© Коллектив авторов, 2020

Шмаров М.М.^{1,3}, Седова Е.С.¹, Никонова А.Э.¹, Елаков А.Л.¹,
Щербинин Д.Н.¹, Артемова Э.А.¹, Лебедева Е.С.², Чулкина М.М.²,
Лосич М.А.¹, Зайкова О.Н.¹, Чернышова Е.В.¹, Алексеева С.В.¹,
Тутыхина И.Л.¹, Сергеев О.В.³, Верховская Л.В.¹, Пичугин А.В.²,
Метлин А.Е.⁴, Баринский И.Ф.¹, Гребенникова Т.В.¹, Логунов Д.Ю.^{1,3},
Атауллаханов Р.И.², Народицкий Б.С.^{1,3}, Гинцбург А.Л.^{1,3}

Иммуногенные и защитные свойства рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма РВ-97

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 123022, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Бешенство – это острое инфекционное заболевание, общее для человека и животных. Для профилактики заболевания до контакта с возбудителем применяется предэкспозиционная профилактическая вакцинация (ПрЭП) групп риска. В России для этой цели применяются классические инактивированные культуральные вакцины. Данные вакцины обладают высокой эффективностью, однако могут вызывать сильные побочные реакции и требуют многократного введения. Поэтому актуальной является разработка новых безопасных антирабических вакцин, позволяющих добиться протективного эффекта при однократной вакцинации.

Цель исследования – создание репликативно-дефектного вирусного вектора на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства, и изучение его протективных и иммуногенных свойств при иммунизации лабораторных мышей.

Материал и методы. Рекомбинантный аденовирус был получен с помощью набора AdEasy Adenoviral vector system (Stratagen, США). Для оценки защитных свойств и иммуногенности аденовируса Ad5-RV97 мыши линии BALB/c были иммунизированы однократно внутримышечно. Гуморальный иммунный ответ изучали с помощью реакции флуоресцентной вирус-нейтрализации, Т-клеточный ответ – с помощью метода ELISpot.

Результаты. Рекомбинантный аденовирус Ad5-RV97 показал 100 % защиту лабораторных мышей от заражения вирусом бешенства. Уже на 14-й день после иммунизации у животных зафиксированы высокие уровни вирус-нейтрализующих антител, продолжающиеся расти вплоть до 42-го дня после иммунизации. Был обнаружен значимый уровень спленоцитов (как CD4⁺, так и CD8⁺-клеток), продуцирующих ИФН-γ в ответ на стимуляцию антигеном.

Заключение. Полученные данные позволяют расценивать аденовирус Ad5-RV97 в качестве основы для создания кандидатной антирабической вакцины, которая может применяться для ПрЭП различных групп риска.

Ключевые слова: вирус бешенства; рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа; антирабическая вакцина; гуморальный иммунный ответ; клеточный иммунный ответ

Для корреспонденции
Седова Елена Сергеевна –
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
лаборатории молекулярной
биотехнологии
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: sedova-es@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Статья поступила 30.06.2020. Принята к печати 16.07.2020.

Для цитирования: Шмаров М.М., Седова Е.С., Никонова А.Э., Елаков А.Л., Щербинин Д.Н., Артемова Э.А., Лебедева Е.С., Чулкина М.М., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Чернышова Е.В., Алексеева С.В., Тутыхина И.Л., Сергеев О.В., Верховская Л.В., Пичугин А.В., Метлин А.Е., Баринский И.Ф., Гребенникова Т.В., Логунов Д.Ю., Атауллаханов Р.И., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Иммуногенные и защитные свойства рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма RV-97. Иммунология. 2020; 41 (4): 312–325. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-312-325>

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Shmarov M.M.^{1,3}, Sedova E.S.¹, Nikonova A.E.¹, Elakov A.L.¹,
Shcherbinin D.N.¹, Artemova E.A.¹, Lebedeva E.S.², Chulkina M.M.²,
Losich M.A.¹, Zaykova O.N.¹, Chernishova E.V.¹, Alekseeva S.V.¹,
Tutykhina I.L.¹, Sergeev O.V.³, Verkhovskaya L.V.¹, Pichugin A.V.²,
Metlin A.E.⁴, Barinsky I.F.¹, Grebennikova T.V.¹, Logunov D.Yu.^{1,3},
Ataullakhanov R.I.², Naroditsky B.S.^{1,3}, Gintsburg A.L.^{1,3}

Immunogenic and protective properties of the recombinant human adenovirus serotype 5 expressing the glycoprotein G gene of the rabies virus vaccine strain RV-97

¹ Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russian Federation

² National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

⁴ The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality of Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 123022, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Rabies is an acute infectious disease common to both humans and animals. To prevent the disease before contact with the pathogen, pre-exposure prophylactic vaccination (PrEP) of risk groups is used. The classic inactivated culture anti-rabies vaccines are used for immunization of risk groups in Russia. These vaccines are highly effective, but can cause severe adverse reactions and requires a multiple administration. Therefore, it is relevant to develop new safe rabies vaccines to achieve a protective effect with a single administration.

The aim of our study was to create replication-defective recombinant human adenovirus serotype 5, that carries the gene for glycoprotein G rabies virus, and to study its protective and immunogenic properties in immunizing laboratory mice.

Material and methods. Recombinant adenovirus was obtained using the kit AdEasy Adenoviral vector system (Stratagen, USA). To evaluate the protective properties and immunogenicity of Ad5-RV97 BALB/c mice were immunized once intramuscularly. The humoral immune response was studied using the fluorescent virus neutralization reaction, the T-cell response using the ELISPOT method.

Results. Recombinant adenovirus Ad5-RV97 was 100 % protection against rabies viruses. Within 14 days after immunization, high level of virus-neutralizing antibodies was reported, which continue to grow up until day 42 after immunization. Significant level of splenocytes (both CD4⁺- and CD8⁺-cells) producing IFN- γ in response to antigen stimulation was detected.

Conclusion. The data obtained allow us to consider Ad5-RV97 as the basis for creating a candidate rabies vaccine, which can be used to treat various risk groups.

Keywords: rabies virus; recombinant human adenovirus serotype 5; rabies vaccine; humoral immune response; cellular immune response

Received 30.06.2020. Accepted 16.07.2020.

For citation: Shmarov M.M., Sedova E.S., Nikonova A.E., Elakov A.L., Shcherbinin D.N., Artemova E.A., Lebedeva E.S., Chulkina M.M., Losich M.A., Zaykova O.N., Chernishova E.V., Alekseeva S.V., Tutykhina I.L., Sergeev O.V., Verkhovskaya L.V., Pichugin A.V., Metlin A.E., Barinsky I.F., Grebennikova T.V., Logunov D.Yu., Ataullakhanov R.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Immunogenic and protective properties of the recombinant human adenovirus serotype 5 expressing the glycoprotein G gene of the rabies virus vaccine strain RV-97. Immunologiya. 2020; 41 (4): 312–25. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-312-325> (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Elena S. Sedova –
PhD, Researcher of Laboratory
of Molecular Biotechnology
N.F. Gamaleya FRCM,
Ministry of Health
of the Russian Federation
E-mail: sedova-es@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Введение

Бешенство – это острое инфекционное заболевание, общее для человека и животных, вызываемое РНК-содержащим вирусом рода *Lyssavirus*, семейства *Rhabdoviridae*. Заболевание проявляется нарушениями функций нервной системы, энцефаломиелимитами и характеризуется практически абсолютной летальностью. Заболевание регистрируется чаще среди диких и домашних плотоядных животных, которые являются основным его переносчиком. Путь передачи бешенства человеку связан с укусом или попаданием слюны больного животного на поврежденные кожные покровы или слизистые оболочки [1].

