

## УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООСПЕННОЙ ВАКЦИНЫ

**Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Титова К.А., Пьянков С.А.,  
Якубицкий С.Н.**

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора,  
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Резюме.** В настоящее время человеческая популяция практически не имеет иммунитета к ортопоксвирусным инфекциям, которые вызывают вирусы натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, оспы буйволов. С каждым годом на разных континентах регистрируются все более массовые вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей. Для предотвращения перехода таких вспышек в распространённые эпидемии необходимо разрабатывать методы их вакцинопрофилактики. Массовое применение при этом классической живой вакцины на основе вируса осповакцины в настоящее время неприемлемо из-за ее высокой реактогенности. Поэтому необходимо создавать варианты вируса осповакцины со сниженной вирулентностью и с увеличенной иммуногенностью/протективностью. Целью данной работы было изучение протективного эффекта от летальной ортопоксвирусной инфекции, возникающего после иммунизации мышей в низких дозах вариантами вируса осповакцины с мутантным геном A34R, обуславливающим увеличенную продукцию внеклеточных вирионов, или с делетированным геном A35R, белковый продукт которого ингибирует представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II. Сравнивали штамм L1VP вируса осповакцины, который используется в России в качестве противооспенной вакцины, и созданные на его основе рекомбинантные варианты L1VP-A34R\*, L1VP-dA35R и L1VP-A34R\*-dA35R при интраназальной или внутрикожной иммунизации мышей линии BALB/c в дозах 10<sup>5</sup> или 10<sup>3</sup> БОЕ. Через 28 сут. после введения препаратов вирусов (экспериментальные группы) или физиологического раствора (контрольные группы) у мышей проводили прижизненный забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса и в индивидуальных сыворотках крови иммуноферментным анализом определяли уровень вирион-специфичных антител. На 30-е сут. эксперимента мышей заражали вирусом оспы коров в дозе 32 ЛД<sub>50</sub>, что в контрольной группе приводило к полной гибели мышей на 6-10-е сут. В группах мышей, иммунизированных изучаемыми вирусами в дозе 10<sup>5</sup> БОЕ, все животные выжили независимо от штамма и способа иммунизации. При внутрикожной иммунизации в дозе 10<sup>3</sup> БОЕ в группе мышей, иммунизированных исходным вирусом L1VP, выжило 83% животных, а все мутантные штаммы вируса осповакцины обеспечили 100%-ную защиту мышей от последующей инфекции вирусом оспы коров. Интраназальная иммунизация мышей в дозе 10<sup>3</sup> БОЕ штаммом L1VP защищала от летальной инфекции вирусом оспы коров лишь 33% животных, в то время как мутантные штаммы L1VP-A34R\* и L1VP-A34R\*-dA35R обеспечили защиту 67%, а штамм L1VP-dA35R – 75% мышей. Изученные мутантные вирусы осповакцины могут рассматриваться не только как новые кандидатные вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека, но и как векторные платформы для создания живых поливалентных вакцин против других инфекционных заболеваний.

*Ключевые слова:* вирус осповакцины, вирус оспы коров, мыши, иммунный ответ, антитела, протективность

### Адрес для переписки:

Щелкунов Сергей Николаевич  
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора  
630559, Россия, Новосибирская область, р. п. Кольцово.  
Тел.: 8 (903) 939-94-80.  
Факс: 8 (383) 336-74-09.  
E-mail: snshchel@rambler.ru, snshchel@vector.nsc.ru

### Address for correspondence:

Shchelkunov Sergei N.  
State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”  
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo.  
Phone: 7 (903) 939-94-80.  
Fax: 7 (383) 336-74-09.  
E-mail: snshchel@rambler.ru, snshchel@vector.nsc.ru

### Образец цитирования:

С.Н. Щелкунов, А.А. Сергеев, К.А. Титова,  
С.А. Пьянков, С.Н. Якубицкий «Увеличение  
протективности противооспенной вакцины» //  
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 1.  
С. 201-206. doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2203  
© Щелкунов С.Н. и соавт., 2022

### For citation:

S.N. Shchelkunov, A.A. Sergeev, K.A. Titova, S.A. Pyankov,  
S.N. Yakubitskiy “Increasing protectivity of the smallpox  
vaccine”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 1, pp. 201-206.  
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2203  
DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2203

## INCREASING PROTECTIVITY OF THE SMALLPOX VACCINE

Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Titova K.A., Pyankov S.A.,  
Yakubitskiy S.N.

