10^6 геномов на 1 грамм ткани.

Испытания, демонстрирующие опорные показатели эффективности, должны планироваться таким образом, чтобы обеспечить получение автономных данных (не зависящих от других исследований), которые моделируют, насколько это возможно, фазу III клинических испытаний на человеке, поскольку медицинские обозреватели будут использовать данные этих испытаний вместо данных клинических испытаний на человеке для оценки эффективности лекарств. В докладе Института медицины Соединенных Штатов под названием "Рассмотрение вопроса о необходимости продолжать исследования живых вирусов натуральной оспы" таблица 4-1 характеризует использование приматов кроме человека в качестве моделей, как "наиболее целесообразное с точки зрения получения вероятной пользы от лекарств-кандидатов и вакцин, предназначенных для лечения натуральной оспы в человеческой популяции" (US Institute of Medicine, 2009). Для того чтобы вести поиск характерного для лекарства признака, обуславливающего снижение смертности от натуральной оспы, одним из опорных исследований должно стать исследование, в котором используется модель MPXV – приматы. Единственная разработанная к настоящему времени модель для инфицирования VARV на животном, которая похожа на классическую натуральную оспу, характеризуется 33-процентной летальностью, а

единственная лаборатория, в которой могут проводиться исследования VARV, не приспособлена к содержанию достаточного количества приматов, которое позволило бы получить статистически значимые результаты (в соответствии с расчетными критериями, обеспечивающими высокую достоверность результатов исследования, определяемую размером выборки, необходимое количество приматов (кроме человека) составляет 120 при величине $P = 0,05$, с двусторонне ограниченным критерием и 79-процентной статистической мощностью). Поэтому для достижения статистической значимости доказательство снижения смертности необходимо проводить на модели, близкой к MPXV-инфицированию приматов, которая индуцирует смертность, превышающую 90%.

6.4 Необходимость клинических исследований для подтверждения данных, полученных на животных моделях

Натуральная оспа была ликвидирована в то время, когда основные современные методы, используемые в настоящее время при изучении патогенеза болезни, только зарождались. В результате существует очень мало данных клинических исследований, которые можно было бы сравнить с результатами исследований патогенеза, проводившихся с использованием VARV- и MPXV-инфицирования обезьян *synomolgus*. Потребность в такой информации побудила USFDA предложить USAMRIID провести естественно-историческое исследование оспы обезьян, вызывающей заболевание человека, как самой близкой из существующих болезней к натуральной оспе, для обоснования достоверности данных, полученных на животных моделях, которые отвечают требованиям оценки эффективности в соответствии с Правилами. Такое исследование в настоящее время проводится в больнице общего профиля в городе Коли, район Санкуру (L'Hôpital Général de Référence de Kolé, Sankuru District) в Демократической Республике Конго. Исследование проводится совместно с Национальным институтом биомедицинских исследований в Киншасе, Демократическая Республика Конго, и USAMRIID (Huggins, частное сообщение, 2010).

6.5 Внутривенно вводимый цидофовир

ВВ-цидофовир (Вистид) разрешен USFDA к применению в качестве лекарства для лечения HCMV-ретинита у больных с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД). Цидофовир, низкомолекулярный нуклеозидный аналог, который избирательно ингибирует вирусную ДНК-полимеразу, был одинаково активен в отношении 35 изолятов VARV, отобранных таким образом, чтобы были представлены по возможности максимальное географическое разнообразие и максимальный временной интервал (LeDuc et al., 2002). Цидофовир подавляет репликацию VARV в клеточной культуре в 1000–100 000 раз (Baker, Bray & Huggins, 2003). Эффективность цидофовира при лечении CPXV-инфекции у мышей линии BALB/c исследовалась в целях оценки новых средств терапии при инфицировании вирулентными OPV мелких животных. После внутримышечной инокуляции 100 мг/кг цидофовира в дни 0, 2 или 4 после инфекции, с применением интраперитонеального, аэрозольного или интраназального путей инфицирования соответственно, была отмечена 90–100-процентная выживаемость в моделях, которые в иных условиях были безусловно летальными. Лечение, проведенное в день 0, снижало максимальные вирусные титры в легких в 10–100 раз, снижало тяжесть вирусного пневмонита и предотвращало легочное кровотечение (Bray et al., 2000).

Для демонстрации эффективности лекарства были использованы приматы в качестве двух моделей постэкспозиционной профилактики. Первой была летальная модель с МРХV, в которой эффективность лекарства оценивалась по снижению смертности, числа оспенных поражений и вирусной нагрузки. Второй была модель кожных поражений, вызываемых VARV, в которой эффективность лекарства оценивали по снижению числа поражений и вирусной нагрузки. В обеих моделях лечение было начато через 24 часа после инфицирования, когда репликация составляла более 10^4 геномов/г ткани во всех органах. В целях определения возможности успешно вылечить модель кожных поражений летальная внутривенная МРХV-модель, которая более близка к VARV-модели после инфицирования дозой 10^8 PFU, была использована для демонстрации того, что профилактическое применение цидофовира полностью защитило животное. У обезьян, которых лечили цидофиром, не было никаких признаков болезни, а репликация вирусов в крови контролировалась; напротив, у животного, получавшего плацебо, было более 850 поражений, а уровень вирусов в крови был выше 10^7 геномов/мл, животное умерло на день 12. Исследования с МРХV показали, что удвоение дозы цидофовира (в четыре раза выше дозы, разрешенной для человека) способствовало лучшему контролю репликации вирусов; однако эту повышенную дозу не разрешено применять для лечения HCMV-ретинита у больных СПИДом. Применение цидофовира ассоциируется с возможностью значительной нефротоксичности – в связи с этим требуется ВВ-прегидратация, введение пробенецида и пост-ВВ гидратация – что может стать серьезным бременем для медицинских учреждений в период эпидемии. Существуют противоречивые мнения относительно возможной переносимости повышенных доз, но не была идентифицирована ни одна популяция пациентов, в которой терапевтический эффект этой повышенной дозы был бы достаточно благоприятным, чтобы оправдать ее испытания на людях.

