JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643
ORIGINAL RESEARCHES

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

Исследование протективных свойств иммунодоминантных белков ортопоксвирусов при различных способах иммунизации

Зрелкин Д.И.[#], Зубкова О.В.[#]✉, Ожаровская Т.А., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Всемирная организация здравоохранения в 2022 г. объявила оспу обезьян чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения. Вирус оспы обезьян (MPV) принадлежит к роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Ортопоксвирусы во время репликации образуют 2 отдельные формы вирусных частиц: экзоцитозом выделяется оболочечный внеклеточный вирион (EEV), а зрелый внутриклеточный вирион (IMV) высвобождается в результате лизиса клеток. У этих двух форм вирионов отличаются наборы поверхностных белков, что обусловливает их различия в иммуногенности и инфекционности.

Цель работы — оценка иммуногенной и протективной активности 9 поверхностных антигенов вируса осповакцины.

Материал и методы. Геномы рекомбинантных аденовирусов человека 2-го серотипа, несущих поверхностные антигены вируса осповакцины, получали методом гомологичной рекомбинации в бактериальных клетках с последующей сборкой аденовирусных частиц в клетках HEK293. Иммуногенные и протективные свойства полученных рекомбинантных аденовирусов изучали на мышах BALB/c. Сыворотки крови после иммунизации животных исследовали методом иммуноферментного анализа на наличие антител к вирусу осповакцины. Протективные свойства оценивали на летальной модели инфекции мышей после интраназального заражения вирусом осповакцины штамма Western Reserve.

Результаты. Наиболее иммуногенными и протективными антигенами вируса осповакцины в составе рекомбинантных аденовирусов человека 2-го серотипа были гликопротеин B5 оболочечного внеклеточного вириона и мембранно-ассоциированный белок H3 зрелого внутриклеточного вириона. При изучении защитной эффективности антигенов показана 100% эффективность B5 и H3 при интраназальной иммунизации.

Заключение. При использовании панели рекомбинантных аденовирусных векторов, несущих гены поверхностных белков вируса осповакцины, показано, что оптимальная защита может быть достигнута с помощью комбинации антигенов оболочечного и зрелого вирионов. Данный подход может быть использован при разработке новых поливалентных вакцин против различных вирусных инфекций.

Ключевые слова: *вирус оспы обезьян, вирус осповакцины, рекомбинантный аденовирус, иммуногенность, протективность*

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 34 от 16.01.2023).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Зрелкин Д.И., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Исследование протективных свойств иммунодоминантных белков ортопоксвирусов при различных способах иммунизации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):18–30.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643
EDN: https://www.elibrary.ru/ONKJVE

[#] Авторы статьи, внёсшие равный вклад в подготовку публикации.

© Зрелкин Д.И., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

Study of the protective properties of immunodominant proteins of orthopoxviruses in various methods of immunization

Denis I. Zrelkin[#], Olga V. Zubkova[#] ✉, Tatiana A. Ozharovskaia, Olga Popova, Daria V. Voronina, Polina P. Goldovskaya, Irina V. Vavilova, Anastasia S. Chugunova, Inna V. Dolzhikova, Dmitry N. Shcherbinin, Dmitry V. Shcheblyakov, Denis Y. Logunov, Alexander L. Gintsburg

National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. In 2022, the World Health Organization declared monkeypox a public health emergency. The monkeypox virus (MPV) is part of the *Orthopoxvirus* genus within the *Poxviridae* family. During replication, orthopoxviruses produce two distinct forms of viral particles: the extracellular enveloped virion (EEV), released via exocytosis, and the intracellular mature virion (IMV), released through cell lysis. These forms differ in surface proteins composition, influencing their immunogenicity and infectivity.

Aim. To evaluate the immunogenic and protective activity of nine surface antigens of vaccinia virus.

Materials and methods . Recombinant human adenoviruses type 2 (rAd2) carrying surface antigens of vaccinia virus were obtained using homologous recombination in bacteria, followed by adenoviral particle assembly in HEK293 cells. The immunogenic and protective properties of these adenoviruses were tested in BALB/c mice. The presence of antibodies to the vaccinia virus was assessed using ELISA, and survival rates were evaluated in a lethal infection model after intranasal challenge with the vaccinia virus strain Western Reserve.

Results. The most immunogenic and protective antigens of the vaccinia virus within rAd2 were glycoprotein B5 of the EEV and membrane-associated protein H3 of the IMV, both showing 100% protective efficacy after intranasal immunization.

Conclusion. Using a panel of recombinant adenoviruses carrying genes of vaccinia virus surface proteins, it was shown that optimal protection is achieved using a combination of enveloped and mature virion antigens. This method could be used for development of new multivalent preparations against various viral infections.

Keywords: *monkeypox virus, vaccinia virus, recombinant adenovirus, immunogenicity, protective activity*

Ethical approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (protocol No. 34, January 16, 2023).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Zrelkin D.I., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Popova O., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Vavilova I.V., Chugunova A.S., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Study of the protective properties of immunodominant proteins of orthopoxviruses in various methods of immunization. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):18–30.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-634
EDN: https://www.elibrary.ru/ONKJVE

Введение

Ортопоксвирусы (ОПВ) относятся к семейству *Poxviridae*, подсемейству *Chordopoxvirinae,* роду *Orthopoxvirus,* который содержит 13 видов: *Orthopoxvirus abatinomacacapox*, *Orthopoxvirus akhmetapox*, *Orthopoxvirus camelpox*, *Orthopoxvirus cowpox*, *Orthopoxvirus ectromelia*, *Orthopoxvirus monkeypox*, *Orthopoxvirus raccoonpox*, *Orthopoxvirus skunkpox*, *Orthopoxvirus taterapox*, *Orthopoxvirus vaccinia*, *Orthopoxvirus variola*, *Orthopoxvirus volepox* и неофициально классифицированный вирус оспы Аляски[1]. Виды делятся на 2 родственные клады: ОПВ «Старого Света» (евразийские и африканские) и североамериканские ОПВ [1]. Многие из этих вирусов могут вызывать серьёзные заболевания у домашних животных, а также зоонозные инфекции у человека. Заражение людей чаще всего

[1] ICTV. Subfamily: Chordopoxvirinae. Genus: Orthopoxvirus. URL: https://ictv.global/report/chapter/poxviridae/poxviridae/orthopoxvirus

[#] Authors of the article who made an equal contribution to the preparation of the publication.

© Zrelkin D.I., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Popova O., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Vavilova I.V., Chugunova A.S., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

происходит при разведении скота, контакте с домашними животными, а также при торговле экзотическими животными в результате непосредственного контакта с ними. При попадании в неэндемичные регионы энзоотические ОПВ могут представлять угрозу для местных и эндемичных видов [2–4].

ОПВ разных видов антигенно и иммунологически близки друг к другу. Вакцинация против натуральной оспы, к примеру, обеспечивает перекрёстную защиту и от других представителей рода [5]. Однако после глобального искоренения натуральной оспы в 1980 г. многие страны начали постепенно прекращать плановую вакцинацию от этого заболевания [6]. В результате на сегодняшний день значительная часть населения лишена иммунной защиты к ОПВ. Именно это обстоятельство объясняет учащение в различных регионах мира вспышек, среди которых особо выделяется оспа обезьян. Произошедшая в 2022 г. глобальная вспышка была признана Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение [7]. Продолжающаяся эпидемия оспы обезьян в странах Африки может привести к ускоренной вирусной эволюции и адаптации к передаче зоонозного заболевания от человека к человеку [8]. Несмотря на существующие вакцинные препараты, ВОЗ рекомендовала разработку менее реактогенных вакцин для повышения эффективности и длительности защиты с целью контроля текущей вспышки.