State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Abstract.** At the present time, vast majority of human population lacks immunity against orthopoxvirus infections caused by variola (smallpox), monkeypox, cowpox, or buffalopox viruses. More and more mass outbreaks of orthopoxvirus infections are yearly registered among humans on different continents. To prevent transition of these outbreaks to widespread epidemics, we should develop appropriate immunoprophylaxis strategies. Currently, massive usage of the classic live vaccine based on vaccinia virus is not acceptable, due to its high reactogenicity. Therefore, it is necessary to develop the variants of vaccinia virus with reduced virulence and increased immunogenicity/protectivity. The aim of this work was to study protective effects against a lethal orthopoxvirus infection occurring after low-dose immunization of mice with vaccinia virus variants, i.e., carrying mutant *A34R* gene causing increased production of extracellular virions, or a *A35R* gene deletion encoding protein product inhibiting antigen presentation by the major histocompatibility complex class II. The LVP viral strain used in Russia as a smallpox vaccine, and its recombinant variants (LVP-A34R\*, LVP-dA35R and LVP-A34R\*-dA35R) were compared with intranasal or intradermal immunization of BALB/c mice at the doses of  $10^5$  or  $10^3$  PFU. 28 days following administration of viral preparations (experimental groups) or saline (control groups), the mice underwent intravital blood sampling from retroorbital venous sinus. The levels of virion-specific antibodies were determined in individual serum samples by enzyme immunoassay. On the day 30 of experiment, the mice were infected with cowpox virus at a dose of 32 LD<sub>50</sub>, which caused total death of control mice on days 6-10. In the groups immunized with the studied viruses at a dose of  $10^5$  PFU, all the animals survived, regardless of strain, or immunization method. Upon intradermal immunization ( $10^3$  PFU) of mice immunized with the original LVP virus, 83% of the animals survived, whereas all mutant strains of the vaccinia virus provided 100% protection of the mice from subsequent cowpox virus infection. Intranasal immunization of mice at a dose of  $10^3$  PFU with LVP strain protected only 33% of animals from lethal infection with cowpox virus, while the mutant strains LVP-A34R\* and LVP-A34R\*-dA35R provided 67% protection, and the LVP-dA35R strain has rescued 75% of the mice. The studied mutant vaccinia viruses can be considered not only new candidate vaccines against smallpox and other human orthopoxvirus infections, but also as vector platforms for creating live multivalent vaccines against other infectious diseases.

**Keywords:** vaccinia virus, cowpox virus, mice, immune response, antibodies, protectivity

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00006).

### Введение

Благодаря использованию вируса осповакцины (vaccinia virus, VACV) в качестве живой вакцины и строгому эпидемиологическому контролю к 1980 году удалось ликвидировать в глобальном масштабе такое особо опасное инфекционное заболевание человека как натуральная оспа. После удостоверения этого исторического события Всемирная организация здравоохранения настоятельно рекомендовала всем странам прекратить противооспенную вакцинацию [5]. Это было обусловлено тем, что при массовой вакцинации VACV в небольшом проценте случаев вызывал тяжелые побочные реакции, иногда завершающиеся летальными исходами [10]. За прошедшие с тех пор 40 лет человеческая популяция практически утратила иммунитет не только к оспе, но и другим зоонозным ортопоксвирусным инфекциям, которые вызывают близкородственные вирусы натуральной оспы вирусы оспы обезьян, оспы коров, оспы буйволов. Это привело к возраста-

нию опасности зоонозных ортопоксвирусов для человека. С каждым годом на разных континентах регистрируются все более массовые вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей [2, 9]. Для предотвращения перехода таких вспышек в распространенные эпидемии необходимо разрабатывать методы их иммунопрофилактики, главным из которых является вакцинопрофилактика. Массовое применение при этом классической вакцины на основе VACV в настоящее время противопоказано вследствие ее высокой реактогенности. Поэтому необходимо создавать варианты VACV со сниженной вирулентностью (аттенуированные, ослабленные) и/или с увеличенной иммуногенностью/протективностью [6, 8]. В последнем случае можно значительно снизить иммунизирующую дозу вируса и тем самым избавиться от патогенного воздействия VACV на организм [12].