Для профилактики заболевания до контакта с возбудителем применяется предэкспозиционная профилактическая вакцинация (ПрЭП) групп риска (лица, подверженные профессиональному риску, и путешественники). На территории РФ используются классические инактивированные вакцины: концентрированная очищенная культуральная антирабическая вакцина (КОКАВ), культуральная антирабическая вакцина Раби-пур®, культуральная антирабическая вакцина Рабивак-Внуково-32® и культуральная антирабическая вакцина производства ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН. Данные вакцины обладают высокой эффективностью, однако во многих случаях их применение связано с риском развития аллергических и побочных реакций. Кроме того, они имеют многократную схему введения, что часто приводит к неполному прохождению курса иммунизаций [2]. Еще одним существенным недостатком этих вакцин является необходимость работы с живыми штаммами вируса бешенства в процессе их производства. Это существенно усложняет производственный процесс и требует обеспечения высокого уровня биологической безопасности. Также производство инактивированных антирабических вакцин осуществляется с использованием первичных культур клеток животных, а такой способ характеризуется высокой трудоемкостью и низкой технологичностью [3].

В настоящее время разрабатываются новые подходы к созданию антирабических вакцин. К ним относится в том числе применение плазмидных и вирусных векторов, доставляющих в клетки организма гены целевых антигенов вируса [4, 5]. Основным целевым антигеном вируса бешенства является поверхностный гликопротеин G. Антитела, вырабатываемые к гликопротеину G, обладают нейтрализующей активностью и способны защитить организм от развития болезни.

Одним из наиболее популярных вирусных векторов, применяемых для создания рекомбинантных вакцин, является аденовирус человека 5-го серотипа. Рекомбинантный аденовирус 5-го серотипа (pAd5) обеспечивает высокий уровень экспрессии целевого трансгена в клетке-мишени, индуцирует высокие уровни как гуморального, так и клеточного иммунного ответа [6], он показал свою безопасность во множестве клинических

испытаний [7]. Получение pAd5 проводят в перемываемых культурах клеток, поэтому при производстве нет необходимости в работе с первичными клеточными культурами.

В настоящее время в Канаде и США для вакцинации диких животных успешно применяются вакцины на основе репликативно-компетентного pAd5, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства. Так, ветеринарная вакцина ONRAB® показала себя высокоэффективной при иммунизации множества видов диких плотоядных [8]. Таким образом, перспективным с точки зрения создания новых безопасных и эффективных антирабических вакцин является применение pAd5 в качестве средства доставки генов антигенов вируса бешенства в организм.

Цель нашей работы – создание репликативно-дефектного вирусного вектора на основе pAd5, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства, и изучение его защитных и иммуногенных свойств.

Материал и методы

Мыши. В работе были использованы самки мышей линии BALB/c с массой тела 12–15 г (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, Российская Федерация). Животных содержали в виварии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России согласно действующим правилам [9]. Эвтаназию животных проводили в соответствии с Европейской директивой 2010/63 с помощью углекислого газа [10].

Вирусные штаммы. Для оценки гуморального иммунного ответа, а также защитного действия рекомбинантного аденовируса использовали вирус бешенства CVS-11 (фиксированный лабораторный штамм), полученный из ФГБУ «ВГНКИ» Россельхознадзора, г. Москва.

Клеточные культуры. Для постановки реакции вирус-нейтрализации была использована культура клеток ВНК-21 С13 (клетки почки новорожденного сирийского золотого хомячка). Для получения и наращивания pAd5 использовали культуру клеток 293-НЕК (клетки эмбриональной почки человека). Клеточные культуры были получены из Коллекции клеточных культур лаборатории культур тканей подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва.

Филогенетический анализ и методы построения третичной структуры. Выравнивание и обработку нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакетов программ Geneious Prime, а филогенетический анализ – с использованием пакета программ MEGA X [11]. Для анализа использовали 1248 последовательностей гена гликопротеина G изолятов, выделенных в Российской Федерации, странах европейского региона и Северной Америке и доступных в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Эволюционная история была выведена с помощью метода присоединения соседей [12]. Показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей = 11.56545795.

Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального правдоподобия [13] и выражены в единицах числа базовых замен на участок. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В конечном наборе данных было всего 1403 позиции.

Получение рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа. Последовательность гена гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма RB-97 (GenBank № AY683208.1) была химически синтезирована (ЗАО «Евроген») и клонирована в плазмиду pAL-TA. Далее целевой ген переклонировали в плазмиду pShuttle-CMV из набора AdEasy Adenoviral vector system (Stratagen, США). Рекомбинантный аденовирус Ad5-RV97 получили в соответствии с инструкцией к набору. Также в работе был использован рAd5, не несущий трансгена, Ad5-null, полученный ранее с помощью того же набора. Титры рAd5 получали на культуре клеток 293-НЕК с помощью реакции бляшкообразования [14]. Изучение экспрессии рекомбинантным аденовирусом гена целевого антигена проводили с помощью иммуноблот-анализа [15].

Иммунизация лабораторных животных. Для оценки защитного действия аденовируса Ad5-RV97 животные двух групп по 10 лабораторных мышей в каждой были однократно внутримышечно иммунизированы аденовирусом в дозах $1 \cdot 10^7$ БОЕ/мышь и $1 \cdot 10^8$ БОЕ/мышь. Через 28 дней после иммунизации животных заражали вирусом бешенства CVS-11 в дозе 100 ЛД₅₀ и оценивали их состояние в течение 15 дней после заражения. Для оценки гуморального и клеточного ответа 21 мышь была иммунизирована аденовирусом Ad5-RV97 в дозе $1 \cdot 10^7$ БОЕ/мышь. Через 14, 28 и 42 дня после иммунизации у шести мышей отбирали сыворотку крови для дальнейшего изучения гуморального иммунного ответа, а у трех мышей через 42 дня после иммунизации отбирали селезенку для дальнейшего изучения клеточного иммунного ответа. В качестве контрольных использовали животных, получавших фосфатный буфер.