ОПВ имеют большой и сложный протеом, содержащий более 200 белков, из которых более 30 относятся к структурным [9, 10]. Во время инфекции вирус существует в двух антигенно различных инфекционных формах [11–13]. Внутриклеточные зрелые вирионы (IMV) являются основными инфекционными вирусными частицами и играют ключевую роль в передаче вируса от человека к человеку. Поверхностная мембрана этой формы содержит по меньшей мере 11 белков: A14.5 (~10 кДа), E10 (12 кДа), I5 (13 кДа), A13 (14 кДа), A27 (14 кДа), A9 (~18 кДа), A14 (17–25 кДа), A17 (23–29 кДа), L1 (25–29 кДа), D8 (34 кДа) и H3 (35 кДа) [9–13]. Внеклеточные оболочечные вирионы (EEV) образуются из IMV и имеют дополнительную липопротеиновую мембрану, отвечающую за распространение вируса внутри организма [12]. Поверхностные белки EEV и IMV обеспечивают инфекционность ОПВ и служат основными мишенями для индукции протективного иммунитета [14, 15]. Поскольку антитела, нейтрализующие IMV, не нейтрализуют EEV, считается, что для максимальной защиты необходима иммунизация антигенами обеих этих форм [16].

Иммунодоминантными белками, на которые вырабатываются антитела, в том числе вируснейтрализующие, являются два гликопротеина EEV — A33 и B5, а также белки IMV: L1, H3, D8 и комплекс из 3 белков незрелого вириона A14, A17 и D13 либо комплекс A14, A17 и A27 зрелого вириона [14, 17–19]. Белки A33 и B5 играют роль в образовании оболочечного вириона и последующей инфекции [14]. Среди поверхностных белков зрелого вириона 3 белка опосредуют прикрепление вируса к клетке-хозяину. Белок D8 образует димеры на вирусной мембране и обеспечивает инфекционность вириона за счёт связывания с хондроитинсульфатом клеточной мембраны [20]. Белки A27 и H3 связывают гепарансульфат. A27 — мажорный белок мембраны, необходим для образования оболочечного внеклеточного вириона и участвует в прикреплении вируса к клетке и последующем слиянии вирусной и клеточной мембран. A27 формирует комплекс с трансмембранными белками A14 и A17, которые являются важными структурными элементами мембраны зрелого вириона. A17 также необходим для проникновения вируса в клетку и служит якорем для A27 [21]. H3 связывается с поверхностью клетки через гепарансульфаты и, как и белки D8 и A27, участвует в проникновении вируса в клетку. H3 является основным белком при развитии иммунного ответа в организме человека [22]. L1 — трансмембранный белок, который необходим для формирования зрелых вирионов и участвует в проникновении вируса в клетку [23].

Хотя большинство этих антигенов (A27, L1, B5 и A33) были изучены в составе различных поливалентных вакцин [18, 24, 25], некоторые иммунодоминантные белки не были включены в эти исследования. Кроме того, при высокой иммуногенности ОПВ сами по себе антигены обладают низкой иммуногенностью. Вакцинация очищенными белками или ДНК, кодирующими белки вируса осповакцины, требует многократной иммунизации для индукции протективного иммунного ответа [24, 26, 27]. В отличие от ДНК-вакцин и субъединичных вакцин, было показано, что вакцинация рекомбинантными аденовирусами (rAd) способствует формированию как напряжённого гуморального и клеточного иммунного ответа, так и защитного иммунитета после однократной иммунизации [28–30]. Учитывая важность быстрой индукции защитного иммунитета в условиях потенциальной вспышки, мы изучили возможность однократной иммунизации rAd, экспрессирующими антигены EEV и IMV вируса осповакцины.

Целью данной работы являлась оценка иммуногенной и протективной активности 9 поверхностных антигенов вируса осповакцины. Для реализации данной цели были сконструированы rAd, несущие гены поверхностных белков зрелого (D8, H3, L1, A14, A17, A27 и D13) и внеклеточного (A33 и B5) вирионов вируса осповакцины. Далее проводили исследование индивидуальных иммуногенных и

протективных свойств полученных аденовирусов при интраназальном и внутримышечном способах иммунизации. Данный подход может использоваться при разработке новых поливалентных вакцин против различных вирусных инфекций.

Материалы и методы

Культуры клеток и вирусы

Клетки линии Vero E6 (почка зелёной мартышки) культивировали в среде DMEM («Cytiva»), содержащей 4% фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Gibco»), 25 000 ЕД пенициллина и 25 мг стрептомицина («Панэко») при 5% CO_2. Клетки линии HEK293 (почка эмбриона человека) культивировали в среде DMEM («Cytiva»), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Gibco»), 25 000 ЕД пенициллина и 25 мг стрептомицина («Панэко») при 5% CO_2.

Вирус оспавакцины штамм Western Reserve (VACV WR) (GenBank #OP584857.1) накапливали в клетках Vero E6. Аликвоты вируссодержащей среды хранили при –80ºС. Биологическую активность вируса определяли стандартным методом титрования на культуре клеток путём подсчёта бляшек [31].

Получение рекомбинантных аденовирусов

rAd конструировали с использованием технологии, описанной ранее [32]. Гены антигенов вируса оспавакцины были амплифицированы с генома VACV WR (GenBank #OP584857.1) с использованием праймеров, указанных в **табл. 1**, и клонированы под контроль промотора цитомегаловируса человека. Плазмидные векторы с геномом rAd человека 2-го серотипа (rAd2) и целевым антигеном получали методом гомологичной рекомбинации в бактериальных клетках. rAd собирали и накапливали в клетках HEK293. Очистку и концентрирование вирусов проводили методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия в соответствии со стандартной методикой [33]. Количество вирусных частиц определяли стандартным спектрофотометрическим методом [34].

Животные

Мыши инбредной линии BALB/c, самцы и самки массой тела 16–18 г, были получены из питомника НПП «Питомник лабораторных животных г. Пущино» ФИБХ РАН. Животные содержались на базе вивария НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи в соответствии с требованиями по содержанию лабораторных животных и имели свободный доступ к корму и воде. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 34 от 16.01.2023).

Таблица 1. Последовательности праймеров для амплификации генов вируса оспавакцины
Table 1. Primer sequences for amplification of vaccinia virus genes

Название | Name	Последовательность | Sequence
A33-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGATGACACCAGAAAACGACG
A33-R	GATATCTCTAGATTAACAAAAATACTTTCTAACTTCTTGTG
H3-F	ACTAAGCTTATATGGCGGCGGCGAAAACT
H3-R	ATCTAGATATCTG TTAGATAAATGCGGTAAC
B5-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGAAAACGATTTCCGTTGTTACG
B5-R	TCTAGATTACGGTAGCAATTTATGGAACTTATA
D8-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGCCGCAACAACTATCTCCTATTAA
D8-R	GATATCGCTAGCTTACTAGTTTTGTTTTTCTCGCGAATATCG
A14-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGGACATGATGCTTATGATTGG
A14-R	GATATCTCTAGATTATTAGTTCATGGAAATATCGCTATG
A27-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGGACGGAACTCTTTTCCC
A27-R	TCTAGATTATTACTCATATGGGCGCCGTC
L1-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGGGTGCCGCGGCAAGCAT
L1-R	GATATCTCTAGATTATCAGTTTTGCATATCCGTGGTAGC
A17-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGAGTTATTTAAGATATTACAATATG
A17-R	GATATCTCTAGATTATTAATAATCGTCAGTATTTAAACTG
D13-F	CACCGGCGGTCGACAGATCTGCCACCATGAATAATACTATCATTAATTCTTTG
D13-R	ACTAGTTTATTAGTTATTATCTCCCATAATCTTG

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

Иммунизация и заражение животных

Пятинедельным мышам BALB/c интраназально под лёгким ингаляционным наркозом или внутримышечно вводили rAd в дозе 2×10^{10} вирусных частиц. Повторно те же аденовирусы вводили в той же дозе через 21 день. Образцы сыворотки собирали на 28-й день после 1-й иммунизации. Иммунизированные мыши были подвергнуты интраназальному заражению VACV WR в дозе 16 $ЛД_{50}$ (5×10^4 БОЕ) спустя 35 дней после 1-й иммунизации. В течение 14 дней после заражения проводили ежедневный осмотр животных и фиксировали клинические симптомы оспенной инфекции (снижение двигательной активности, сгорбленность, взъерошенность шерсти, конъюнктивит), изменение массы тела и гибель. Животных умерщвляли, если они теряли более 25% массы тела.