Затем оценивалось воздействие цидофовира на VARV в модели постэкспозиционной профилактики. Группы по три обезьяны *супотолгус* лечили, начиная с дней 0, 1 или 2, и сравнивали с плацебо. Одна из трех (33%) обезьян в плацебо-группе умерла, и все три обезьяны были очень тяжело больны. Ни одна из обезьян, которых лечили цидофовиром, не умерла и не была серьезно больна. Число оспенных поражений и уровень вирусной нагрузки во всех группах, лечившихся цидофовиром, были ниже, чем в плацебо-группе ($P < 0,01$). Модель геморрагической натуральной оспы использовали для демонстрации успешности профилактики при применении цидофовира, но в связи с подавляющей природой этой инфекции модель геморрагической натуральной оспы непригодна для оценки эффективности лечения типичной натуральной оспы.

Эти результаты показали, что цидофовир, введенный до начала болезни, но не после (данные не представлены), может предотвратить смерть животных. Однако для получения оптимальных результатов необходима доза 20 мг/кг. Хотя точная эквивалентность доз для людей и обезьян *супотолгус* не была полностью установлена, это превышает дозу 5 мг/кг, которая была разрешена для лечения HCMV-ретинита у людей. Ограниченные данные по безопасности для человека позволяют предположить, что доза 10 мг/кг, возможно, является переносимой, однако исследования по оценке безопасности, которые предстоит провести, не могут быть оправданы, если не существует ни одной популяции больных, где повышенная доза принесла достаточную пользу, которая перевешивает возросшую опасность нефротоксичности. Таким образом, нет возможности получить данные по безопасности, которые содействовали бы получению разрешения на применение более высокой дозы. Важно отметить, что вмешательство после появления оспенных поражений в этих моделях оказалось безуспешным. Обе модели могут индуцировать болезнь, более тяжелую, чем натуральная оспа, особенно если течение болезни ускоряется, и, возможно, цидофовир

мог бы стать эффективным средством лечения натуральной оспы, однако попытки разработать менее тяжелые, но симптоматические модели, на которых демонстрировалась бы эффективность препарата после появления кожных поражений, не привели к успеху.

6.6 Пероральный препарат CMX001

Цидофовир поглощается посредством пиноцитоза, поэтому требуется ВВ-введение, которое может вызвать нефротоксичность. Липидный аналог, 1-О-гексадецилоксипропил-цидофовир (HDP-цидофовир, CMX001), биологически доступен при пероральном приеме, и не было обнаружено никакой нефротоксичности ни в доклинических токсикологических исследованиях, ни в клинических испытаниях (Kern et al., 2002; Keith et al., 2004; Painter & Hostetler, 2004; Beadle et al., 2006; Lebeau et al., 2006); обзор данных о CMX001 представлен в разделе 6.9. Если подходить чисто механически, липидная половина CMX001 определяет фармакокинетические свойства, проявляющиеся в органах-мишенях, тогда как противовирусная активность сосредоточена в нуклеозидном остатке. В отличие от цидофовира, который поступает в клетки посредством малоэффективных процессов, конъюгат действует подобно лизофосфатидилхолину, используя естественные пути поглощения липидов и достигая высоких внутриклеточных концентраций. Оказавшись внутри клетки-мишени, липидная боковая цепь с CMX001 расщепляется, предположительно, при участии фермента фосфолипазы С, при этом выделяется свободный цидофовир. Преобразование цидофовира в активный противовирусный агент, цидофовир-дифосфат, осуществляется посредством двухступенчатого процесса фосфорилирования, катализируемого внутриклеточными анаболическими киназами. Цидофовир-дифосфат проявляет свои противовирусные эффекты внутриклеточно, действуя как сильный альтернативный ингибитор синтеза вирусной ДНК.

Исследовалась противовирусная активность CMX001 в отношении OPV *in vitro* и *in vivo* – на мышах, кроликах и приматах кроме человека. *In vitro* активность CMX001 в отношении VARV составляет 0,1 мкМ и варьирует от 0,5 до 0,9 мкМ в отношении CPXV, VACV, ECTV и RPXV (Hostetler, 2009). В опытах на мышах эффективность CMX001 проявлялась в предотвращении смертности после интраназального инфицирования летальными инокулятами ECTV, CPXV, VACV или MPXV, если препарат вводили через несколько дней после инфицирования. Эффективные дозы в диапазоне от 1 до 20 мг/кг вводятся один раз в день в течение 5 дней. В то же время в некоторых случаях оказывалась эффективной однократная доза 20–100 мг/кг. В опытах на кроликах CMX001 тоже был эффективен, предотвращая смертельный исход после летального инфицирования RPXV. Эффективные дозы варьировали от 1 мг/кг дважды в день в течение 5 дней до 20 мг/кг один раз в день в течение 5 дней. В некоторых случаях также эффективна однократная доза 20 мг/кг. В недавнем рандомизированном слепом плацебо-контролируемом исследовании, объектами которого были инфицированные RPXV кролики, лечение было начато после появления кожных поражений; три дозы препарата по 20 мг/кг, введящиеся через день (суммарная доза 60 мг/кг), обеспечивали статистически значимую защиту от смертельного исхода после интрадермальной инокуляции кроликов летальной дозой RPXV (11/12 выживших животных в группе CMX001 и 2/12 выживших в плацебо-группе).

В связи с различиями в метаболизме и экспозиции к CMX001 у приматов (кроме человека), исследования CMX001 на обезьянах *супотолгус* не релевантны для человека. Однако было показано, что цидофовир эффективен в моделях инфицирования обезьян; кроме того, как цидофовир, так и CMX001 доставляют к

мишеням одно и то же противовирусное соединение – цидофовир-дифосфат. Например, обезьяны были защищены от смертельного исхода после летальной внутривенной инокуляции МРХV, если цидофовир вводили в дозе 20 мг/кг в дни 1, 6 и 11 после инфицирования; было 7/8 выживших животных в цидофовир-группе и 1/8 в плацебо-группе (Huggins, неопубликованные данные, 2004).