**Целью данной работы** было изучение протективного (защитного) эффекта от летальной ортопоксвирусной инфекции, возникающего после иммунизации мышей в низких дозах вариантами VACV с направленно измененным геном *A34R*,

обусловливающим увеличенную продукцию внеклеточных вирионов, или с deletированным геном *A35R*, контролирующим представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II.

## Материалы и методы

Штамм L1VP вируса осповакцины (VACV) [12] и созданные на его основе рекомбинантные варианты VACV L1VP-A34R\* [11], L1VP-dA35R [14] и L1VP-A34R\*-dA35R, а также штамм GRI-90 вируса оспы коров (CPXV) [1] получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

В исследованиях использовали инбредных разнополых 3-5-недельных мышей линии BALB/c массой 13-16 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Исследования и манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № ГНЦ ВБ «Вектор»/08-09.2020 от 25.09.2020 г.).

Препараты вирусов L1VP, L1VP-A34R\*, L1VP-dA35R и L1VP-A34R\*-dA35R или физиологический раствор вводили животным интраназально (и/н) или внутрикожно (в/к), как описано [12]. Использовали дозы заражения  $10^5$  или  $10^3$  БОЕ/30 мкл/животное. В каждой группе экспериментальных и контрольных животных было по 6 особей.

Через 28 сут. после введения препаратов VACV (экспериментальные группы) или физиологического раствора (контрольные группы) у мышей проводили прижизненный забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса с помощью одноразовых стерильных капилляров. Из крови мышей была получена сыворотка путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием. Индивидуальные образцы сывороток крови мышей хранили при температуре минус 20 °С.

Иммуноферментный анализ (ИФА) индивидуальных сывороток крови мышей выполняли, как описано [12]. В качестве антигена использовали очищенный препарат зрелых внутриклеточных вирионов VACV L1VP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

На 30-е сут. эксперимента (второй день после взятия крови) иммунизированных вирусами и контрольных животных и/н заражали вирусом

оспы коров штамм GRI-90 в дозе 32 ЛД<sub>50</sub>. За животными наблюдали в течение 14 сут. и регистрировали их гибель.

## Результаты и обсуждение

Вирус VACV входит в состав рода Orthorovirus семейства Poxviridae, объединяющего крупнейшие ДНК-содержащие вирусы млекопитающих. Вирусный геном ортопоксвирусов в зависимости от вида имеет размер 190-220 тыс. пар нуклеотидов и кодирует около 200 белков. Основной инфекционной формой в потомстве данных вирусов является внутриклеточный зрелый вирион (intracellular mature virion, IMV), в состав которого входит не менее 85 разных вирусных белков. Небольшая часть синтезируемых в клетке вирусных частиц одевается дополнительной липопротеидной оболочкой и такие оболочечные вирионы (extracellular enveloped virion, EEV) выходят из инфицированных клеток. EEV дополнительно содержат 8 вирусных белков, ассоциированных с их внешней оболочкой [10].

Препараты вакцин на основе VACV содержат в основном IMV частицы, получаемые после разрушения инфицированных клеток. Следует отметить, что только при размножении VACV *in vivo* происходит продукция антител как к антигенам IMV, так и EEV форм. Более того, только живой вирус в организме животного индуцирует синтез протективных антител к невирионным белкам, а также стимулирует клеточный иммунный ответ [6].

Сложная организация ортопоксвирусов обуславливает то, что механизм иммунной защиты от оспы (и других ортопоксвирусных инфекций) до сих пор не полностью изучен [3, 6, 10]. Известно, что гуморальный (антительный) ответ на противооспенную вакцинацию играет решающую роль в защите от последующей вирусной инфекции [4, 6, 13].

Ортопоксвирусы в процессе коэволюции с чувствительными к ним животными выработали различные молекулярные механизмы подавления разных этапов развития врожденного и адаптивного иммунных ответов на инфекцию. Удаление или направленная модификация вирусных генов, которые подавляют иммунный ответ организма на инфекцию, в некоторых случаях может обуславливать увеличение иммуногенности VACV [2, 11].

Ранее было показано, что белок, кодируемый геном *A35R* VACV, ингибирует презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II, тем самым снижая антительный ответ на вирусную инфекцию [7, 14]. Делеция гена *A35R* приводит к аттенуации VACV [7] и увеличению продукции вирусспецифических антител [14].