Иммуноферментный анализ

Титр специфических IgG-антител к вирусу осповакцины в образцах сыворотки определяли с помощью иммуноферментного анализа. 96-луночные планшеты сенсибилизировали VACV WR (10^5 БОЕ/планшет), разведённым в карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6), в течение ночи при 4ºC. Образцы сыворотки двукратно серийно разводили до 1 : 102 400, добавляли в заблокированные 96-луночные планшеты и инкубировали при 37ºC в течение 1 ч. Затем планшеты промывали и в каждую лунку добавляли вторичные антитела, конъюгированные с комплексом рекомбинантного стрептавидина с пероксидазой хрена. Инкубировали в течение 1 ч при 37ºC. После этого в планшеты вносили тетраметилбензидина гидрохлорид. Реакцию останавливали добавлением H_2SO_4, поглощение (450 нм) считывали с помощью планшетного фотометра «Multiskan FC» («ThermoFisher»). За конечный титр принимали наибольшее разведение сыворотки, значение оптической плотности в которой в 2 раза и более превышало значение в соответствующем разведении сыворотки крови интактных (неиммунизированных) мышей.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных и построение диаграмм проводили в программе «GraphPad Prism 8». Статистическую значимость различий между исследуемыми группами определяли с помощью Т-критерия Вилкоксона для зависимых выборок или U-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Дизайн и получение rAd, экспрессирующих гены поверхностных антигенов

Основными иммунодоминантными белками вируса осповакцины являются 2 гликопротеина оболочечного внеклеточного вириона — A33 и B5, а также белки зрелого внутриклеточного вириона: D8, H3, L1, A14, A17, A27 и D13. Указанные антигены обладают высокой степенью гомологии между разными видами ОПВ (**табл. 2**) [35–37].

Гены описанных выше белков были получены из генома вируса осповакцины и клонированы в геном rAd2 под контроль промотора цитомегаловируса человека (**рис. 1**). Геном rAd2 несет делецию области E1, которая делает аденовирус дефектным по репликации (в этот сайт делеции клонируется экспрессионная кассета с целевым геном). Для увеличения пакующей ёмкости дополнительно проводили делецию области E3.

Таким образом, нами были получены 9 rAd2, 2 из которых несли поверхностные антигены оболочечного вириона (rAd2-B5 и rAd2-A33), а 7 — антигены зрелого вириона (rAd2-H3, rAd2-L1, rAd2-D8, rAd2-D13, rAd2-A14, rAd2-A17 и rAd2-A27).

Таблица 2. Гомология между белками разных видов ОПВ
Table 2. Homology between proteins of different orthopoxvirus species

Антиген вируса осповакцины VACV antigen	Антиген (% гомологии) | Antigen (% homology)		
	Orthopoxvirus monkeypox	Orthopoxvirus cowpox	Orthopoxvirus variola
L1	M1 (98,4%)	CPVX099 (98,4%)	M1 (99,2%)
H3	H3 (93,83%)	CPVX112 (94,46%)	I3 (93,85%)
D8	E8 (94,41%)	CPVX125 (97,37%)	F8 (93,09%)
D13	E13 (98,91%)	CPVX131 (98,73%)	N3 (98,91%)
A14	A15 (100%)	CPVX146 (100%)	A14 (97,78%)
A17	A18 (97,55%)	CPVX150 (95,59%)	A17 (97,55%)
A27	A29 94,55%)	CPVX162 (95,45%)	A30 (93,64%)
A33	A35 (92,47%)	CPVX168 (91,49%)	A36 (89,25%)
B5	B6 (96,53%)	CPVX199 (93,69%)	B7 (92,74%)

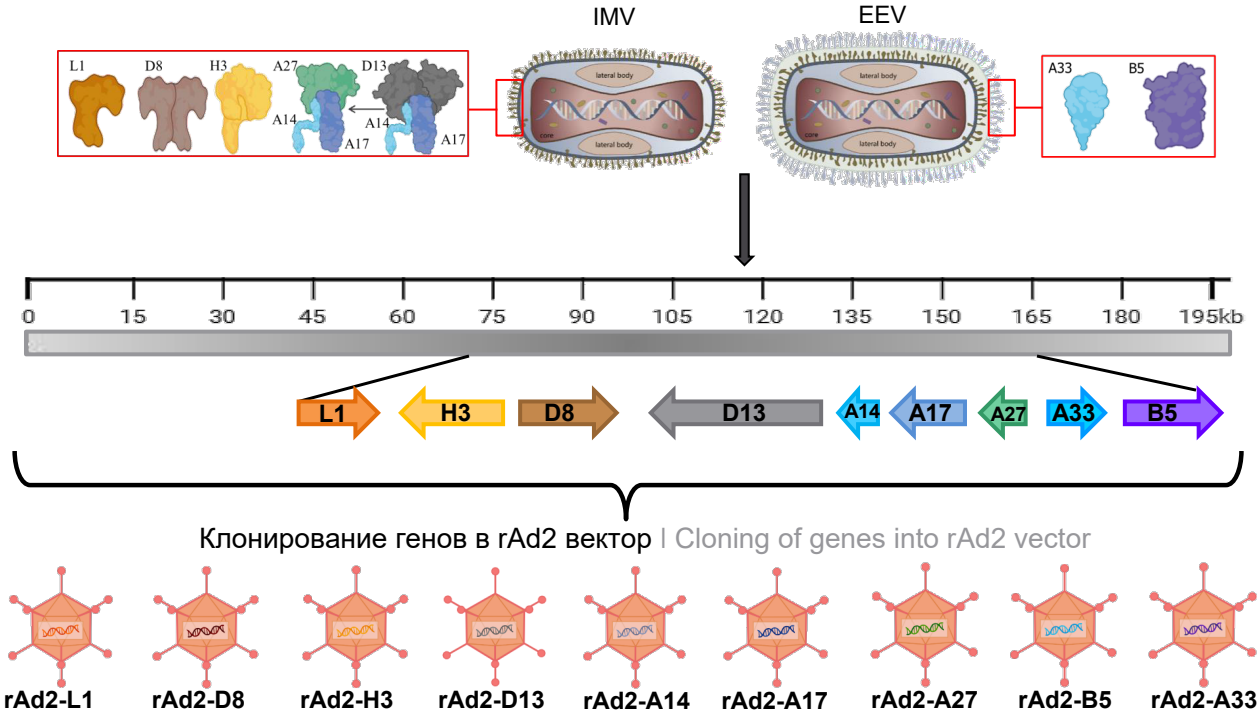

Рис. 1. Схема получения rAd, экспрессирующих поверхностные антигены вируса осповакцины.

L1 — миристоилированный белок; H3 — мембранно-ассоциированный белок p35 IMV; D8 — трансмембранный карбоангидразоподобный белок; D13 — белок мембраны IMV; A14 — структурный трансмембранный белок p16 IMV; A17 — трансмембранный белок IMV (фактор морфогенеза); A27 — белок мембраны IMV; B5 — мембранный гликопротеин типа I; A33 — мембранный гликопротеин типа II.

Fig. 1. Scheme for the production of recombinant adenoviruses expressing surface antigens of the vaccinia virus.

L1 — myristoylated protein; H3 — membrane-associated protein p35 IMV; D8 — transmembrane carbonic anhydrase-like protein; D13 — IMV membrane protein; A14 — structural transmembrane protein p16 IMV; A17 — transmembrane protein IMV (morphogenesis factor); A27 — membrane protein IMV; B5 — type I membrane glycoprotein; A33 — type II membrane glycoprotein.

Векторы rAd2 индуцируют гуморальный иммунный ответ in vivo

Для оценки иммуногенности сконструированных rAd (rAd2-A33, rAd2-B5, rAd2-H3, rAd2-L1, rAd2-D8, rAd2-D13, rAd2-A14, rAd2-A17, rAd2-A27) мышам внутримышечно или интраназально вводили аденовирусы в дозе 2×10^{10} вирусных частиц однократно или двукратно. Титры специфических IgG-антител к вирусу осповакцины определяли методом иммуноферментного анализа на 28-е сутки после иммунизации (**рис. 2, 3**).