В целом комбинированные исследования СМХ001 и цидофовира на животных показывают, что эти соединения эффективны в отношении различных ОРV-инфекций *in vivo* в схемах испытаний, предполагающих лечение до экспозиции и симптоматическое лечение болезни после экспозиции (то есть после образования кожных поражений). Кроме того, ВВ-цидофовир может быть использован для моделирования эффективной экспозиции к цидофовир-дифосфату приматов (кроме человека), в этих моделях вследствие метаболических различий прямая оценка СМХ001 невозможна. Будут определяться системная экспозиция к СМХ001 и/или цидофовиру и уровни цидофовир-дифосфата в мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС) при применении эффективной дозы и эффективной схемы лечения. Предполагаемые исследования будут проводиться на инфицированных РРХV кроликах с пероральным введением СМХ001, и на инфицированных МРХV и VARV обезьянах *synotolgus* с внутривенным введением цидофовира.

Фармакокинетические данные по СМХ001 и/или цидофовиру, а также внутриклеточные уровни цидофовирдифосфата в РВМС здоровых и инфицированных кроликов и обезьян будут использованы для определения эффективной дозы для человека. В испытаниях на людях уровни цидофовир-дифосфата в РВМС будут определяться после введения различных доз СМХ001. При лечении натуральной оспы человека эффективная доза и интервалы между введениями доз СМХ001 должны быть такими, чтобы концентрация цидофовир-дифосфата в РВМС оставалась равной эффективной концентрации или была выше ее (в соответствии с определением на животных моделях), с тем чтобы продолжительность воздействия соответствовала нормальному течению натуральной оспы.

СМХ001 хорошо абсорбируется в организме человека, это ведет к скоплению высоких концентраций лекарства в плазме. Больного человека с прогрессирующей VACV-инфекцией успешно лечили, применяя терапевтический режим, включающий СМХ001; подробности этой истории болезни можно найти на вебсайте *Morbidity and Mortality Weekly Review*¹³. В настоящее время в клинических испытаниях в фазе II исследуется активность СМХ001 в отношении вируса ВК и HCMV; к настоящему времени он был введен более чем 80 здоровым добровольцам и больным в трех клинических испытаниях, в которых не было выявлено ни одного серьезного побочного эффекта, связанного с применением лекарства.

6.7 Пероральный препарат ST-246

ST-246 (тековиримат) – низкомолекулярное соединение, которое является сильнодействующим избирательным препаратом, активным в отношении многих ОРV, включая МРХV, вирус оспы верблюдов, СРХV, ECTV и VARV (Yang et al., 2005; Bailey et al., 2007). Мишенью лекарства является ген (СРХV V061 ген, VACV F13L ген или VARV Bangladesh ген C17L VARV-ORF-040), который кодирует основной белок оболочки – р37, обнаруживаемый во внешней мембране EEV. Этот белок необходим для образования

¹³ <http://www.cdc.gov/mmwr/>.

внутриклеточного вируса. В присутствии ST-246 образование бляшек и индуцированные вирусами цитопатические эффекты подавляются. Кроме того, образование внутриклеточных вирусов подавлялось в 158 раз, тогда как образование IMV (внутриклеточных зрелых вирусов) подавлялось в 11 раз, по данным анализа урожая вирусов, в котором использовалась низкая множественность инфицирования. ST-246 не вызывал дефектов в образовании IMV, но невозможность формирования EEV подавляла перенос вируса к неинфицированным клеткам. Лечение препаратом ST-246 не влияло на образование части IMV и на их морфологию, что подтверждается данными трансмиссионной электронной микроскопии. В опытах *in vivo* пероральное введение ST-246 защищало мышей BALB/c от летальной инфекции после интраназальной инокуляции дозой $10 \times LD_{50}$ VACV (штамм J Международного департамента здравоохранения). Лечившиеся лекарством и выжившие после инфицирования мыши приобрели защитный иммунитет и были резистентны к последующему заражению летальной дозой ($10 \times LD_{50}$) VACV (Yang et al., 2005). ST-246, вводимый в дозе 50 мг/кг дважды в день, защищал мышей линии ANC/R от летальной инфекции после интраназальной инокуляции дозой $40\,000 \times LD_{50}$ ECTV. У животных, которых лечили ST-246, титры инфекционных вирусов в печени, селезенке и легких на день 8 после инфицирования были ниже порогов обнаружения (<10 PFU/мл). Напротив, средние титры вирусов в тканях печени, селезенки и легких мышей, получавших плацебо, составляли $6,2 \times 10^7$, $5,2 \times 10^7$ и $1,8 \times 10^5$ PFU/мл соответственно. Пероральное введение ST-246 подавляло индуцированное VACV образование поражений на хвосте мышей линии NMRI, инокулированных в хвостовую вену. Пероральное введение ST-246 также защищало от летального заражения MPXV сусликов в 13-line модели до 3 дней после инфицирования (Sbrana et al., 2007). В совокупности эти данные подтверждают, что белок p37 является мишенью противовирусного воздействия, и показывают, что ингибитор образования EEV может защищать мышей от OPV-индуцированной болезни. На основании очень благоприятного профиля безопасности лекарства в доклинических испытаниях препарат ST-246 компании SIGA Technologies получил статус IND и Fast Track. (Статус Fast Track позволяет представлять данные клинических испытаний в USFDA по мере того, как они становятся доступными, а не в конце исследований.)

