

Р.А.Максютов

## ЖИВЫЕ ПРОТИВООСПЕННЫЕ ВАКЦИНЫ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация

Ликвидация натуральной оспы в результате кампании глобальной вакцинации до сих пор остается одним из величайших триумфов медицинской науки. С учетом последующего прекращения вакцинации в настоящее время человеческая популяция практически не имеет противооспенного иммунитета и является беззащитной перед патогенными для человека ортопоксвирусами. Использование классической живой вакцины первого поколения, получаемой размножением вируса на коже телят, или вакцины второго поколения, продуцируемой на культурах клеток млекопитающих, или развивающихся куриных эмбрионах, для массовой вакцинации в настоящее время недопустимо из-за значительного увеличения в последние десятилетия иммунодефицитных состояний в человеческой популяции. Атенуированные нереплицирующиеся противооспенные вакцины третьего поколения, создаваемые в процессе множественных пассажей вируса осповакцины (ВОВ) в культуре клеток гетерологичного хозяина, индуцируют более низкий противооспенный иммунитет в сравнении с классической вакциной. Наиболее перспективным подходом является получение противооспенной вакцины четвертого поколения путем направленного нарушения генов ВОВ, контролирующих защитные реакции организма против вирусной инфекции, генов круга хозяев и генов, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот, не затрагивая гены, контролирующие размножение вируса. Новый аттенуированный и высокоиммуногенный штамм ВОВ LIVPΔ6 с нарушением шести генов вирулентности в настоящее время проходит доклинические исследования и в дальнейшем может явиться эффективной и безопасной вакциной четвертого поколения против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

**Ключевые слова:** натуральная оспа, оспа обезьян, аттенуированная высокоиммуногенная противооспенная вакцина четвертого поколения.

Корреспондирующий автор: Максютлов Ринат Амирович, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

R.A.Maksyutov

### Live Antivariolic Vaccines

State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation

Smallpox eradication due to global vaccination is still one of the paramount triumphs of medical science. Given the termination of the subsequent immunization, nowadays humanity virtually possesses no antivariolic immunity and is unprotected against the pathogenic for humans orthopoxviruses. Utilization of the first-generation traditional live vaccines, obtained with the help of the virus replication on calf skin, or the second-generation preparation, produced in mammalian cell cultures or grown on bird embryos, for mass vaccination is currently unacceptable in view of considerable increase in immune deficiency states among the human population within the recent decades. Attenuated non-replicating antivariolic vaccines of the third generation, obtained in the process of multiple vaccinia virus (VV) passage on cell cultures of heterologous host, induce weaker antivariolic response as compared to traditional vaccine. The most prospective approach is to produce the vaccines of the fourth generation, applying targeted VV genes' mutation, which control protective reactions of an organism against viral infection, as well as host range genes and the genes involved in nucleic acid metabolism, while skipping the genes responsible for virus replication. Novel attenuated and highly immunogenic strain, VV LIVPΔ6, having mutations in 6 virulence genes, is presently in the phase of pre-clinical trial and later on it may turn an effective and safe vaccine of the fourth generation against smallpox and other orthopoxvirus infections in humans.

**Key words:** smallpox, Monkeypox, attenuated highly immunogenic vaccine of the fourth generation.

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

**Funding:** The study is performed with financial support from the Russian Science Foundation (Project No 16-15-10101).

Corresponding author: Rinat A. Maksyutov, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

Citation: Maksyutov R.A. Live Antivariolic Vaccines. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:72–77. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-72-77

Ликвидация натуральной оспы в результате кампании всеобщей вакцинации остается одним из величайших успехов современной науки в области здравоохранения. Натуральная оспа на протяжении большей части истории человечества являлась причиной высокой заболеваемости и смертности, только в XX веке приведя к гибели более 500 млн человек [13].

Первым способом защиты людей от эпидемий натуральной оспы явилась вариоляция, при кото-

рой вирус натуральной оспы (ВНО), выделенный из инфекционного материала больных оспой, вводили посредством скарификации или инсуффляции здоровым людям [36]. Индуцированное заболевание протекало в относительно легкой форме по сравнению с обычной респираторной передачей натуральной оспы от человека к человеку и приводило к значительно меньшей смертности (0,5–2 %) в сравнении с наблюдавшейся во время эпидемий натуральной

оспы (20–30 %) [12]. Вариоляция использовалась на протяжении столетий в Индии и Китае, прежде чем была введена в практику здравоохранения в Европе в 1721 г., где еще на протяжении более 70 лет оставалась единственным средством защиты против натуральной оспы [12, 36].

