

ISSN 2221-996X (Print)  
ISSN 2619-1156 (Online)

# БИО

# ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Том / Volume

№ / No.

23

1

2023

**BIOLOGICAL PRODUCTS.**  
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

ТЕМА НОМЕРА

**Вопросы разработки  
новых противовирусных вакцин**

[www.biopreparations.ru](http://www.biopreparations.ru)





### Уважаемые коллеги!

Главная тема предлагаемого номера – «Вопросы разработки новых противовирусных вакцин». Пандемия, вызванная вирусом SARS-CoV-2, показала, что следует сохранять настороженность в отношении возвращающихся и вновь возникающих (эмерджентных) инфекций, имеющих серьезные социально-экономические последствия. Об этом свидетельствуют зарегистрированные в 2022 г. случаи заболеваний людей оспой обезьян, появление новых переносчиков других вирусных инфекций, прежде всего относящихся к семействам *Filoviridae* и *Togaviridae*.

Возникновение новых инфекционных заболеваний, с которыми человечество ранее не сталкивалось, требует разработки и производства иммунобиологических лекарственных препаратов для профилактики, диагностики и лечения данных заболеваний, изменения в порядке экспертизы и регистрации, а также проведения исследований безопасности и эффективности препаратов в пострегистрационном периоде.

Ускоренному созданию новых вакцин и средств диагностики способствует обоснованный выбор технологических платформ, оборудования, разработка новых методов контроля, что является очень важным для нашей страны в настоящее время.

Данный выпуск журнала включает статьи, посвященные анализу нормативных требований для доклинической оценки эффективности и безопасности вакцин, изучению методов контроля, диагностике вирусных инфекций (COVID-19, лихорадка Западного Нила), вопросам разработки и применения вакцин для профилактики оспы, лихорадки Чикунгунья и др.

С уважением,  
доктор медицинских наук, профессор

**ИГНАТЬЕВ Георгий Михайлович**

## BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

**ТОМ 23, № 1,  
ЯНВАРЬ – МАРТ 2023**

**Научно-практический журнал  
Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год)  
Основан в 2001 году**

**Учредитель:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, включен в «Белый список» научных журналов. Журнал принимает статьи по следующим научным специальностям: биотехнология, молекулярная биология, вирусология, микробиология, аллергология и иммунология.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 1,182.

Журнал индексируется в базах данных: Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM каталог, DOAJ, Ulrichsweb и др.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0.

**VOLUME 23, NO. 1,  
JANUARY–MARCH 2023**

**Research and practice journal  
Published quarterly (four issues per year)  
Founded in 2001**

**Founder:**

Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation (Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products)

The journal is included in the White list of Russian scientific journals and in the List of peer-reviewed scientific publications that the State Commission for Academic Degrees and Titles recommends for publishing the main scientific results of theses for Candidate of Science and Doctor of Science degrees. Articles submitted to the journal should cover the following fields of research: biotechnology, molecular biology, virology, microbiology, allergology and immunology.

The journal's two-year RISC impact factor is 1,182.

The journal is indexed in the following databases: Russian Index of Science Citation (RISC), Russian Science Citation Index (RSCI), Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM Catalog, DOAJ, Ulrichsweb, etc.

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript. The content is licensed under Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0.

На обложке: «Иммуноглобулины к вирусу SARS-CoV-2» (лицензированное изображение фотобанка ООО Фотодженика <https://photogenica.ru/zoom/PHX344477440/>)

Cover image: Anti-SARS-CoV-2 immunoglobulins, a licensed image from the Photogenica image bank (<https://photogenica.ru/zoom/PHX344477440/>)

## Главный редактор

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, проф., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, Россия)

## Заместители главного редактора

**Бондарев Владимир Петрович**, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Хайтов Муса Рахимович**, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

## Ответственный секретарь

**Гойкалова Ольга Юрьевна**, канд. биол. наук, доц., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

В журнале публикуются обзорные, оригинальные, дискуссионные статьи по вопросам разработки регуляторных процедур, стандартизации, контроля качества, производства и применения терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов – иммунобиологических, биотехнологических, генотерапевтических и лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека и животных; а также различных групп иммуномодулирующих лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

## Редакционная коллегия

**Авдеева Жанна Ильдаровна**, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Амвросьева Тамара Васильевна**, д-р мед. наук, проф., РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь)  
**Аракелов Сергей Александрович**, канд. биол. наук, ФГУП «СПбНИИВС» ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)  
**Бакулин Михаил Константинович**, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)  
**Борисевич Игорь Владимирович**, д-р мед. наук, проф., ФМБА России (Москва, Россия)  
**Борисевич Сергей Владимирович**, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)  
**Брико Николай Иванович**, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Валента Рудольф**, проф., Венский медицинский университет (Вена, Австрия)  
**Гинцбург Александр Леонидович**, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Дармов Илья Владимирович**, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)  
**Дегтярев Сергей Харитонович**, д-р биол. наук, проф., НПО «СибЭнзайм» (Новосибирск, Россия)  
**Дятлов Иван Алексеевич**, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Московская область, Россия)  
**Зверев Виталий Васильевич**, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, Россия)

**Иванов Вячеслав Борисович**, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Игнатъев Георгий Михайлович**, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)  
**Климов Владимир Иванович**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Кутырев Владимир Викторович**, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, Россия)  
**Леви Диана Тимофеевна**, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Медуницын Николай Васильевич**, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва, Россия)  
**Мионов Александр Николаевич**, д-р мед. наук, проф., ООО «Национальное агентство лекарственных средств» (Москва, Россия)  
**Мовсесянц Арташес Авакович**, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Мосягин Вячеслав Дмитриевич**, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)  
**Пашенко Юрий Иванович**, д-р биол. наук, проф., ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)  
**Токаревич Николай Константинович**, д-р мед. наук, проф., ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (Санкт-Петербург, Россия)  
**Хамитов Равиль Авгатович**, д-р мед. наук, проф., АО «Генериум» (Вольгинский, Владимирская область, Россия)  
**Чумаков Константин Михайлович**, д-р биол. наук, проф., Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

#### Учредитель и издатель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

#### Шеф-редактор

Федотова Ольга Федоровна  
+7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)

[Fedotovaof@expmed.ru](mailto:Fedotovaof@expmed.ru)

#### Ответственный редактор тематического выпуска

Игнатьев Георгий Михайлович,  
д-р мед. наук, проф.

#### Научные редакторы

Гукасова Надежда Вадимовна,  
канд. биол. наук  
Лебединская Елена Владимировна,  
канд. биол. наук

#### Редактор перевода

Балтина Любовь Александровна

#### Адрес учредителя и редакции

127051, Москва,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2  
тел.: +7 (499) 190-18-18  
(доб. 63-42, 63-02, 63-35)  
[biopreparaty@expmed.ru](mailto:biopreparaty@expmed.ru)

#### Исполнитель

ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва,  
ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

#### Типография

ООО «Издательство «Триада»: 170034,  
Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514

#### Тираж

150 экз. Цена свободная

#### Подписано в печать

22.03.2023

#### Дата выхода в свет

30.03.2023

#### Подписной индекс

в каталоге «Пресса России» – 57941,  
в каталоге агентства «Урал-Пресс» –  
57941

Журнал зарегистрирован в Федераль-  
ной службе по надзору в сфере связи,  
информационных технологий и массо-  
вых коммуникаций. Свидетельство ПИ  
№ ФС77-82918 от 14 марта 2022 г.

© Составление. Оформление.  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,  
2023

## СОДЕРЖАНИЕ

### Тема номера: Вопросы разработки новых противовирус- ных вакцин

- Д.В. Горенков, Е.И. Комаровская, А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева,  
В.П. Бондарев  
**Современные нормативные требования к проведению  
доклинических исследований профилактических вакцин .....7**
- Л.Ф. Стомба, О.В. Чухраля, Н.К. Черникова, А.Л. Хмелев,  
С.В. Борисевич  
**Безопасность и иммуногенность вакцины третьего поколения  
IMVAMUNE® на основе вируса вакцины, штамм MVA..... 26**
- Е.В. Отрашевская, В.П. Трухин, В.А. Меркулов, Г.М. Игнатьев  
**Прогресс в разработке вакцин для профилактики лихорадки  
Чикунгуния и перспективы появления на рынке ..... 42**
- С.М. Суханова, А.С. Тихонова, З.Е. Бердникова  
**Анализ подходов к проведению испытания вакцин  
для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность» ..... 65**
- А.А. Деркаев, Е.И. Рябова, В.В. Прокофьев, И.А. Фаворская,  
Д.М. Гроусова, И.Б. Есмагамбетов, И.В. Должикова,  
Д.В. Щепляков  
**Получение и характеристика гомодимерной формы  
RBD S-белка SARS-CoV-2, обладающей повышенной  
авидностью к специфическим антителам ..... 76**
- Е.В. Прохвятилова, Г.А. Ткаченко, А.А. Батурин, Л.И. Белицкая,  
А.В. Топорков  
**Оценка диагностической эффективности набора реагентов  
для *in vitro* диагностики лихорадки Западного Нила методом  
полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией  
и гибридационно-флуоресцентной детекцией ..... 90**
- Ю.А. Захарова, А.В. Остапчук, В.В. Василевский, О.С. Федотова,  
Н.А. Шмелева  
**Характеристика чувствительности новых  
клеточных культур животного происхождения к вирусам  
*Coxsackievirus B5* и *Herpes simplex virus-1* .....102**
- К.В. Каа, Г.М. Игнатьев, А.А. Синюгина, А.А. Ишмухаметов  
**Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгуния  
и подбор метода наработки вирусного материала  
в промышленных объемах .....111**

---

## BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

---

### Editor-in-Chief

**Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

### Deputy Editors-in-Chief

**Vladimir P. Bondarev**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

**Musa R. Khaitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, National Research Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

### Executive Secretary

**Olga Yu. Goykalova**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

The journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* publishes reviews, original articles, and discussion articles on such issues as development of regulatory procedures, standardisation, quality control, production and use of biological products for disease prevention, diagnosis, and treatment: immunobiological, biotechnological, gene therapy, human and animal blood plasma products, as well as various groups of immunomodulatory and biomedical cell products.

---

### Editorial Board

**Zhanna I. Avdeeva**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

**Tamara V. Amvrosyeva**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

**Sergey A. Arakelov**, Cand. Sci. (Biol.), Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

**Mikhail K. Bakulin**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

**Igor V. Borisevich**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal Medical Biological Agency of Russia (Moscow, Russia)

**Sergey V. Borisevich**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

**Nikolay I. Briko**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

**Rudolf Valenta**, MD, Prof., Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

**Aleksandr L. Gintsburg**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

**Ilya V. Darmov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

**Sergey Kh. Degtyarev**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., SibEnzyme Ltd (Novosibirsk, Russia)

**Ivan A. Dyatlov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (Obolensk, Moscow Region, Russia)

**Vitaly V. Zverev**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

**Vyacheslav B. Ivanov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

**Georgy M. Ignatyev**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

**Vladimir I. Klimov**, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

**Vladimir V. Kutyrev**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (Saratov, Russia)

**Diana T. Levi**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

**Nikolay V. Medunitsyn**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Aleksandr N. Mironov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Agency of Medicines (Moscow, Russia)

**Artashes A. Movsesyants**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

**Vyacheslav D. Mosyagin**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

**Yuriy I. Pashchenko**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

**Nikolay K. Tokarevich**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint-Petersburg Pasteur Institute (Saint Petersburg, Russia)

**Ravil A. Khamitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Generium JSC (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

**Konstantin M. Chumakov**, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Food and Drug Administration (Silver Spring, Maryland, USA)

### Founder and publisher

Federal State Budgetary Institution  
“Scientific Centre for Expert Evaluation  
of Medicinal Products” of the Ministry  
of Health of the Russian Federation

### Managing Editor

**Olga F. Fedotova**  
+7 (495) 121-06-00 (63-05)  
[Fedotovaof@expmed.ru](mailto:Fedotovaof@expmed.ru)

### Guest editor for the special issue

**Georgy M. Ignatyev**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

### Science Editor

**Nadezhda V. Gukasova**, Cand. Sci. (Biol.)  
**Elena V. Lebedinskaya**, Cand. Sci. (Biol.)

### Translation Editor

**Liubov A. Baltina**

### Postal address of the founder and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051  
Tel.: +7 (499) 190-18-18  
(63-42, 63-02, 63-35)  
[biopreparaty@expmed.ru](mailto:biopreparaty@expmed.ru)

### Contract publisher

NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St.,  
Moscow 115114

### Printing office

“Triada” publishing house: 9 Tchaikovsky  
Ave, office 514, Tver 170034

### Print run

150 copies. Free price

### Passed for printing

22 March 2023

### Date of publication

30 March 2023

### Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941  
Ural-Press agency catalogue: 57941

The journal is registered as mass media  
by the Federal Service for Supervision  
of Communications, Information  
Technologies and Mass Communications.  
Certificate PI No. FS77-82918 dated  
14 March 2022

© Compilation, design. Scientific Centre  
for Expert Evaluation of Medicinal  
Products, 2023

## CONTENTS

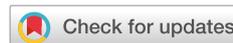
### Issue topic: Development of new viral vaccines

- D.V. Gorenkov, E.I. Komarovskaya, A.A. Soldatov, Zh.I. Avdeeva,  
V.P. Bondarev  
**Current regulatory requirements for non-clinical evaluation  
of prophylactic vaccines** ..... 7
- L.F. Stovba, O.V. Chukhralya, N.K. Chernikova, A.L. Khmelev,  
S.V. Borisevich  
**Safety and immunogenicity of IMVAMUNE®, a third-generation  
vaccine based on the modified vaccinia Ankara (MVA) strain** ..... 26
- E.V. Otrashesvskaja, V.P. Trukhin, V.A. Merkulov, G.M. Ignatyev  
**Chikungunya vaccines: advances in the development  
and prospects for marketing approval** ..... 42
- S.M. Sukhanova, A.S. Tikhonova, Z.E. Berdnikova  
**Analysis of approaches to sterility testing of COVID-19  
prevention vaccines** ..... 65
- A.A. Derkaev, E.I. Ryabova, V.V. Prokofiev, I.A. Favorskaya,  
D.M. Grousova, I.B. Esmagambetov, I.V. Dolzhikova,  
D.V. Shcheblyakov  
**Production and characterisation of a SARS-CoV-2 S-protein RBD  
homodimer with increased avidity for specific antibodies** ..... 76
- E.V. Prokhvatilova, G.A. Tkachenko, A.A. Baturin, L.I. Belitskaya,  
A.V. Toporkov  
**Evaluation of the diagnostic efficacy of a reagent kit  
for *in vitro* diagnosis of West Nile fever using reverse  
transcription polymerase chain reaction  
with fluorescent probe-based detection** ..... 90
- Yu.A. Zakharova, A.V. Ostapchuk, W.W. Wasielewski, O.S. Fedotova,  
N.A. Shmeleva  
**Characterisation of new animal cell cultures' sensitivity  
to *Coxsackievirus B5* and *Herpes simplex virus-1*** ..... 102
- K.V. Kaa, G.M. Ignatyev, A.A. Sinyugina, A.A. Ishmukhametov  
**Susceptibility of various cell lines to the *Chikungunya virus*  
and method selection for commercial-scale production  
of viral material** ..... 111

УДК 615.371:57.08

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-25>

Обзорная статья | Review article



## Современные нормативные требования к проведению доклинических исследований профилактических вакцин

Д.В. Горенков, Е.И. Комаровская, А.А. Солдатов✉, Ж.И. Авдеева, В.П. Бондарев

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Солдатов Александр Алексеевич; [Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

### Резюме

К вакцинам предъявляются особые нормативные требования для оценки их качества, эффективности и безопасности. Учитывая, что Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) является основной международной организацией, координирующей проведение мероприятий по борьбе с вспышками инфекционных заболеваний, начиная с 2005 г. ВОЗ начала разработку документов, касающихся вопросов оценки качества, безопасности и эффективности вакцин. Ведущими мировыми регуляторными органами (FDA, EMA и др.) подготовлены рекомендации для проведения доклинических исследований вакцин.