Ген *A34R* направляет синтез белка, который входит в состав липопротеидной оболочки EEV

и контролирует высвобождение этой формы вирионов из клеток и эффективное распространение их по инфицированному организму. Большинство штаммов VACV продуцируют менее 1% EEV в суммарном потомстве при размножении на культурах клеток, но введение двух точечных мутаций в гене *A34R* приводит к увеличению пропорции EEV до 30% продуцируемых вирионов и как следствие повышает иммунный ответ на инфекцию [11, 15].

Патогенность и иммуногенность VACV зависят от используемого штамма вируса, способа и дозы его введения в организм животного [4, 10]. В большинстве работ иммуногенные свойства вариантов VACV изучали при введении их мышам в дозах от  $10^6$  до  $10^8$  БОЕ [7, 11, 12, 13, 14, 15]. Снижение иммунизирующей дозы VACV приводит не только к уменьшению реактогенности вируса, но и к снижению уровня синтезируемых VACV-специфичных антител [4, 11, 12].

В данной работе нами впервые изучено на мышинной модели влияние вирусных генов *A34R* и *A35R* на свойства протективности VACV при введении вирусов в низкой иммунизирующей дозе.

Проводили сравнение клонового варианта штамма L1VP и полученных на его основе мутантных штаммов L1VP-A34R\* (в ген *A34R* направлено введены две точечные мутации, приводящие к увеличению продукции EEV [11]), L1VP-dA35R

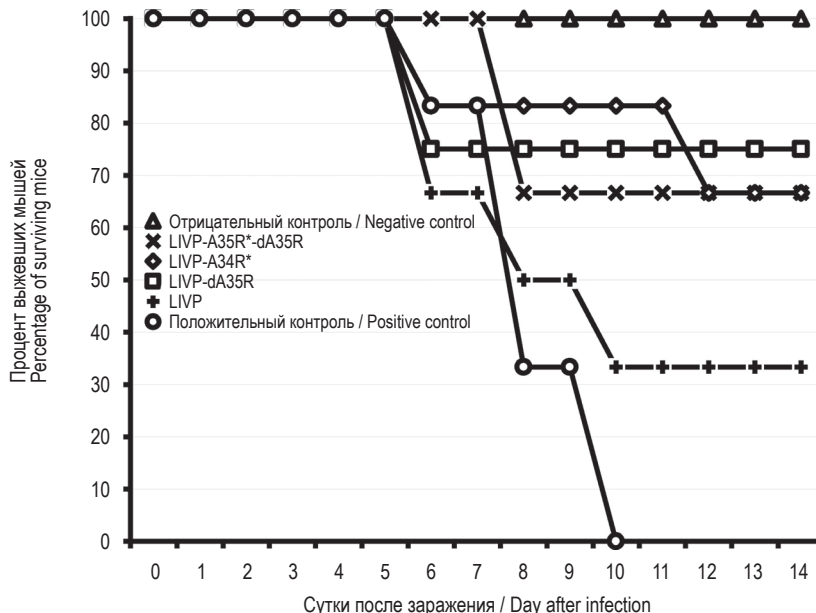
(направленно делетирован ген *A35R* [14]) и L1VP-A34R\*-dA35R. Мышам линии BALB/c вводили изучаемые вирусы интраназально (и/н) или внутривожно (в/к) в дозах  $10^5$  или  $10^3$  БОЕ.

Для оценки протективности (защитного эффекта) на 30-е сут. после иммунизации мышей и/н заражали CPXV GRI-90 в дозе 32 ЛД<sub>50</sub>. В группе положительного контроля (введен физиологический раствор) инфекция CPXV приводила к полной гибели мышей на 6-10 сут. В группах мышей, иммунизированных изучаемыми вирусами в дозе  $10^5$  БОЕ, все животные выжили не зависимо от штамма и способа иммунизации.

При в/к иммунизации в дозе  $10^3$  БОЕ все рекомбинантные штаммы VACV обеспечили 100% защиту мышей от последующей инфекции CPXV. В группе мышей, иммунизированных исходным вирусом L1VP, при этом выжило 83% животных.

И/н иммунизация мышей в дозе  $10^3$  БОЕ привела к формированию существенно меньшего протективного эффекта. Исходный штамм L1VP при этом обеспечил защиту лишь 33% животных от летальной инфекции CPXV, в то время как рекомбинантные штаммы VACV L1VP-A34R\* и L1VP-A34R\*-dA35R обеспечили защиту 67%, а штамм L1VP-dA35R – 75% мышей (рис. 1).