Однократная внутримышечная иммунизация приводила к формированию специфических IgG-антител у мышей, которым вводили rAd2-B5, rAd2-H3, rAd2-D8, rAd2-D13 и rAd2-A14. Значения титров в этих группах имели значимые отличия от контрольной группы, где титры составляли менее 1 : 50 (рис. 2, *а*). Высокий уровень IgG-антител обнаружен в группе мышей, иммунизированных rAd2-H3 (средние геометрические титры (СГТ) 1 : 3676). Введение rAd2-B5 приводило к индукции IgG-антител с СГТ = 1 : 348,2. Минимальный уровень IgG-антител наблюдали для групп rAd2-D8 (СГТ = 1 : 100), rAd2-A14 (СГТ = 1 : 107,2) и rAd2-D13 (СГТ = 1 : 57,43) без достоверных различий между группами. Двукратная иммунизация привела к значительному росту уровня IgG-антител по сравнению с однократной только для групп rAd2-H3 (СГТ = 1 : 14703) и rAd2-B5 (СГТ = 1 : 2111) (рис. 2, *б*). Существенных различий между другими группами не обнаружено.

При однократной интраназальной иммунизации специфические IgG-антитела в сыворотке крови не были детектированы ни в одной группе. При двукратной интраназальной иммунизации специфические IgG-антитела обнаружены в сыворотке крови животных, которым вводили rAd2-B5 и rAd2-H3. Значения титров в этих группах имели значимые отличия от контрольной группы, где титры составляли менее 1 : 50 (рис. 3). Высокий уровень антител обнаружен в группе мышей, иммунизированных rAd2-H3 (СГТ = 1 : 1902,73). Введение rAd2-B5 приводило к индукции IgG-антител с СГТ = 1 : 183,4.

Протективная эффективность rAd2 in vivo

Следующим шагом была проверка защитной эффективности антигенов. Через 35 дней от начала двукратной иммунизации мышей заражали патоген-

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

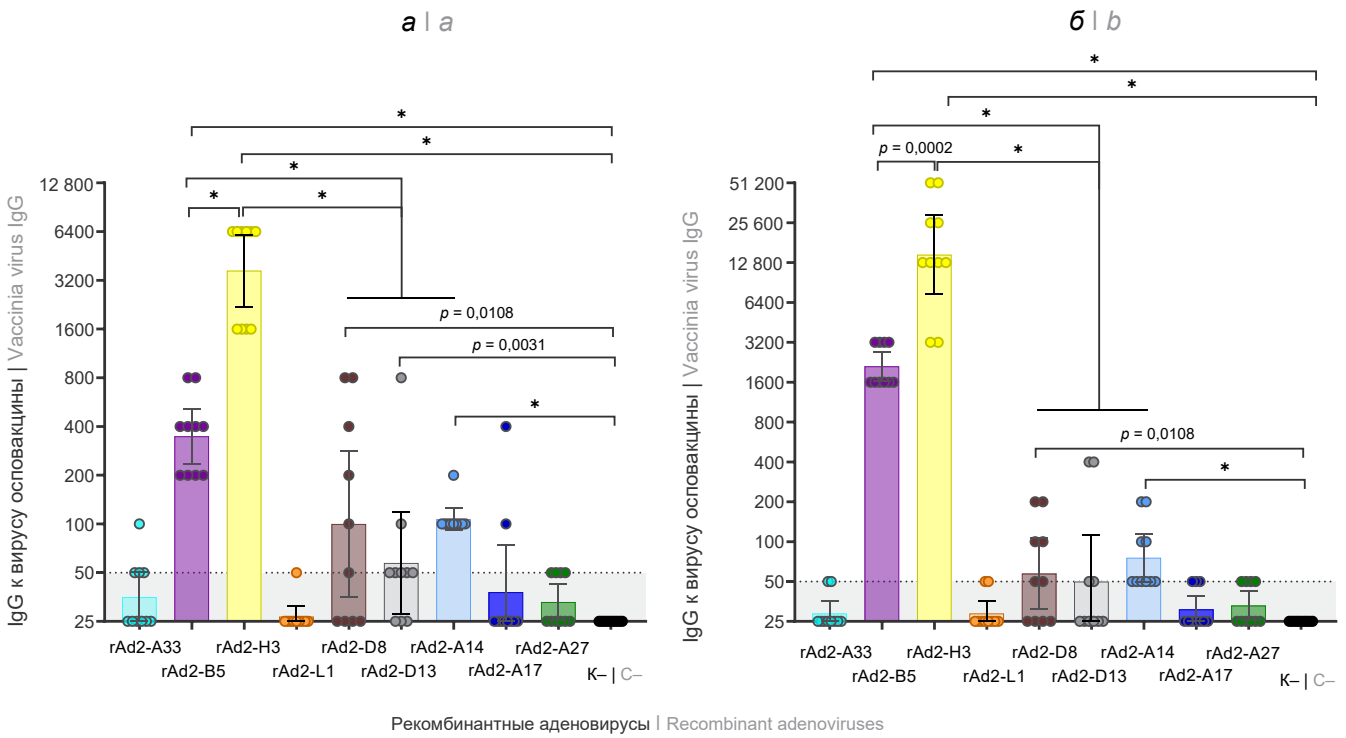

Рис. 2. Иммуногенность rAd, экспрессирующих поверхностные антигены вируса осповакцины, после однократной (*а*) и двукратной (*б*) внутримышечной иммунизации.

На рисунках указана достоверность при $p < 0,05$; *$p < 0,0001$. К– — контроль.

Fig. 2. Immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing surface antigens of the vaccinia virus after single (*a*) and double (*b*) intramuscular immunization.

The figures show the confidence at $p < 0.05$; *$p < 0.0001$. C– — control.

ным штаммом WR в дозе 16 $ЛД_{50}$ (5×10^4 БОЕ). Инфицирующая доза была выбрана на основании предварительных экспериментов по определению $ЛД_{50}$ *in vivo* [38]. Выживаемость и изменение массы тела регистрировали в течение 14 дней после заражения.

Как и ожидалось, в контрольной группе ярко выраженные клинические признаки заболевания с потерей массы тела более 13% проявлялись уже с 4-го дня. Как показано на **рис. 4**, все контрольные животные быстро теряли массу и умирали на 5–8-й день после заражения.

При внутримышечной иммунизации rAd2-B5, экспрессирующим гликопротеин B5 EEV, мы наблюдали 20% защиту животных от летальной инфекции (рис. 4, *а*, *б*). Двукратная внутримышечная иммунизация rAd2-D8, экспрессирующим гликопротеин D8 IMV, обеспечила 40% выживаемость животных. Животные, иммунизированные rAd2, экспрессирующими другие поверхностные антигены, потеряли 25% от своего первоначального веса в течение 5–7 дней после заражения. По результатам исследования сделан вывод о том, что при использовании внутримышечного способа введения одного антигена недостаточно для защиты.

Интересно, что интраназальная иммунизация значительно уменьшала тяжесть инфекции и защищала животных как от летального исхода, так и от потери веса (рис. 4, *в*, *г*). В частности, при иммунизации rAd2-B5 мы наблюдали 100% защитную эффективность. Стоит отметить, что в группе животных, иммунизированных rAd2-B5, незначительную потерю веса (не более 3%) на 3–5-й дни наблюдали только у половины животных. В группе rAd2-H3 выживаемость составила 87,5% (пала 1 мышь из 8). Кроме того, на 5-й день у 1 животного потеря веса была около 15% с постепенным восстановлением к 14-му дню. В группах rAd2-A33, rAd2-L1, rAd2-D8 и rAd2-D13 выживаемость составила 75%. Временная потеря веса к 5-му дню для групп не превышала 25%. У животных из групп rAd2-A17 и rAd2-A27 наблюдали 50% летальность при потере веса не более 15%. Животные, иммунизированные rAd2-A14, потеряли 21% от своего первоначального веса в течение 5 дней после заражения. Выживаемость в этой группе составила всего 25%.

Эти данные свидетельствуют о том, что rAd2-B5 и rAd2-H3 являются оптимальными векторами для защиты от интраназального заражения вирусом осповакцины, демонстрируя важность B5 и H3 в качестве протективных антигенов в этой модели ортопоксвирусной инфекции. Поэтому далее мы проверили эффективность сочетанной иммунизации (внутримышечно + интраназально) для индукции как системного, так и местного ответа.