Определение уровня антител к гликопротеину G вируса бешенства с помощью реакции флуоресцентной вирус-нейтрализации. Для определения гуморального иммунного ответа у иммунизированных мышей их сыворотку крови анализировали с помощью флуоресцентной вирус-нейтрализации (ФВН) [16, 17]. Реакцию проводили в культуре клеток ВНК-21 в 96-луночных плоскодонных планшетах. Клетки добавляли к предварительно проинкубированной вместе смеси исследуемых сывороток и вируса бешенства CVS-11. Через три дня окрашивали зафиксированную клеточную культуру с помощью флуоресцентного антирабического конъюгата (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics Inc., США). Инфицированные клетки учитывали, осматривая всю поверхность каждой лунки. Результат оценивали качественным образом: отсутствие флуоресцирующих клеток – отрицательный результат, присутствие одной и более флуоресцирующих клеток –

положительный результат. Титры исследуемых сывороток выражали в МЕ/мл, сравнивая полученный для каждой сыворотки результат со стандартной сывороткой (Human Rabies Immunoglobulin BRP-SEE-LEAFLET, Sigma-Aldrich, США) с известным количеством МЕ/мл.

Получение костномозговых дендритных клеток. Дендритные клетки (ДК) были получены из костного мозга сингенных интактных мышей [18]. Жизнеспособность и концентрацию клеток определяли методом проточной цитометрии на проточном лазерном цитофлуориметре-сортировщике BD FACSAria II (BD Biosciences, США) с использованием калибровочных шариков CountBright™ (Thermo Fisher Scientific Inc., США, кат. № C36950) и 1 мкг/мл красителя DAPI (Serva, ФРГ).

Выделение спленоцитов и получение популяций CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов. Через 42 дня после иммунизации у мышей отбирали селезенку, измельчали и спленоциты выделяли на фиколле плотностью 1,09 г/см³ [14]. Концентрацию и жизнеспособность клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием калибровочных шариков CountBright™ (Thermo Fisher Scientific Inc., США, кат. № C36950) и 1 мкг/мл красителя DAPI (Serva, ФРГ).

Для выделения чистых популяций CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов половину суспензии спленоцитов от каждой мыши окрашивали анти-CD4⁺-APC-Cy7 клон GK 1.5 (Biolegend, США) и анти-CD8⁺-PE-CF594 клон 53-6.7 (BD Biosciences, США) с последующим добавлением раствора DAPI (Serva, ФРГ) в конечной концентрации 1 мкг/мл. Клетки анализировали и сортировали на цитофлуориметре-сортировщике BD FACSAria II (BD Biosciences, США). Чистота отсортированных популяций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток составляла 95–97 %.

Изучение Т-клеточного ответа на гликопротеин G вируса бешенства у иммунизированных животных. Для оценки Т-клеточного иммунного ответа в лунки 96-луночного планшета для ELISpot (mouse IFN-γ ELISPOT Kit, кат. № 552569, BD Biosciences, США) вносили 150 мкл суспензии ДК (50000 ДК на лунку) в среде DMEM с добавлением 100 нг/мл липополисахарида [LPS Escherichia coli 055:B5(L-2880), Sigma-Aldrich, США]. В часть лунок добавляли Ad5-RV97 из расчета 100 БОЕ/клетка, в часть лунок добавляли Ad5-null из расчета 100 БОЕ/клетка, остальные лунки оставляли в качестве контроля. Планшет с ДК инкубировали 20 ч. На следующий день в вертикальные ряды добавляли по 50 мкл суспензии тестируемых клеток: спленоциты (100 тыс. на лунку), очищенные CD4⁺- (100 тыс. на лунку) и очищенные CD⁺-Т-клетки (50 тыс. на лунку) от каждой индивидуальной мыши.

Планшет, содержащий совместную культуру ДК и тестируемых клеток, инкубировали в течение 20 ч в CO₂-инкубаторе. Далее планшет обрабатывали по протоколу производителя раствором детектирующих антител к ИФН-γ (ELISPOT Mouse IFN-γ set BD Biosciences, США, кат. № 551083), как описано в [14].

После обработки каждую лунку индивидуально фотографировали с помощью бинокулярной лупы

МБС-10 ($\times 4$) и цифровой камеры Levenhuk DCM800 с разрешением 1280 $\times$ 960 pxls. Количество точек (зон ИФН- γ , образованных одиночными клетками в лунках) подсчитывали с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США). Результаты выражали в количестве точек в пересчете на 1 млн клеток [19].

Статистическую обработку выживаемости животных проводили – с помощью критерия Гехана–Бреслоу–Вилкоксона, значений титров антител с помощью двухстороннего t -критерия Стьюдента, а обработку результатов анализа Т-клеточного иммунного ответа – с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (to-way analysis of variance, ANOVA). Для статистической обработки была использована программа GraphPad Prism 5.0.

Результаты

Изучение филогенетического родства с полевыми изолятами гликопротеина G вакцинного штамма вируса бешенства РВ-97. Для получения эффективной антирабической вакцины на основе рАд5, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства, необходимо было подобрать источник гена гликопротеина G, наиболее подходящего для иммунизации лиц, проживающих на территории Российской Федерации. Анализ литературных данных показал, что наиболее популярным «донором» гена гликопротеина G вируса бешенства для получения рекомбинантных вирусных векторов является вакцинный штамм вируса бешенства ERA (Evelyn-Rokitnicki-Abelseth) [20, 21]. Он был получен из штамма SAD (Street Alabama Duffring), выделенного из слюнных желез бешеной собаки в штате Алабама, США. На основе гена гликопротеина G вируса бешенства штамма ERA были созданы ветеринарные вакцины ONRAB® (репликативно-компетентный рАд5, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства) [7] и RABORAL® (рекомбинантный вирус осповакцины, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства) [22].

Однако согласно литературным данным, вирусы бешенства не являются генетически однородными и разделяются на различные филогенетические группы, соотносящиеся с местом выделения [23]. Таким образом, можно предположить, что штамм ERA, полученный из изолята, выделенного на территории Северной Америки, по нуклеотидной последовательности будет достаточно далек от штаммов, циркулирующих на территории Российской Федерации. Более логичным видится использование в качестве «донора» гена гликопротеина G вакцинного штамма, хорошо показавшего себя при применении на территории Российской Федерации и являющегося европейским или азиатским по проис-

Рис. 1. (Начало) Филогенетическое дерево, построенное на основе алгоритма присоединения соседей с использованием нуклеотидных последовательностей внеклеточных доменов гликопротеина G вируса бешенства:

А – филогенетическое дерево

Рис. 1. (Окончание) Филогенетическое дерево, построенное на основе алгоритма присоединения соседей с использованием нуклеотидных последовательностей внеклеточных доменов гликопротеина G вируса бешенства:

Б – фрагмент филогенетического дерева, выделенный рамкой на рис. 1, А. Голубым цветом показаны штаммы североамериканского происхождения, черным цветом – европейского происхождения, оранжевым – российского происхождения, зеленым цветом – вакцинные штаммы вируса бешенства.

хождению. Наиболее подходящим на эту роль нам видится вакцинный штамм вируса бешенства РВ-97. Этот штамм хорошо показал себя при вакцинации животных (вакцины «СИНРАБ», ФГБУ «ВНИИЗЖ», ФКП «Щелковский биокOMBинат», г. Щелково, «РАБИСТАВ» ФКП «Ставропольская биофабрика», г. Ставрополь) [24] на территории Российской Федерации, а кроме того, он является прямым потомком Пастеровского штамма, имеющего несомненное европейское происхождение [25].