Оценивалась постэкспозиционная профилактическая активность перорального ST-246 в отношении VARV-инфекции обезьян *synomolgus*, которая очень похожа на натуральную оспу человека. В плацебо-группе отмечалось типичное развитие болезни – более 1250 оспенных поражений и 33-процентная смертность. В лечебной группе пероральное чреззондовое введение ST-246 началось через 24 часа после инфицирования, когда в костном мозге, селезенке, некоторых лимфатических узлах и в печени было более 10^8 геномов/г и во всех тканях – 10^4 – 10^6 геномов/г. Лечение ликвидировало болезнь, о чем свидетельствует полное отсутствие поражений (лучший прогностический показатель тяжести протекания натуральной оспы у человека) и отсутствие каких-либо значимых неблагоприятных клинических или лабораторных показателей. Титры вирусов в крови не увеличились относительно уровней долечебного периода (10^6 геномов/мл), и вирусы были удалены через 6 дней, тогда как в плацебо-группе вирусы были удалены через 16 дней (на основании ретроспективных данных) (Huggins et al., 2009).

Затем ST-246 оценивали, используя MPXV-инфекцию обезьян *synomolgus*, которая очень похожа на натуральную оспу человека. В плацебо-группе наблюдалось типичное течение болезни – с образованием более 1500 оспенных поражений и 100-процентной смертностью. Чреззондовое введение ST-246 началось через 24 часа после инфицирования, когда костный мозг, селезенка, некоторые лимфатические узлы и

печень содержали более 10^7 геномов/г и все ткани содержали 10^5 – 10^6 геномов/г. Лечение устранило болезнь, о чем свидетельствует полное отсутствие образования поражений и отсутствие каких-либо значимых клинических или лабораторных изменений. Титры вирусов не увеличивались относительно уровней долечебного периода, и вирус был выведен через 4 дня, тогда как у плацебо-животных или животных, лечившихся ВВ-цидофовиrom, вирус был выведен через 16 дней (на основании ретроспективных данных). В отдельном эксперименте пероральное чреззондовое лечение препаратом ST-246 началось через 3 дня после инфицирования, когда костный мозг, селезенка, некоторые лимфатические узлы и печень содержали более 10^8 геномов/г, и все ткани содержали более 10^6 геномов/г. И в данном случае лечение устраняло болезнь, что подтверждалось полным отсутствием образования поражений у двух из трех обезьян и наличием менее 5% от контрольных поражений у другой обезьяны (эти поражения не прогрессировали), а также отсутствием каких-либо значимых клинических или лабораторных изменений. Вирусные титры в крови не увеличивались относительно уровней долечебного периода, и вирус был выведен через 6 дней, тогда как у плацебо-животных он был выведен через 16 дней (Jordan et al., 2009). ST-246 в установленной для обезьян дозе 10 мг/кг (которая эквивалентна дозе, предлагаемой для человека) может успешно лечить оспу обезьян после появления кожных поражений. Первоначальные исследования проводились с дозой 300 мг/кг, и результаты были еще более резко выраженными.

ST-246 был отобран из числа близких аналогов после многочисленных попыток оптимизировать активность соединения и его стабильность при проведении анализа метаболического преобразования в печени (фракция S9). Соединение продемонстрировало умеренную степень связывания с белками (около 80% в организме человека, около 88% у мышей и обезьян, от 0,03 мкМ до 50 мкМ). Экспозиция ограничивалась абсорбцией, которая снижала биодоступность примерно на 30%. В связи с этими ограничениями активность соединения чрезвычайно важна для обеспечения его эффективности. Связывание с белками, абсорбция и экскреция низкомолекулярных соединений различаются у разных видов, и это может очень сильно повлиять на эффективность соединения в животных моделях, тем самым ограничивая их прогностическую ценность для человека. Непредвиденные проблемы, которые возникают в результате этих различий, – это конкретные примеры, которые показывают, почему активность, обнаруживаемая при использовании мелких грызунов в качестве моделей, может не привести к получению продукта, годного к применению в клинической практике.

6.8 Влияние введения противовирусных препаратов на защитное действие вакцин

6.8.1 Цидофовир и Dryvax

Эффект совместного применения цидофовира и Dryvax изучали на мышах и обезьянах. У обезьян *supotlogus* совместное введение однократной дозы цидофовира (20 мг/кг) и Dryvax снижало вирусные VACV-нагрузки и побочные эффекты Dryvax по сравнению с аналогичными показателями в экспериментах только с одной вакциной; однако цидофовир снижал также иммунитет, как показали измерения гуморальных и клеточных иммунных ответов, и уменьшал степень защиты от MPXV-заражения (показатель "число выживших/общее число" составлял 2/6 в плацебо-группе, 6/6 в Dryvax-группе и 5/6 в группе цидофовир плюс Dryvax) (Wei, 2009). Когда Dryvax и цидофовир (12,5 мг/кг) одновременно вводили мышам A/NCR, пораженные участки были меньше и заживали быстрее, чем при применении только одной вакцины. Как и в

исследовании на обезьянах, реакции антител подавлялись; однако в отличие от исследования на обезьянах, не было ощутимого снижения степени защиты мышей от заражения гетерологичным OPV (ECTV). Эти данные последовательно демонстрируют снижение титров антител при совместном введении цидофовира и вакцины Dryvax; этого следовало ожидать, если лекарство, которое ингибирует репликацию вирусов на ранней стадии жизненного цикла, комбинируется с вакциной, для действия которой требуются многократные раунды репликации с типичными инокулятами. Планируются исследования, в которых будут оцениваться CMX001 и вакцинация модифицированной вакциной vaccinia Ankara (IMVAMUNE), которая вводится в высокой дозе, поскольку в человеческих клетках не происходит репликация вирусов.