**Цель работы** – критический анализ нормативных требований для доклинической оценки эффективности и безопасности вакцин, подготовленных зарубежными национальными и международными регуляторными органами.

Проведенный анализ показал, что начиная с 2000-х гг. ВОЗ и ведущими регуляторными органами мира было подготовлено более 40 нормативных документов, в которых описаны те или иные стороны проведения доклинических исследований эффективности и безопасности вакцин. Документы можно разделить на две группы: документы, посвященные общим вопросам доклинических исследований вакцин, и документы, касающиеся оценки качества, эффективности и безопасности определенных видов вакцин. В Российской Федерации последняя редакция рекомендаций для доклинической оценки качества, безопасности и эффективности иммунобиологических лекарственных препаратов была опубликована в 2013 г. и не содержит информации относительно препаратов последнего поколения. В настоящее время проводится работа по подготовке нормативно-правовой базы, касающейся лекарственных средств, в том числе вакцин, на территории государств – членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Представленный в статье анализ нормативных документов по доклиническим исследованиям эффективности и безопасности вакцин может быть полезен для подготовки гармонизированных рекомендаций по соответствующим группам вакцин в рамках ЕАЭС, а также разработчикам, фармпроизводителям и ученым-исследователям, занимающимся созданием и доклиническими исследованиями вакцин.

**Ключевые слова:** вакцины; доклинические исследования; разработка вакцин; нормативное регулирование

**Для цитирования:** Горенков Д.В., Комаровская Е.И., Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Бондарев В.П. Современные нормативные требования к проведению доклинических исследований профилактических вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):7–25. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-25>

© Д.В. Горенков, Е.И. Комаровская, А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева, В.П. Бондарев, 2023

## Current regulatory requirements for non-clinical evaluation of prophylactic vaccines

D.V. Gorenkov, E.I. Komarovskaya, A.A. Soldatov ✉, Zh.I. Avdeeva, V.P. Bondarev

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Aleksandr A. Soldatov; [Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

### Abstract

Vaccines are subject to specific regulatory requirements for the evaluation of their quality, safety, and efficacy. In 2005, the World Health Organisation (WHO), as the main international organisation coordinating measures to combat infectious disease outbreaks, began developing documents on the evaluation of vaccine quality, safety, and efficacy. The world's leading regulatory authorities (FDA, EMA, etc.) have also issued recommendations for conducting non-clinical studies of vaccines.

**The aim of this study** was a critical review of the regulatory requirements established by foreign national and international regulatory authorities for non-clinical evaluation of the safety and efficacy of vaccines.

According to the study results, since the 2000s, the WHO and the world's leading regulatory authorities have produced more than 40 regulatory documents describing certain aspects of non-clinical studies of the safety and efficacy of vaccines. These documents can be divided into two groups: the first group addresses non-clinical studies of vaccines in general, and the second one dwells upon the evaluation of the quality, safety, and efficacy of specific types of vaccines. For the Russian guidelines on non-clinical evaluation of the quality, safety, and efficacy of immunobiologicals, the latest revision dates back to 2013 and does not provide any information on new medicinal products. Currently, work is underway to prepare the regulatory framework for medicines, including vaccines, in the Member States of the Eurasian Economic Union (EAEU). This review of regulatory documents on non-clinical safety and efficacy studies of vaccines may be useful in drafting harmonised guidelines for the relevant groups of vaccines in the EAEU. It may also be of use to developers, manufacturers, and researchers involved in the creation and non-clinical study of vaccines.

**Key words:** vaccines; non-clinical studies; vaccine development; regulation

**For citation:** Gorenkov D.V., Komarovskaya E.I., Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Bondarev V.P. Current regulatory requirements for non-clinical evaluation of prophylactic vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):7–25. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-25>

### Введение

В настоящее время эффективность вакцин для профилактики инфекционных заболеваний не вызывает сомнения. Вакцины не только защищают людей от инфекционных заболеваний, но и способствуют улучшению здоровья и качества жизни населения как на национальном, так и на общемировом уровнях. Кроме того, с экономической точки зрения вакцины более выгодны в сравнении с лечебными препаратами и другими видами терапии. Многолетний опыт вакцинации продемонстрировал высокий уровень безопасности данной группы препаратов [1].

Начиная с XVIII века и вплоть до 80-х годов XX века вакцины получали на основе инактивированных микроорганизмов, живых аттенуированных микроорганизмов и инактивированных токсинов (анатоксинов). Данные вакцины в сво-

ем составе содержали антигены, которые стимулировали как врожденный, так и адаптивный иммунитет.

С появлением новых биотехнологических методов (с 1980-х годов) началась разработка вакцин следующего поколения. На этом этапе основной целью разработки вакцин было снижение реактогенности и повышение безопасности уже применяемых вакцин. Исследования в данном направлении позволили не только значительно повысить уровень очистки вакцин, но и создать вакцины на основе новых технологических платформ (конъюгированные вакцины, субъединичные вакцины, вакцины на основе рекомбинантных белков и синтетических пептидов). В процессе разработки подобных препаратов во многих случаях иммуностимулирующие фрагменты, присутствующие в живых ослаблен-

ных вакцинах, могут утрачиваться, что требует включения в их состав адъювантов для усиления иммунного ответа на антигены вакцин. В последние годы были разработаны вакцины нового поколения на основе мРНК, вирусных векторов, вирусоподобных частиц и др. [2].

Известно, что вакцины существенно отличаются от других групп лекарственных средств, в первую очередь препаратов, получаемых путем химического синтеза. Во-первых, вакцины относятся к группе биологических лекарственных препаратов, то есть для их производства используется биологический источник, а для характеристики применяются, в том числе биологические методы<sup>1</sup>. Во-вторых, большинство вакцин получают из живых организмов, поэтому очень сложно охарактеризовать их состав по физико-химическим характеристикам (исключение составляют вакцины на основе синтетических антигенов и вакцины последнего поколения). В-третьих, основной механизм действия всех вакцин основан на формировании специфической защиты от инфекционного агента путем взаимодействия с системой иммунитета. В-четвертых, при создании вакцин образуется много примесей, связанных с производством, которые могут влиять на эффективность и безопасность препарата, что требует особого контроля за производством и подходов к обеспечению качества препаратов (как и для всех биологических лекарственных препаратов). В-пятых, вакцины предназначены для введения широкому кругу здоровых лиц, в связи с чем особые требования предъявляются к оценке безопасности вакцин. Основная юридическая ответственность за показатели качества, безопасности и эффективности вакцин возлагается на производителя.

К вакцинам предъявляются особые нормативные требования для оценки их качества, эффективности и безопасности. Кроме того, в последние годы в связи с пандемиями гриппа (2009–2010 гг.) и COVID-19 (с 2019 г.) значительно повысилась активность в сфере разработки вакцин с использованием новых технологических платформ, адъювантов и вспомогательных веществ, что требует дополнения и обновления уже существующих регуляторных требований для регистрации вакцин [3].

При проведении исследований с целью регистрации вакцины и при внесении серьезных изменений в производственный процесс оценка безопасности и эффективности проводится на всех этапах разработки, включая этап доклинических исследований (ДИ). Учитывая особен-

ности и разнообразие видов вакцин, в одном документе невозможно представить рекомендации по всем вопросам доклинической оценки эффективности и безопасности разных вакцин, поэтому разрабатываются отдельные документы, касающиеся частных вопросов оценки вакцин. В настоящее время активно проводится разработка единых нормативных требований к оценке качества, эффективности и безопасности и регистрации лекарственных средств на территории государств – членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС), в том числе документов, гармонизированных с лучшими мировыми практиками.

Цель работы – критический анализ нормативных требований для доклинической оценки эффективности и безопасности вакцин, подготовленных зарубежными национальными и международными регуляторными органами.

### Доклиническая оценка вакцин

Из-за сложного механизма действия вакцин или отсутствия на момент разработки вакцины эпидемии исследования на животных обычно являются единственной возможностью охарактеризовать фармакологические и токсикологические свойства вакцин. Доклинические программы исследований для вакцин и адъювантов должны не только продемонстрировать, что вакцина является иммуногенной и обладает протективной эффективностью, но также обосновать безопасность препарата, связанную, в первую очередь, с технологическим процессом получения вакцин, учитывая использование в производстве вакцин куриных эмбрионов, клеточных линий, иммортализованных клеток и др., что предопределяет возможность присутствия в них производственных примесей, а также риски, обусловленные составом вакцин (адъюванты, стабилизаторы, вспомогательные вещества и новые устройства доставки препаратов).

Основной целью проведения ДИ вакцин является демонстрация эффективности и безопасности при введении вакцины человеку. Для демонстрации протективной эффективности вакцин обычно используются релевантные модели с заражением животных. Потенциальные риски безопасности вакцин могут быть связаны с системной и местной реактогенностью, пирогенностью, неблагоприятными иммунологическими эффектами, такими как стимуляция аутоиммунных реакций, сенсбилизация, феномен антителозависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE), и в некоторых случаях –

<sup>1</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

развитием отрицательных тератогенных/репродуктивных эффектов<sup>2</sup>.

ДИ вакцин, проведенные на животных, предоставляют клиницистам данные о потенциальной токсичности, об органах или системах органов, на которые может повлиять сама вакцина, примеси или контаминанты, компоненты состава или их взаимодействия, а также о токсичности, возникающей в результате ожидаемого иммунного ответа на вакцину. Данные о токсичности вакцин также используются для определения дозы, которую можно безопасно вводить человеку, и уровня дозы, при которой эффект не наблюдается, или дозы, при которой не было выявлено токсикологически значимых результатов. Ограничения ДИ заключаются в том, что возможны редкие токсические эффекты на уровне субпопуляций, которые можно оценить только при исследовании на человеке, так как модели на животных могут не всегда отражать наблюдаемые у людей эффекты.

Поскольку вакцины представляют собой очень разнообразный класс препаратов, очень сложно создать единую стратегию для проведения ДИ. Фундаментальные принципы ДИ безопасности любых фармацевтических препаратов изложены в руководстве ICH M3 (R2)<sup>3</sup>. Некоторые подходы, описанные в данном документе, применимы и к вакцинам, однако из-за уникальных особенностей вакцин существуют значительные различия, касающиеся необходимых исследований и их дизайна. При проведении ДИ безопасности вакцин в первую очередь необходимо учитывать, что вакцины изначально предназначены для воздействия на иммунную систему, и, следовательно, оценка воздействия вакцины на иммунные органы и/или функции должна быть обязательно включена в любые токсикологические исследования.

### Нормативные документы, регламентирующие общий порядок проведения доклинических исследований вакцин

Первый документ, регламентирующий проведение ДИ вакцин «Note for guidance on

preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines» был разработан Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) в 1998 г.<sup>4</sup> Документ содержал краткие общие рекомендации, касающиеся исследований: токсичности при однократном и многократном введении, иммуногенности, протективной эффективности и фармакологической безопасности. Данный документ был недостаточно подробен и в большей степени регламентировал тестирование в процессе сертификации выпускаемых серий.

Учитывая указанные недостатки документа, возникло достаточно много вопросов, связанных с оценкой эффективности и безопасности вакцин на доклиническом этапе разработки. После проведения консультаций с ведущими специалистами фарминдустрии было принято решение о начале разработки новой редакции руководства по проведению ДИ. Учитывая роль Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в работе по координации борьбы с эпидемиями в мире, разработка данного документа проводилась под эгидой ВОЗ. Руководство ВОЗ по доклинической оценке вакцин<sup>5</sup> было опубликовано в 2005 г. и явилось результатом сотрудничества экспертов из различных регуляторных органов, учреждений здравоохранения, научных организаций и производителей вакцин. Регуляторные органы стран Европейского союза (ЕС) приняли активное участие в этой работе, от Российской Федерации в разработке документа принимал участие Т.А. Бектимиров – заместитель директора Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича. Руководство ВОЗ по доклинической оценке вакцин является наиболее полным документом, касающимся общих основных вопросов проведения ДИ вакцин, и согласно мнению экспертов EMA «это руководство будет и впредь отражать глобальную и согласованную позицию, в том числе при необходимости пересмотра ориентиров»<sup>6</sup>.

<sup>2</sup> Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP/SWP/465/95). EMA; 1997. <https://www.ema.europa.eu/en/preclinical-pharmacological-toxicological-testing-vaccines-scientific-guideline>

<sup>3</sup> ICH guideline M3 (R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals—Scientific guideline, 2009. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals-scientific>

<sup>4</sup> Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP/SWP/465/95). EMA; 1997. <https://www.ema.europa.eu/en/preclinical-pharmacological-toxicological-testing-vaccines-scientific-guideline>

<sup>5</sup> WHO guidelines on non-clinical evaluation of vaccines, Annex 1, TRS No. 927. WHO; 2005. <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccines-annex-1-trs-no-927>

<sup>6</sup> Questions and answers on the withdrawal of the CPMP Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP/SWP/465) (EMA/CHMP/SWP/242917/2016) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/questions-answers-withdrawal-cmpm-note-guidance-preclinical-pharmacological-toxicological-testing/swp/465\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/questions-answers-withdrawal-cmpm-note-guidance-preclinical-pharmacological-toxicological-testing/swp/465_en.pdf)

В руководстве<sup>7</sup> изложены вопросы, касающиеся оценки иммуногенности, токсичности, характеристики адъювантов и состава препаратов, устройств для введения вакцин, альтернативных путей введения, моделей с использованием животных, аспектов ДИ живых и комбинированных вакцин и др. В руководстве ВОЗ представлены более жесткие требования, касающиеся исследований на животных. В частности, указано, что нет необходимости в специальных исследованиях фармакологической безопасности в случае исследования токсичности при введении повтор-

ных доз и оценке конечных точек безопасности. В руководстве также обосновывается оценка токсичности при однократном введении в процессе проведения исследований при многократном введении. Также, в отличие от руководства ЕМА, в руководство ВОЗ включены аспекты проведения ДИ вакцин на основе вирусного вектора и нуклеиновых кислот.

Основные документы по ДИ вакцин разработаны (и продолжают разрабатываться) экспертами ВОЗ при активном участии специалистов регуляторных органов разных стран (табл. 1).