Для подтверждения этой гипотезы нами было изучено родство вакцинных штаммов ERA и РВ-97 и их близость к изолятам, циркулирующим на территории Европы, Российской Федерации и Североамериканского региона. Для этого нами были отобраны все гены гликопротеина G вируса бешенства, доступные в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), выделенные на территории Европы, Российской Федерации или Северной Америки (всего 1248 последовательностей).

Рис. 2. Выживаемость животных, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-RV97, после заражения 100 ЛД₅₀ вируса бешенства CVS-11. Животные получали $1 \cdot 10^7$ БОЕ/мышь Ad5-RV97, $1 \cdot 10^8$ БОЕ/мышь Ad5-RV97 и фосфатный буфер (К-). Показана посуточная динамика как % выживших животных

По оси абсцисс – продолжительность наблюдения после заражения, сут; по оси ординат – доля выживших животных, %. Показана достоверная разница между выживаемостью в опытной и контрольной группах ($p < 0,005$).

Последовательности были выровнены и на них были отмечены основные функциональные домены. Так как лидерный пептид встречается только у незрелого протеина [26], первые 19 аминокислот лидерного пептида были исключены из анализа. Так же из анализа были исключены трансмембранный и цитоплазматический домены, достаточно вариабельные и при этом не содержащие известные антигенные сайты [27].

Таким образом, филогенетический анализ проводился на основании последовательностей, кодирующих поверхностную часть гликопротеина G с помощью пакета программ MEGA X [11] по алгоритму присоединения соседей [12]. Полученная филограмма представлена на рис. 1.

Как видно из рис. 1А, группа, содержащая вакцинные штаммы PB-97, ERA, SAD Bern и Flury-NEP, включает почти все штаммы европейского и российского происхождения и часть североамериканских штаммов. При этом вакцинный штамм PB-97 находится в центре российско-европейской части группы, тогда как вакцинные штаммы ERA, SAD Bern и Flury-NEP находятся на ее североамериканских ветках (см. рис. 1Б). Таким образом, по нуклеотидной последовательности внеклеточной части гликопротеина G штамм PB-97 более близок к последовательностям штаммов, циркулирующих на территории Российской Федерации, чем вакцинный штамм ERA.

Исходя из вышеизложенного ген гликопротеина G вакцинного штамма вируса бешенства PB-97 был выбран для получения целевого рАд5, нами был сконструирован аденовирус Ad5-RV97, экспрессирующий ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма PB-97.

Защитное антирабическое действие рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген глико-

протеина G вируса бешенства, при иммунизации лабораторных мышей. Для оценки защитного действия аденовируса Ad5-RV97 лабораторные мыши были иммунизированы однократно внутримышечно Ad5-RV97 в дозах $1 \cdot 10^7$ БОЕ/мышь и $1 \cdot 10^8$ БОЕ/мышь. Через 28 дней после иммунизации животных заражали вирусом бешенства CVS-11 в дозе 100 ЛД₅₀ на животное. За животными наблюдали в течение 15 дней после заражения, результаты представлены на рис. 2.

На протяжении четырех дней после инфицирования ни одно животное не проявляло клинических симптомов заболевания. На пятый день у большинства контрольных животных наблюдались шаткость походки, сгорбленная спина и взъерошенная шерсть. На шестой день 50 % животных в контрольной группе пало, у остальных, помимо вышеперечисленных симптомов, наблюдались параличи конечностей. В течение восьми дней после инфицирования умерли все контрольные животные. Иммунизированные Ad5-RV97 животные не проявляли никаких признаков заболевания. К 15-му дню после заражения вирусом бешенства у животных, иммунизированных Ad5-RV97 в обеих дозах, выживаемость составила 100 %. Таким образом, был показан высокий уровень защитных свойств обеих доз рекомбинантного аденовируса Ad5-RV97. Для дальнейшего изучения механизма защитного действия была выбрана более низкая доза – 10^7 БОЕ/животное.

Изучение гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим ген гликопротеина G вируса бешенства. Сыворотки крови мышей, полученные через 14, 28 и 42 дня после иммунизации аденовирусом Ad5-RV97, были исследованы с помощью ФВН в культуре клеток ВНК-21. Результаты оценки уровня вируснейтрализующих антител в сыворотке крови иммунизированных животных представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, на 14-й день после иммунизации средний уровень антител у иммунизированных животных составил 10,2 МЕ/мл. На 28-й день наблюдалось достоверное увеличение уровня нейтрализующих антител по сравнению с 14-м днем ($p < 0,05$) до 72 МЕ/мл. К 42-му дню продолжался достоверный прирост уровня антител по сравнению с 28-м днем ($p < 0,05$) и средний уровень антител составил 92,3 МЕ/мл. При этом уровень антител в контрольной группе не превышал 0,01 МЕ/мл.

Таким образом, показано образование защитных уровней вируснейтрализующих антител после иммунизации животных аденовирусом Ad5-RV97 в дозе 10^7 БОЕ/животное уже к 14-му дню после иммунизации и значительное увеличение их уровня к 42-му дню после иммунизации.

Изучение специфического Т-клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим ген гликопротеина G вируса бешенства. Т-клеточный иммунный ответ оценивали с помощью метода ELISpot, основанного на детекции цитокинов, секретируемых

индивидуальными клетками [28]. В нашей работе ДК путем трансдукции аденовирусом Ad5-RV97 трансформировали в антиген-презентирующие клетки, экспрессирующие эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС-I и МНС-II. Из селезенки иммунизированных Ad5-RV97 и контрольных мышей путем сортировки на проточном лазерном цитофлуориметре получали высокоочищенные (чистота 95–97 %) популяции CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток. При сокультивировании CD8⁺-Т-клеток с ДК, экспрессирующими эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС-I, и CD4⁺-Т-клеток с ДК, экспрессирующими эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС-II, Т-клетки начинали секретировать ИФН-γ. Далее с помощью набора ELISpot была детектирована секреция ИФН-γ индивидуальными клетками.

Результаты определения уровня Т-клеточного ответа у иммунизированных мышей на эпитопы гликопротеина G вируса бешенства представлены на рис. 4.

При реактивации спленоцитов иммунизированных животных ДК, презентировавшими эпитопы гликопротеина G вируса бешенства, наблюдался достоверный прирост количества ИФН-γ-секретирующих клеток. При реактивации спленоцитов иммунизированных животных ДК без антигенной нагрузки или ДК, обработанными Ad5-null, достоверного прироста количества

Рис. 3. Динамика изменения титров нейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотке крови мышей, иммунизированных Ad5-RV97 и контрольных животных (К-).

По оси абсцисс – изменения титров после иммунизации через 14, 28 и 42 сут; по оси ординат – средний уровень антител, выраженный в МЕ/мл; * – достоверная разница между уровнем антител в опытной и контрольной группах, $p < 0,05$.