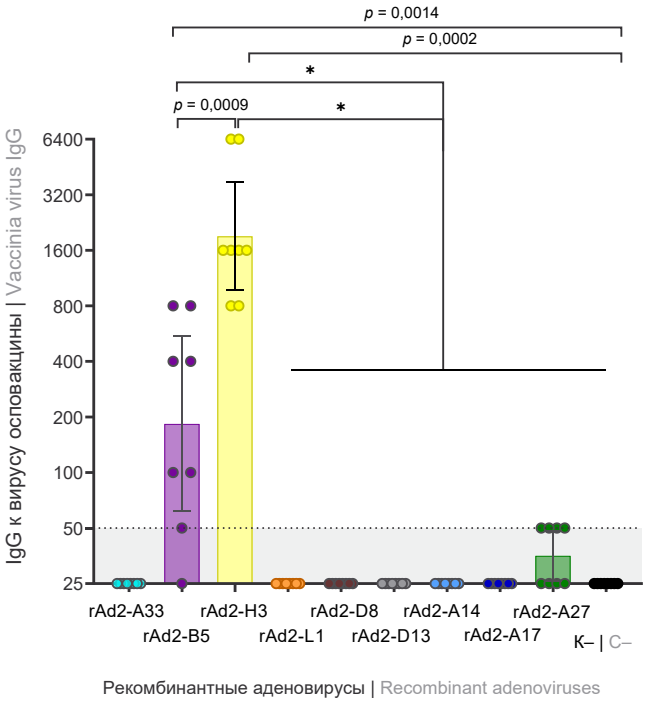

Рис. 3. Иммуногенность rAd, экспрессирующих поверхностные антигены вируса осповакцины, после двукратной интраназальной иммунизации.

На рисунке указана достоверность при $p < 0,05$; $*p < 0,0001$. К– — контроль.

Fig. 3. Immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing surface antigens of the vaccinia virus after two intranasal immunizations.

The figure shows the confidence at $p < 0.05$; $*p < 0.0001$. C– — control.

Мышам внутримышечно вводили rAd2-B5 или rAd2-H3 в дозе 2×10^{10} вирусных частиц, через 21 день тот же аденовирусный вектор вводили интраназально. Через 35 дней от начала иммунизации животных заражали патогенным штаммом WR в дозе 16 $ЛД_{50}$ (5×10^4 БОЕ). Выживаемость и изменение массы тела регистрировали в течение 14 дней после заражения (**рис. 5**).

Сочетанная иммунизация rAd2-B5 или rAd2-H3 обеспечивала 100% защиту животных от летальной инфекции. В группе животных, внутримышечно и интраназально иммунизированных rAd2-B5, потеря веса не была зарегистрирована. Однако в группе rAd2-H3 на 6-й день у 2 животных из 8 потеря веса была около 23% с постепенным восстановлением к 14-му дню.

Обсуждение

С момента использования вируса осповакцины в прошлом столетии сопутствующая вакцинация больше не проводится. Несмотря на ликвидацию натуральной оспы, мир продолжает сталкиваться с ортопоксвирусными инфекциями, которые требуют активных действий. Серьёзные побочные эффекты после вакцинации вирусом осповакцины подчеркнули необходимость разработки более безопасных вакцинных препаратов для борьбы с актуальными ортопоксвирусными инфекциями, такими как оспа обезьян.

Российские учёные внесли большой вклад в разработку противооспенных вакцин [39–41]. В настоящее время наименее реактогенной и безопасной является недавно разработанная вакцина «ОртопоксВак» научного центра «Вектор» Роспотребнадзора для профилактики ортопоксвирусных инфекций, которая представляет из себя штамм Л-ИВП вируса осповакцины с 6 нарушенными генами вирулентности [42].

Высокая степень гомологии в центральной области генома вирусов оспы обезьян и осповакцины, составляющая 96,3%, указывает на их генетическое сходство [35–37]. В частности, гены *MPV A35, B6, M1, E8, H3, A15, A18, A29* и *E13* демонстрируют значительную консервативность с ортологичными генами ОПВ, включая вирусы осповакцины и натуральной оспы [24].

Для разработки ортопоксвирусных вакцин использованы несколько технологий: живая вакцина, аттенуированный вирус с дефектом репликации, вакцина на основе ДНК и субъединичные вакцины. У каждой из них есть свои недостатки, такие как серьёзные нежелательные явления при применении живой вакцины, более низкая иммуногенность у аттенуированных нереплицирующихся вакцин и ДНК-вакцин, а также длительный цикл разработки рекомбинантных белков [24, 26, 43, 44].

rAd обладают рядом ключевых свойств, что делает их хорошими кандидатами для разработки векторных вакцин. rAd физически и генетически стабильны, эффективно индуцируют врождённый и адаптивный иммунный ответ при различных способах введения, в том числе при доставке через поверхности слизистых оболочек [45]. Последнее является значительным преимуществом перед другими типами вакцин, т. к. эффективность вакцинации зависит от места введения и привлечения антигенпрезентирующих клеток [46]. Внутримышечная иммунизация приводит к стимуляции системного иммунного ответа, но не обеспечивает эффективный барьерный иммунитет. При этом интраназальная иммунизация может вызвать гуморальный и клеточный иммунитет как на слизистых оболочках, так и системно [47]. Таким образом, разработка мукозальных вакцин позволит удовлетворить потребности в более эффективной защите от патогенов, проникающих через слизистые оболочки.

Аденовирусная технология представляет собой универсальную платформу для быстрой разработки и внедрения вакцин для борьбы с вирусными инфекциями, обладающими в том числе пандемическим потенциалом. В этом исследовании мы разра-