**Таблица 1.** Нормативные документы, регламентирующие общий порядок проведения доклинических исследований эффективности и безопасности вакцин

**Table 1.** Regulatory documents addressing the general procedure of non-clinical studies of the safety and efficacy of vaccines

Наименование документа <i>Document title</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Регуляторный орган, страна/регион <i>Regulatory authority, country/region</i>	Источник <i>Reference</i>
Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines (CPMP/SWP/465/95)	1998	ЕМА, ЕС <i>EMA, EU</i>	Сноска <sup>8</sup> <i>Footnote<sup>8</sup></i>
The Drugs and Cosmetics Act, 1940; and The Drugs and Cosmetics Rules, 1945	2005	МНФВ, Индия <i>MHFW, India</i>	Сноска <sup>9</sup> <i>Footnote<sup>9</sup></i>
WHO guidelines on non-clinical evaluation of vaccines, Annex 1, TRS No. 927	2005	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>10</sup> <i>Footnote<sup>10</sup></i>
Guideline on adjuvants in vaccines for human use (EMA/CHMP/VEG/134716/2004)	2005	ЕМА, ЕС <i>EMA, EU</i>	Сноска <sup>11</sup> <i>Footnote<sup>11</sup></i>
Considerations for developmental toxicity studies for preventive and therapeutic vaccines for infectious disease indications. Guidance for industry	2006	FDA, США <i>FDA, USA</i>	Сноска <sup>12</sup> <i>Footnote<sup>12</sup></i>
Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. Guidance for industry	2007	FDA, США <i>FDA, USA</i>	Сноска <sup>13</sup> <i>Footnote<sup>13</sup></i>
Guidelines for assuring the quality and non-clinical safety evaluation of DNA vaccines, Annex 1, TRS No. 941	2007	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>14</sup> <i>Footnote<sup>14</sup></i>
Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009)	2010	ЕМА, ЕС <i>EMA, EU</i>	Сноска <sup>15</sup> <i>Footnote<sup>15</sup></i>
Guideline for non-clinical studies of vaccines for preventing infectious diseases (PFSB/ELD Notification No. 0527-1)	2010	МНЛВ, Япония <i>MHLW, Japan</i>	Сноска <sup>16</sup> <i>Footnote<sup>16</sup></i>

<sup>7</sup> WHO guidelines on non-clinical evaluation of vaccines, Annex 1, TRS No. 927. WHO; 2005. <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccines-annex-1-trs-no-927>

<sup>8</sup> <https://www.ema.europa.eu/en/preclinical-pharmacological-toxicological-testing-vaccines-scientific-guideline>

<sup>9</sup> Government of India, Ministry of Health and Family Welfare (Department of Health). The drugs and cosmetics act and rules. The drugs and cosmetics act, 1940. The drugs and cosmetics rules, 1945. (As amended up to 31 December, 2016). [https://cdsco.gov.in/opencms/export/sites/CDSCO\\_WEB/Pdf-documents/acts\\_rules/2016DrugsandCosmeticsAct1940Rules1945.pdf](https://cdsco.gov.in/opencms/export/sites/CDSCO_WEB/Pdf-documents/acts_rules/2016DrugsandCosmeticsAct1940Rules1945.pdf)

<sup>10</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccines-annex-1-trs-no-927>

<sup>11</sup> <https://www.ema.europa.eu/en/adjuvants-vaccines-human-use-scientific-guideline>

<sup>12</sup> <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-developmental-toxicity-studies-preventive-and-therapeutic-vaccines-infectious-disease>

<sup>13</sup> <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-plasmid-dna-vaccines-infectious-disease-indications>

<sup>14</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/annex-1-trs941-dna-vax>

<sup>15</sup> <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines-scientific-guideline>

<sup>16</sup> Guidelines for non-clinical studies of vaccines for preventing of infectious diseases (PFSB/ELD Notification No. 0527-1) (in Japanese). Ministry of Health, Labour and Welfare; 2010.

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Наименование документа <i>Document title</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Регуляторный орган, страна/регион <i>Regulatory authority, country/region</i>	Источник <i>Reference</i>
Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты) <i>Guidelines for non-clinical studies of medicines (Immunobiological medicinal products)</i>	2012	ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Россия <i>Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health, Russia</i>	Сноска <sup>17</sup> <i>Footnote<sup>17</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of DT-based combined vaccines, Annex 6, TRS No. 980	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>18</sup> <i>Footnote<sup>18</sup></i>
Guidelines on the non-clinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, Annex 2, TRS No. 987	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>19</sup> <i>Footnote<sup>19</sup></i>
Адьюванты вакцин для лечения и профилактики заболеваний человека (глава 16). Решение Совета ЕЭК № 89 <i>Adjuvants for vaccines to treat and prevent human diseases (Module 16). Decision No. 89 of the EEC</i>	2016	Совет ЕЭК, ЕАЭС <i>Council of the EEC, EAEU</i>	Сноска <sup>20</sup> <i>Footnote<sup>20</sup></i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of plasmid DNA vaccines, Annex 2, TRS No. 1028	2021	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>21</sup> <i>Footnote<sup>21</sup></i>

*Примечание.* ЕМА – Европейское агентство по лекарственным средствам; ЕС – Европейский союз; МНФВ – Министерство здравоохранения и благосостояния семьи; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; FDA – Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств; МНЛВ – Министерство здравоохранения, труда и благосостояния; ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия; ЕАЭС – Евразийский экономический союз.

*Note.* EMA, European Medicines Agency; EU, European Union; МНФВ, Ministry of Health and Family Welfare; WHO, World Health Organisation; FDA, Food and Drug Administration; МНЛВ, Ministry of Health, Labour and Welfare; EEC, Eurasian Economic Commission; EAEU, Eurasian Economic Union.

Создание новых препаратов стимулировало подготовку рекомендаций по актуальным проблемам разработки и регистрации вакцин. Были подготовлены руководства по исследованию комбинированных вакцин, ДНК-вакцин, вакцин для введения беременным и др., в которые были включены разделы, касающиеся ДИ (табл. 1). Оценка токсичности (безопасности) всех препаратов, вводимых беременным, регламентируется документом ICH S5(R3)<sup>22</sup>. Однако стратегии доклинических исследований, изложенные в данном документе, могут быть неприменимы непосредственно к вакцинам, и дизайн исследований может потребовать адаптации с учетом особенностей вакцин.

Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food

and Drug Administration, FDA) было подготовлено руководство по оценке влияния вакцин на беременность, развитие плода и младенцев в период грудного вскармливания<sup>23</sup>. В документе рассматриваются риски безопасности, связанные с влиянием вакцин на развитие иммунного ответа, при введении аттенуированных, инактивированных, рекомбинантных, полинуклеотидных, полисахаридных, белковых, векторных и конъюгированных вакцин. Рекомендовано предоставлять обоснование выбора модели животного для проведения исследования онтогенетической токсичности, которое должно включать демонстрацию того, что у выбранного вида животного вырабатывается иммунный ответ на вакцинный антиген; при этом допустимы отдельные межвидовые количественные и качественные отличия

<sup>17</sup> Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

<sup>18</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/annex-6-trs980-combined-vax>

<sup>19</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccine-adjuvants-and-adjuvanted-vaccines-annex-2-trs-no-987>

<sup>20</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

<sup>21</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/plasmid-dna-vaccines-annex-2-trs-no-1028>

<sup>22</sup> ICH guideline. Detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals S5(R3), 2020. <https://ich.org/page/safety-guidelines>

<sup>23</sup> Considerations for developmental toxicity studies for preventive and therapeutic vaccines for infectious disease indications. Guidance for industry. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-developmental-toxicity-studies-preventive-and-therapeutic-vaccines-infectious-disease>

в иммунном ответе<sup>24</sup>. Наиболее часто используемыми видами в исследованиях онтогенетической токсичности являются крысы, кролики и мыши. При этом в некоторых случаях адекватный иммунный ответ может быть показан только на приматах. В дополнение к демонстрации иммунного ответа при вакцинации беременных самок рекомендуется провести оценку влияния на плод материнских антител против антигена вакцины. Поскольку существуют различия между приматами, негрызунами и видами животных-грызунов с точки зрения времени передачи материнских антител потомству, рекомендуется оценка пре- и постнатального воздействия материнских антител на потомство в качестве критерия для выбора наиболее подходящей экспериментальной модели. Кроме того, у выбранного вида животных должны быть охарактеризованы изменения во внутриутробном и постнатальном развитии.

В руководстве ВОЗ по доклинической оценке вакцинных адъювантов и адъювантных вакцин, а также в документе «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» изложены подходы к исследованию новых адъювантов, которые включают сравнительные исследования готовой формы вакцинного препарата, вакцины без адъюванта и самого адъюванта<sup>25</sup>.

В период разработки первых ДНК-вакцин были подготовлены руководства, посвященные вопросам оценки качества, безопасности и эффективности ДНК-вакцин. ДНК-вакцины представляют собой очищенные плазмидные препараты, способные индуцировать и/или стимулировать иммунный ответ против патогена. ВОЗ и FDA были подготовлены руководства, касающиеся ДИ ДНК-вакцин<sup>26</sup>.

Развитие пандемии COVID-19 резко стимулировало рост исследований по разработке вакцин, поэтому с учетом накопленного опыта ВОЗ подготовило новую редакцию руководства по ДНК-вакцинам в 2021 г<sup>27</sup>. С учетом развития пандемии COVID-19 в документе большое внимание уделено возможности ускоренного проведения ДИ. В последней редакции руководства ВОЗ указано, что ДИ ДНК-вакцин проводятся на основании руководства ВОЗ по доклинической оценке вакцин и руководства ВОЗ по доклинической оценке вакцинных адъювантов и адъювантных вакцин<sup>28</sup>. В случаях ДНК-вакцин, кодирующих кроме антигена цитокин или другой иммуномодулирующий белок, при выборе модели на животных может потребоваться учет видовой специфичности и проведение исследования для демонстрации протективной эффективности с использованием видовых аналогов разрабатываемого продукта для человека. Токсикологические исследования, в том числе оценка иммуно-токсичности, могут быть выполнены с продуктом и/или аналогом, специфичным для человека.

Другой потенциальной проблемой при доклинической оценке ДНК-вакцин может быть их использование в гетерологичных схемах первичной бустерной вакцинации. В случаях, если отсутствуют доклинические или клинические данные об отдельных вакцинах, используемых в схеме (или, по крайней мере, о компоненте схемы с ДНК-вакциной), программа ДИ должна быть разработана на основании рекомендаций ВОЗ<sup>29</sup> и в соответствии с GLP<sup>30</sup>. Однако при наличии значительного клинического опыта применения схем с вакцинами, экспрессирующими одни и те же или родственные иммуногены, программа ДИ может быть сокращена [4]. Например, в случае, если в состав вакцины входят другие белки обо-

<sup>24</sup> Там же.

<sup>25</sup> Guidelines on the non-clinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, Annex 2, TRS No. 987. WHO; 2014. <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccine-adjuvants-and-adjuvanted-vaccines-annex-2-trs-no-987>

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

<sup>26</sup> Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. Guidance for industry. FDA; 2007. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-plasmid-dna-vaccines-infectious-disease-indications>

Guidelines for assuring the quality and non-clinical safety evaluation of DNA vaccines, Annex 1, TRS No. 941. WHO; 2007. <https://www.who.int/publications/m/item/annex-1-trs941-dna-vax>

<sup>27</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of plasmid DNA vaccines, Annex 2, TRS No. 1028. WHO; 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/plasmid-dna-vaccines-annex-2-trs-no-1028>

<sup>28</sup> WHO guidelines on non-clinical evaluation of vaccines, Annex 1, TRS No. 927. WHO; 2005. <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccines-annex-1-trs-no-927>

Guidelines on the non-clinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines, Annex 2, TRS No. 987. WHO; 2014. <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccine-adjuvants-and-adjuvanted-vaccines-annex-2-trs-no-987>

<sup>29</sup> Там же.

<sup>30</sup> Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies (21 CFR Parts 16 and 58). FDA, 2016. <https://www.federalregister.gov/documents/2016/08/24/2016-19875/good-laboratory-practice-for-nonclinical-laboratory-studies>

лочки вируса или другие гемагглютинины вируса гриппа, или в случае, если в аминокислотную последовательность ранее используемой вакцины вносятся лишь ограниченные модификации. Аналогично для новых ДНК-вакцин на основе уже существующих плазмидных конструкций, для которых уже имеется значительный доклинический (и, возможно, клинический) опыт, следует рассмотреть сокращенную программу ДИ [5, 6]. Если новая ДНК-вакцина содержит вставку гена, кодирующего антиген, который уже был ранее изучен в доклинических (и, возможно, клинических) программах, безопасная начальная доза и режим введения для новой вакцины могут быть установлены на основе существующих доклинических и клинических данных без необходимости дополнительных токсикологических исследований. В случаях, если уже проведены клинические исследования вакцины на основе плазмидной конструкции, кодирующей родственный антиген (например, если в случае пандемического штамма гриппа тестировался антиген сезонного или другого потенциально пандемического штамма), доклиническая программа может ограничиваться исследованием иммуногенности. Однако в таком исследовании должно быть собрано как можно больше данных о безопасности. В случае если животных умерщвляют в конце исследования иммуногенности, следует провести макроскопическую и гистологическую оценку патологических изменений<sup>31</sup>.

Особенности ДИ комбинированных вакцин представлены в рекомендациях ВОЗ по ДИ комбинированных вакцин на основе дифтерийного и столбнячного антигенов<sup>32</sup>. Токсикологические исследования готовой формы вакцины рекомен-

дуется проводить с учетом рекомендаций руководства ВОЗ по доклинической оценке вакцин (2005 г.). В руководстве указано, что в первую очередь необходимо оценить интенсивность иммунного ответа на каждый антиген, а также возможность потенциальной интерференции и/или несовместимости между антигенами. Для этого необходимо провести сравнительные исследования с отдельными компонентами (моноантигенами) вакцины. При исследовании иммуногенности готовой формы вакцины рекомендуется проводить сравнительную оценку с теми же антигенами (моноантигенами), которые используются в зарегистрированных вакцинах. В некоторых случаях в качестве вакцины сравнения может быть использована зарегистрированная комбинированная вакцина, содержащая меньшее количество антигенов, чем исследуемая вакцина (например, АКДС может использоваться в качестве препарата сравнения для комбинированной вакцины АКДС-геРВ)<sup>33</sup>.

### Рекомендации для доклинических исследований конкретных видов вакцин

Руководство ВОЗ по доклинической оценке вакцин касается общих аспектов ДИ, в то же время исследования конкретных вакцин имеют свои особенности. В связи с этим было разработано около 30 руководств, в которых представлены рекомендации по оценке качества, доклиническим и клиническим исследованиям конкретных вакцин (табл. 2). Кроме того, регуляторными органами в ответ на развитие пандемии (например, пандемия гриппа 2009–2010 гг.) были подготовлены документы, регламентирующие доклинические исследования некоторых типов вакцин (табл. 2).