ИФН-γ-секретирующих клеток не наблюдалось. Также не наблюдалось достоверного прироста количества ИФН-γ-секретирующих клеток в спленоцитах мышей из контрольной группы как реактивированными ДК, обработанными Ad5-null и Ad5-RV97, так и ДК без антигенной нагрузки (см. рис. 4А). Наличие у иммунизи-

Рис. 4. Определение количества спленоцитов, CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток мышей, иммунизированных Ad5-RV97, отвечающих секрецией ИФН-γ на специфическую реактивацию дендритными клетками, «нагруженными» гликопротеином G вируса бешенства. По оси ординат – среднее количество ИФН-γ-секретирующих спленоцитов (А), очищенных CD4⁺-клеток (Б) и очищенных CD8⁺-клеток (Б) (из расчета на 1 млн клеток селезенки) у интактных мышей (К-) и мышей, иммунизированных Ad5-RV97, в ответ на их рестимуляцию ДК, трансфицированными Ad5-null, Ad5-RV97, а также без трансфекции; * – достоверная разница между количеством клеток в опытной и контрольной группах, $p < 0,05$.

ванных Ad-RV97 животных ИФН- γ -продуцирующих CD4⁺-Т-клеток было нами показано через реактивацию отсортированных CD4⁺-Т-клеток ДК, трансдуцированными Ad5-RV97. Показан достоверный прирост уровня ИФН- γ -секретирующих CD4⁺-Т-клеток после реактивации ДК, презентующими эпитопы гликопротеина G вируса бешенства (см. рис. 4Б). Также мы обнаружили значительное количество ИФН- γ -продуцирующих CD8⁺-Т-клеток, способных узнавать эпитопы гликопротеина G вируса бешенства, презентуемые ДК (см. рис. 4В).

Обсуждение

Современные инактивированные вакцины против бешенства считаются достаточно эффективными, но они не лишены ряда недостатков. К таким недостаткам относятся их реактогенность, многократная схема введения и необходимость работы при их производстве с живыми штаммами вируса бешенства. При этом свою эффективность на животных показали новые типы антирабических вакцин – вакцины на основе вирусных векторов, несущих ген основного антигена вируса бешенства – гликопротеина G [2]. Перспективным является создание антирабических вакцин на основе рекомбинантных вирусных векторов для ПрЭП групп риска путем однократного введения, что исключит возможность неполного прохождения курса вакцинации. Заметное количество вакцин на основе вирусных векторов против широкого ряда патогенов уже прошло клинические испытания безопасности, и одной из самых многочисленных групп вакцин здесь являются вакцины на основе рАд5. Показали свою безопасность вакцины на основе рАд5 против гриппа, малярии, лихорадки Эбола, туберкулеза, респираторно-синцитиального вируса и др. [29], это позволяет рассчитывать на низкую реактогенность и высокую безопасность кандидатных антирабических вакцин на основе рАд5.

Одной из основных задач при создании антирабической вакцины на основе вирусных векторов является правильный подбор целевого антигена. Как известно, основным антигеном вируса бешенства, вызывающим образование вирус-нейтрализующих антител, является поверхностный гликопротеин G. Считается, что наличие в крови вирус-нейтрализующих антител к гликопротеину G в количестве более 0,5 МЕ/мл обеспечивает полную защиту от заражения [30]. Нами была проведена аналитическая работа по подбору наиболее подходящего штамма вируса бешенства, который мог бы послужить «донором» гена гликопротеина G для создания рекомбинантной вакцины на основе рАд5. Литературные данные показывают, что наиболее часто в качестве таких «доноров» выступают вакцинные штаммы вируса бешенства, хорошо показавшие себя при проведении программ вакцинирования как населения, так и диких и домашних животных. Среди существующих в Российской Федерации вакцинных штаммов Москва 3253, Овечий-ВГНКИ, Щелково-51 [23], РБ-71, ВНИИЗЖ и РВ-97 [24] являются прямыми потомками Пастеровского штамма, выделенного на территории Европы. На

основе штамма РВ-97 были созданы живые оральные вакцины для иммунизации диких плотоядных – СИН-РАБ®, ОРАЛРАБИВАК® и РАБИСТАВ®, которые показали свою эффективность при многократном использовании в различных регионах Российской Федерации начиная с 2003 г. [24]. Поэтому штамм РВ-97 был выбран наиболее подходящим «донором» гена гликопротеина G для конструирования рАд5, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства.

Для оценки близости последовательности гликопротеина G штамма РВ-97 к последовательностям гликопротеинов из изолятов вирусов бешенства, выделенных на территории Российской Федерации, нами был проведен филогенетический анализ. На рис. 1 видно, что нуклеотидная последовательность внеклеточной части (несущей все известные антигенные сайты) гликопротеина G штамм РВ-97 находится в группе последовательностей из штаммов европейского и российского происхождения.

Нами был получен рекомбинантный аденовирус, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства штамма РВ-97 (Ad5-RV97), и для оценки его защитных свойств была проведена однократная внутримышечная иммунизация лабораторных мышей аденовирусом Ad5-RV97 в дозах 10⁷ и 10⁸ БОЕ/животное. Обе дозы показали свою протективность при заражении животных фиксированным штаммом вируса бешенства CVS-11. У животных не наблюдалось симптомов заболевания, и выживаемость через 15 дней после заражения составила 100 %. При этом в контрольной группе все животные пали уже на 8-й день после заражения (см. рис. 2). Для дальнейшего исследования иммуногенных свойств аденовируса Ad5-RV97 была выбрана меньшая доза – 10⁷ БОЕ/животное. Стоит отметить, что фиксированный штамм, используемый для экспериментального заражения вирусом бешенства – CVS-11, находится на филогенетическом дереве среди североамериканских штаммов (см. рис. 1). Поэтому успешная защита от этого штамма говорит о широте действия полученного рАд5 и о его способности защищать от штаммов вируса бешенства, циркулирующих не только на территории Европы и Российской Федерации.

Согласно литературным данным, гуморальный иммунный ответ играет доминирующую роль в защитном иммунитете против вируса бешенства [32]. Для оценки гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных аденовирусом Ad5-RV97, был изучен уровень вирус-нейтрализующих антител. Содержание в сыворотках крови вирус-нейтрализующих антител в количестве более 0,5 МЕ/мл считается достаточным для защиты от заражения [30], при этом после лечебно-профилактических прививок титры вирус-нейтрализующих антител, как правило, не превышают 10 МЕ/мл [33]. В нашей работе было показано, что иммунизация Ad5-RV97 приводит к образованию антирабических антител в количестве, существенно превышающем 0,5 МЕ/мл уже с 14-го дня после иммунизации (см. рис. 3). На 14-й день после иммунизации средний титр антител составил 10,2 МЕ/мл, на 28-й день после иммунизации – 72 МЕ/мл, а к 48-му дню после имму-

низации достиг 92,3 МЕ/мл. При этом уровень антител в контрольной группе не превышал 0,01 МЕ/мл. Таким образом, можно с уверенностью сказать, что уже через две недели после иммунизации животные обладали защитным титром антирабических антител, а к 42-му дню после иммунизации этот титр существенно превышал обычные уровни антител, получаемые в результате ПрЭП.