6.8.2 ST-246 (тековиримат) и Dryvax и ACAM2000

Исследования показали, что лечение препаратом ST-246, вводимым во время вакцинации, не ставит под угрозу эффективность вакцин Dryvax и ACAM2000. Нормальные иммунокомпетентные мыши были вакцинированы Dryvax (Grosenbach et al., 2008) или ACAM2000 (Berhanu et al., 2010) с использованием стандартных для человека доз и способа вакцинации, и сразу после вакцинации было проведено лечение ST-246. В результате лечения ST-246 уменьшилась тяжесть вакцинных поражений и ускорилось их устранение. Кроме того, уменьшилось выделение вирусов из пораженных мест (Berhanu et al., 2009). Гуморальные иммунные реакции могли несколько снизиться после лечения ST-246, но клеточные иммунные реакции, по-видимому, стали немного интенсивнее. Животные, которые были вакцинированы и лечились ST-246, были в равной мере защищены от последующего летального заражения как в кратковременных, так и в продолжительных экспериментах, таким образом было отчетливо продемонстрировано, что ST-246 не оказывает неблагоприятного воздействия на эффективность вакцин. В серии последующих экспериментов многочисленные мышинные модели с иммунной недостаточностью были вакцинированы ACAM2000 с применением стандартных для человека доз и способов вакцинации, затем их лечили ST-246 (Berhanu et al., 2010). ST-246 был эффективен во всех моделях, кроме тех, у которых был полный клеточный иммунодефицит (комбинированная CD4⁺ и CD8⁺ недостаточность). ST-246 снижал реактогенность вакцины и ускорял устранение вакцинных поражений. Лечение ST-246 также способствовало уменьшению выделения вирусов из пораженных участков. В моделях с частичным иммунодефицитом животные были успешно вакцинированы и продемонстрировали резистентность при последующих летальных заражениях в кратковременных и продолжительных экспериментах. Таким образом было показано, что даже в условиях частичного иммунодефицита ST-246 повышает безопасность вакцины, содействуя при этом индуцированию устойчивых иммунных реакций, которые способны противодействовать летальному заражению.

6.9 Лекарства, находящиеся в клинической разработке

В заключительной части отчета Института медицины Соединенных Штатов под названием "Рассмотрение вопроса о необходимости продолжать исследования живых вирусов натуральной оспы", отмечается, что "наиболее убедительная причина необходимости длительного сохранения запасов живых вирусов натуральной оспы – это их важнейшая роль в идентификации и разработке противовирусных лекарственных средств, предназначенных для применения в случае крупномасштабной вспышки эпидемии натуральной оспы" (US Institute of Medicine, 2009).

Несмотря на то что были идентифицированы многочисленные соединения,

ингибирующие репликацию OPV во многих *in vitro* тест-системах (включая ограниченные оценки в отношении VARV), небольшая часть из них оценивалась в мелких грызунах-моделях, обычно в мышинных моделях. Данные об OPV животных моделей, главным образом мышинных, которые использовались для оценки активности соединений, недавно были обобщены в обзоре Smee (Smee, 2008). Эти модели позволяют получить полезную информацию, но это только первый этап в длительном, сложном, многослойном процессе, необходимом для получения разрешения на применение лекарства.

Многие соединения, обеспечивающие защиту от инфекции в первоначальных животных моделях, сталкиваются с рядом проблем, которые не позволяют им стать успешно применяемыми лекарствами; в числе таких проблем чрезмерная токсичность, метаболическая инактивация, неспособность аккумулироваться в тканях-мишенях в достаточных концентрациях, экономическая неосуществимость производственного процесса и/или многочисленные другие возможные проблемы.

К настоящему времени проведена успешная разработка трех соединений, позволяющая проводить их оценку в клинических испытаниях на людях в соответствии с заявкой на статус IND, это цидофовир, лекарство, которое разрешено применять при лечении HCMV-ретинита; CMX001, липидное пролекарство цидофовира; и ST-246. Все три соединения обнаруживают активность в спектре моделей мелкие грызуны – суррогатные OPV; цидофовир и ST-246 обеспечивают защиту приматов-моделей от VARV-инфекции. Однако ни одно из этих соединений не разрешено применять при лечении натуральной оспы, так как не были выполнены необходимые оценки.

Поскольку проведение клинических испытаний с применением возбудителя натуральной оспы невозможно по этическим соображениям, USFDA разработало новый подход к процедуре санкционирования лекарственных средств, который позволяет оценивать их эффективность на животных моделях; такой подход нередко называют Правилами. Согласно этим Правилам, в исследованиях на животных моделях должна быть такая же тщательность проверки данных и такой же уровень критического научного анализа, как при проведении клинических испытаний на человеке, цель которых – содействовать получению одобрения продуктов по другим типам показаний, с использованием других путей санкционирования.

Центр оценки и исследований лекарств USFDA не видит убедительных аргументов в пользу того, что представление результатов исследований по натуральной оспе можно считать обоснованным без данных о VARV. Это означает, что USFDA не может выдать лицензию на лекарство, если не представлены данные о его эффективности в отношении VARV, полученные на животных моделях. В связи с уникальной историей и вирулентностью VARV пути к санкционированию представлений по натуральной оспе не совсем ясны и не единообразны даже *при наличии* модели VARV-заражения. Аналогичные регулирующие ведомства в странах помимо Соединенных Штатов дают еще меньше официальных указаний по этой проблеме. Некоторые спонсоры могут вести разработку своего продукта, предназначенного для лечения другого заболевания или состояния, имея при этом статус IND или его эквивалент для применения продукта для лечения натуральной оспы. Однако использование IND-продукта во время экстренных ситуаций сопряжено с дополнительными сложностями, в том числе логистическими. Чтобы частично решить эти проблемы, USFDA одобрило процедуру выдачи разрешения на применение в экстренных ситуациях, но как именно она будет осуществляться, будет выяснено в ходе дальнейшей разработки.

USFDA также опубликовало проект руководства (USFDA, 2007) по применению Правил. Любое лекарство, одобренное в соответствии с этими Правилами, должно еще отвечать всем другим требованиям лицензирования, включая представление данных по безопасности для человека. В том случае, если лекарство также может применяться для лечения болезней помимо тех, которые вызываются OPV, оно должно быть протестировано на здоровых добровольцах. Это возможно только в том случае, если у лекарства имеются незначительные побочные эффекты, поскольку участвующие в эксперименте объекты не получают от него никакой пользы. Это требование значительно ограничивает число лекарств-кандидатов, которые могут разрабатываться. Если некоторая степень токсичности может переноситься больными оспой, риск смертности у которых составляет 30%, этот довод непригоден при тестировании безопасности на здоровых добровольцах.