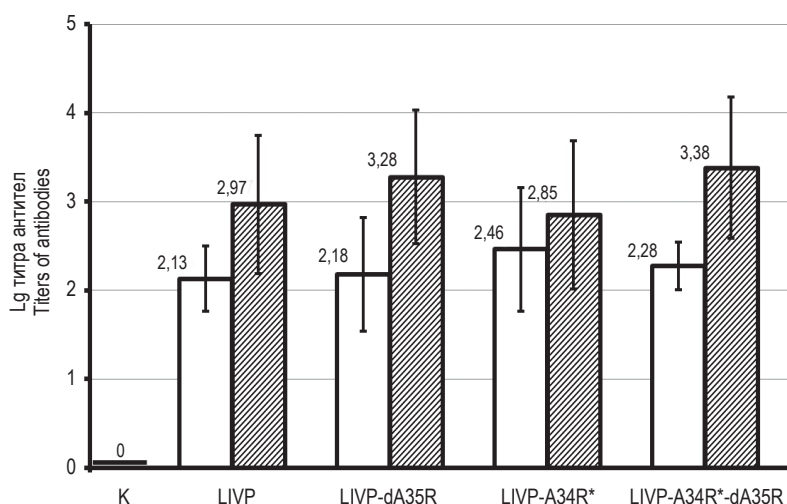
ИФА сывороток крови в экспериментальных группах мышей показал, что при в/к иммунизации всеми вариантами VACV индуцируется более



**Рисунок 1.** Динамика гибели мышей, иммунизированных VACV L1VP, L1VP-dA35R, L1VP-A34R\*, L1VP-A34R\*-dA35R в дозе  $10^3$  БОЕ/животное, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 32 ЛД<sub>50</sub> на 30 сут. эксперимента  
Примечание. Приведены данные для групп животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также не иммунизированных групп и не инфицированных (Отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 (Положительный контроль).

Figure 1. Death dynamic of mice, immunized by VACV L1VP, L1VP-dA35R, L1VP-A34R\*, L1VP-A34R\*-dA35R in dose  $10^3$  pfu/animal after intranasal infection with CPXV GRI-90 in 32 LD<sub>50</sub> dose on day 30 of the experiment

Note. Data for animal groups immunized with the corresponding virus or non-immunized groups and non-infected (Negative control) or infected by CPXV GRI-90 (Positive control).



**Рисунок 2.** Титры VACV-специфичных антител в сыворотке крови мышей, инфицированных интраназально (белые столбцы) или внутрикожно (столбцы со штриховкой) вирусами LIVP, LIVP-dA35R, LIVP-A34R\* или LIVP-A34R\*-dA35R, определенные методом ИФА

Примечание. Цифрами над столбцами указаны средние геометрические значения логарифма обратного титра VACV-специфических IgG для групп из 6 животных. К – контрольная группа.

Figure 2. Titers of VACV-specific antibodies in sera of mice, infected intranasally (the white bars) and intradermally (the bars) by the viruses LIVP, LIVP-dA35R, LIVP-A34R\* or LIVP-A34R\*-dA35R assessed by ELISA

Note. The geometric means of log reciprocal titer of VACV-specific IgG determined for the study groups of 6 animals are mentioned by digits. C, control group.

высокий уровень антител, специфичных к антигенам IMV VACV, по сравнению с аналогичными группами животных, и/н иммунизированных (рис. 2).

Таким образом, меньший протективный эффект, выявленный при и/н введении вирусных препаратов по сравнению с в/к инъекцией, обусловлен меньшим уровнем индуцируемых VACV-специфичных антител.

## Заключение

Введение точечных мутаций, приводящих к заменам Asp110 → Asn и Lys151 → Glu в белке A34, либо делеция гена A35R в составе генома VACV LIVP приводит к увеличению защитного эффекта вируса от последующей летальной ортопоксвирусной инфекции (рис. 1). Наиболее выраженно этот эффект наблюдался при низкой иммунизирующей дозе ( $10^3$  БОЕ), когда штамм VACV LIVP, используемый в России для противосспенной вакцинации, не обеспечивал 100% защиты от 32 ЛД<sub>50</sub> CPXV GRI-90. Следует отметить, что двойная мутация A34R\*-dA35R не обеспечивала кумулятивного эффекта по увеличению выработки IMV-специфичных антител и усиле-

нию протективного эффекта от последующей летальной ортопоксвирусной инфекции мышей. По-видимому, изученные мутантные вирусы обуславливают увеличение протективности не только за счет продукции антител к вирионным белкам IMV VACV, но и вследствие более эффективной индукции других механизмов развития гуморального и клеточного иммунных ответов как на вирионные, так и на невирионные вирусные белки [3, 6].