Открытие в 1798 г. возможности вакцинации людей, используя инокуляцию вируса оспы коров (ВОК), и последующее вытеснение ВОК вирусом осповакцины (ВОВ) в качестве противооспенной вакцины привело к значительному снижению смертности и риска тяжелых побочных эффектов [1].

В 1980 г. на 33-й сессии Всемирной Ассамблеи Здравоохранения, учитывая тяжелые поствакцинальные осложнения при использовании классической живой вакцины и подтверждение ликвидации оспы, повсеместную рутинную вакцинацию против данной инфекции было рекомендовано прекратить. Как следствие, к настоящему времени человеческая популяция практически не имеет коллективного противооспенного иммунитета и является беззащитной не только перед возможным инфицированием другими близкородственными ортопоксвирусами, такими как вирусы оспы обезьян (ВОО) или оспы коров, природным резервуаром которых являются мелкие грызуны, но и перед заражением ВНО в результате теракта или возникновения вируса в природе путем эволюции зоонозных ортопоксвирусов [39, 40]. В последние годы отмечается увеличение числа зарегистрированных случаев заболевания людей оспой коров [6, 7, 10, 18, 22, 32], вакциноподобным заболеванием [4, 42, 47, 50] и оспой обезьян [24, 33, 37, 38]. Вакцинопрофилактика остается единственным эффективным инструментом сдерживания возрастающей угрозы ортопоксвирусных инфекций человека.

**Противооспенные вакцины первого поколения.** Противооспенная вакцинация с помощью живого ВОВ применялась во всем мире более 180 лет без единой общепринятой международной стандартизации вакцинных препаратов. За это время в различных странах использовали разнообразные штаммы ВОВ, различающиеся по биологическим свойствам, формируемому иммунитету и тяжести побочных эффектов. Имеющиеся исторические данные свидетельствуют о низкой вирулентности штаммов NYCBH и Lister, которые применялись повсеместно и были рекомендованы в дальнейшем для использования в кампании по глобальной ликвидации оспы, инициированной СССР в 1958 г. [13]. Международная кампания под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), основанная на массовой вакцинации населения Земли ВОВ, методе кольцевой вакцинации и строгом эпидемиологическом надзоре, привела к элиминации случаев заражения людей ВНО: последний случай природного заболевания натуральной оспой зафиксирован в Сомали в 1977 г. [46].

Многолетнее массовое использование живых противооспенных вакцин 1-го поколения позволило определить основные, сопряженные с вакцинацией,

побочные эффекты с соответствующими частотами встречаемости: генерализованная вакцинация (до 70 случаев на 1 млн вакцинируемых), вакцинальная экзема (до 80 на 1 млн), прогрессирующая вакцинация (1 на 1 млн), поствакцинальный энцефалит или энцефалопатия (до 1200 на 1 млн) и смертельный случай (1 на 1 млн) [23]. Традиционные противооспенные вакцины 1-го поколения нарабатывали на коже живых животных – преимущественно телят, но также буйволов, кроликов и овец. Используемая методика получения вакцинных препаратов не позволяла получать гомогенный ВОВ, свободный от других инфекционных агентов, что также вносило свой вклад в наблюдаемые побочные эффекты [31].

**Противооспенные вакцины второго поколения.** Вакцины следующего поколения с целью снижения побочных эффектов, стандартизации методики получения и контроля возможной бактериальной контаминации нарабатывали на линиях клеток млекопитающих и/или развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Первые работы по получению вакцины второго поколения проводились еще во время кампании по ликвидации натуральной оспы: с 1958 г. в Бразилии противооспенная вакцина, производившаяся на куриных эмбрионах, заменила вакцину первого поколения в процессе искоренения натуральной оспы [13]; в 1973 г. в Индонезии противооспенная вакцина на основе штамма Lister, производившаяся на линии клеток почки кролика, в ходе клинических испытаний продемонстрировала свою безопасность в сравнении с традиционно производимой вакциной первого поколения [16].

К настоящему времени лицензированы несколько противооспенных вакцин второго поколения, полученные как из штамма Lister (неклональные вакцины Lister/CEP и Elstree-BN, производимые компаниями Sanofi Pasteur и Bavarian Nordic соответственно [14, 48]), так и из штамма NYCBH (культуральная вакцина ACAM2000, полученная клонированием ВОВ из вакцины первого поколения Dryvax [15, 29, 34]).