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

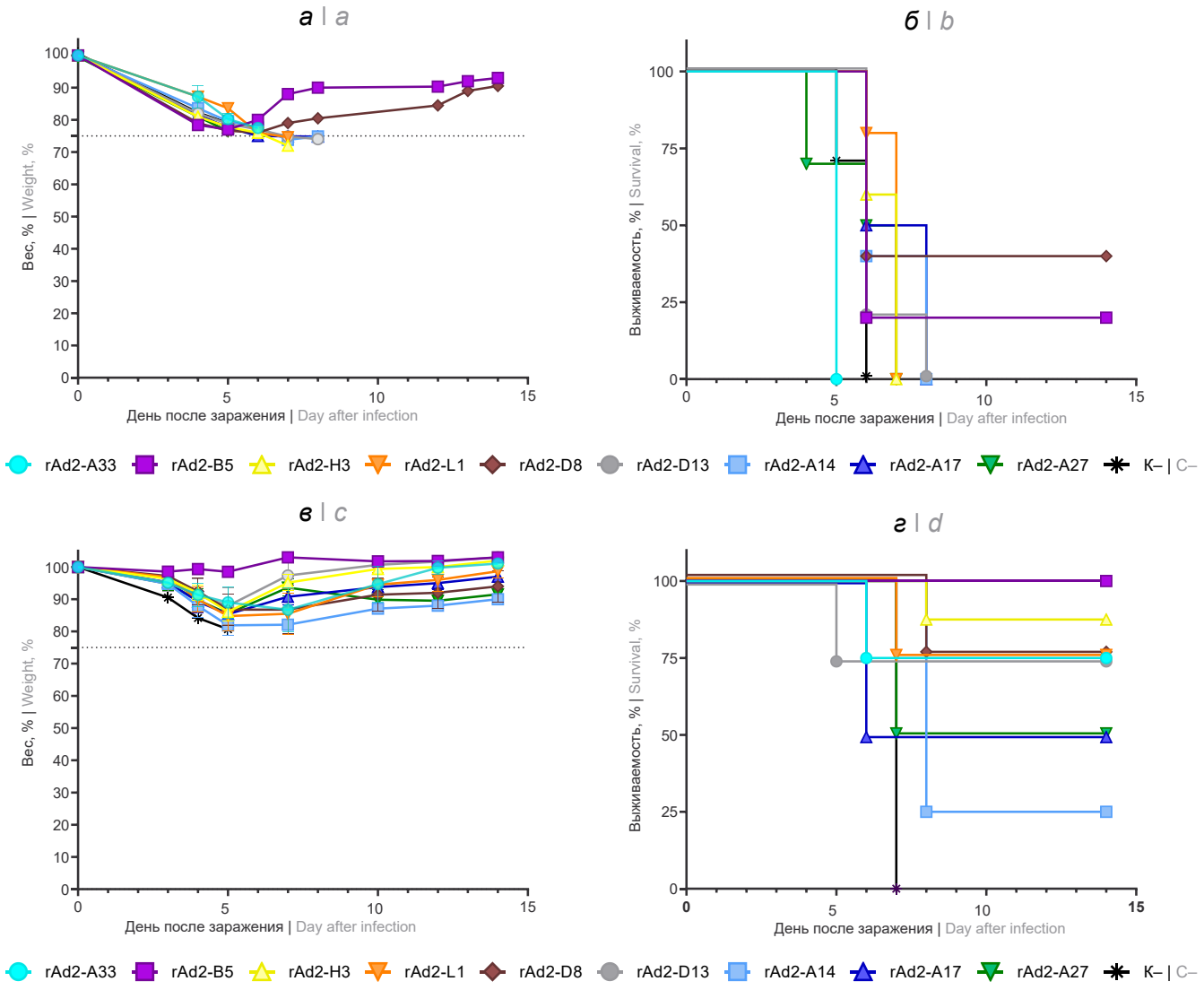

Рис. 4. Протективность rAd, экспрессирующих поверхностные антигены вируса оспавакцины, после внутримышечной (*а*, *б*) или интраназальной (*в*, *г*) иммунизации на модели летальной инфекции у мышей.

а, *в* — динамика веса (на графике указаны среднее значение и стандартная ошибка среднего значения); *б*, *г* — выживаемость. К– — контроль.

Fig. 4. The protective efficacy of recombinant adenovirus vectors expressing the surface antigens of the vaccinia virus after intramuscular (*a*, *b*) or intranasal (*c*, *d*) immunization in a mouse model of lethal infection.

a, *c* — weight dynamics (the graph shows the average value and the standard error of the average value); *b*, *d* — survival. C– — control.

ботали панель рекомбинантных репликативно-дефектных векторов на основе аденовируса человека 2-го серотипа, кодирующих поверхностные белки вируса оспавакцины. Два белка внеклеточного оболочечного вириона (A33 и B5) и 7 белков внутриклеточного зрелого вириона (L1, D8, H3, A14, A17, A27, D13) были выбраны для клонирования в геном rAd2. Мы оценили иммуногенность 9 поверхностных белков EEV и IMV, большинство из которых в предыдущих исследованиях показали свою эффективность [15, 17, 19, 24, 26, 27]. Однако в нашем исследовании из 9 поверхностных антигенов только B5 и H3 индуцировали иммунный ответ у мышей при системном и интраназальном введении. Мы предполагаем, что это может быть связано с тем, что оба белка B5 и H3 являются гликопротеинами и содержат эпитопы, которые распознаются клетками иммунной системы более эффективно, чем у белков других типов. По данным литературы, *in silico* предсказаны B- и T-клеточные эпитопы для иммунодоминантных белков MPV (M1, H3, E8, A29, A35 и B6) [48].

В экспериментах по исследованию протективности rAd нами продемонстрирована эффективность интраназальной иммунизации. Интраназальная иммунизация rAd2-B5, экспрессирующим гликопротеин B5 EEV, обеспечила наилучшую защиту (100%) с наименьшей потерей веса и быстрым восстановлением. Интраназальная иммунизация rAd2-H3, экспрессирующим гликопротеин

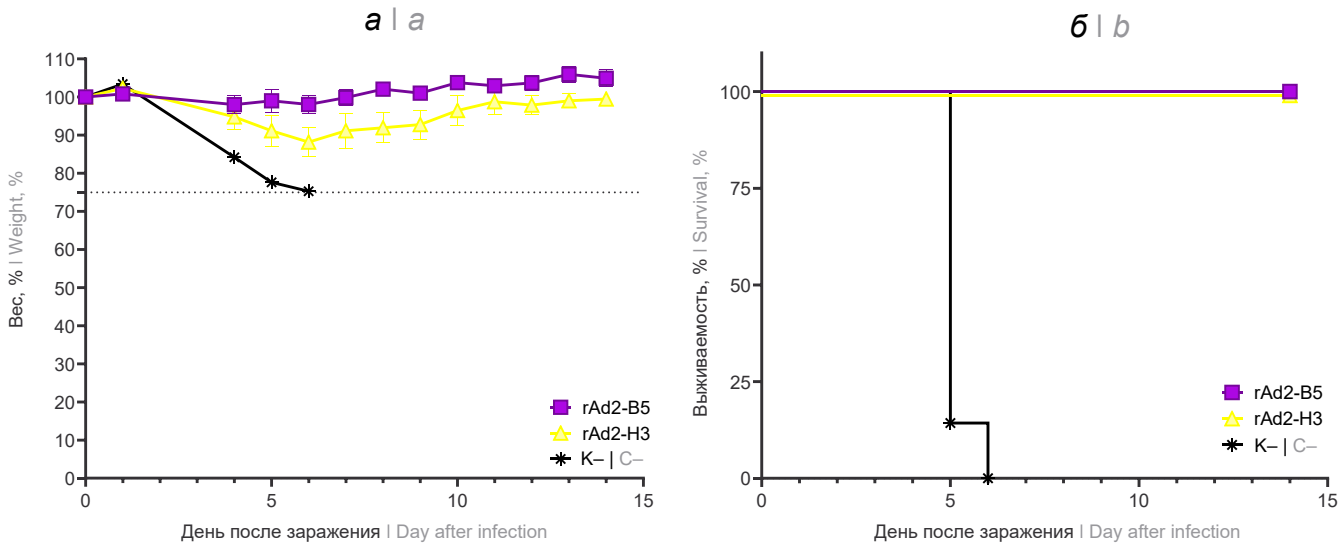

Рис. 5. Протективность rAd2-B5 и rAd2-H3 после сочетанной иммунизации (внутримышечно + интраназально) на модели летальной инфекции у мышей.

а — динамика веса; *б* — выживаемость. К– — контроль.

Fig. 5. The protective efficacy of recombinant adenovirus vectors rAd2-B5 and rAd2-H3 after combined immunization (im+in) in a mouse model of lethal infection.

a — weight dynamics; *b* — survival. C– — control.

H3 IMV, обеспечила 87,5% защиту. Другие поверхностные белки: EEV A33, IMV L1, D8 и D13 защищали животных от летальной инфекции на 75%. Введение rAd с антигенами IMV A17, A27 и A14 обеспечивало только частичную защиту от VACV на 25–50% в зависимости от антигена. Эффективность сочетанной иммунизации (внутримышечно + интраназально) rAd2-B5 или rAd2-H3 составила 100%. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований, в которых было показано, что для защиты от интраназального заражения наиболее важен специфический иммунитет к поверхностным антигенам EEV [49]. Антитела, специфические к B5, играют важную роль в борьбе с лёгочной или внутримозговой инфекцией [50]. Белок H3 активирует дендритные клетки, что приводит к секреции таких цитокинов, как интерлейкины-12p70, -10, -6 и фактор некроза опухоли-α, что в дальнейшем индуцирует пролиферацию $CD8^+$-Т-лимфоцитов, тем самым уничтожая инфицированные вирусом клетки [51].

Полученные результаты демонстрируют защитный потенциал выбранных антигенов и дают ценную информацию для последующей разработки эффективных и безопасных поливалентных вакцин против ОПВ. Наше исследование подтверждает, что B5 и H3 обладают наибольшим защитным потенциалом, а в комбинации с другими поверхностными белками зрелого вириона могут обеспечить максимальную эффективность. Необходимо дальнейшее изучение иммуногенного и протективного потенциала различных комбинаций антигенов. Эта работа закладывает прочный фундамент для последующей оптимизации векторных вакцин, подтверждая целесообразность объединения различных поверхностных антигенов EEV и IMV, что позволит достичь максимальной защиты против ОПВ, включая вирус оспы обезьян.