В культивируемых клетках животных изученные мутантные вирусы размножаются с такой же эффективностью, как исходный штамм LIVP [11, 14]. Возможность снижения иммунизирующей дозы этих вариантов VACV позволяет при необходимости значительно упростить производство на их основе большого количества доз живой вакцины для массовой вакцинации.

Вирусы LIVP-A34R\* и LIVP-dA35R могут рассматриваться не только как новые кандидатные живые вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека, но и как векторные платформы для создания на их основе методами генетической инженерии поливалентных вакцин против других инфекционных заболеваний.

## Список литературы / References

1. Маренникова С.С., Гашников П.В., Жукова О.А., Рябчикова Е.И., Стрельцов В.В., Рязанкина О.И., Чекунова Э.В., Янова Н.Н., Щелкунов С.Н. Биотип и генетическая характеристика изолята вируса оспы коров, вызвавшего инфекцию ребенка // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1996. № 4. С. 6-10. [Marennikova S.S., Gashnikov P.V., Zhukova O.A., Ryabchikova E.I., Streltsov V.V., Ryazankina O.I.,

Chekunova E.V., Yanova N.N., Shchelkunov S.N. Biotype and genetic characterization of the isolate of cowpox virus having caused infection in a child. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1996, no. 4, pp. 6-10. (In Russ.)

2. Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы // Вопросы вирусологии, 2019. Т. 64, № 5. С. 206-214. [Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal*], 2019, Vol. 64, no. 5, pp. 206-214. (In Russ.)

3. Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses*, 2018, Vol. 10, e101. doi: 10.3390/v10030101.

4. Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. Shared models of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, pp. 9458-9463.

5. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.

6. Moss B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 239, no. 1, pp. 8-26.

7. Rehm K.E., Roper R.L. Deletion of the gene from modified vaccinia virus Ankara increases immunogenicity and isotype switching. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, pp. 3276-3283.

8. Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses*, 2015, Vol. 7, pp. 1726-1803.

9. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.*, 2013, Vol. 9, e1003756. doi: 10.1371/journal.ppat.1003756.

10. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. Genes that control vaccinia virus immunogenicity. *Acta Naturae*, 2020, Vol. 12, pp. 33-41.

11. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulichev L.E., Yurganova I.A., Odnoshevskiy D.A., Kolosova I.V., Pyankov S.A., Taranov O.S. The influence of an elevated production of extracellular enveloped virions of the vaccinia virus on its properties in infected mice. *Acta Naturae*, 2020, Vol. 12, pp. 120-132.

12. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. Effect of the route of administration of the vaccinia virus strain LIVP to mice on its virulence and immunogenicity. *Viruses*, 2020, Vol. 12, 795. doi: doi.org/10.3390/v12080795.

13. Xu R., Johnson A.J., Liggitt D., Bevan M.J. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, pp. 6265-6271.

14. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Highly immunogenic variant of attenuated vaccinia virus. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2016, Vol. 466, pp. 35-38.

15. Yu J., Li Y., Zhong M., Yang J., Zhou D., Zhao B., Cao Y., Yan H., Zhang E., Yang Y., Feng Z., Qi X., Yan H. Improved immune response against HIV-1 Env antigen by enhancing EEV production via K151E mutation in the A34R gene of replication-competent vaccinia virus Tiantan. *Antiviral Res.*, 2018, Vol. 153, pp 49-59.

---

**Авторы:**

**Щелкунов С.Н.** — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Сергеев А.А.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Титова К.А.** — младший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Пьянков С.А.** — ведущий научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Якубицкий С.Н.** — младший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Authors:**

**Shchelkunov S.N.**, PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Sergeev A.A.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Titova K.A.**, Junior Research Associate, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Pyankov S.A.**, Leading Research Associate, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Yakubitskiy S.N.**, Junior Research Associate, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

---

Поступила 11.02.2021  
Принята к печати 07.11.2021

Received 11.02.2021  
Accepted 07.11.2021