**Таблица 2.** Нормативные документы, регламентирующие проведение доклинических исследований эффективности и безопасности отдельных вакцин

**Table 2.** Regulatory documents addressing non-clinical studies of the efficacy and safety of specific vaccines

Наименование документа <i>Document title</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Регуляторный орган <i>Regulatory authority</i>	Источник <i>Reference</i>
Note for guidance on the development of vaccinia virus-based vaccines against smallpox (CPMP/1100/02)	2002	EMA	Сноска <sup>34</sup> Footnote <sup>34</sup>
Recommendations for whole-cell pertussis vaccine, Annex 6, TRS No. 941	2007	ВОЗ WHO	Сноска <sup>35</sup> Footnote <sup>35</sup>
Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral), Annex 3, TRS No. 941	2007	ВОЗ WHO	Сноска <sup>36</sup> Footnote <sup>36</sup>

<sup>31</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of plasmid DNA vaccines, Annex 2, TRS No. 1028. <https://www.who.int/publications/m/item/plasmid-dna-vaccines-annex-2-trs-no-1028>

<sup>32</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of DT-based combined vaccines, Annex 6, TRS No. 980. WHO; 2014. <https://www.who.int/publications/m/item/annex-6-trs980-combined-vax>

<sup>33</sup> Там же.

<sup>34</sup> <https://www.ema.europa.eu/en/development-vaccinia-virus-based-vaccines-against-smallpox-scientific-guideline>

<sup>35</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/whole-cell-pertussis-vaccine-annex-6-trs-no-941>

<sup>36</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/oral-live-attenuated-rotavirus-vaccines-annex-3-trs-no-941>

Продолжение таблицы 2  
Table 2 (continued)

Наименование документа <i>Document title</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Регуляторный орган <i>Regulatory authority</i>	Источник <i>Reference</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines, Annex 2, TRS No. 962	2011	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>37</sup> <i>Footnote<sup>37</sup></i>
Recommendations for Japanese encephalitis vaccine (inactivated) for human use, Annex 1, TRS No. 963	2011	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>38</sup> <i>Footnote<sup>38</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines, Annex 3, TRS No. 979	2013	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>39</sup> <i>Footnote<sup>39</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines, Annex 4, TRS No. 978	2013	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>40</sup> <i>Footnote<sup>40</sup></i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated), Annex 2, TRS No. 979	2013	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>41</sup> <i>Footnote<sup>41</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of influenza vaccines (human, live attenuated) for intranasal administration, Annex 4, TRS No. 977	2013	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>42</sup> <i>Footnote<sup>42</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines, Annex 5, TRS No. 978	2013	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>43</sup> <i>Footnote<sup>43</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of diphtheria vaccines (adsorbed), Annex 4, TRS No. 980	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>44</sup> <i>Footnote<sup>44</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of Japanese encephalitis vaccines (live, attenuated) for human use, Annex 7, TRS No. 980	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>45</sup> <i>Footnote<sup>45</sup></i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of recombinant malaria vaccines targeting the pre-erythrocytic and blood stages of <i>Plasmodium falciparum</i> , Annex 3, TRS No. 980	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>46</sup> <i>Footnote<sup>46</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines, Annex 4, TRS No. 979	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>47</sup> <i>Footnote<sup>47</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (oral, live, attenuated), Annex 2, TRS No. 980	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>48</sup> <i>Footnote<sup>48</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of tetanus vaccines (adsorbed), Annex 5, TRS No. 980	2014	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>49</sup> <i>Footnote<sup>49</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No. 993	2015	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>50</sup> <i>Footnote<sup>50</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant human papillomavirus virus-like particle vaccines, Annex 4, TRS No. 999	2016	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>51</sup> <i>Footnote<sup>51</sup></i>
Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (EMA/CHMP/VWP/457259/2014)	2016	EMA	Сноска <sup>52</sup> <i>Footnote<sup>52</sup></i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of Ebola vaccines, Annex 2, TRS No. 1011	2018	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>53</sup> <i>Footnote<sup>53</sup></i>

<sup>37</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/group-a-meningococcal-conjugate-vaccines-annex-2-trs-no-962>

<sup>38</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/japanese-encephalitis-vaccine-inactivated-annex-1-trs-no-963>

<sup>39</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/trs-979-annex-3-bcg-vax>

<sup>40</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hep-b-A4-trs-978>

<sup>41</sup> [https://www.who.int/publications/m/item/TRS\\_979\\_annex-2-dengue](https://www.who.int/publications/m/item/TRS_979_annex-2-dengue)

<sup>42</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/influenza-attenuated-intranasal-administration-annex-4-trs-no-977>

<sup>43</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/yellow-fever-vaccines-live-attenuated-annex-5-trs-no-978>

<sup>44</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/annex4-trs-980-diphtheria>

<sup>45</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/japanese-encephalitis-vaccines-live-attenuated-annex-7-trs-no-980>

<sup>46</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-malaria-vaccine-annex-3-trs-980>

<sup>47</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/acellular-pertussis-vaccines-annex-4-trs-no-979>

<sup>48</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/oral-live-attenuated-poliomyelitis-vaccine-annex-2-trs-no-980>

<sup>49</sup> [https://www.who.int/publications/m/item/tetanus-vaccines-\(adsorbed\)-annex-5-trs-no-980](https://www.who.int/publications/m/item/tetanus-vaccines-(adsorbed)-annex-5-trs-no-980)

<sup>50</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/poliomyelitis-vaccines-inactivated-annex-3-trs-no-993>

<sup>51</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hpv-like-particle-vaccines-annex-4-trs-no-999>

<sup>52</sup> <https://www.ema.europa.eu/en/influenza-vaccines-non-clinical-clinical-module-scientific-guideline>

<sup>53</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs1011-ebola>

Продолжение таблицы 2  
Table 2 (continued)

Наименование документа <i>Document title</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Регуляторный орган <i>Regulatory authority</i>	Источник <i>Reference</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis E vaccines, Annex 2, TRS No. 1016	2019	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>54</sup> <i>Footnote<sup>54</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No. 1024	2020	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>55</sup> <i>Footnote<sup>55</sup></i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of respiratory syncytial virus vaccines, Annex 2, TRS No. 1024	2020	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>56</sup> <i>Footnote<sup>56</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of typhoid conjugate vaccines, Annex 2, TRS No. 1030	2020	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>57</sup> <i>Footnote<sup>57</sup></i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No. 1030	2021	ВОЗ <i>WHO</i>	Сноска <sup>58</sup> <i>Footnote<sup>58</sup></i>
Указания по проведению доклинических и клинических исследований вакцин для профилактики гриппа (проект) <i>Guidance on non-clinical and clinical studies of vaccines to prevent influenza (draft)</i>	2022	Совет ЕЭК, ЕАЭС <i>Council of the EEC, EAEU</i>	Сноска <sup>59</sup> <i>Footnote<sup>59</sup></i>

*Примечание.* ЕМА – Европейское агентство по лекарственным средствам; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия; ЕАЭС – Евразийский экономический союз.

*Note.* EMA, European Medicines Agency; WHO, World Health Organisation; EEC, Eurasian Economic Commission; EAEU, Eurasian Economic Union.

Первое руководство, регламентирующее проведение оценки качества, эффективности и безопасности вакцины для профилактики оспы, было подготовлено в 2002 г. ЕМА в связи с прогнозируемой в тот период потенциальной вспышкой инфекции<sup>60</sup>. В руководстве указано, что фармакологические и токсикологические свойства вакцины-кандидата необходимо оценить относительно препарата сравнения, представляющего собой оригинальный вакцинный штамм, на основе которого была получена вакцина. Отмечается, что вирус осповакцины способен вызывать иммунный ответ у нескольких видов животных: мышей, кроликов, обезьян.

Исследования токсичности требуется проводить на всех основных этапах производства вакцины и с готовой формой препарата. При этом оценка протективной эффективности проводится только с готовой формой вакцины<sup>61</sup>. Первичной конечной точкой должна быть протективная эффективность вакцины-кандидата в сравнении с оригинальной вакциной при экспериментальном инфицировании патогенным

ортопоксвирусом. Кросс-протективность должна быть показана к двум различным патогенным ортопоксвирусам на двух различных видах млекопитающих. При использовании в качестве модели мышей линии BALB/c первичной конечной точкой будет являться протективность в отношении летальной респираторной инфицирующей дозы ортопоксвируса, например вируса коровьей оспы. При этом вирус-индуцированные симптомы (например, снижение веса тела) будут являться вторичными конечными точками. При использовании обезьян первичной конечной точкой также является протективность в отношении летальной дозы вируса<sup>62</sup>.

Местная репликация вируса может быть исследована на модели мышей при внутрикожном введении вируса в ушную раковину, а также при оценке дозозависимой выживаемости после аэрозольного применения. Способность вакцинного вируса реплицироваться в головном мозге должна быть исследована путем непосредственного введения в мозг, например на неполовозрелых мышах. Репродуктивная токсич-

<sup>54</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hepatitis-e-vaccines-annex-2-trs-1016>

<sup>55</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/poliomyelitis-vaccines-annex-3-trs-no-1024>

<sup>56</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/respiratory-syncytial-virus-vaccines-annex-2-trs-no-1024>

<sup>57</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/tcv71-recommendations>

<sup>58</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/ev71-recommendations>

<sup>59</sup> <https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/fdf/Vnesenie-izmeneniy-v-Pravila-provedeniya-issledovaniy-biologicheskikh-lekarstvennykh-sredstv.pdf?ysclid=lesj2d845j550108747>

<sup>60</sup> Note for guidance on the development of vaccinia virus-based vaccines against smallpox (CPMP/1100/02). EMA; 2002. <https://www.ema.europa.eu/en/development-vaccinia-virus-based-vaccines-against-smallpox-scientific-guideline>

<sup>61</sup> Там же.

<sup>62</sup> Там же.

ность может быть исследована на моделях мышей или кроликов при внутрикожном введении вакцины-кандидата и вакцины-сравнения<sup>63</sup>.

В руководстве ВОЗ по инактивированным вакцинам против японского энцефалита регламентируется проведение ДИ иммуногенности<sup>64</sup>. При оценке уровня нейтрализующих антител рекомендовано включение, по крайней мере, одной зарегистрированной вакцины в качестве препарата сравнения. При оценке протективной эффективности вакцины необходимо продемонстрировать защиту иммунизированных животных при заражении штаммом гомологичного вируса (рекомендовано использование вируса генотипа 3). Кроме того, протективная эффективность вакцины может быть оценена при введении иммунных сывороток от вакцинированных животных или человека невакцинированным животным с последующим их заражением. Результаты данных исследований позволяют определить титры нейтрализующих антител, коррелирующих с протективным эффектом вакцины<sup>65</sup>.

В руководстве ВОЗ по оценке качества, безопасности, эффективности вакцины БЦЖ<sup>66</sup> представлены рекомендации по ДИ иммуногенности и безопасности на животных; подробно прописаны методики проведения данных исследований.

В разделе по доклинической оценке новых вакцин против гепатита В руководства ВОЗ<sup>67</sup> регламентируется проведение исследований иммуногенности новых рекомбинантных вакцин на основе HBsAg и ранее зарегистрированных (при внесении изменений в производства). Оценку иммуногенности рекомендуется проводить с использованием кроликов, морских свинок, мышей и, возможно, приматов. При проведении иммунизации величины титров анти-HBsAg антител следует сравнивать между исследуемой вакциной и по крайней мере одним зарегистрированным препаратом сравнения. Если предполагается, что новая вакцина-кандидат будет содержать адъювант, его включение в вакцину необходимо обосновать адекватными данными об иммуногенности, в том числе и результатами оценки клеточного иммунного ответа. Исследования должны

быть сравнительными и включать адъювантную вакцину-кандидат с одним HBsAg и/или вакцину с HBsAg в сочетании с хорошо зарекомендовавшим себя адъювантом (например, на основе соединений алюминия). При включении в состав вакцины нового адъюванта должны быть проведены его доклинические токсикологические исследования. Если для производства вакцины против гепатита В используется новый клеточный субстрат, то необходимо изучить соответствующие аспекты безопасности, такие как потенциальный иммунный ответ на остаточные белки клетки-хозяина. Изменения в способе введения или составе вакцины против гепатита В требуют оценки иммуногенности и проведения адекватных исследований безопасности на животных<sup>68</sup>.

Раздел руководства ВОЗ по ДИ вакцины для профилактики лихорадки денге<sup>69</sup> содержит рекомендации по оценке живой ослабленной тетравалентной вакцины. В документе регламентируется проведение исследований по оценке стабильности показателей специфической активности (квалификация штамма) уже на этапе производственного процесса. При этом необходимо продемонстрировать (используя доступные подходы *in vivo* и *in vitro*) генетическую стабильность ослабленного вакцинного вируса, чтобы снизить потенциальный риск возврата к вирулентной форме на этапе производства вакцины, либо на следующих этапах. Для оценки иммуногенности и протективной эффективности (с заражением диким штаммом) рекомендуется использовать нечеловекообразных приматов. При этом необходимо оценить иммунный ответ или протективную активность каждого из четырех серотипов в тетравалентной вакцине. При изучении безопасности вакцины следует контролировать возможное развитие побочных реакций, связанных с дозой вакцины, а также с репликацией вакцинного вируса и тканевого тропизма. Кроме того, живые вакцины против лихорадки денге должны быть проверены на нейровирулентность. Рекомендуемой моделью для оценки нейровирулентности вакцины являются нечеловекообразные приматы; также может быть рассмотрена модель грызунов (в соответствии с рекомендациям

<sup>63</sup> Там же.

<sup>64</sup> Recommendations for Japanese encephalitis vaccine (inactivated) for human use, Annex 1, TRS No. 963. <https://www.who.int/publications/m/item/japanese-encephalitis-vaccine-inactivated-annex-1-trs-no-963>

<sup>65</sup> Там же.

<sup>66</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines, Annex 3, TRS No. 979. <https://www.who.int/publications/m/item/trs-979-annex-3-bcg-vax>

<sup>67</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant Hepatitis B vaccines, Annex 4, TRS No. 978. <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hep-b-A4-trs-978>

<sup>68</sup> Там же.

<sup>69</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetraivalent vaccines (live, attenuated), Annex 2, TRS No. 979. [https://www.who.int/publications/m/item/TRS\\_979\\_annex-2-dengue](https://www.who.int/publications/m/item/TRS_979_annex-2-dengue)

ВОЗ по тестированию нейровирулентности вакцин против желтой лихорадки<sup>70</sup>) [7].

После начала разработки первых назальных вакцин ВОЗ было подготовлено руководство для оценки качества, эффективности и безопасности интраназальных живых аттенуированных вакцин против гриппа. Устройство введения может влиять на доставку вакцины к соответствующим отделам ЛОР-органов, ее безопасность и эффективность, поэтому доклинические исследования таких вакцин должны включать тщательную оценку пригодности устройства для интраназальной доставки и подтверждения безопасности и эффективности вакцины.

ДИ гриппозной вакцины в соответствии с рекомендациями руководства ВОЗ по оценке качества, эффективности и безопасности интраназальных живых аттенуированных вакцин против гриппа<sup>71</sup> включает характеристику типа иммунного ответа: частоту и продолжительность иммунных реакций, особенности праймирования и бустирования, защитную эффективность, определяемые в исследованиях на животных. Необходимо провести исследования по выявлению маркеров аттенуации, которые можно использовать для контроля результатов на этапах клинической оценки. Первичные исследования по оценке аттенуации могут быть проведены на ряде чувствительных к вирусу гриппа видов, таких как хорьки, мыши и нечеловекообразные приматы, чтобы установить взаимосвязь конкретных генетических признаков с фенотипом аттенуации. Для оценки иммуногенности вакцины необходимо провести определение уровня антител против гемагглютининов. Протективную эффективность оценивают непосредственно после иммунизации животных путем инфекционного заражения диким штаммом или лабораторными штаммами вирусов гриппа<sup>72</sup>.