Следует отметить, что опыт использования вакцин второго поколения во время кампании по ликвидации оспы, в подавляющем количестве, ограничен и не позволяет подтвердить ее эффективность в полевых условиях против натуральной оспы. Несмотря на то, что производство вакцин на культуре клеток/РКЭ происходит в соответствии с современными стандартами, противооспенные вакцины второго поколения по-прежнему могут обуславливать серьезные побочные эффекты при вакцинации и могут иметь ограниченное применение [15]. С момента ликвидации натуральной оспы в человеческой популяции значительно возросло количество людей с супрессивным иммунитетом, что значительно ограничивает возможность использования классической противооспенной вакцины первого поколения или культуральной вакцины второго поколения. В связи с этим особенно актуальным является разработка со-

временных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций человека.

**Противооспенные вакцины третьего поколения.** Во время кампании по ликвидации натуральной оспы аттенуированные штаммы ВОВ получали многократными пассажами исходных диких вариантов вируса на культурах клеток различных животных. Возникающие при этом генетические изменения (мутации и протяженные делеции) приводили к снижению вирулентности и ограничению круга чувствительных к измененному штамму хозяев [13].

Противооспенная вакцина третьего поколения LC16m8, лицензированная в Японии, была получена на основе ВОВ штамм *Lister* путем 45 пассажей на первичной культуре клеток почки кролика при низкой температуре (30 °C). Клинические исследования показали значительное снижение побочных эффектов в сравнении с традиционной вакциной на основе штамма *Lister* [17]. Аттенуация вакцинного штамма, главным образом, объясняется мутацией в гене B5R, который кодирует белок внеклеточного покрытого двойной оболочкой вириона (EEV) [30]. Отсутствие в составе вакцины EEV-формы, являющейся важной мишенью для наработки вируснейтрализующих антител, не позволяет сформировать полноценный противооспенный иммунитет, поэтому вакцина LC16m8 не может являться оптимальной для широкого применения [3, 21].

Еще более аттенуированной противооспенной вакциной третьего поколения является вакцинный штамм modified Ankara (MVA) ВОВ, полученный из штамма Ankara путем 570 пассажей на культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов [5, 9]. MVA характеризуется протяженными делециями в терминальных участках генома и неспособностью реплицироваться в большинстве клеток млекопитающих, включая клетки человека [27]. К настоящему времени вакцина на основе штамма MVA ВОВ (Imvanex/Imvamune), производства Bavarian Nordic, прошла 19 клинических испытаний с 7676 вакцинированными (включая 1070 пациентов с atopическим дерматитом и ВИЧ). Показана индукция профиля антител, аналогичного профилю, индуцируемому классической вакциной первого поколения, и продемонстрирована защита против зоонозных ортопоксвирусов в различных лабораторных животных [11, 26]. Imvanex/Imvamune лицензирована в 32 странах, включая все страны Европы, Канаду и США, и в первую очередь предназначена для пациентов с противопоказаниями к противооспенным вакцинам первого и второго поколений.

Основным недостатком данной вакцины является то, что в ее основе используется нереплицирующийся ВОВ, что требует использования более высоких доз и многократной схемы иммунизации, что у некоторых вакцинируемых может вызывать аллергические реакции. Решением данной проблемы является получение живой реплицирующейся высокоаттенуированной вакцины четвертого по-

коления на основе ВОВ, в геном которого последовательно вводятся делеции по генам вирулентности, не затрагивая гены, обеспечивающие функции размножения вируса.

**Противооспенные вакцины четвертого поколения.** Современные биотехнологические методы генетической инженерии позволяют получать новые более аттенуированные и эффективные ортопоксвирусные вакцины путем направленного введения делеций и/или вставок в целевые участки ДНК ВОВ [20]. Получение аттенуированного вируса может быть достигнуто нарушением генов, контролирующих защитные реакции организма против вирусной инфекции, генов круга хозяев и генов, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот: белки, связывающие и нейтрализующие интерферон, цитокины и хемокины; белки, ингибирующие апоптоз, или сигнальные пути, необходимые для продукции интерферона и других цитокинов [43].

Противооспенная вакцина четвертого поколения NYVAC, полученная из штамма Copenhagen путем направленной делеции 18 генов: 12 генов от C7L до K1L (район «генов круга хозяев»); B13R/B14R («геморрагический» район); A26L (белок включения типа A); A56R (гемагглютинин); I4L (большая субъединица рибонуклеотид редуктазы) и J2R (тимидинкиназа), характеризовалась значительной аттенуацией, без способности к распространению в иммунодефицитных животных и вызову инфекции у человека [44]. Последующие исследования показали, что штамм NYVAC индуцирует у человека более низкий противооспенный иммунитет в сравнении с классической вакциной на основе штамма *Lister* или Dryvax, что при его использовании может потребовать неоднократного введения значительно более высоких доз вируса [28].