При оценке эффективности антирабических вакцин традиционно используют такой показатель, как уровень вирус-нейтрализующих антител, в то время как влияние Т-клеточного иммунитета на эффективность вакцинации изучена гораздо менее широко. Однако существующие литературные данные указывают на важность Т-клеточного иммунитета в формировании защиты от вируса бешенства [34]. В нашей работе было оценено количество CD4⁺- и CD8⁺-клеток, способных секретировать ИФН- γ в ответ на стимуляцию антиген-презентирующими ДК. ДК были трансформированы в антиген-презентирующие с помощью трансдукции аденовирусом Ad5-RV97. В результате ДК стали способны презентировать эпитопы гликопротеина G вируса бешенства как в комплексе с молекулами МНС-I, так и с молекулами МНС-II, что позволило стимулировать как CD4⁺-, так и CD8⁺-иммунные клетки, реагирующие на различные эпитопы вируса бешенства (см. рис. 4). Среднее количество спленоцитов, реагирующих продукцией ИФН- γ в ответ на стимуляцию ДК, трансдуцированными Ad5-RV97, у иммунизированных животных составило 2246 ± 253 на 1 млн клеток селезенки, тогда как у контрольных мышей – 366 ± 15 . Среднее количество CD4⁺-клеток, реагирующих продукцией ИФН- γ в ответ на стимуляцию ДК, трансдуцированными Ad5-RV97, у иммунизированных животных составило 4126 ± 951 на 1 млн CD4⁺-клеток, тогда как у контрольных мышей – 433 ± 143 . Среднее количество CD8⁺-клеток, реагирующих продукцией ИФН- γ в ответ на стимуляцию ДК, трансдуцированными Ad5-RV97, у иммунизированных животных составило 9846 ± 2070 на 1 млн CD4⁺-клеток, тогда как у контрольных мышей 280 ± 81 . Таким образом, нами был продемонстрирован значимый как CD4⁺-, так и CD8⁺-клеточный иммунный ответ на введение мышам рекомбинантного аденовируса Ad5-RV97.

■ Литература

1. Hatz C.F., Kuenzli E., Funk M. Rabies: relevance, prevention, and management in travel medicine. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2012; 26 (3): 739–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.05.001>.
2. Седова Е.С., Шмаров М.М. Новые антирабические рекомбинантные вакцины. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016; 16 (4): 219–28.
3. Грачев В.П., Хапчаев Ю.Х. Применение перевиваемых линий клеток человека и животных для изготовления вирусных вакцин. ЖМЭИ. 2008; 1: 82–90.
4. Liu C., Li J., Yao Q., Gao Z., Cheng Y., Zhou M. et al. AAV-expressed G protein induces robust humoral and cellular immune response and provides durable protection from rabies virus challenges in mice. *Vet. Microbiol.* 2020; 242: 108578. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108578>
5. Wang X., Fang Z., Xiong J., Yang K., Chi Y., Tang X. et al. A chimpanzee adenoviral vector-based rabies vaccine protects beagle

Заключение

Сконструированный нами рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма РВ-97, показал при иммунизации лабораторных мышей высокий уровень защитных свойств против вируса бешенства, а также значимые уровни гуморального и клеточного антирабического иммунного ответа. Полученные данные позволяют расценивать аденовирус Ad5-RV97 в качестве основы для создания кандидатной антирабической вакцины, которая может применяться для ПрЭП различных групп риска. В дальнейшем планируется изучение длительности полученного при иммунизации Ad5-RV97 иммунного ответа, а также возможность влияния на уровень антирабического иммунного ответа предсуществующих антител к аденовирусу человека 5-го серотипа.

Вклад авторов

Идея, концепция и дизайн исследования – Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л., Метлин А.Е.; утверждение окончательной версии статьи для публикации – Шмаров М.М.; интерпретация результатов исследования, доработка текста – Алексеева С.В., Тутыкина И.Л.; написание текста – Седова Е.С., Никонова А.Э.; консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ – Метлин А.Е., Логунов Д.Ю., Атауллаханов Р.И., Народицкий Б.С., Щербинин Д.Н.; сбор и систематизация данных – Никонова А.Э., Верховская Л.В.; проведение работ по получению рекомбинантного аденовируса – Седова Е.С., Тутыкина И.Л., Верховская Л.В.; проведение биоинформатических исследований – Никонова А.Э., Щербинин Д.Н.; статистическая обработка данных – Никонова А.Э.; дизайн исследования по проведению работ с вирусом бешенства – Гребенникова Т.В.; проведение работ с вирусом бешенства – Елаков А.Л., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Чернышова Е.В., Сергеев О.В., Баринский И.Ф.; проведение иммунизации животных, отбора образцов крови – Артемова Э.А.; дизайн исследования по изучению Т-клеточного ответа у животных – Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В.; изучение Т-клеточного ответа у животных – Лебедева Е.С., Чулкина М.М.

dogs from lethal rabies virus challenge. *Virology.* 2019; 536: 32–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.022>

6. Ковыршина А.В., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Балясин М.В., Ботиков А.Г., Панина Л.В. и др. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу ББРС-KoV. *Иммунология.* 2020; 41 (2): 135–43. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143>
7. Zhang C., Zhou D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12 (8): 2064–74. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1165908>
8. Sobey K.G., Jamieson S.E., Walpole A.A., Rosatte R.C., Donovan D., Fehlner-Gardiner C. et al. ONRAB® oral rabies vaccine is shed from, but does not persist in, captive mammals. *Vaccine.* 2019; 37 (31): 4310–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.046>

9. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание).
10. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. *Международный вестник ветеринарии*. 2015; (2): 96–107.
11. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35: 1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
12. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 11 030–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
13. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4: 406–25.
14. Tutykhina I., Esmagambetov I., Bagaev A., Pichugin A., Lysenko A., Shcherbinin D. et al. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One*. 2018; 13 (1): e0191574 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
15. Есмагамбетов И.Б., Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Гарас М.Н., Шмаров М.М. и др. Конструирование рекомбинантного аденовируса человека, экспрессирующего гены консервативных антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; 2: 22–8. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416814020050>
16. Cliquet F., Aubert M., Sagne L. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*. 1998; 212 (1): 79–87.
17. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th ed. 2008. URL: <https://www.oie.int/doc/ged/D7710.PDF>
18. Madaan A., Verma R., Singh A.T., Jain S.K., Jaggi M. A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J. Biol. Methods*. 2014; 1: e1. DOI: <https://doi.org/10.14440/jbm.2014.12>
19. Pichugin A., Bagaev A., Ataulakhov R. High-fidelity detection of IFN- γ secreting CD4 and CD8 cells in response to soluble or Ad5 transduced influenza antigens using ELISPOT and cell sorting. *PLoS ONE*. 13 (1): e0191574. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
20. Wang C., Dulal P., Zhou X., Xiang Z., Goharriz H., Banyard A. et al. A simian-adenovirus-vectored rabies vaccine suitable for thermostabilisation and clinical development for low-cost single-dose pre-exposure prophylaxis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12 (10): e0006870. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006870>
21. Zhou D., Cun A., Li Y., Xiang Z., Ertl H.C. A chimpanzee-origin adenovirus vector expressing the rabies virus glycoprotein as an oral vaccine against inhalation infection with rabies virus. *Mol. Ther.* 2006; 14 (5): 662–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.027>
22. Maki J., Guiot A.L., Aubert M., Brochier B., Cliquet F., Hanlon C.A. Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-rabies-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG®): a global review. *Vet. Res.* 2017; 48 (1): 57. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0459-9>
23. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N. et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One*. 2017; 12 (2): e0171855. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
24. Borisov A.V., Savvin A.V., Mikhilishin V.V. Gruzdev K.N., Domskey I.A. Determination of efficacy of rabies vaccine in the Saratov Region. *Dev. Biol.* 2006; 125: 217–20.
25. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhilishin V., Huovilainen A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132 (1–2): 242–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.016>
26. Luo T.R., Minamoto N., Hishida M., Yamamoto K., Fujise T., Hiraga S. et al. Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* 1998; 42 (3): 187–93.
27. Fallahi F., Wandeler A.I., Nadin-Davis S.A. Characterization of epitopes on the rabies virus glycoprotein by selection and analysis of escape mutants. *Virus Res.* 2016; 220: 161–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.019>
28. McElhaney J.E., Xie D., Hager W.D., Barry M.B., Wang Y., Kleppinger A. et al. T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *J. Immunol.* 2006; 176: 6333–9.
29. Черенова Л.В., Каштиго Т.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. Разработка вакцин на основе аденовирусных векторов: обзор зарубежных клинических исследований (часть 2). *Медицинская иммунология*. 2017; 19 (4): 329–58.
30. WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series 1012. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?ua=1>
31. Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец В.И., Еремец Н.К., Иванов И.В., Салов Д.А. и др. Основные направления разработки и внедрения антирабических вакцин из шт. Щелково-51. *Ветеринарная медицина*. 2011; 95: 175–7.
32. Yang F., Lin S., Ye F., Yang J., Qi J., Chen Z. et al. Structural analysis of rabies virus glycoprotein reveals pH-dependent conformational changes and interactions with a neutralizing antibody. *Cell Host Microbe*. 2020; 27 (3): 441–53.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.012>
33. Udow S.J., Marrie R.A., Jackson A.C. Clinical features of dog- and bat-acquired rabies in humans. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57: 689–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cit372>
34. Overduin L.A., van Dongen J.J.M., Visser L.G. The cellular immune response to rabies vaccination: a systematic review. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7 (3): E110. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines7030110>

■ References

1. Hatz C.F., Kuenzli E., Funk M. Rabies: relevance, prevention, and management in travel medicine. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2012; 26 (3): 739–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.05.001>
2. Sedova E.S., Shmarov M.M. New recombinant rabies vaccines. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016; 16 (4): 219–28. (in Russian)
3. Grachev V.P., Khapchaev Yu.Kh. Use of continuous human and animal cell lines for the production of viral vaccines. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2008; 1: 82–90. (in Russian)
4. Liu C., Li J., Yao Q., Gao Z., Cheng Y., Zhou M., et al. AAV-expressed G protein induces robust humoral and cellular immune response and provides durable protection from rabies virus challenges in mice. *Vet. Microbiol.* 2020; 242: 108578. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108578>
5. Wang X., Fang Z., Xiong J., Yang K., Chi Y., Tang X., et al. A chimpanzee adenoviral vector-based rabies vaccine protects beagle dogs from lethal rabies virus challenge. *Virology*. 2019; 536: 32–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.022>
6. Kovyrshina A.V., Dolzhikova I.V., Grousova D.M. Balyasin M.V., Botikov A.G., Panina L.V., et al. A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV. *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 135–43. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143> (in Russian)
7. Zhang C., Zhou D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12 (8): 2064–74. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1165908>
8. Sobey K.G., Jamieson S.E., Walpole A.A., Rosatte R.C., Donovan D., Fehlner-Gardiner C., et al. ONRAB® oral rabies vaccine is shed from, but does not persist in, captive mammals. *Vaccine*. 2019; 37 (31): 4310–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.046>
9. GOST 33216-2014. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits (reprint). (in Russian)
10. Rybakova A.V., Makarova M.N. Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European Directive 2010/63. *Mezhdunarodniy vestnik veterinarii*. 2015; (2): 96–107 (in Russian)
11. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35: 1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

12. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 11 030–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
13. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4: 406–25.
14. Tutikhina I., Esmagambetov I., Bagaev A., Pichugin A., Lysenko A., Shcherbinin D., et al. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One*. 2018; 13 (1): e0191574 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
15. Esmagambetov I.B., Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Lysenko A.A., Garas M.N., Shmarov M.M., et al. Construction of recombinant adenoviral vector expressing genes of the conservative proteins M2 «ion channel» and nucleoprotein of influenza A virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2014; 29: 69–76. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416814020050> (in Russian)
16. Cliquet F., Aubert M., Sagne L. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*. 1998; 212 (1): 79–87.
17. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th ed. 2008. URL: <https://www.oie.int/doc/ged/D7710.PDF>
18. Madaan A., Verma R., Singh A.T., Jain S.K., Jaggi M. A step-wise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J. Biol. Methods*. 2014; 1: e1. DOI: <https://doi.org/10.14440/jbm.2014.12>
19. Pichugin A., Bagaev A., Ataullakhanov R. High-fidelity detection of IFN- γ secreting CD4 and CD8 cells in response to soluble or Ad5 transduced influenza antigens using ELISPOT and cell sorting. *PLoS ONE*. 13 (1): e0191574. DOI: <https://doi.org/10.17504/protocols.io.jn4cmgw>
20. Wang C., Dulal P., Zhou X., Xiang Z., Goharriz H., Ban-yard A., et al. A simian-adenovirus-vectored rabies vaccine suitable for thermostabilisation and clinical development for low-cost single-dose pre-exposure prophylaxis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12 (10): e0006870. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006870>
21. Zhou D., Cun A., Li Y., Xiang Z., Ertl H.C. A chimpanzee-origin adenovirus vector expressing the rabies virus glycoprotein as an oral vaccine against inhalation infection with rabies virus. *Mol. Ther.* 2006; 14 (5): 662–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.027>
22. Maki J., Guiot A.L., Aubert M., Brochier B., Cliquet F., Hanlon C.A. Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-rabies-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG®): a global review. *Vet. Res.* 2017; 48 (1): 57. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0459-9>
23. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One*. 2017; 12 (2): e0171855. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
24. Borisov A.V., Savvin A.V., Mikhailishin V.V., Gruzdev K.N., Domskey I.A. Determination of efficacy of rabies vaccine in the Saratov Region. *Dev. Biol.* 2006; 125: 217–20.
25. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., Huovilainen A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132 (1–2): 242–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.016>
26. Luo T.R., Minamoto N., Hishida M., Yamamoto K., Fujise T., Hiraga S., et al. Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* 1998; 42 (3): 187–93.
27. Fallahi F., Wandeler A.I., Nadin-Davis S.A. Characterization of epitopes on the rabies virus glycoprotein by selection and analysis of escape mutants. *Virus Res.* 2016; 220: 161–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.019>
28. McElhaney J.E., Xie D., Hager W.D., Barry M.B., Wang Y., Kleppinger A., et al. T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *J. Immunol.* 2006; 176: 6333–9.
29. Cherenova L.V., Kashtigo T.V., Saadian Kh.S., Shmarov M.M. Development of vaccines based on adenoviral vectors: a review of foreign clinical studies (part 2). *Meditinskaya immunologiya*. 2017; 19 (4): 329–58. (in Russian)
30. WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series 1012. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?ua=1>
31. Pukhova N.M., Samuilenko A.Ya., Eremets V.I., Eremets N.K., Ivanov I.V., Salov D.A., et al. The main directions of development and implementation of rabies vaccines from st. Schelkovo-51. *Veterinarna meditsina*. 2011; 95: 175–7 (in Russian).
32. Yang F., Lin S., Ye F., Yang J., Qi J., Chen Z., et al. Structural analysis of rabies virus glycoprotein reveals pH-dependent conformational changes and interactions with a neutralizing antibody. *Cell Host Microbe*. 2020; 27 (3): 441–53.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.012>
33. Udow S.J., Marrie R.A., Jackson A.C. Clinical features of dog- and bat-acquired rabies in humans. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57: 689–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cit372>
34. Overduin L.A., van Dongen J.J.M., Visser L.G. The cellular immune response to rabies vaccination: a systematic review. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7 (3): E110. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines7030110>