Согласно требованиям руководства ВОЗ по оценке вакцин для профилактики желтой лихорадки новый вакцинный кандидат штамма 17D должен быть охарактеризован по параме-

трам иммуногенности и безопасности в сравнении, по крайней мере, с одним штаммом, используемым в настоящее время для производства зарегистрированной вакцины<sup>73</sup>. ДИ должны показать, что новая вакцина-кандидат индуцирует нейтрализующие антитела к вирусу желтой лихорадки у мышей и нечеловекообразных приматов. Особенностью ДИ токсичности данной вакцины является обязательная оценка нейротропизма и висцеротропизма на модели обезьян с использованием вакцины на основе штамма 17D в качестве препарата сравнения<sup>74</sup>.

В Руководстве ВОЗ по оценке дифтерийных вакцин<sup>75</sup> представлены рекомендации, относящиеся к вакцинам на основе химически детоксигированного дифтерийного токсина, адсорбированного на адьюванте на основе соединений алюминия. При проведении исследований необходимо продемонстрировать обеспечение полной и необратимой детоксикации дифтерийного токсина, оценить специфическую токсичность и вероятность реверсии токсичности. Потенциальные токсические эффекты вакцины должны быть оценены как минимум на одном виде животных с гистологической оценкой патологических изменений органов и тканей. Исследование иммуногенности должно включать оценку уровня нейтрализующих токсин антител в образцах сыворотки вакцинированных животных. Оценка иммуногенной активности вакцины на модели морских свинок или мышей должна проводиться путем сравнения с эталонной вакциной<sup>76</sup>.

Раздел руководства ВОЗ по ДИ живых аттенуированных вакцин против японского энцефалита содержит рекомендации по оценке иммуногенности вакцин на мышах и нечеловекообразных приматах<sup>77</sup>. Эффективность вакцин оценивается по способности стимулировать формирование вирус-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток и секрецию провоспалительных цитокинов, повышать уровень интерлейкинов 4 и 5, что предопределяет повышение выживаемости иммунизированных животных при их последующем

<sup>70</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines, Annex 5, TRS No. 978. <https://www.who.int/publications/m/item/yellow-fever-vaccines-live-attenuated-annex-5-trs-no-978>

<sup>71</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of influenza vaccines (human, live attenuated) for intranasal administration, Annex 4, TRS No. 977. <https://www.who.int/publications/m/item/influenza-attenuated-intranasal-administration-annex-4-trs-no-977>

<sup>72</sup> Там же.

<sup>73</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines, Annex 5, TRS No. 978. <https://www.who.int/publications/m/item/yellow-fever-vaccines-live-attenuated-annex-5-trs-no-978>

<sup>74</sup> Там же.

<sup>75</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of diphtheria vaccines (adsorbed), Annex 4, TRS No. 980. <https://www.who.int/publications/m/item/annex4-trs-980-diphtheria>

<sup>76</sup> Там же.

<sup>77</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of Japanese encephalitis vaccines (live, attenuated) for human use, Annex 7, TRS No. 980. <https://www.who.int/publications/m/item/japanese-encephalitis-vaccines-live-attenuated-annex-7-trs-no-980>

заражении вирусом. Протективная эффективность вакцины определяется в реакции нейтрализации против штамма вируса SA14-14-2 или химерного вируса японского энцефалита. При ДИ безопасности живых аттенуированных вакцин необходимо оценить репликацию вакцинного вируса у животного, восприимчивого к заражению вирусом, так как с этим связан уровень токсических эффектов. В экспериментах на мышах оценивается значение титра вируса в крови, головном мозге и других тканях в разные сроки после заражения, и в случае отсутствия репликации вируса у мышей следует рассмотреть возможность тестирования на обезьянах. Для характеристики штамма-кандидата вакцины рекомендуется изучение нейровирулентности на мышах и нечеловекообразных приматах и оценка возможности реверсии нейровирулентных свойств у восприимчивых мышей<sup>78</sup>.

В руководстве ВОЗ по противомаларийным вакцинам<sup>79</sup> в разделе по ДИ указано на целесообразность проведения исследования иммуногенности на животных моделях для оптимизации состава адъюванта и оценки иммунологических характеристик антигенов вакцины, включая способность индуцировать функциональные антитела. Использование грызунов в качестве животной модели ограничено, так как они не являются естественными хозяевами для паразитов человека и их иммунный ответ на малярийные антигены может быть нерелевантным течению инфекции у человека. Тем не менее отсутствие протективности в таких моделях указывает на то, что исследуемую вакцину-кандидат не следует допускать до клинических исследований. Восприимчивость приматов к малярии человека, хотя и в модифицированных формах, является главным преимуществом перед другими животными моделями. Возможные модели приматов подробно охарактеризованы в руководстве ВОЗ для оценки качества, безопасности и эффективности противомаларийных вакцин<sup>80</sup>.

В руководстве ВОЗ по оценке бесклеточных коклюшных вакцин<sup>81</sup> подробно описаны известные антигены вакцин и представлены модели и методы для их характеристики. Для вакцин, содержащих химически или генетически

инактивированный токсин коклюша, требуется тщательная оценка остаточной активности токсина коклюша и, при необходимости, возможной реверсии токсичности во время хранения. Учитывая, что в настоящее время не существует бесклеточных коклюшных моновакцин, следует проводить исследование протективной эффективности с использованием конечной лекарственной формы (лекарственной формы, включающей дифтерийный и столбнячный анатоксины и другие компоненты). В случае разработки нового состава вакцин необходимо проводить доклиническую оценку способности бесклеточной коклюшной вакцины защищать от заражения *B. pertussis* на модели мышей. Согласно руководству ВОЗ<sup>82</sup> доклинические испытания могут не потребоваться в случае, если в вакцине присутствуют такие же коклюшные антигены (того же производителя и при использовании той же технологии), как и в вакцинах, которые уже зарегистрированы на основании оценки их безопасности и эффективности.

При проведении ДИ противостолбнячных вакцин согласно рекомендациям руководства ВОЗ<sup>83</sup> требуется проведение исследований для подтверждения отсутствия специфической токсичности и реверсии токсичности. Потенциальные токсические эффекты очищенного инактивированного анатоксина должны быть изучены, по крайней мере, на одном виде животных, включая проведение патогистологического исследования основных органов, оценку местных воспалительных реакций и системной токсичности на иммунную систему. Используемые виды животных должны быть чувствительны к биологическим эффектам вакцины и токсина. Исследования иммуногенности и/или эффективности вакцины могут проводиться с использованием более одной модели животных. Оценка эффективности вакцины должна проводиться с учетом нескольких разведений (по крайней мере, трех разведений каждой тестируемой вакцины и подходящего эталонного препарата) на модели морских свинок или мышей с последующим контрольным заражением столбнячным токсином или путем титрования образцов иммунной сыворотки

<sup>78</sup> Там же.

<sup>79</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of recombinant malaria vaccines targeting the pre-erythrocytic and blood stages of *Plasmodium falciparum*, Annex 3, TRS No. 980. <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-malaria-vaccine-annex-3-trs-980>

<sup>80</sup> Там же.

<sup>81</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines, Annex 4, TRS No. 979. <https://www.who.int/publications/m/item/acellular-pertussis-vaccines-annex-4-trs-no-979>

<sup>82</sup> Там же.

<sup>83</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of tetanus vaccines (adsorbed), Annex 5, TRS No. 980. <https://www.who.int/publications/m/item/oral-live-attenuated-poliomyelitis-vaccine-annex-2-trs-no-980>

для определения функционально активных (токсин-нейтрализующих) антител<sup>84</sup>.

В руководстве ВОЗ по инактивированным полиомиелитным вакцинам<sup>85</sup> регламентируется проведение исследования иммуногенности на подходящих животных моделях (например, на крысах), включающего кандидатную и зарегистрированную вакцину, с оценкой по уровню титров типоспецифических сывороточных нейтрализующих антител как против штаммов Сэбина, так и штаммов вируса дикого типа. На основании результатов этих исследований возможен выбор количественного содержания D-антигена в вакцине для проведения последующих исследований по определению дозы на людях. Однако важно отметить, что данные об иммуногенности на животных не позволяют надежно определить содержание антигена, которое бы соответствовало однократной дозе для человека. Исследование с использованием трансгенных мышей может быть выполнено для сравнения индуцированного иммунного ответа и степени защиты при иммунизации вакциной-кандидатом и зарегистрированной вакциной от последующего заражения вирулентной дозой вируса<sup>86</sup>.

Руководство ВОЗ по оценке качества, безопасности и эффективности рекомбинантных вакцин против вируса папилломы человека (ВПЧ) содержит рекомендации по новой вакцине на основе вирусоподобных частиц (virus-like particle, VLP) – вакцине L1 VLP против ВПЧ 6, 11, 16 и 18 типов<sup>87</sup>. Следует отметить, что адекватной и подходящей животной модели инфекции ВПЧ не существует, поскольку папилломавирусы являются видоспецифичными. В руководстве ВОЗ указано на целесообразность оценки фармакодинамических свойств вакцины на основе L1 VLP с помощью исследований иммуногенности (например, на грызунах, кроликах и/или, возможно, на приматах). При этом необходимо провести характеристику сывороточных нейтрализующих антител, индуцированных против каждого из типов ВПЧ L1 VLP, включенных в вакцину, и сывороточных перекрестно-нейтрализующих антител к широкому спектру типов ВПЧ. Поскольку целевой группой для вакцин против ВПЧ являются жен-

щины детородного возраста, требуется проведение исследований по оценке репродуктивной и онтогенетической токсичности<sup>88</sup>.

Пандемия гриппа 2009–2010 гг. инициировала разработку ЕМА нормативных требований, регламентирующих оценку качества, эффективности и безопасности вакцин для профилактики гриппа<sup>89</sup>. Раздел руководства ЕМА по ДИ содержит рекомендации по оценке иммуногенности вакцин с использованием мелких видов экспериментальных животных, наиболее чувствительных в отношении вакцин против вируса гриппа (например, крысы, хомяки, морские свинки, мыши и хорьки)<sup>90</sup>. При этом необходимо оценить гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также зависимость эффекта от дозы. Для пандемических, препандемических (зоонозных) и сезонных вакцин с адъювантом следует провести исследование кросс-нейтрализующих эффектов в отношении гетерологичных штаммов вирусов гриппа. Оценка протективных свойств гриппозных вакцин с новым механизмом действия рекомендуется проводить на релевантной модели животных.

Наиболее адекватной моделью для исследования защитных свойств вакцин для профилактики гриппа (при условии, что исследуемый штамм вируса гриппа хорошо реплицируется и вызывает симптоматическую инфекцию) являются хорьки, поскольку патогенез заболевания, клиническая симптоматика, включая лихорадку, и механизмы формирования иммунитета схожи с таковыми у человека; кроме того, хорьки обладают наиболее высокой восприимчивостью к заражению вирулентными штаммами вируса гриппа; оценка протективности на мышах нецелесообразна. Изучение токсичности вакцины при однократном введении предпочтительно проводить в рамках изучения токсичности при многократном введении. Исследование иммуногенности вакцин с адъювантом на доклиническом этапе включает оценку оптимального соотношения адъювант/антиген путем исследования эффекта комбинации различных доз адъюванта с различными дозами антигена вакцины<sup>91</sup>. Руководство ЕМА по доклиническим

<sup>84</sup> Там же.

<sup>85</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No. 993. <https://www.who.int/publications/m/item/poliomyelitis-vaccines-inactivated-annex-3-trs-no-993>

<sup>86</sup> Там же.

<sup>87</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant human papillomavirus virus-like particle vaccines, Annex 4, TRS No. 999. <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hpv-like-particle-vaccines-annex-4-trs-no-999>

<sup>88</sup> Там же.

<sup>89</sup> Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module. <https://www.ema.europa.eu/en/influenza-vaccines-non-clinical-clinical-module-scientific-guideline>

<sup>90</sup> Там же.

<sup>91</sup> Там же.

и клиническим исследованиям вакцин для профилактики гриппа взято за основу для подготовки аналогичного руководства ЕАЭС.

В соответствии с требованиями руководства ВОЗ по оценке качества, безопасности и эффективности вакцин против лихорадки Эбола рекомендуется проведение исследования механизма иммунной защиты вакцин с использованием грызунов (мыши, морские свинки) и нечеловекообразных приматов (макаки-крабоеды или макаки-резусы)<sup>92</sup>. Для исследования протективной эффективности вакцин необходимо использование лабораторий с уровнем биологической безопасности BSL-4. Эти исследования имеют более высокую прогностическую ценность, чем исследования иммуногенности для прогнозирования эффективности вакцин у людей. Для оценки доконтактной профилактики животных обычно заражают в то время, когда развился пиковый уровень реакции на вакцину (например, максимальный титр антител). С целью определения различных стратегий вакцинации желательно получить информацию, оценивая результаты при заражении животных до пика развития иммунного ответа или при его снижении.

Следует провести исследование иммунного ответа на каждый из штаммов вируса Эбола в поливалентной вакцине, включая оценку любой потенциальной иммунологической интерференции между штаммами. Данные о перекрестно-нейтрализующих антителах и перекрестной реактивности должны быть получены для моновалентных и поливалентных вакцин путем использования гетерологичных вирусов.

При изучении иммуногенности вакцин следует оценивать гуморальный и клеточный иммунный ответ, формирующийся на каждый из предполагаемых защитных антигенов и антигенов используемого вектора. Оценка клеточного иммунитета должна включать фенотипическую и функциональную характеристику ответов CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток с использованием чувствительных и высокоспецифичных тестов, таких как ELISPOT (enzyme linked immunosorbent spot assay) и ICS (intracellular cytokine staining assay), с помощью многопараметрической проточной цитометрии. В зависимости от свойств вакцин-кандидатов могут потребоваться дополнительные испытания на безопасность. Для реплицирующегося рекомбинантного вакцинного вектора с нейро-

вирулентным потенциалом необходима оценка нейровирулентности на релевантных видах животных. Если в вакцине используется рекомбинантный вирусный вектор, то необходимо проведение исследования биораспределения<sup>93</sup>.

В руководстве ВОЗ по вакцинам против гепатита Е регламентируется проведение исследований иммуногенности с использованием релевантных видов животных, реагирующих на антиген<sup>94</sup>. Оценка иммуногенности вакцины должна включать определение сывороточных антител класса IgG к вирусу гепатита Е (HEV). Защитный эффект вакцины следует также исследовать на релевантной модели животных. Примеры моделей животных, для которых экспериментально показано инфицирование HEV человека, включают свиней (генотипы 3 и 4), кроликов (генотип 4) и различные виды нечеловекообразных приматов, такие как яванские макаки (генотипы 1 и 2) и макаки-резусы (генотипы 1–4). Используемые животные должны быть HEV-наивными. Вирус, используемый для исследований с контрольным заражением животных, должен соответствовать штамму вируса дикого типа, из которого получен вакцинный антиген. Исследования пассивной иммунизации на животных моделях, включающие перенос антител от вакцинированных людей наивным животным с последующим заражением HEV, могут быть полезны для оценки титра специфических антител класса IgG, связанных с защитой.