Наиболее перспективными противооспенными вакцинами четвертого поколения в настоящее время являются вакцинные штаммы 1421ABJCN и LIVPΔ6 ВОВ, полученные из ВОВ штамма LIVP, используемого в Российской Федерации для вакцинации людей, путем направленного последовательного нарушения пяти и шести генов, кодирующих гемагглютинин (A56R), гамма-интерферонсвязывающий белок (B8R), тимидинкиназу (J2R), комплементсвязывающий белок (C3L), Bcl2-подобный ингибитор апоптоза (NIL), и гена A35R, контролирующего презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II [2, 49].

Ранее в независимых экспериментах было показано, что удаление гена A56R, кодирующего гемагглютинин, обеспечивающего способность вируса присоединяться к клетке-мишени и активирующего инфекционность вирионов, у различных штаммов ВОВ приводило к снижению вирулентности на несколько порядков по сравнению с исходным родительским вирусом [41]. Ген NIL, кодирующий ингибитор апоптоза, не влияет на репродукцию ВОВ на культуре клеток, но также участвует в проявлении

вирулентности вируса *in vivo* [25]. Ген *B8R* кодирует гликопротеин, имеющий сходство с внеклеточным доменом клеточного рецептора гамма-интерферона, делеция которого приводила к аттенуации ВОВ в сравнении с вирусом дикого типа [8]. Нарушение гена *J2R*, кодирующего тимидинкиназу, также приводило к значительному снижению вирулентности вируса *in vivo* [45]. Ген *C3L* кодирует комплемент-связывающий белок, ингибирующий активность системы комплемента через взаимодействие с C3b/C4b и ингибирующий антителозависимую нейтрализацию вирионов ВОВ, усиленную комплементом [19]. Одиночная делеция данного гена приводила к снижению вирулентности исследуемого вируса.

Показано, что рекомбинантный вариант ВОВ 1421ABJCN с пятью направленно-инактивированными генами вирулентности, указанными выше, обладает значительно сниженной реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным штаммом ВОВ LIVP. При этом вакцинный штамм 1421ABJCN сохранил иммуногенные и протективные свойства родительского штамма [49].

Ранее показано, что делеция по гену *A35R* в значительно аттенуированном MVA ВОВ приводила к увеличению иммуногенности вируса [35]. Поэтому с целью усиления иммуногенности и получения более эффективной вакцины на основе штамма 1421ABJCN авторами сконструирован рекомбинантный вариант ВОВ LIVPΔ6 с дополнительной делецией гена *A35R*. Созданный штамм LIVPΔ6 индуцировал достоверно более высокий уровень вируснейтрализующих антител по сравнению с исходным штаммом LIVP и обеспечивал 100 % защиту мышей от инфекции вирусом экстремелии в дозе 100 LD<sub>50</sub>, что не наблюдалось для родительского штамма [2].

Новый аттенуированный и высокоиммуногенный штамм ВОВ LIVPΔ6 с нарушением шести генов вирулентности в настоящее время проходит доклинические исследования в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)» и в дальнейшем может явиться эффективной и безопасной вакциной четвертого поколения против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10101).

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: KMK Scientific Press Ltd; 1998. 386 с.
2. Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. Высокоиммуногенный вариант аттенуированного вируса осповакцины. *Биохимия, биофизика, мол. биол.* 2016; 466:241–4.
3. Bell E., Shamim M., Whitbeck J.C., Sfyroera G., Lambris J.D., Isaacs S.N. Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing

capacity of vaccinia immune globulin. *Virology*. 2004; 325:425–31. DOI: 10.1016/j.virol.2004.05.004.

4. Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhya R., Gandhale P., Reddy K.V., Damle A.S., Kher H.N., Chandan B.S., Chauhan H.C., Singh R.K. Zoonotic infections of buffalopox in India. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57:e149–55. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01314.x.
5. Blanchard T.J., Alcamí A., Andrea P., Smith G.L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* 1998; 79:1159–67. DOI: 10.1099/0022-1317-79-5-1159.
6. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):777–80. DOI: 10.3201/eid1505.090159.
7. Carletti F., Bordi L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission, northeastern Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(3):499–500. DOI: 10.3201/eid1503.080813.
8. Denes B., Gridley D.S., Fodor N., Takatsy Z., Timiryasova T.M., Fodor I. Attenuation of a vaccine strain of vaccinia virus via inactivation of interferon viroreceptor. *J. Gene Med.* 2006; 8(7):814–23. DOI: 10.1002/jgm.907.
9. Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V., Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 1998; 79:347–52. DOI: 10.1099/0022-1317-79-2-347.
10. Ducournau C., Ferrier-Rembert A., Ferraris O., Joffre A., Favier A.L., Flusin O., Van Cauteren D., Kecir K., Auburtin B., Védry S., Bessaud M., Peyrefitte C.N. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(12):1996–9. DOI: 10.3201/eid1912.130256.
11. Earl P.L., Americo J.L., Wyatt L.S., Eller L.A., Whitbeck J.C., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Hartmann C.J., Jackson D.L., Kulesh D.A., Martinez M.J., Miller D.M., Mucker E.M., Shamblin J.D., Zwiers S.H., Huggins J.W., Jahrling P.B., Moss B. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*. 2004; 428(6979):182–5. DOI: 10.1038/nature02331.
12. Fenner F. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res. Virol.* 1989; 140(5):465–6.
13. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. World Health Organization: Geneva; 1988. 1460 p.
14. Ferrier-Rembert A., Drillien R., Meignier B., Garin D., Crance J.M. Safety, immunogenicity and protective efficacy in mice of a new cell-cultured Lister smallpox vaccine candidate. *Vaccine*. 2007; 25(49):8290–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.050.
15. Frey S.E., Newman F.K., Kennedy J.S., Ennis F., Abate G., Hofst D.F., Monath T.P. Comparison of the safety and immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax® in healthy vaccinia-naïve adults. *Vaccine*. 2009; 27(10):1637–44. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.079.
16. Hekker A.C., Bos J.M., Rai N.K., Keja J., Cuboni G., Emmet B., Djalins J. Large-scale use of freeze-dried smallpox vaccine prepared in primary cultures of rabbit kidney cells. *Bull. World Health Organ.* 1976; 54(3):279–84.
17. Hirayama M. Smallpox vaccination in Japan. In: Fukumi H., editor. The vaccination theory and practice. Tokyo: International Medical Foundation of Japan; 1975.
18. Hobi S., Mueller R.S., Hill M., Nitsche A., Löscher T., Guggemos W., Ständer S., Rjosk-Dendorfer D., Wollenberg A. Neurogenic inflammation and colliquative lymphadenitis with persistent orthopox virus DNA detection in a human case of cowpox virus infection transmitted by a domestic cat. *Br. J. Dermatol.* 2015; 173(2):535–9. DOI: 10.1111/bjd.13700.
19. Isaacs S.N., Kotwal G.J., Moss B. Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89(2):628–32.
20. Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res.* 2009; 84(1):1–13. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
21. Johnson B.F., Kanatani Y., Fujii T., Saito T., Yokote H., Smith G.L. Serological responses in humans to the smallpox vaccine LC16m8. *J. Gen. Virol.* 2011; 92:2405–10. DOI: 10.1099/vir.0.034207-0.
22. Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmilä H., Piiparinen H., Sironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimaa J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti O. Severe Ocular Cowpox in a Human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2261–3. DOI: 10.3201/