Сведения об авторах

Шмаров Максим Михайлович – д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, доцент кафедры инфектологии и вирусологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: mmshmarov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Седова Елена Сергеевна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: sedova-es@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Никонова Алена Эдуардовна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: merrikful@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7606-3310>

Елаков Александр Леонидович – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: alelakov@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5798-6518>

Authors' information

Maksim M. Shmarov – Dr.Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Associate Prof. of the Department of Infectology and Virology of the I.M. Sechenov FMSMU (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: mmshmarov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Elena S. Sedova – PhD, Researcher of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: sedova-es@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Alena E. Nikonova – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: merrikful@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7606-3310>

Alexander L. Elakov – PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Diagnostics of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: alelakov@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5798-6518>

Щербинин Дмитрий Николаевич – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: dim284@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Артемова Элина Алексеевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: elina.sugar@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7081-0311>

Лебедева Екатерина Семеновна – младший научный сотрудник лаборатории активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: EkaterinaLebedeva2612@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0384-9299>

Чулкина Марина Михайловна – к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: chulkina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2840-937X>

Лосич Милана Анатольевна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: mkohnovich@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5618-1918>

Зайкова Ольга Николаевна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: zaykova_o_n@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

Чернышова Елена Владимировна – к.в.н., научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: ELE-Ai-Petri@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>

Алексеева Светлана Викторовна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: sv.alekseeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3313-1894>

Тутыхина Ирина Леонидовна – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: their@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7667-5432>

Сергеев Олег Витальевич – д.б.н., проф., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: osergeyev123@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-3407-2224>

Верховская Людмила Викторовна – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: verkhov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Пичугин Алексей Васильевич – к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: pichalvas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5356-3331>

Метлин Артем Евгеньевич – д.в.н., заместитель директора по научной работе ФГБУ «ВГНКИ», Москва, Российская Федерация; <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>

Dmitriy N. Shcherbinin – PhD, Researcher of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: dim284@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Elina A. Artemova – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: elina.sugar@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7081-0311>

Ekaterina S. Lebedeva – Junior researcher of Laboratory of Immunity Activation, NRC – Institute of immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: EkaterinaLebedeva2612@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0384-9299>

Marina M. Chulkina – PhD, Junior Researcher of Laboratory of Immunity Activation, NRC – Institute of immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: chulkina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2840-937X>

Milana A. Losich – PhD, Researcher of the Laboratory of Molecular Diagnostics of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: mkohnovich@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5618-1918>

Olga N. Zaykova – Researcher of the Laboratory of Molecular Diagnostics of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: zaykova_o_n@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

Elena V. Chernishova – PhD, Researcher of the Laboratory of Immunobiotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: ELE-Ai-Petri@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>

Svetlana V. Alekseeva – PhD, Senior researcher of the Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: sv.alekseeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3313-1894>

Irina L. Tutykhina – PhD, Leader researcher of the Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: their@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7667-5432>

Oleg V. Sergeev – Dr. Sci., Prof., Senior lecturer of the Department of Microbiology of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; e-mail: osergeyev123@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-3407-2224>

Lyudmila V. Verkhovskaya – PhD, Leader Researcher of the Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: verkhov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Aleksey V. Pichugin – PhD, Leader Researcher of Laboratory of Immunity Activation, NRC – Institute of immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: pichalvas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5356-3331>

Artem E. Metlin – Dr.Sci., Deputy Director for Science of the VGNKI, Moscow, Russian Federation; <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>

Баринский Игорь Феликсович – д.м.н., проф., заведующий лабораторией сравнительной вирусологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; <https://orcid.org/0000-0002-9909-3598>

Гребенникова Татьяна Владимировна – д.б.н., проф., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: t_grebennikova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Логунов Денис Юрьевич – д.б.н., член-корр. РАН, заместитель директора по научной работе, зав. лабораторией клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, проф. кафедры инфектологии и вирусологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: logunov@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Атауллаханов Равшан Иноятович – д.м.н., проф., руководитель отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

Народицкий Борис Савельевич – д.б.н., проф., заместитель директора по научной работе подразделения Институт вирусологии им. Д. И. Иванковского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, проф. кафедры инфектологии и вирусологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: bsnar1941@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0001-5522-8238>

Гинцбург Александр Леонидович – академик РАН, д.б.н., проф., директор ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, зав. кафедрой инфектологии и вирусологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Igor F. Barinsky – MD, Prof., Head of the Laboratory for Comparative Virology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; <https://orcid.org/0000-0002-9909-3598>

Tatiana V. Grebennikova – Dr.Sci., Prof., Corr. member of RAS, Head of Laboratory of Molecular diagnostics of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: t_grebennikova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Denis Yu. Logunov – Dr.Sci. (Biol.), Corr. member of RAS, Deputy Director for Research, Head of Laboratory of Cell Microbiology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Prof. of the Department of Infectology and Virology of the I.M. Sechenov FMSMU (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: logunov@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Ravshan I. Ataullakhanov – MD, Prof., Head of Laboratory of Immunity Activation, NRC – Institute of immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

Boris S. Naroditsky – Dr.Sci. (Biol.), Prof., Deputy Director for Science of the Department of the D.I. Ivanovskii Institute of Virology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Prof. of the Department of Infectology and Virology of the I.M. Sechenov FMSMU (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: bsnar1941@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0001-5522-8238>

Alexander L. Gintsburg – Acad. of RAS, Dr.Sci. (Biol.), Prof., Director of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Head of the Department of Infectology and Virology of the I.M. Sechenov FMSMU (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>