Согласно рекомендациям руководства ВОЗ по вакцинам против респираторно-синцитиального вируса (RSV)<sup>95</sup> при исследовании иммуногенности следует уделить внимание выбору подтипа RSV (A или B), а также типу клеток, которые будут использоваться для оценки нейтрализующих антител. Дизайн ДИ зависит от механизма действия вакцины. Вакцины-кандидаты могут быть разработаны для стимуляции клеточного иммунитета. Для других вакцин предполагаемым механизмом защитного действия может быть индукция эффективного иммунного ответа слизистой оболочки, например для вакцин, вводимых интраназальным путем. Это касается некоторых живых аттенуированных или векторных вакцин.

Для мультивалентной вакцины-кандидата необходимо оценить иммунный ответ на каждый из вакцинных антигенов-мишеней. В случае живых вирусных векторных вакцин следует

<sup>92</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of Ebola vaccines, Annex 2, TRS No. 1011. <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs1011-ebola>

<sup>93</sup> Там же.

<sup>94</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant Hepatitis E vaccines, Annex 2, TRS No. 1016. <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hepatitis-e-vaccines-annex-2-trs-1016>

<sup>95</sup> Guidelines on the quality, safety and efficacy of respiratory syncytial virus vaccines, Annex 2, TRS No. 1024. <https://www.who.int/publications/m/item/respiratory-syncytial-virus-vaccines-annex-2-trs-no-1024>

проводить исследование биораспределения (если оно ранее не проводилось) во всех тканях и органах, включая головной мозг. В руководстве ВОЗ рекомендуется исследование вакцин-индуцированных иммунных реакций и связанного с вакциной риска ADE-эффекта на моделях животных (мыши, хлопковые крысы, африканские зеленые мартышки, яванские макаки, телята). Необходимость оценки ADE-эффекта определяется типом вакцины против RSV и/или целевой группой населения и должна рассматриваться в каждом конкретном случае. Например, для вакцин-кандидатов с иммунологическими характеристиками, аналогичными формалинизированной вакцине против RSV (FI-RSV), и разработанных для активной иммунизации младенцев, ранее не инфицированных RSV, предварительная оценка риска ADE-эффекта имеет решающее значение<sup>96</sup>.

В руководстве ВОЗ по оценке качества, безопасности, эффективности брюшнотифозных конъюгированных вакцин<sup>97</sup> представлены рекомендации по исследованию иммуногенности, которая может сильно различаться у разных видов животных. Указано, что исследования на животных следует проводить только в том случае, если они позволяют получить информацию, свидетельствующую о протективной эффективности вакцин. Уровень регистрируемых антител класса IgG к Vi-полисахариду при исследовании иммуногенности вакцины на используемой модели животных должен значительно превышать уровень иммунного ответа в контрольной группе животных, например в группе животных, которые получают неконъюгированную Vi-полисахаридную вакцину.

ДИ иммуногенности могут включать оценку частоты сероконверсии и/или средних геометрических значений титров антител. Рекомендуется проводить изучение функциональных характеристик иммунного ответа, например оценку уровня сывороточных бактерицидных антител, антителозависимой фагоцитарной активности и опсонофагоцитарной активности. В исследовании иммуногенности следует включать оценку интерференции, которая может возникать между антигенами при использовании полиантигенных вакцин; в таких случаях следует оценивать иммунную реакцию на каждый антиген.

Согласно рекомендациям руководства ВОЗ по вакцинам для профилактики энтеровируса 71 типа (EV71)<sup>98</sup> иммуногенность новой вакцины необходимо исследовать на соответствующих моделях животных (например, мыши, крысы или кролики) с оценкой уровня нейтрализующих антител в сыворотке крови против изолированных штаммов вируса или псевдовирюсов при использовании разных доз препарата. Иммунный ответ на вакцину-кандидат следует оценивать после введения каждой дозы вакцины и, по возможности, в сравнении с зарегистрированной вакциной против EV71 в качестве контроля. В процессе оценки иммуногенности рекомендуется проводить характеристику перекрестно-нейтрализующих антител с использованием изолированных гетерологичных вирусов или псевдовирюсов различных субгеногрупп. Эти данные могут служить ориентиром при выборе уровня доз, режима дозирования и пути введения в клинических исследованиях. В связи с ограниченным на настоящее время объемом клинических данных по перекрестной эффективности для ее подтверждения необходимо предоставлять соответствующие данные, полученные в исследованиях на животных. Следует проводить исследование защитной эффективности вакцин на соответствующих моделях животных для оценки защитного потенциала в отношении гетерологичных вирусов различных геногрупп, поскольку результаты таких исследований позволят охарактеризовать широту защиты вакцины от энтеровирусов<sup>99</sup>.

### Особенности требований к проведению доклинических исследований вакцин регуляторных органов разных стран

В настоящее время нормативные рекомендации для проведения ДИ вакцин в большинстве стран мира гармонизированы с рекомендациями ЕМА, FDA и ВОЗ. В то же время в ряде стран по некоторым вопросам ДИ приняты собственные подходы, которые отличаются от рекомендаций ВОЗ, ЕМА, регуляторных органов Японии и Китая.

В частности, в Индии разработка и регистрация вакцин регламентируется Законом о лекарствах и косметике<sup>100</sup> и ДИ осуществляются на основе единых требований для всех лекар-

<sup>96</sup> Там же.

<sup>97</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of typhoid conjugate vaccines, Annex 2, TRS No. 1030. <https://www.who.int/publications/m/item/tcv71-recommendations>

<sup>98</sup> Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No. 1030. <https://www.who.int/publications/m/item/ev71-recommendations>

<sup>99</sup> Там же.

<sup>100</sup> Government of India, Ministry of Health and Family Welfare (Department of Health). The drugs and cosmetics act and rules. The drugs and cosmetics act, 1940. The drugs and cosmetics rules, 1945 (As amended up to 31 December, 2016). [https://cdsco.gov.in/opencms/export/sites/CDSCO\\_WEB/Pdf-documents/acts\\_rules/2016DrugsandCosmeticsAct1940Rules1945.pdf](https://cdsco.gov.in/opencms/export/sites/CDSCO_WEB/Pdf-documents/acts_rules/2016DrugsandCosmeticsAct1940Rules1945.pdf)

ственных средств. Доклиническая оценка токсичности вакцин согласно этому документу является наиболее обширной и сложной в сравнении с общепринятыми программами, прописанными в рекомендациях других регуляторных органов. Согласно требованиям индийского руководства необходимо проведение исследований на двух видах животных с использованием двух путей введения (например, внутримышечного и подкожного); при этом требуется введение широкого диапазона доз и определение максимально переносимой дозы. ДИ иммуногенности обычно проводятся более чем на одном виде, что позволяет оценить видоспецифические особенности токсичности.

В Японии при подаче заявки на регистрацию или проведение клинических исследований вакцин, которые уже зарегистрированы в других странах, требуется представление подробных обзоров любых имеющихся данных об исследовании на животных<sup>101</sup>. Если эта информация будет сочтена недостаточной, может быть сделан запрос на проведение рутинных ДИ токсичности до начала клинических исследований и/или подачи заявки на регистрацию.

Кроме того, в большинстве руководств указано, что проведение исследований фармакологической безопасности необходимо только в том случае, если данные доклинических или клинических исследований предполагают, что вакцина может влиять на основные физиологические параметры центральной нервной системы, дыхательной системы, сердечно-сосудистой системы, почек. Исключение составляет японское руководство, в котором указано, что необходимость исследования фармакологической безопасности требуется для всех вакцин (новых и ранее выпущенных на рынок)<sup>102</sup>. Тем не менее в этом руководстве указано, что отдельное исследование фармакологической безопасности вакцин может быть сокращено или исключено, если в исследование токсичности с введением повторных доз были включены конкретные конечные точки, позволяющие оценить безопасность вакцины. Хотя дизайн фармакологических исследований безопасности вакцин следует рассматривать отдельно в каждом конкретном

случае, общее описание дизайна этих исследований представлено в руководстве ICH S7A<sup>103</sup>.

### «Правило животных»

Отдельно следует выделить подход, принятый в США, который позволяет проводить регистрацию препарата без представления результатов клинических исследований на основании документа, разработанного FDA, который известен под названием «Правило животных» (Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных – Animal Rule, CFR 314, подраздел I или CFR 601, подраздел H)<sup>104</sup>. Данный документ разработан для регистрации профилактических и терапевтических препаратов в случае, если проведение исследований на человеке невозможно по этическим или иным причинам. Согласно «Правилу животных» возможна регистрация препаратов, предназначенных для профилактики и лечения серьезных или опасных для жизни состояний (заболеваний), вызванных действием летальных (или приводящих к тяжелым последствиям) токсичных веществ биологической, химической или радиологической природы.

Указанный нормативный акт применяется только к тем новым лекарственным препаратам, для которых окончательные исследования эффективности на людях не могут быть проведены, поскольку было бы неэтично преднамеренно подвергать здоровых добровольцев потенциально летальным или приводящим к необратимым нарушениям воздействиям. Данный документ не распространяется на препараты, которые могут быть зарегистрированы на основе других рекомендаций FDA (например, ускоренное одобрение на основе суррогатных маркеров или клинических конечных точек, основанных не на выживаемости или развитии необратимых нарушений).

На основании «Правила животных» возможна регистрация вакцин. Для этого в первую очередь важно наличие релевантной модели для обоснования протективной эффективности (защиты) и безопасности (токсичности) вакцины (и адьюванта). В дополнение к обязательным исследованиям эффективности и безопасности

<sup>101</sup> Ministry of Health, Labour and Welfare. PSEHB/PED Notification No.0527-1 Guidelines for non-clinical studies of vaccines for preventing infectious diseases (in Japanese); 2010.

<sup>102</sup> Там же.

<sup>103</sup> ICH Guideline. Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals S7A. [https://database.ich.org/sites/default/files/S7A\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/S7A_Guideline.pdf)

<sup>104</sup> Approval of biological products when human efficacy studies are not ethical or feasible. <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-D/part-314/subpart-1>  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=601&showFR=1&subpartNo=21:70.1.1.2.8>  
<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-regulatory-science/animal-rule-summary>

на животных (возможно на двух видах) также необходимо проведение клинических исследований иммуногенности/безопасности I, II и III фаз. Соответственно, в некоторых случаях регистрация вакцины на основании данного положения может быть более длительной и дорогостоящей в сравнении с регистрацией по обычной процедуре.

В настоящее время еще не зарегистрирована ни одна вакцина на основании «Правил животных», но FDA одобрило такие препараты, как пиридоцинол бромид (для профилактики летальных последствий отравления нервно-паралитическим агентом зоман), Суапokit (гидроксокобаламин, для лечения известного или предполагаемого отравления цианидами), левакин (левофлоксацин, антибиотик для лечения легочной чумы), моноклональное антитело раксобакумаб (для лечения ингаляционной формы сибирской язвы) и др. Предполагается, что на основе данного нормативного акта могут быть зарегистрированы вакцины для профилактики сибирской язвы, чумы, туляремии, оспы, ботулизма, вирусного энцефалита, пандемического гриппа и др. [8].

## Заключение

Проведенный анализ нормативных документов показал, что начиная с 2000-х годов ВОЗ и ведущими мировыми регуляторными органами было подготовлено более 40 документов, в которых регламентированы те или иные стороны проведения доклинических исследований эффективности и безопасности вакцин. Подавляющее большинство рекомендаций подготовлено ВОЗ. В указанных руководствах представлены рекомендации для проведения доклинических исследований, которые можно разделить на две группы. К первой группе относятся документы, посвященные общим вопросам доклинических исследований вакцин, исследований ДНК-вакцин, комплексных вакцин, адъювантов вакцин и др. Вторая группа документов включа-

ет руководства для оценки качества, эффективности и безопасности конкретных видов вакцин.

В целом, учитывая разнообразие антигенов, состава вакцин, адъювантов и механизмов действия, программы доклинических исследований вакцин обычно включают исследования *in vitro* и *ex vivo*, а также исследования *in vivo* на одном или нескольких видах животных. Как правило, программа исследования безопасности (токсичности) вакцин практически одинакова для всех видов вакцин (в соответствии с Руководством ВОЗ по доклинической оценке вакцин), однако для некоторых вакцин требуется оценка нейровирулентности. Особенностью исследования безопасности для некоторых вакцин является оценка токсичности на этапах производственного процесса получения препарата (например, на этапе детоксикации дифтерийной вакцины).

Доклиническая оценка эффективности индивидуальна для каждого вакцинного препарата. Основной проблемой при разработке любой программы ДИ является выбор релевантных видов животных, у которых иммунные ответы на целевые антигены будут максимально схожими с таковыми у человека. Для большинства вакцин отсутствуют релевантные модели инфекционного процесса для оценки протективной эффективности вакцины и обоснованные корреляты защиты. Исследования протективной эффективности рекомендуется проводить при заражении живыми штаммами возбудителя, чаще дикого типа.

В последних рекомендациях, подготовленных ВОЗ для конкретных видов вакцин, представлены разделы, касающиеся выбора релевантных моделей для оценки эффективности вакцин, описаны особенности проведения доклинических исследований каждой вакцины, такие как оценка нейровирулентности, оценка кросс-реактивности и др. Необходимость проведения дополнительных или специальных исследований вакцин определяется в каждом конкретном случае.

## Литература/References

1. Stratton K, Ford A, Rusch E, Clayton EW, eds. Committee to Review Adverse Effects of Vaccines, Institute of Medicine. *Adverse Effects of Vaccines: Evidence and Causality*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
2. Siegrist CA. Section 1: General aspects of vaccination. Vaccine immunology. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*. New York: Elsevier Health Sciences; 2008. P. 17–36.
3. Солдатов АА, Горенков ДВ, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Особенности и проблемы регистрации и применения препаратов для профилактики COVID-19 в период пандемии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):361–81. Soldatov AA, Gorenkov DV, Merkulov VA, Bondarev VP. Aspects and issues of marketing authorization and use of medicinal products for COVID-19 prevention during the pandemic. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):361–81 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-361-381>
4. Sheets RL, Stein J, Bailer RT, Koup RA, Andrews C, Naason M, et al. Biodistribution and toxicological safety

- of adenovirus type 5 and type 35 vectored vaccines against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1), Ebola, or Marburg are similar despite differing adenovirus serotype vector, manufacturer's construct, or gene inserts. *J Immunotoxicol.* 2008;5(3):315–35. <https://doi.org/10.1080/15376510802312464>
5. Tebas P, Roberts CC, Muthumani K, Reuschel EL, Kudchodkar SB, Zaidi FI, et al. Safety and immunogenicity of an anti-Zika virus DNA vaccine. *N Engl J Med.* 2021;385(12):e35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708120>
  6. Sheets RL, Stein J, Manetz TS, Duffy C, Nason M, Andrews C, et al. Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts. *Toxicol Sci.* 2006;91(2):610–9. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj169>
  7. Levenbook IS, Pelleu LJ, Elisberg BL. The monkey safety test for neurovirulence of yellow fever vaccines: the utility of quantitative clinical evaluation and histological examination. *J Biol Stand.* 1987;15(4):305–13. [https://doi.org/10.1016/s0092-1157\(87\)80003-3](https://doi.org/10.1016/s0092-1157(87)80003-3)
  8. Snoy PJ. Establishing efficacy of human products using animals: the US food and drug administration's "animal rule". *Vet Pathol.* 2010;47(5):774–8. <https://doi.org/10.1177/0300985810372506>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Д.В. Горенков** – обработка и анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; **Е.И. Комаровская** и **Ж.И. Авдеева** – критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; **А.А. Солдатов** – концепция работы, написание текста рукописи; **В.П. Бондарев** – критическое обсуждение текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** В.П. Бондарев является заместителем главного редактора, Ж.И. Авдеева – членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **D.V. Gorenkov** reviewed and analysed literature data, and edited the manuscript. **E.I. Komarovskaya** and **Zh.I. Avdeeva** participated in the critical discussion and editing of the manuscript. **A.A. Soldatov** conceptualised the study and drafted the manuscript. **V.P. Bondarev** participated in the critical discussion of the manuscript and approved the final version for publication.