Заключение

В данной работе создана панель rAd, несущих гены поверхностных белков вируса осповакцины, и проведена оценка их иммуногенности и эффективности. В ходе нашего исследования установлено, что на модели летальной инфекции, вызываемой VACV WR, гликопротеины B5 и H3 демонстрируют наибольшую защиту при интраназальной иммунизации. Кроме того, сочетание с другими антигенами может не только усилить иммунный ответ, но и сформировать перекрёстный иммунитет к другим представителям рода *Orthopoxvirus*, вызывающим инфекции у людей. Эти результаты дают представление о защитном механизме поливалентных векторных вакцин и основу для дальнейшей разработки и внедрения таких препаратов, направленных на усиление защиты против ОПВ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Emerson G.L., Li Y., Frace M.A., et al. The phylogenetics and ecology of the orthopoxviruses endemic to North America. *PLoS One.* 2009;4(10):e7666.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007666
2. McInnes C.J., Wood A.R., Thomas K., et al. Genomic characterization of a novel poxvirus contributing to the decline of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK. *J. Gen. Virol.* 2006;87(Pt. 8):2115–25.
DOI: https://doi.org/10.1099/vir.0.81966-0

3. Smits J.E., Tella J.L., Carrete M., et al. An epizootic of avian pox in endemic short-toed larks (*Calandrella rufescens*) and Berthelot's pipits (*Anthus berthelotti*) in the Canary Islands, Spain. *Vet. Pathol.* 2005;42:59–65. DOI: https://doi.org/10.1354/vp.42-1-59
4. Thiel T., Whiteman N.K., Tirapé A., et al. Characterization of canarypox-like viruses infecting endemic birds in the Galápagos islands. *J. Wildl. Dis.* 2005;41(2):342–53. DOI: https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.2.342
5. Voigt E.A., Kennedy R.B., Poland G.A. Defending against smallpox: a focus on vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2016;15(9):1197–211. DOI: https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1175305
6. Henderson D.A. The eradication of smallpox – an overview of the past, present, and future. *Vaccine.* 2011;29(Suppl. 4):D7–9. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080
7. Nuzzo J.B., Borio L.L., Gostin L.O. The WHO declaration of monkeypox as a global public health emergency. *JAMA.* 2022; 328(7): 615–7. DOI: https://doi.org/10.1001/jama.2022.12513
8. WHO. Executive board, 154th session. Provisional agenda item 18 "Smallpox eradication: destruction of variola virus stocks"; 2024.
9. Rothenburg S., Yang Z., Beard P., et al. Monkeypox emergency: Urgent questions and perspectives. *Cell*. 2022;185(18):3279–81. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.002
10. Zhang R.R., Wang Z.J., Zhu Y.L., et al. Rational development of multicomponent mRNA vaccine candidates against mpox. *Emerg. Microbes Infect.* 2023;12(1):2192815. DOI: https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2192815
11. Galinski M.S. Paramyxoviridae: transcription and replication. *Adv. Virus Res.* 1991;39:129–62. DOI: https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60794-0
12. Curran J., Kolakofsky D. Replication of paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* 1999;54:403–22. DOI: https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60373-5
13. Law M., Smith G.L. Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. *Virology.* 2001;280(1):132–42. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.2000.0750
14. Riccardo V., Pablo G.C. Neutralization determinants on poxviruses. *Viruses*. 2023;15(12):2396. DOI: https://doi.org/10.3390/v15122396
15. Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* 2011;239(1):8–26. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x
16. Lustig S., Fogg C., Whitbeck J.C., et al. Combinations of polyclonal or monoclonal antibodies to proteins of the outer membranes of the two infectious forms of vaccinia virus protect mice against a lethal respiratory challenge. *J. Virol.* 2005;79(21):13454–62. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13454-13462.2005
17. Mucker E.M., Golden J.W., Hammerbeck C.D., et al. A nucleic acid-based orthopoxvirus vaccine targeting the vaccinia virus L1, A27, B5, and A33 proteins protects rabbits against lethal rabbitpox virus aerosol challenge. *J. Virol.* 2022;96(3):e0150421. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.01504-21
18. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., et al. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell.* 2016;167(3):684–94.e9. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.049
19. Sakhatskyy P., Wang S., Chou T.W., Lu S. Immunogenicity and protection efficacy of monovalent and polyvalent poxvirus vaccines that include the D8 antigen. *Virology.* 2006;355(2):164–74. DOI: https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.017.
20. Niles E.G., Seto J. Vaccinia virus gene D8 encodes a virion transmembrane protein. *J. Virol.* 1988;62(10):3772–8. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.62.10.3772-3778.1988
21. Takahashi T., Oie M., Ichihashi Y. N-terminal amino acid sequences of vaccinia virus structural proteins. *Virology.* 1994;202(2): 844–52. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.1994.1406
22. Chertov O.Yu., Telezhinskaya I.N., Zaitseva E.V., et al. Amino acid sequence determination of vaccinia virus immunodominant protein p35 and identification of the gene. *Biomed. Sci.* 1991;2(2):151–4.
23. Franke C.A., Wilson E.M., Hruby D.E. Use of a cell-free system to identify the vaccinia virus L1R gene product as the major late myristylated virion protein M25. *J. Virol.* 1990;64(12):5988–96. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.64.12.5988-5996.1990
24. Hooper J., Custer D., Thompson E. Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. *Virology*. 2003;306(1):181–95. DOI: https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00038-7
25. Golden J.W., Zaitseva M., Kapnick S., et al. Polyclonal antibody cocktails generated using DNA vaccine technology protect in murine models of orthopoxvirus disease. *Virol. J.* 2011;8:441. DOI: https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-441
26. Berhanu A., Wilson R.L., Kirkwood-Watts D.L., et al. Vaccination of BALB/c mice with Escherichia coli-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge. *J. Virol.* 2008;82(7):3517–29. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.01854-07
27. Fogg C., Lustig S., Whitbeck J.C., et al. Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. *J. Virol.* 2004;78(19):10230–7. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10230-10237.2004
28. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020;396(10255):887–97. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3
29. Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017;13(3):613–20. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1238535
30. Tukhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., et al. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine «Sputnik Light» for prevention of coronavirus infection in healthy adults. *Lancet Reg. Health Eur.* 2021;11:100241. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100241
31. Yakimovich A., Mercer J. High-content analyses of vaccinia plaque formation. In: Mercer J., eds. *Vaccinia Virus. Methods in Molecular Biology, Volume 2023.* New York;2019:237–53. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9593-6_15
32. Ожаровская Т.А., Попова О., Зубкова О.В. и др. Разработка и характеристика векторной системы на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. *Вестник РГМУ.* 2023;(1):4–11. DOI: https://doi.org/10.24075/vrgmu.2023.006 Ozharovskaia T.A., Popova O., Zubkova O.V., et al. Development and characterization of a vector system based on the simian adenovirus type 25. *Bulletin of RSMU*. 2023;(1):4–11. DOI: https://doi.org/10.24075/brsmu.2023.006
33. Su Q., Sena-Esteves M., Gao G. Purification of the recombinant adenovirus by cesium chloride gradient centrifugation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019;2019(5). DOI: https://doi.org/10.1101/pdb.prot095547
34. Maizel J.V., White D.O., Scharff M.D. The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology.* 1968;36(1):115–25. DOI: https://doi.org/10.1016/0042-6822(68)90121-9
35. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Safronov P.F., et al. Analysis of the monkeypox virus genome. *Virology*. 2002;297(2):172–94. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.2002.1446