6.10 Время, необходимое для разработки лекарственных препаратов для лечения натуральной оспы

При разработке всех предназначенных для лечения оспы противовирусных лекарств необходимо использовать Правила при оценке их эффективности, но требование оценивать эффективность лекарств только на животных, безусловно, не сокращает путь к получению разрешения на применение лекарства. По существу, оно усложняет путь к лицензированию, так как подкрепляющая регулирующая система еще только развивается. Поскольку к настоящему времени только два лекарства оценивались в соответствии с Правилами, еще слишком рано оценивать типы и число исследований, которые потребуются для определения эффективности лекарств против натуральной оспы. Для того чтобы ответить на эти вопросы, предстоит выполнить значительную работу по решению многих научных проблем, и это вносит неопределенность в вопрос о сроках, которые потребуются для получения лицензии на лекарство против оспы.

Значительная неопределенность также сопряжена с проблемой комбинирования *in vitro* данных и данных, полученных на животных моделях, которые будут достаточны для демонстрации эффективности. Ведомства, регулирующие производство и применение лекарств, предлагают руководства, касающиеся типов исследований, которые могут быть полезны для оценки лекарства-кандидата, но для них довольно трудно составить точные указания; вместо этого они просят участвующего в разработке лекарства спонсора представить на их рассмотрение план клинических испытаний. В некоторых областях, где по многим продуктам выданы лицензии на лечение конкретных болезней, путь к успешному применению лекарств стал более отчетливым. Однако кроме открытых рекомендаций USFDA, направляемых промышленникам, семинаров USFDA и частных совещаний по конкретным лекарствам между USFDA и спонсором (которые, как правило, не бывают открытыми), нет никакого другого опыта, который позволил бы нам прогнозировать временной график. Еще меньше указаний можно получить от большинства других аналогичных структур. Каждой стране необходимо получить разрешение на применение лекарства в пределах ее границ. В конечном счете именно на спонсора возлагается ответственность за подготовку плана клинических разработок, включающего указания по представлению пакета материалов, которые должны адекватно демонстрировать как безопасность, так и эффективность рассматриваемого продукта. Для оказания помощи в этом процессе USFDA опубликовало проект *Guidance to industry* (Руководство по промышленному производству лекарственных средств для лечения натуральной оспы). USFDA намерено создать Консультативную группу USFDA, в которую войдут технические эксперты, призванные оказать помощь в определении того, какая комбинация животных моделей потребуется для замены клинических испытаний на людях в исследованиях,

предназначенных для демонстрации эффективности лекарств в моделях заражения VARV. Эти испытания должны быть "хорошо контролируемы"; в случае исследований на животных это означает, что они должны проводиться в соответствии с требованиями GLP (надлежащей лабораторной практики). Обеспечение соответствия требованиям GLP в условиях BSL-3 для MPXV оказалось трудным, но возможным (Huggins, неопубликованные данные, 2008), но следование всем нормам GLP может оказаться неосуществимым при проведении исследований лекарств с применением VARV в BSL-4 условиях из-за ограничений, сопряженных с работой в защитном скафандре. В связи с большим числом неизвестных необходимость проведения непредвиденных дополнительных исследований с живыми VARV может возникнуть в любое время до окончательной регистрации лекарства. Современные правила USFDA требуют, чтобы материалы наиболее важных исследований сохранялись в течение двух лет после регистрации лекарства, это позволит провести повторные оценки в случае возникновения экстренных ситуаций в процессе клинического применения препарата. Как это правило будет применяться к лекарствам, предназначенным для лечения натуральной оспы, неизвестно.

Опыт промышленного производства позволяет сделать вывод, что для лекарств, проходящих испытания в фазе I исследований, вероятность достижения стадии регистрации составляет 10–25%, и этот процесс обычно занимает от пяти до восьми дополнительных лет. Принимая во внимание эти ограничения, следует признать замечательным тот факт, что три лекарства получили статус IND для лечения натуральной оспы и что две сотрудничающие с USFDA компании разрабатывают так называемую дорожную карту, то есть план действий, направленных на достижение стадии регистрации лекарства. Если оценивать ситуацию реально, процесс получения разрешения на применение лекарства, вероятно, займет по меньшей мере 5–10 лет, даже если все исследования будут успешными. Однако очень важно, чтобы исследования проводились на должном уровне, а не просто для получения от регулирующих ведомств разрешения на продажу лекарства. Кроме того, важно, чтобы должностные лица служб здравоохранения располагали достаточной информацией, которая позволит распределять скудные ресурсы, имеющиеся в сфере здравоохранения, таким образом, чтобы с максимальной эффективностью ликвидировать вспышки эпидемии и сводить к минимуму уровень смертности и заболеваемости в клинических случаях. Для получения такой информации могут потребоваться дополнительные исследования, прежде всего для преобразования благоприятного эффекта лечения животных моделей в возможный благоприятный эффект при лечении человека, а также для того, чтобы оценить вероятное влияние на потребность в медицинских ресурсах.

6.11 Заключительное обсуждение

Противовирусные лекарства, даже в виде IND-продуктов, не существуют для многих вирусных заболеваний, включая такие, как обычная простуда, где имеется огромный потенциал получения прибылей в случае успешной разработки продукта. Это очевидное доказательство того, что процесс разработки противовирусных лекарств сопряжен с большими трудностями.

Замечательно, что три лекарства-кандидата получили статус IND для лечения болезней, вызываемых OPV, и что все три препарата применялись для лечения побочных эффектов, индуцируемых VACV-вакцинациями. Ни одно из этих лекарств не применялось для лечения MPXV, вызывающей заболевание у людей, и необходимо получить дополнительную информацию по безопасности, прежде чем можно будет без

опасений исследовать их применение в удаленных регионах, где оспа обезьян легко передается.