- eid2112.150621.
23. Lane J.M., Ruben F.L., Neff J.M., Millar J.D. Complications of smallpox vaccination, 1968: results of ten statewide surveys. *J. Infect. Dis.* 1970; 122(4):303–9.
  24. Levine R.S., Peterson A.T., Yorita K.L., Carroll D., Damon I.K., Reynolds M.G. Ecological niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa. *PLoS One*. 2007; 2(1):e176. DOI: 10.1371/journal.pone.0000176.
  25. Maluquer de Motes C., Cooray S., Ren H., Almeida G.M., McGourty K., Bahar M.W., Stuart D.I., Grimes J.M., Graham S.C., Smith G.L. Inhibition of apoptosis and NF- $\kappa$ B activation by vaccinia protein N1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. *PLoS Pathog.* 2011; 7(12):e1002430. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002430.
  26. McCurdy L.H., Larkin B.D., Martin J.E., Graham B.S. Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38(12):1749–53. DOI: 10.1086/421266.
  27. Meyer H., Sutter G., Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 1991; 72:1031–8. DOI: 10.1099/0022-1317-72-5-1031.
  28. Midgley C.M., Putz M.M., Weber J.N., Smith G.L. Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *J. Gen. Virol.* 2008; 89:2992–7. DOI: 10.1099/vir.0.2008/004440-0.
  29. Monath T.P., Caldwell J.R., Mundt W., Fusco J., Johnson C.S., Buller M., Liu J., Gardner B., Downing G., Blum P.S., Kemp T., Nichols R., Weltzin R. 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:S31–44. DOI: 10.1016/j.ijid.2004.09.002.
  30. Morikawa S., Sakiyama T., Hasegawa H., Saijo M., Maeda A., Kurane I., Maeno G., Kimura J., Hirama C., Yoshida T., Asahi-Ozaki Y., Sata T., Kurata T., Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J. Virol.* 2005; 79(18):11873–91. DOI: 10.1128/JVI.79.18.11873-11891.2005.
  31. Murphy F.A., Osburn B.I. Adventitious agents and smallpox vaccine in strategic national stockpile. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(7):1086–9. DOI: 10.3201/eid1107.050277.
  32. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781–4. DOI: 10.3201/eid1505.090235.
  33. Parker S., Nuara A., Buller R.M., Schultz D.A. Human monkeypox: an emerging zoonotic disease. *Future Microbiol.* 2007; 2(1):17–34. DOI: 10.2217/17460913.2.1.17.
  34. Poland G.A., Grabenstein J.D., Neff J.M. The US smallpox vaccination program: a review of a large modern era smallpox vaccination implementation program. *Vaccine*. 2005; 23(17–18):2078–81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.012.
  35. Rehm K.E., Connor R.F., Jones G.J., Yimbu K., Roper R.L. Vaccinia virus A35R inhibits MHC class II antigen presentation. *Virology*. 2010; 397(1):176–86. DOI: 10.1016/j.virol.2009.11.008.
  36. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)*. 2005; 18(1):21–5.
  37. Rimoin A.W., Kisalu N., Kebela-Hlunga B., Mukaba T., Wright L.L., Formenty P., Wolfe N.D., Shongo R.L., Tshioko F., Okitolonda E., Muyembe J.J., Ryder R.W., Meyer H. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(6):934–7. DOI: 10.3201/eid1306.061540.
  38. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37):16262–7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.
  39. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*. 2011; 29:D49–53. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.037.
  40. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.
  41. Shida H., Hinuma Y., Hatanaka M., Morita M., Kidokoro M., Suzuki K., Maruyama T., Takahashi-Nishimaki F., Sugimoto M., Kitamura R. Effects and virulences of recombinant vaccinia viruses derived from attenuated strains that express the human T-cell leukemia virus type I envelope gene. *J. Virol.* 1988; 62(12):4474–80.
  42. Silva-Fernandes A.T., Travassos C.E., Ferreira J.M., Abrahão J.S., Rocha E.S., Viana-Ferreira F., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* 2009; 44(4):308–13. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.01.007.
  43. Smith G.L., Benfield C.T., Maluquer de Motes C., Mazzoni M., Ember S.W., Ferguson B.J., Sumner R.P. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* 2013; 94:2367–92. DOI: 10.1099/vir.0.055921-0.
  44. Tartaglia J., Cox W.I., Pincus S., Paoletti E. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev. Biol. Stand.* 1994; 82:125–9.
  45. Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk)-deficient and tk+ phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *J. Gen. Virol.* 1991; 72:125–30. DOI: 10.1099/0022-1317-72-1-125.
  46. The global eradication of smallpox, final report of the global commission for the certification of smallpox eradication, Geneva, December 1979. World Health Organization: Geneva; 1980.
  47. Trindade G.S., Guedes M.I., Drumond B.P., Mota B.E., Abrahao J.S., Lobato Z.I., Gomes J.A., Corrêa-Oliveira R., Nogueira M.L., Kroon E.G., da Fonseca F.G. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Diseases*. 2009; 48(3):e37–40. DOI: 10.1086/595856.
  48. Wisner I., Balicer R.D., Cohen D. An update on smallpox vaccine candidates and their role in bioterrorism related vaccination strategies. *Vaccine*. 2007; 25(3):976–84. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.09.046.
  49. Yakubitsky S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of Vaccinia Virus. *Acta Naturae*. 2015; 7(4):113–21.
  50. Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(6):902–4. DOI: 10.3201/eid1306.061068.