36. Antoine G., Scheiflinger F., Dorner F., Falkner F.G. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology.* 1998;244(2): 365–96. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.1998.9123
37. Diaz-Cánova D., Mavian C., Brinkmann A., et al. Genomic sequencing and phylogenomics of cowpox virus. *Viruses.* 2022;14(10):2134. DOI: https://doi.org/10.3390/v14102134
38. Zrelkin D.I., Goldovskaia P.P., Kan V.Y. Determination of threshold value of protective level of antibodies to one of members of orthopoxvirus genus. In: *Scientific Research of the SCO Countries: Synergy and Integration.* Beijing;2024. DOI: https://doi.org/10.34660/INF.2024.87.21.085
39. Максютов Р.А., Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Щелкунов С.Н. Сравнение кандидатных вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека. *Acta Naturae.* 2017;9(2):93–99. Maksyutov R.A., Yakubitskyi S.N., Kolosova I.V., Shchelkunov S.N. Comparing new-generation candidate vaccines against human orthopoxvirus infections. *Acta Naturae.* 2017;9(2):88–93. DOI: https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-88-93 EDN: https://elibrary.ru/yyylkl
40. Стовба Л.Ф., Чухраля О.В., Черникова Н.К. и др. Безопасность и иммуногенность вакцины третьего поколения IMVAMUNE® на основе вируса вакцины, штамм MVA. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(1):26–41. Stovba L.F., Chukhralya O.V., Chernikova N.K., et al. Safety and immunogenicity of IMVAMUNE®, a third-generation vaccine based on the modified vaccinia Ankara (MVA) strain. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):26–41. DOI: https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-26-41 EDN: https://elibrary.ru/tjwrhx
41. Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Титова К.А. и др. Увеличение протективности противооспенной вакцины. *Медицинская иммунология.* 2022;24(1):201–6. Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Titova K.A., et al. Increasing protectivity of the smallpox vaccine. *Medical Immunology (Russia).* 2022;24(1):201–6. DOI: https://doi.org/10.15789/1563-0625-IPO-2203 EDN: https://elibrary.ru/asgrmi
42. Щелкунов С.Н., Якубицкий С.Н., Титова К.А. и др. Аттенуированный и высокоиммуногенный вариант вируса оспавакцины. *Acta Naturae.* 2024;16(2):82–9. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., et al. An attenuated and highly immunogenic variant of the vaccinia virus. *Acta Naturae.* 2024;16(2):82–9. DOI: https://doi.org/10.32607/actanaturae.27384 EDN: https://elibrary.ru/kcsbnp
43. Payne L.G., Kristensson K. Extracellular release of enveloped vaccinia virus from mouse nasal epithelial cells *in vivo*. *J. Gen. Virol.* 1985;66(Pt. 3):643–6. DOI: https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-3-643
44. Kenner J., Cameron F., Empig C., et al. LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine.* 2006;24(47-48):7009–22. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.087
45. Gao J., Mese K., Bunz O., Ehrhardt A. State-of-the-art human adenovirus vectorology for therapeutic approaches. *FEBS Lett.* 2019;593(24):3609–22. DOI: https://doi.org/10.1002/1873-3468.13691
46. Hervouet C., Luci C., Bekri S., et al. Antigen-bearing dendritic cells from the sublingual mucosa recirculate to distant systemic lymphoid organs to prime mucosal CD8 T cells. *Mucosal Immunol.* 2014;7(2):280–91. DOI: https://doi.org/10.1038/mi.2013.45
47. Holmgren J., Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 2005;11(4 Suppl.):S45–53. DOI: https://doi.org/10.1038/nm1213
48. Wang Y., Yang K., Zhou H. Immunogenic proteins and potential delivery platforms for mpox virus vaccine development: a rapid review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;245:125515. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125515
49. Kaufman D.R., Goudsmit J., Holterman L., et al. Differential antigen requirements for protection against systemic and intranasal vaccinia virus challenges in mice. *J. Virol.* 2008;82(14):6829–37. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.00353-08
50. Agrawal S., Gupta S., Agrawal A. Vaccinia virus proteins activate human dendritic cells to induce T cell responses in vitro. *Vaccine.* 2009;27(1):88–92. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.031
51. Monath T.P., Caldwell J.R., Mundt W., et al. ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) — a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int. J. Infect. Dis.* 2004;8(Suppl. 2):S31–44. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2004.09.002

Информация об авторах

Зрелкин Денис Игоревич — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, aleza4striker@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-0899-8357

Зубкова Ольга Вадимовна✉ — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, olga-zubkova@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7893-8419

Ожаровская Татьяна Андреевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, t.ozh@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7147-1553

Попова Ольга — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, olga.popova31@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3248-1227

Воронина Дарья Владимировна — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, daryavoronin2009@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6629-744X

Голдовская Полина Павловна — лаборант-исследователь лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, goldovskaya00@mail.ru, https://orcid.org/0009-0000-1965-0482

Вавилова Ирина Викторовна — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, vavilovairinav@yandex.ru, https://orcid.org/0009-0008-6272-0368

Information about the authors

Denis I. Zrelkin — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, aleza4striker@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-0899-8357

Olga V. Zubkova✉ — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, olga-zubkova@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7893-8419

Tatiana A. Ozharovskaia — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, t.ozh@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7147-1553

Olga Popova — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, olga.popova31@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3248-1227

Daria V. Voronina — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, daryavoronin2009@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6629-744X

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-643

Чугунова Анастасия Сергеевна — лаборант-исследователь лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, 170297_97@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-5964-6045

Должикова Инна Вадимовна — канд. биол. наук, зав. лаб. государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, dolzhikova@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-2548-6142

Щербинин Дмитрий Николаевич — канд. биол. наук лаб. молекулярной биотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, dim284@inbox.ru, https://orcid.org/0000-0002-8518-1669

Щебляков Дмитрий Викторович — канд. биол. наук, в. н. с., зав. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, sdmitriyv@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1289-3411

Логунов Денис Юрьевич — д-р биол. наук, академик РАН, зав. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, logunov@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-4035-6581

Гинцбург Александр Леонидович — д-р биол. наук, академик РАН, директор НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, gintsburg@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-1769-5059

Участие авторов: *Зрелкин Д.И.* — концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, написание статьи; *Зубкова О.В.* — руководство исследованием, участие в формулировании концепции и плана экспериментов, статистическая обработка данных, написание и научное редактирование статьи; *Ожаровская Т.А., Попова О.* — проведение исследований, получение генно-инженерных конструкций, написание и научное редактирование статьи; *Воронина Д.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Чугунова А.С., Щербинин Д.Н.* — проведение экспериментов; *Должикова И.В.* — научное редактирование текста рукописи; *Щебляков Д.В.* — научное редактирование текста рукописи, концептуализация, руководство; *Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.* — руководство проектом госзадания, привлечение финансирования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 03.01.2024;
принята к публикации 23.02.2025;
опубликована 28.02.2025

Polina P. Goldovskaya — laboratory assistant researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, goldovskaya00@mail.ru, https://orcid.org/0009-0000-1965-0482

Irina V. Vavilova — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, vavilovairinav@yandex.ru, https://orcid.org/0009-0008-6272-0368

Anastasia S. Chugunova — laboratory assistant researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, 170297_97@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-5964-6045

Inna V. Dolzhikova — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of the State Virus Collection, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, dolzhikova@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-2548-6142

Dmitry N. Shcherbinin — Cand. Sci. (Biol.), Laboratory of molecular biotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, dim284@inbox.ru, https://orcid.org/0000-0002-8518-1669

Dmitry V. Shcheblyakov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, sdmitriyv@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1289-3411

Denis Y. Logunov — Dr. Sci. (Biol.), RAS academician, Head, Laboratory of cellular microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, logunov@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-4035-6581

Alexander L. Gintsburg — Dr. Sci. (Biol.), RAS Academician, Director, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, gintsburg@gamaleya.org, https://orcid.org/0000-0003-1769-5059

Authors' contribution: *Zrelkin D.I.* — concept and design of research, experimental work, collecting, analyzing and interpreting data, writing the article; *Zubkova O.V.* — supervision, participation in the formulation of the concept and plan of experiments, statistical data processing, writing and editing the article; *Ozharovskaia T.A., Popova O.* — research work, obtaining genetically engineered constructs, writing and editing the article; *Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Vavilova I.V., Chugunova A.C., Shcherbinin D.N.* — experimental work; *Dolzhikova I.V.* — editing the text of the article; *Shcheblyakov D.V.* — editing the manuscript, conceptualization, supervision; *Logunov D.Y., Gintsburg A.L.* — project management of the state task, funding acquisition. International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 03.01.2024;
accepted for publication 23.02.2025;
published 28.02.2025