**Acknowledgments.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Conflict of interest.** V.P. Bondarev is the Deputy Editor-in-Chief, and Zh.I. Avdeeva is a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

**Горенков Дмитрий Витальевич.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>  
[gorenkov@expmed.ru](mailto:gorenkov@expmed.ru)

**Комаровская Елена Игоревна.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9035-6072>  
[komarovskaya@expmed.ru](mailto:komarovskaya@expmed.ru)

**Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук.**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>  
[Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

**Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф.**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9377-1378>  
[avdeeva@expmed.ru](mailto:avdeeva@expmed.ru)

**Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф.**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>  
[Bondarev@expmed.ru](mailto:Bondarev@expmed.ru)

Поступила 06.02.2023

После доработки 07.03.2023

Принята к публикации 13.03.2023

**Dmitry V. Gorenkov.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>  
[gorenkov@expmed.ru](mailto:gorenkov@expmed.ru)

**Elena I. Komarovskaya.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9035-6072>  
[komarovskaya@expmed.ru](mailto:komarovskaya@expmed.ru)

**Aleksandr A. Soldatov, Dr. Sci. (Med.).**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>  
[Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

**Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Professor.**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9377-1378>  
[avdeeva@expmed.ru](mailto:avdeeva@expmed.ru)

**Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Professor.**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>  
[Bondarev@expmed.ru](mailto:Bondarev@expmed.ru)

Received 6 February 2023

Revised 7 March 2023

Accepted 13 March 2023



## Безопасность и иммуногенность вакцины третьего поколения IMVAMUNE® на основе вируса вакцины, штамм MVA

Л.Ф. Стомба, О.В. Чухраля, Н.К. Черникова, А.Л. Хмелев, С.В. Борисевич✉

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Октябрьская, д. 11, г. Сергиев Посад-6, Московская область, 141306, Российская Федерация

✉ Борисевич Сергей Владимирович, [48cnii@mil.ru](mailto:48cnii@mil.ru)

### Резюме

В 1980 г. Всемирная ассамблея здравоохранения официально провозгласила искоренение натуральной оспы в мире, что позволило в развитых странах отменить профилактическую вакцинацию против этого заболевания. Однако из-за постоянно циркулирующих и вновь возникающих ортопоксвирусов, а также отсутствия популяционного иммунитета необходимо наличие в чрезвычайных ситуациях противооспепных вакцин, отвечающих современным требованиям к иммунобиологическим препаратам.

**Цель работы** — анализ безопасности и эффективности в условиях отсутствия популяционного иммунитета к ортопоксвирусам оспенной вакцины третьего поколения на основе штамма MVA вируса вакцины, отвечающей повышенным требованиям иммуногенности и безопасности, особенно с учетом применения ее для лиц с отклонениями в состоянии здоровья. Проанализирован опыт применения противооспепных вакцин. Среди противооспепных вакцин третьего поколения особое место занимает вакцина на основе вируса вакцины, штамм MVA (modified vaccinia virus Ankara), выпускаемая компанией Bavarian Nordic под тремя названиями (в Европе — Imvanex, в США — Jynneos™, в Канаде — IMVAMUNE®), поскольку он безопасен и может использоваться для конструирования векторных вакцин. Результаты клинических исследований вакцины на основе штамма MVA на здоровых добровольцах и лицах с различными отклонениями в здоровье показали, что основные побочные реакции легкой степени тяжести (эритема, болезненность, зуд, припухлость) в основном регистрировались в месте введения вакцины. Из системных побочных реакций отмечены утомление, головная боль, миалгия, озноб; у незначительной части — инфекция верхних дыхательных путей, тошнота, гастроэнтерит, которые самопроизвольно проходили в течение первых суток. Вакцина не вызывает нарушений сердечной деятельности, включая миоперикардит, может быть применена для лиц с экземой, атопическим дерматитом и воспалительными кожными заболеваниями, ею можно вакцинировать ВИЧ-инфицированных, больных туберкулезом, лиц с нарушениями сердечной деятельности, а также детей младшего возраста, подростков и беременных женщин. Определена оптимальная иммунизирующая доза вакцины при внутрикожном введении, равная  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub>. Выявлено, что при двукратном введении в данной дозе вакцина индуцирует выраженный гуморальный и клеточный иммунный ответ, сопоставимый по уровню с иммунитетом после однократного введения вакцины первого поколения, а также бустит иммунитет, ранее сформировавшийся при иммунизации противооспепной вакциной первого поколения. Вакцина Jynneos™ в настоящее время одобрена CDC (США) для профилактики оспы обезьян у взрослых в возрасте 18 лет и старше.

**Ключевые слова:** оспенная вакцина третьего поколения; праймирование/бустирование; уровень сероконверсии; среднее геометрическое значение титров антител; ортопоксвирусы; вакцинация; оспа обезьян; вирус вакцины

**Для цитирования:** Стомба Л.Ф., Чухраля О.В., Черникова Н.К., Хмелев А.Л., Борисевич С.В. Безопасность и иммуногенность вакцины третьего поколения IMVAMUNE® на основе вируса вакцины, штамм MVA. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(1):26–41. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-26-41>

© Л.Ф. Стомба, О.В. Чухраля, Н.К. Черникова, А.Л. Хмелев, С.В. Борисевич, 2023

# Safety and immunogenicity of IMVAMUNE®, a third-generation vaccine based on the modified vaccinia Ankara (MVA) strain

L.F. Stovba, O.V. Chukhralya, N.K. Chernikova, A.L. Khmelev, S.V. Borisevich✉

48 Central Scientific Research Institute, 11 Oktyabrskaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region 141306, Russian Federation

✉ *Sergey V. Borisevich*; [48cnii@mil.ru](mailto:48cnii@mil.ru)

## Abstract

In 1980, the World Health Assembly officially declared smallpox eradicated in the world, which allowed developed countries to stop preventive vaccination against this disease. However, circulating and emerging orthopoxviruses along with the lack of herd immunity prompt the need for emergency smallpox vaccines meeting the current requirements for biologicals. **The aim of the study** was to analyse the safety and efficacy of third-generation smallpox vaccines based on the MVA strain of vaccinia virus compliant with the current (stricter) immunogenicity and safety requirements in healthy subjects and especially in patients with underlying health conditions, considering the lack of herd immunity to orthopoxviruses. The authors analysed the existing experience with smallpox vaccines. The vaccines based on the modified vaccinia Ankara (MVA) strain hold a special place amongst other third-generation vaccines, as this strain is safe and can be used for creating vector vaccines. Bavarian Nordic produces the MVA-based vaccine under three brand names (Imvanex in the EU, Jynneos™ in the USA, and IMVAMUNE® in Canada). According to the results of MVA-based vaccine clinical trials in healthy volunteers and patients with various underlying conditions, the main mild adverse drug reactions (erythema, pain, pruritus, and swelling) were mostly registered at the injection site. The systemic adverse drug reactions included fatigue, headache, myalgia, and chills; several subjects developed upper respiratory tract infections, nausea, and gastroenteritis, which resolved spontaneously within a day. MVA-based vaccines did not cause any cardiac abnormalities, including myo- or pericarditis. Thus, the vaccines may be used in patients with eczema, atopic dermatitis, inflammatory skin conditions, HIV, tuberculosis, cardiac abnormalities, as well as in children, adolescents, and pregnant women. The optimal intradermal immunisation dose was  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>. Two injections at this dose induced a pronounced humoral and cell-mediated immune response comparable to that induced by one administration of a first-generation smallpox vaccine. At this dose, the study vaccine also boosted pre-existing immunity conferred by a first-generation vaccine. The US Centers for Disease Control and Prevention recommend Jynneos™ for preventing monkeypox in adults (18 years of age and older).

**Key words:** third-generation smallpox vaccine; priming/boosting; seroconversion rate; geometric mean antibody titers; orthopoxviruses; vaccination; monkeypox; vaccinia virus

**For citation:** Stovba L.F., Chukhralya O.V., Chernikova N.K., Khmelev A.L., Borisevich S.V. Safety and immunogenicity of IMVAMUNE®, a third-generation vaccine based on the modified vaccinia Ankara (MVA) strain. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):26–41. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-26-41>

## Введение

В 1980 г. Всемирная ассамблея здравоохранения декларировала искоренение натуральной оспы в мире. Это событие привело к прекращению обязательной противооспенной иммунизации во всем мире. Однако заболевания, вызываемые другими ортопоксвирусами, регистрируются и в настоящее время. Вспышки

инфекций, обусловленные вирусом оспы коров, зафиксированы в Европе, вирусом оспы обезьян – в центральной Африке, вакциноподобными штаммами – в Бразилии и Колумбии, вирусом оспы верблюдов и буйволов – на Среднем Востоке, Индии и Африке<sup>1</sup> [1].

Кроме того, помимо уже известных возбудителей ортопоксвирусных инфекций, выявлены

<sup>1</sup> <https://www.who.int/emergencies/situations/monkeypox-oubreak-2022>

новые ортопоксвирусы. Так, в 2013 г. в Грузии в районе поселка Ахмета из кожных поражений двух пастухов был выделен возбудитель, который сначала отнесли к вирусу оспы коров, однако секвенирование его генома показало, что это новый ортопоксвирус [2]. В Италии в 2015 г. при вспышке оспоподобного заболевания среди содержащихся в неволе обезьян был выделен новый вирус Abatino [3]. В том же году в Северной Америке на Аляске из кожных поражений у женщины был выделен новый ортопоксвирус, названный вирусом Аляска [4]. В 2017 г. в Италии было зарегистрировано заболевание у домашней кошки, выделенный из павшего животного возбудитель был отнесен к семейству оспенных вирусов, роду ортопоксвирусов и был обозначен Italy-09/17 [5].

В связи с этим существование постоянно циркулирующих и вновь возникающих ортопоксвирусов, а также отсутствие популяционного иммунитета требуют в чрезвычайных ситуациях наличия противооспенных вакцин.

Цель работы – анализ безопасности и эффективности в условиях отсутствия популяционного иммунитета к ортопоксвирусам оспенной вакцины третьего поколения на основе штамма MVA вируса вакцины, отвечающей повышенным требованиям иммуногенности и безопасности, особенно с учетом применения ее для лиц с отклонениями в состоянии здоровья.

### Вакцины, используемые во время кампании по глобальной ликвидации натуральной оспы

На протяжении XX столетия для оспопрививания использовались вакцинные препараты на основе различных штаммов вируса, относящегося к виду *Vaccinia virus* (VACV, вирус вакцины), входящего в состав рода *Orthopoxvirus*<sup>2</sup>. Эти вакцины первого поколения имели повышенную реактогенность для человека. Противооспенные вакцины, основанные на таких штаммах вируса вакцины, как Lister/Elstree, New York City Board of Health (NYCBH), EM-63, Tian Tan, Ikeda, Dairen I, преимущественно использовались во время кампании по ликвидации натуральной оспы в мире из-за более высокой безопасности по сравнению с другими штаммами, такими как Copenhagen и Bern [6]. Но даже они вызывали редкие, но тяжелые побочные реакции, особенно у беременных женщин, детей младшего возраста и подростков, а также лиц, инфицированных ВИЧ, больных туберкулезом, воспалительными кожными заболеваниями и сердеч-

ными заболеваниями. Так, в США в настоящее время 25% населения не может быть вакцинировано против натуральной оспы, что обусловлено перечисленными противопоказаниями [7]. В качестве субстрата накопления вируса при производстве вакцин первых поколений использовали хорионаллантоисную оболочку развивающихся куриных эмбрионов (ХАО РКЭ) и/или кожу телят, что повышало риск контаминации препаратов посторонними возбудителями.

При разработке вакцин второго поколения, например Elstree-BN на основе штамма Lister/Elstree, производимой компанией Bavarian Nordic (Дания), и ACAM2000™, производимой компанией Acambis, были учтены современные требования к безопасности. Указанные вакцины хоть и были созданы на основе штаммов, которые использовались в кампании по ликвидации натуральной оспы, однако производились с применением клонирования вируса и нарабатывались на линиях клеток [8]. Эти изменения были направлены на улучшение качества вакцин: гомогенности и минимизации риска загрязнений. Однако, поскольку второе поколение вакцин основано на использовании тех же штаммов, что и первое, то для них свойственны те же самые риски развития вакцинальной экземы и прогрессирующей вакцинии [9]. Риски развития тяжелых побочных реакций обусловили проведение исследований по разработке вакцин третьего и четвертого поколений.

### Вакцины против натуральной оспы третьего и четвертого поколений

В отличие от противооспенных вакцин первого и второго поколений, основанных на тех штаммах вируса, которые показали свою эффективность во время кампании по искоренению натуральной оспы в мире, вакцины третьего и четвертого поколений никогда не использовались для предотвращения натуральной оспы. Эффективность этих вакцин продемонстрирована на модельных животных и в клинических исследованиях (КИ), что затрудняет их лицензирование.

Основу вакцин третьего поколения составляют живые высокоаттенуированные штаммы вируса вакцины, которые показали свою безопасность и иммуногенность. Это штаммы MVA, LC16m8, NYVAC, Tian Tan, Б-51 БМ. Особое место среди штаммов для разработки оспенных вакцин занимает штамм MVA (modified vaccinia virus Ankara) из-за низкой реактогенности и возможности использования для конструирования векторных вакцин [10]. Четвертое поколение

<sup>2</sup> <https://ictv.global/>

вакцин представлено препаратами на основе генетически измененных вариантов, а также неинфекционными субъединичными вакцинами (ДНК, белками и репликонами) [11].

### Противооспенная вакцина на основе штамма MVA (IMVAMUNE®)

Штамм MVA, являясь одним из наиболее аттенуированных штаммов вируса вакцины, был получен в результате пассирования в культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов (570 пассажей) родительского вируса вакцины, штамм Анкара [12]. По сравнению с родительским аттенуированным штаммом имеет 6 больших делеций и несколько точечных мутаций, что привело к потере около 20% генома. Штамм MVA не репродуцируется в большинстве клеток млекопитающих, что связано с частичной либо полной делецией основных ортопоксвирусных генов, определяющих круг хозяев вируса. У штамма MVA не происходит сборки зрелых инфекционных вирионов в клетках человека. Штамм MVA в них эффективно реплицируется, но не способен образовывать инфекционные вирусные частицы, что ограничивает его способность экспрессировать вирусные гены в первоначально инфицированной клетке. Следовательно, неспособность штамма MVA репродуцироваться в большинстве клеток млекопитающих не отразилась на эффективности индукции адаптивного иммунного ответа против вирусных антигенов [13]. Вакцины на основе этого штамма были использованы при проведении иммунизации более чем 120 тыс. человек, включая детей и лиц с иммунодефицитом, при этом серьезных побочных реакций выявлено не было [14].