## References

1. Marennikova S.S., Shchelkunov S.N. [Pathogenic for Humans Orthopoxviruses]. M.: KMK Scientific Press Ltd.; 1998. 386 p.
2. Yakubitsky S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. [Highly immunogenic variant of attenuated vaccinia virus]. *Biokhim., Biofiz., Mol. Biol.* 2016; 466:241–4.
3. Bell E., Shamim M., Whitbeck J.C., Sfyroera G., Lambris J.D., Isaacs S.N. Antibodies against the extracellular envelope virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology*. 2004; 325:425–31. DOI: 10.1016/j.virol.2004.05.004.
4. Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhy R., Gandhale P., Reddy K.V., Damle A.S., Kher H.N., Chand B.S., Chauhan H.C., Singh R.K. Zoonotic infections of buffalopox in India. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57:e149–55. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01314.x.
5. Blanchard T.J., Alcamì A., Andrea P., Smith G.L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* 1998; 79:1159–67. DOI: 10.1099/0022-1317-79-5-1159.
6. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):777–80. DOI: 10.3201/eid1505.090159.
7. Carletti F., Bordini L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission northeastern Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(3):499–500. DOI: 10.3201/eid1503.080813.
8. Denes B., Gridley D.S., Fodor N., Takatsy Z., Timiryasova T.M., Fodor I. Attenuation of a vaccine strain of vaccinia virus via inactivation of interferon viroreceptor. *J. Gene Med.* 2006; 8(7):814–23. DOI: 10.1002/jgm.907.
9. Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V., Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 1998; 79:347–52. DOI: 10.1099/0022-1317-79-2-347.
10. Ducourneau C., Ferrier-Rembert A., Ferraris O., Joffre A., Favier A.L., Flusin O., Van Cauteren D., Kecir K., Auburtin B., Védry S., Bessaud M., Peyrefitte C.N. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(12):1996–9. DOI: 10.3201/eid1912.130256.
11. Earl P.L., Americo J.L., Wyatt L.S., Eller L.A., Whitbeck J.C., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Hartmann C.J., Jackson D.L., Kulesh D.A., Martinez M.J., Miller D.M., Mucker E.M., Shamblin J.D., Zwiers S.H., Huggins J.W., Jahrling P.B., Moss B. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*. 2004; 428(6979):182–5. DOI: 10.1038/nature02331.
12. Fenner F. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the world-wide smallpox eradication campaign. *Rev. Virol.* 1989; 140(5):465–6.
13. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. World Health Organization: Geneva; 1988. 1460 p.
14. Ferrier-Rembert A., Drilhen R., Meignier B., Garin D., Crance J.M. Safety, immunogenicity and protective efficacy in mice of a new cell-cultured Lister smallpox vaccine candidate. *Vaccine*. 2007; 25(49):8290–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.050.
15. Frey S.E., Newman F.K., Kennedy J.S., Ennis F., Abate G., Hofst D.F., Monath T.P. Comparison of the safety and immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax® in healthy vaccinia-naïve adults. *Vaccine*. 2009; 27(10):1637–44. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.079.
16. Hekker A.C., Bos J.M., Rai N.K., Keja J., Cuboni G., Emmet B., Djalins J. Large-scale use of freeze-dried smallpox vaccine prepared