Существует значительно большее количество соединений, которые представляются перспективными, но до сих пор не находятся в разработке. Сотни соединений демонстрируют активность в клеточных культурах и более десяти соединений проходят стадию первоначальных оценок в экспериментах с мелкими грызунами. Можно было бы утверждать, что очень важно продолжение работы с этими соединениями и поиски новых методов ингибирования репликации вирусов. Опыт промышленного производства лекарств позволяет сделать вывод, что мы пока не можем прогнозировать, будет ли какой-либо из трех существующих IND-продуктов лицензирован, и в связи с этим нам следует продолжать и расширять исследовательскую работу, направленную на разработку дополнительных лекарственных кандидатов для лечения натуральной оспы. Эта работа должна включать поиски новых лекарств с помощью суррогатных OPV, оценку активности перспективных соединений в отношении VARV и затем – на более позднем этапе процесса разработки, после того как установлена доза для приматов, эквивалентная дозе, предлагаемой для человека – оценка эффективности на приматах в качестве модели (моделей) с VARV-инфицированием, которая проводится, если осуществимы клиническая диагностика и лечение.

В настоящее время невозможно прогнозировать, насколько продолжительной должна быть работа, которую предстоит выполнить с живыми VARV. Однако такую работу безусловно необходимо будет проводить до тех пор, пока по меньшей мере два лекарства не будут зарегистрированы в качестве средств лечения клинической натуральной оспы.

USFDA неоднократно заявляло, что оно не видит возможности лицензировать лекарство, по которому не были представлены данные по эффективности в модели VARV-заражения. Поскольку проведение клинических испытаний лекарств против оспы с участием людей невозможно, для демонстрации эффективности лекарств следует использовать Правила USFDA (US 21CFR310.610) или другие процедуры, установленные ведомствами других стран, регулирующими производство и применение лекарств, для выдачи лицензии в своей стране. Учитывая неопределенность в практике применения Правил в связи с нечастым их использованием до настоящего времени, а также тот факт, что сейчас нет ни одного лекарства, которое разрешено применять для лечения натуральной оспы, трудно предоставить точные оценки по временному графику или данные, необходимые для USFDA-лицензирования. Лицензирование в других странах сопряжено по меньшей мере с такой же неопределенностью.

Сокращения

СПИД	синдром приобретенного иммунодефицита
BSL	уровень безопасности
СМХ001	НДР-цидофовир, 1-0-гексадециклооксипропил-цидофовир
СРХV	вирус оспы коров
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ECTV	вирус экстремелии
EEV	внеклеточный оболочечный вирус
НЛП	надлежащая лабораторная практика
НСМV	человеческий цитомегаловирус
НРМРС	цидофовир
ИМСВН	N ₁ -изоникотиноил – N ₂ -3-метил-4-хлорбензоилгидразин
IMV	внутриклеточный зрелый вирус
IND	новый исследуемый препарат, разрешенный к применению в клинических исследованиях
ВВ	внутривенный
МРХV	вирус оспы обезьян
ОРV	ортопоксвирус
РВМС	моноклеарные клетки периферической крови
PFU	бляшкообразующая единица
РНК	рибонуклеиновая кислота
РРХV	вирус оспы кроликов
USAMRIID	Институт медицинских исследований инфекционных заболеваний армии Соединенных Штатов
USFDA	Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов
VACV	вирус осповакцины (vaccinia вирус)
VARV	вирус натуральной оспы
ГНЦ ВБ "Вектор"	Российский государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения

Справочные материалы

- Alkhalil A et al. (2009). Inhibition of monkeypox virus replication by RNA interference. *Virology Journal*, 6:188.
- Bailey TR et al. (2007). N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-Octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[f]isoindol-2-(1H)-yl)carboxamides: identification of novel orthopoxvirus egress inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50:1442–1444.
- Baker RO, Bray M, Huggins JW (2003). Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Research*, 57:13–23.
- Bauer DJ (1955). The antiviral and synergic actions of isatin thiosemicarbazone and certain phenoxyypyrimidines in vaccinia infection in mice. *British Journal of Experimental Pathology*, 36:105–114.
- Beadle JR et al. (2006). Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl derivatives of 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine against cytomegalovirus and orthopoxviruses. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49:2010–2015.
- Berhanu A et al. Impact of ST-246 on ACAM2000 smallpox vaccine reactogenicity, immunogenicity, and protective efficacy in immunodeficient mice. *Vaccine*, doi:10.1016/j.vaccine.2010.10.039.
- Berhanu A et al. (2009). ST-246 inhibits in vivo poxvirus dissemination, virus shedding, and systemic disease manifestation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12):4999–5009.
- Bray M et al. (2000). Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *The Journal of Infectious Diseases*, 181:10–19.
- De Clercq E (2001). Vaccinia virus inhibitors as a paradigm for the chemotherapy of poxvirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:382–397.
- De Clercq E (2003). Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 16:569–596.
- De Clercq E et al. (2005). Antiviral potential of a new generation of acyclic nucleoside phosphonates, the 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 24:331–341.
- Dennis DT et al. (1974). Failure of cytosine arabinoside in treating smallpox. A double-blind study. *Lancet*, 2:377–379.
- Fire A et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806–811.
- Goebel RJ et al. (1982). Synthesis and antiviral activity of certain carbamoylpyrrolopyrimidine and pyrazolopyrimidine nucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 25:1334–1338.
- Grosenbach DW et al. (2008). Immune responses to the smallpox vaccine given in combination with ST-246, a small-molecule inhibitor of poxvirus dissemination. *Vaccine*, 26(7):933–946.
- Hahon N (1961). Smallpox and related poxvirus infections in the simian host. *Bacteriological Reviews*, 25:459–476.