- in primary cultures of rabbit kidney cells. *Bull. World Health Organ.* 1976; 54(3):279–84.
17. Hirayama M. Smallpox vaccination in Japan. In: Fukumi H., editor. *The vaccination theory and practice.* Tokyo: International Medical Foundation of Japan; 1975.
18. Hobi S., Mueller R.S., Hill M., Nitsche A., Löscher T., Guggemos W., Ständer S., Rjosk-Dendorfer D., Wollenberg A. Neurogenic inflammation and colliquative lymphadenitis with persistent orthopox virus DNA detection in a human case of cowpox virus infection transmitted by a domestic cat. *Br. J. Dermatol.* 2015; 173(2):535–9. DOI: 10.1111/bjd.13700.
19. Isaacs S.N., Kotwal G.J., Moss B. Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89(2):628–32.
20. Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res.* 2009; 84(1):1–13. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
21. Johnson B.F., Kanatani Y., Fujii T., Saito T., Yokote H., Smith G.L. Serological responses in humans to the smallpox vaccine LC16m8. *J. Gen. Virol.* 2011; 92:2405–10. DOI: 10.1099/vir.0.034207-0.
22. Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmälä H., Piiparinen H., Sironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimaa J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti Ö. Severe Ocular Cowpox in a Human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2261–3. DOI: 10.3201/eid2112.150621.
23. Lane J.M., Ruben F.L., Neff J.M., Millar J.D. Complications of smallpox vaccination, 1968: results of ten statewide surveys. *J. Infect. Dis.* 1970; 122(4):303–9.
24. Levine R.S., Peterson A.T., Yorita K.L., Carroll D., Damon I.K., Reynolds M.G. Ecological niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa. *PLoS One.* 2007; 2(1):e176. DOI: 10.1371/journal.pone.0000176.
25. Maluquer de Motes C., Cooray S., Ren H., Almeida G.M., McGourty K., Bahar M.W., Stuart D.I., Grimes J.M., Graham S.C., Smith G.L. Inhibition of apoptosis and NF-κB activation by vaccinia protein N1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. *PLoS Pathog.* 2011; 7(12):e1002430. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002430.
26. McCurdy L.H., Larkin B.D., Martin J.E., Graham B.S. Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38(12):1749–53. DOI: 10.1086/421266.
27. Meyer H., Sutter G., Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 1991; 72:1031–8. DOI: 10.1099/0022-1317-72-5-1031.
28. Midgley C.M., Putz M.M., Weber J.N., Smith G.L. Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *J. Gen. Virol.* 2008; 89:2992–7. DOI: 10.1099/vir.0.2008/004440-0.
29. Monath T.P., Caldwell J.R., Mundt W., Fusco J., Johnson C.S., Buller M., Liu J., Gardner B., Downing G., Blum P.S., Kemp T., Nichols R., Weltzin R. 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:S31–44. DOI: 10.1016/j.ijid.2004.09.002.
30. Morikawa S., Sakiyama T., Hasegawa H., Saijo M., Maeda A., Kurane I., Maeno G., Kimura J., Hirama C., Yoshida T., Asahi-Ozaki Y., Sata T., Kurata T., Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J. Virol.* 2005; 79(18):11873–91. DOI: 10.1128/JVI.79.18.11873-11891.2005.
31. Murphy F.A., Osburn B.I. Adventitious agents and smallpox vaccine in strategic national stockpile. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(7):1086–9. DOI: 10.3201/eid1107.050277.
32. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781–4. DOI: 10.3201/eid1505.090235.
33. Parker S., Nuara A., Buller R.M., Schultz D.A. Human monkeypox: an emerging zoonotic disease. *Future Microbiol.* 2007; 2(1):17–34. DOI: 10.2221/17460913.2.1.17.
34. Poland G.A., Grabenstein J.D., Neff J.M. The US smallpox vaccination program: a review of a large modern era smallpox vaccination implementation program. *Vaccine.* 2005; 23(17–18):2078–81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.012.
35. Rehm K.E., Connor R.F., Jones G.J., Yimbu K., Roper R.L. Vaccinia virus A35R inhibits MHC class II antigen presentation. *Virology.* 2010; 397(1):176–86. DOI: 10.1016/j.virology.2009.11.008.
36. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)* 2005; 18(1):21–5.
37. Rimoin A.W., Kitalu N., Kebela-Ilunga B., Mukaba T., Wright L.L., Formenty P., Wolfe N.D., Shongo R.L., Tshioko F., Okitolonda E., Muyembe J.J., Ryder R.W., Meyer H. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(6):934–7. DOI: 10.3201/eid1306.061540.
38. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kitalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37):16262–7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.
39. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine.* 2011; 29:D49–53. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.037.
40. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.
41. Shida H., Hinuma Y., Hatanaka M., Morita M., Kidokoro M., Suzuki K., Maruyama T., Takahashi-Nishimaki F., Sugimoto M., Kitamura R. Effects and virulences of recombinant vaccinia viruses derived from attenuated strains that express the human T-cell leukemia virus type I envelope gene. *J. Virol.* 1988; 62(12):4474–80.
42. Silva-Fernandes A.T., Travassos C.E., Ferreira J.M., Abrahão J.S., Rocha E.S., Viana-Ferreira F., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* 2009; 44(4):308–13. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.01.007.
43. Smith G.L., Benfield C.T., Maluquer de Motes C., Mazzon M., Ember S.W., Ferguson B.J., Sumner R.P. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* 2013; 94:2367–92. DOI: 10.1099/vir.0.055921-0.
44. Tartaglia J., Cox W.I., Pincus S., Paoletti E. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev. Biol. Stand.* 1994; 82:125–9.
45. Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk)-deficient and tk+ phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *J. Gen. Virol.* 1991; 72:125–30. DOI: 10.1099/0022-1317-72-1-125.
46. The global eradication of smallpox, final report of the global commission for the certification of smallpox eradication, Geneva, December 1979. World Health Organization: Geneva; 1980.
47. Trindade G.S., Guedes M.I., Drumond B.P., Mota B.E., Abrahao J.S., Lobato Z.I., Gomes J.A., Corrêa-Oliveira R., Nogueira M.L., Kroon E.G., da Fonseca F.G. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Diseases.* 2009; 48(3):e37–40. DOI: 10.1086/595856.
48. Wiser I., Balicer R.D., Cohen D. An update on smallpox vaccine candidates and their role in bioterrorism related vaccination strategies. *Vaccine.* 2007; 25(3):976–84. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.09.046.
49. Yakubitsky S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of Vaccinia Virus. *Acta Naturae.* 2015; 7(4):113–21.
50. Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(6):902–4. DOI: 10.3201/eid1306.061068.

**Authors:**

Maksyutov R.A. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

**Об авторах:**

Максютов Р.А. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Поступила 29.07.16.