- Hahon N, McGavran MH (1961). Air-borne infectivity of the variola-vaccinia group of poxviruses for the cynomolgus monkey, *Macaca irus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 109:294–298.
- Hahon N, Wilson BJ (1960). Pathogenesis of variola in *Macaca irus* monkeys. *American Journal of Hygiene*, 71:69–80.
- Helliot B et al. (2003). The acyclic nucleoside phosphonate analogues, adefovir, tenofovir and PMEDAP, efficiently eliminate banana streak virus from banana (*Musa spp.*). *Antiviral Research*, 59:121–126.
- Hostetler KY (2009). Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art. *Antiviral Research*, 82(2):A84–A98.
- Huggins J et al. (2009). Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:2620–2625.
- Jahrling PB, Huggins JW (2005). Orthopoxviruses. In: Swarengen JR, ed. *Biodefense: research methodologies and animal models*. CRC Press, Boca Raton, 207–226.
- Jahrling PB et al. (1980). Lassa virus infection of rhesus monkeys: pathogenesis and treatment with ribavirin. *The Journal of Infectious Diseases*, 141:580–589.
- Jahrling PB et al. (2004). Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:15196–15200.
- Jordan R et al. (2009). ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:1817–1822.
- Keith KA et al. (2003). Evaluation of nucleoside phosphonates and their analogs and prodrugs for inhibition of orthopoxvirus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:2193–2198.
- Keith KA et al. (2004). Inhibitory activity of alkoxyalkyl and alkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir against orthopoxvirus replication in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:1869–1871.
- Kern ER (2003). In vitro activity of potential anti-poxvirus agents. *Antiviral Research*, 57:35–40.
- Kern ER et al. (2002). Enhanced inhibition of orthopoxvirus replication in vitro by alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:991–995.
- Kern ER et al. (2009). Activities of certain 5-substituted 4'-thiopyrimidine nucleosides against orthopoxvirus infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:572–579.
- Koplan JP et al. (1975). Treatment of variola major with adenine arabinoside. *The Journal of Infectious Diseases*, 131:34–39.
- Kwong CD et al. (1998). Synthesis and antiviral evaluation of analogs of adenosine-N1-oxide and 1-(Benzyloxy)adenosine. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 17:1409–1443.
- Lancaster MC et al. (1966). Experimental respiratory infection with poxviruses. II. Pathological studies. *British Journal of Experimental Pathology*, 47:466–471.

- Lebeau I et al. (2006). Activities of alkoxyalkyl esters of cidofovir (CDV), cyclic CDV, and (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine against orthopoxviruses in cell monolayers and in organotypic cultures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:2525–2529.
- LeDuc JW et al. (2002). Smallpox research activities: US interagency collaboration, 2001. *Emerging Infectious Diseases*, 8:743–745.
- McFadden G (2005). Gleevec casts a pox on poxviruses. *Nature Medicine*, 11:711–712.
- McKee KT et al. (1988). Ribavirin prophylaxis and therapy for experimental argentine hemorrhagic fever. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32:1304–1309.
- Nguyen T et al. (2008). RNAi therapeutics: an update on delivery. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 10:158–167.
- Painter GR, Hostetler KY (2004). Design and development of oral drugs for the prophylaxis and treatment of smallpox infection. *Trends in Biotechnology*, 22:423–427.
- Rao AR, McFadzean JA, Kamalakshi K (1966). An isothiazole thiosemicarbazone in the treatment of variola major in man. A controlled clinical trial and laboratory investigations. *Lancet*, 1:1068–1072.
- Rao AR, McFadzean JA, Squires S (1965). The laboratory and clinical assessment of an isothiazole thiosemicarbazone (M 2 b 7714) against pox viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 130:118–127.
- Rao AR et al. (1966). Assessment of an isothiazole thiosemicarbazone in the prophylaxis of contacts of variola major. *Lancet*, 1:1072–1074.
- Reeves PM et al. (2005). Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nature Medicine*, 11:731–739.
- Rubins KH et al. (2004). The host response to smallpox: analysis of the gene expression program in peripheral blood cells in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:15190–15195.
- Sbrana E et al. (2007). Efficacy of the antipoxvirus compound ST-246 for treatment of severe orthopoxvirus infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76:768–773.
- Schmutz C et al. (1991). A mutation in the gene encoding the vaccinia virus 37,000-M(r) protein confers resistance to an inhibitor of virus envelopment and release. *Journal of Virology*, 65:3435–3442.
- Sidwell RW et al. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*, 177:705–706.
- Smee DF (2008). Progress in the discovery of compounds inhibiting orthopoxviruses in animal models. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 19:115–124.
- Smee DF, Sidwell RW (2003). A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models. *Antiviral Research*, 57:41–52.
- Sodeik B et al. (1994). Assembly of vaccinia virus: effects of rifampin on the intracellular distribution of viral protein p65. *Journal of Virology*, 68:1103–1114.
- Stephen EL, Jahrling PB (1979). Experimental Lassa fever virus infection successfully treated with ribavirin. *Lancet*, 1:268–269.

- USFDA (United States of America Food and Drug Administration) (2007). *Guidance for industry smallpox (variola) infection: developing drugs for treatment or prevention (draft guidance)*. Washington, DC, (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071179.pdf>, last accessed November 2010).
- USFDA (United States of America Food and Drug Administration) (2009). Subpart I. Approval of new drugs when human efficacy studies are not ethical or feasible. Section 310.610. Approval based on evidence of effectiveness from studies in animals. 21CFR340.610. In: *Application for FDA approval to market a new drug*, Volume 21CFR310.610. United States of America, Code of Federal Regulations, Washington, DC.
- US Institute of Medicine (2009). *Live variola virus: considerations for continuing research*. National Academy Press, Washington, DC.
- WHO (World Health Organization) (2001). *WHO Advisory Committee on Variola Virus Research. Report of the second meeting*. World Health Organization, Geneva, 2:1–10.
- WHO (World Health Organization) (2002). *WHO Advisory Committee on Variola Virus Research. Report of the fourth meeting*. World Health Organization, Geneva, 5.
- Wei H et al. (2009). Coadministration of cidofovir and smallpox vaccine reduced vaccination side effects but interfered with vaccine-elicited immune responses and immunity to monkeypox. *Journal of Virology*, 83:1115–1125.
- Westwood JC et al. (1966). Experimental respiratory infection with poxviruses. I. Clinical virological and epidemiological studies. *British Journal of Experimental Pathology*, 47:453–465.
- Yang G et al. (2005). An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge. *Journal of Virology*, 79:13139–13149.