В доклинических исследованиях на мышах было показано, что при однократном введении препарат на основе штамма MVA не способен вызывать формирование достаточно сильного гуморального и Т-клеточного иммунитета (для индукции гуморального иммунного ответа необходима доза  $10^7$ – $10^8$  бляшкообразующих единиц (БОЕ), в то время как для лицензированной вакцины на основе штамма Dryvax она составляет  $2 \times 10^6$  БОЕ). Поэтому для усиления иммунного ответа необходимы повторные иммунизации [15]. В экспериментах на обезьянах было установлено, что антительный ответ, вызываемый четырьмя инокуляциями рекомбинантного штамма MVA, экспрессирующего ген люциферазы, равен таковому, вызываемому двумя инокуляциями рекомбинантного штамма WR с тем же встроенным геном [16]. В исследовании на мышах было показано, что для индуцирования длительного иммунного ответа, сравнимого с аналогичным

для традиционных вакцин, требуется двукратное введение вакцины на основе штамма MVA в дозе на два порядка превышающей дозы для вакцин первого или второго поколения [17].

При сравнительном исследовании клеточного иммунитета было показано, что после иммунизации 76 добровольцев вакциной на основе штамма MVA и вакциной Dryvax уровень индукции Т-клеточного иммунитета в обоих случаях был аналогичен. Индуцированные  $CD8^+$  Т-клетки были в высокой степени полифункциональными, они дегранулировали и продуцировали интерферон- $\gamma$ , интерлейкин-2, макрофагальный воспалительный белок-1 $\beta$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$  и, в основном, имели необычный фенотип ( $CD45RO^+CD27^{intermediate}$ ) [18].

Таким образом, двукратная иммунизация противооспенной вакциной на основе штамма MVA индуцирует гуморальный и клеточный иммунитет, сравнимый с таковым для традиционных вакцин. В настоящее время коммерческая вакцина на основе штамма MVA (IMVAMUNE®) производится компанией IDT Biologika GmbH (Германия), поставляется фирмой Bavarian Nordic и используется как вакцина третьего поколения в Европе, США и Канаде [19].

### Определение оптимальной дозы и схемы иммунизации в клинических исследованиях вакцины IMVAMUNE®

КИ, в которых оценивали вакцину IMVAMUNE®, были направлены на определение оптимальной дозы, схемы иммунизации, способности бустировать ранее сформировавшийся иммунитет и возможности применения вакцины для лиц с противопоказаниями.

Для определения оптимальной дозы было проведено рандомизированное двойное слепое КИ фазы II в Германии и США. В КИ принимали участие 164 здоровых добровольца в возрасте 18–30 лет (средний возраст  $23,2 \pm 3,0$  года), ранее не вакцинированных противооспенной вакциной. Оценивались безопасность и иммуногенность трех доз вакцины (в единицах 50% цитопатической дозы, ЦПД<sub>50</sub>):  $2 \times 10^7$  ЦПД<sub>50</sub> в первой группе,  $5 \times 10^7$  ЦПД<sub>50</sub> – во второй,  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub> – в третьей, при двукратном подкожном введении с интервалом 28 сут. Безопасность исследуемых доз вакцины исследовали после каждого введения и в течение 12 месяцев. Уровень образования антител оценивали через 28 сут после первой вакцинации и через 14 сут после второй. Уровень IgG к вирусу определяли с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), а уровень специфических нейтрализующих антител к вирусу – методом PRNT (plaque reduction neutralisation test,

реакция нейтрализации) [20]. У большинства добровольцев в каждой из групп наблюдалось, по крайней мере, по одному случаю побочной реакции в месте введения вакцины. Превалирующими были случаи эритемы и болезненности, число которых увеличивалось при более высоких дозах, однако явной зависимости доза–эффект не установлено. У небольшой части добровольцев всех групп отмечались утомление, головная боль с последующей миалгией, ознобом и тошнотой, причем статистической зависимости числа побочных реакций от дозы вакцины не наблюдалось ни по одному из симптомов. Случаев миоперикардита не регистрировалось. Случаев летальных исходов выявлено не было. Число побочных реакций после второй вакцинации было меньше, чем после первой. Все побочные реакции спонтанно проходили через 3–4 сут.

Определение титров антител методом ИФА выявило, что через 28 сут после введения первой дозы вакцины сероконверсия наблюдалась у 59,3% добровольцев из первой группы, у 81,6% – из второй и у 94,2% – из третьей. Через 2 недели после введения второй дозы уровень сероконверсии у добровольцев первой группы составил 94,2%, у добровольцев второй и третьей групп – 100%. Показана линейная зависимость уровней сероконверсии после первой и второй иммунизации от дозы вакцины.

Значения GMT (geometric mean titres, среднее геометрическое значение титров), определенные у добровольцев из трех групп через 28 сут после первой вакцинации методом ИФА, были равны 14,4, 53,2 и 94,2 и повышались к 54 сут до значений 377,2, 583,6, 813,8 соответственно. К 84 сут титры антител снижались у добровольцев из всех групп и составляли 134, 228, 324 соответственно.

Вируснейтрализующие антитела, выявленные в реакции нейтрализации, после первой вакцинации определялись у 7–12% добровольцев из всех групп, после второй их уровень повышался и определялся у 42,6% добровольцев первой группы, у 59,2% – второй группы и у 71,2% – третьей группы. Выявлялась линейная зависимость между дозой вакцины и титром антител. Значения GMT также зависели от дозы вакцины. К 42 сут они составляли 5,51, 10,31, 19,43 для трех групп соответственно. К 84 сут титры антител снижались, однако оставалась линейная зависимость между титром антител и дозой вакцины.

У добровольцев сформировался полифункциональный клеточный иммунный ответ, представленный CD3<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками, что было определено с помощью внутриклеточ-

ного окрашивания цитокинов и проточной цитометрии. В отличие от гуморального иммунного ответа не определялось четкой зависимости уровня клеточного ответа от дозы вакцины.

В этом исследовании было показано, что вакцина IMVAMUNE® во всех изученных дозах безопасна для здоровых добровольцев [20]. Даже самая высокая доза вакцины ( $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub>) была безопасной, и, учитывая показатели иммуногенности, данную дозу можно считать предпочтительной для дальнейшего применения. Зарегистрированные побочные реакции преимущественно были связаны с местом введения вакцины, однако подобные побочные реакции выявлялись при применении и других вакцин [21].

При определении гуморального иммунного ответа показана взаимосвязь между дозой вакцины и антительным ответом, что продемонстрировано с помощью обоих методов (ИФА и реакция нейтрализации). Уровень нейтрализующих антител, индуцированный оптимальной дозой вакцины IMVAMUNE® при прайм/бустерном режиме, соответствовал таковому при применении стандартной дозы вакцины Duvax [22].

Целью КИ, проведенного в Германии и США, являлась отработка схемы применения вакцины IMVAMUNE® для дальнейшего клинического применения. В исследовании участвовали 208 добровольцев в возрасте 18–35 лет (средний возраст 24,7 года), из которых 191 были вакцинированы вакциной IMVAMUNE®, а 17 – плацебо. Все добровольцы были рождены после 1971 г., то есть не имели противооспенного иммунитета. Все были здоровы, с отрицательными результатами анализов на ВИЧ, гепатит В и С, результаты анализов крови в норме, изменения на электрокардиограмме (ЭКГ) отсутствовали [23].

Добровольцы были разделены на 3 группы. В первой группе вакцинирование проводилось дважды с промежутком в 7 сут (группа 0+7), во второй – через 28 сут (группа 0+28), в третьей – однократное вакцинирование (группа 0). Вакцинирующую дозу  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub> во всех группах вводили подкожно. Пробы для оценки иммуногенности отбирались на 14 сут после последней вакцинации, а побочные реакции оценивались в течение 28 сут.

После первой вакцинации у 23,0% добровольцев из группы (0+7), у 20,9% из группы (0+28) и у 27,0% из группы (0) наблюдались побочные реакции. После второй вакцинации они отмечались у 44,1% добровольцев из группы (0+7) и у 35,9% добровольцев из группы (0+28). У 32 добровольцев, иммунизированных вакциной IMVAMUNE®, и у одного из группы плацебо

была выявлена эритема. Другими реакциями в месте введения вакцины были болезненность, зуд, припухлость и сыпь. На протяжении 15-суточного периода наблюдения после второй вакцинации у 4 добровольцев регистрировались такие побочные реакции, как инфекция верхних дыхательных путей, гастроэнтерит и головная боль. У большинства наблюдались ощущения утомления, головной и мышечной боли, а у одного – повышение температуры до 38,6 °C. Значительных различий показателей побочных реакций по группам не отмечалось.

Результаты анализа индуцированного гуморального иммунного ответа, определенного в реакции нейтрализации, показали, что применение вакцины по схеме (0+28) индуцирует более высокий титр нейтрализующих антител (не менее чем в 2 раза) по сравнению со схемами (0+7) и (0) [23]. В сравнительном исследовании сывороток крови, проведенном L.K. Damon с соавт. [22], было установлено, что титры нейтрализующих антител против вируса натуральной оспы у реципиентов, иммунизированных вакциной IMVAMUNE® по схеме (0+28), были подобны таковым при однократной иммунизации вакциной Dryvax. Клеточный иммунный ответ в данном исследовании не определяли.

Преимущество двукратного введения вакцины также установлено в КИ с применением двух доз:  $5 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub> при однократном введении и  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub> – при двукратном с интервалом 28 сут [24].

Таким образом, вакцина IMVAMUNE® является безопасной для здоровых добровольцев, а схема с двукратным введением (0+28) обеспечивает индуцирование иммунного ответа, равноценного с полученным при иммунизации вакциной Dryvax [20, 25].

#### ***Влияние иммунизации вакциной на основе штамма MVA на последующее введение вакцины Dryvax***

Поскольку ни в одном исследовании не была показана защитная эффективность иммунизации вакциной IMVAMUNE® против заражения вирусом натуральной оспы, M.S. Seaman с соавт. [26] было проведено исследование для оценки результатов иммунизации вакциной на основе штамма MVA (ACAM3000 (ACAMBIS)) на последующее введение вакцины Dryvax. В данном исследовании авторы предположили, что поствакцинальные реакции, выявляемые у иммунизированных добровольцев в ответ на введение Dryvax, можно экстраполировать на реакции, которые будут наблюдаться при заражении вирусом натуральной оспы. При проведении

двойного слепого плацебо-контролируемого КИ в США в 2007 г. участвовали 36 здоровых добровольцев в возрасте 20–34 года (средний возраст 27 лет), из которых 29 были ранее вакцинированы MVA вакциной, а 7 – плацебо. Все добровольцы никогда ранее не были вакцинированы традиционными противооспенными вакцинами. Иммунизация вакциной на основе штамма MVA проводилась внутривенно в дозах  $10^6$  ЦПД<sub>50</sub> и  $10^7$  ЦПД<sub>50</sub>, внутримышечно – в дозе  $10^7$  ЦПД<sub>50</sub> или подкожно – в дозах  $10^7$  ЦПД<sub>50</sub> и  $10^8$  ЦПД<sub>50</sub>. Вакцина Dryvax вводилась через 6–15 месяцев в дозе  $10^8$  БОЕ методом скарификации [26].

По результатам испытания было установлено, что первичная иммунизация вакциной на основе штамма MVA вызывает снижение выраженности кожных поражений и длительности диссеминации вируса после последующего введения вакцины Dryvax. Наибольший иммунный ответ наблюдался при внутривенной вакцинации в дозе  $10^7$  ЦПД<sub>50</sub>, которая была в 10 раз меньше, чем применяемая при подкожной вакцинации.

Титры нейтрализующих антител, выраженные в медианных значениях (median ID<sub>50</sub> titers), у добровольцев из группы плацебо, индуцированные введением вакцины Dryvax, достигали определяемого уровня только к 14 сут и повышались до 28 сут. У добровольцев, предварительно иммунизированных вакциной на основе штамма MVA, они определялись уже на 7 сут после бустерного введения вакцины Dryvax и выходили на пик к 14 сут, оставаясь стабильными к 28 сут. При этом уровень титров был выше, чем в группе плацебо. Титры вируснейтрализующих антител к внутриклеточным антигенам L1R и A27L зрелого вириона и к антигенам A33R и B5R внеклеточного оболочечного вируса были также выше у добровольцев, иммунизированных вакциной на основе штамма MVA, чем в группе плацебо.

Таким образом, предварительная иммунизация MVA вакциной приводила к более быстрому росту титров антител при последующем бустерном введении вакцины Dryvax. При этом вакцина на основе штамма MVA, примененная внутривенно, вызывала иммунный ответ, подобный таковому при подкожном введении при дозе в 10 раз большей.

Уровень Т-клеточного иммунного ответа, определенного в тесте на секрецию IFN- $\gamma$  методом ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot assay), зависел от дозы и способа иммунизации вакциной на основе штамма MVA, притом что в группе вакцинированных самой низкой дозой выявлялся более сильный иммунный ответ после введения вакцины Dryvax. Наибольший

уровень Т-клеточного иммунного ответа после введения вакцины Dгувах наблюдался в группе плацебо. Возможно, этот факт объясняется тем, что существующий после вакцинации MVA вакциной гуморальный иммунитет не давал возможности реплицироваться вирусу при последующем введении вакцины Dгувах до значений, необходимых для индуцирования Т-клеточного иммунитета. Следовательно, предварительная иммунизация вакциной на основе штамма MVA уменьшала степень кожных поражений и вирусной диссеминации после последующего введения вакцины Dгувах, не препятствовала увеличению уровня гуморального иммунитета и почти не влияла на индукцию Т-клеточного иммунитета [26]. Полученные результаты согласуются с данными других авторов [25, 27], которые подтвердили, что предварительная иммунизация вакциной на основе штамма MVA уменьшает симптомы кожных поражений, реактогенность и диссеминацию вируса после введения вакцины Dгувах.

**Способность вакцины **IMVAMUNE®** бустировать предсуществующий противооспенный иммунитет**

Для оценки способности вакцины на основе штамма MVA (**IMVAMUNE®**) бустировать предсуществующий иммунитет, индуцированный традиционной противооспенной живой вакциной, проведено отдельное КИ. Поскольку иммунизация традиционными вакцинами была закончена в 1979 г., то сформированный противооспенный иммунитет может наблюдаться только у пожилых людей, в связи с чем из-за ослабления иммунных функций у них могут возникать осложнения после вакцинации [25, 28]. Поэтому для оценки безопасности и иммуногенности вакцины на основе штамма MVA для пожилых людей в США было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое КИ фазы II на 120 добровольцах в возрасте 56–80 лет, ранее вакцинированных оспенной вакциной [29]. В исследовании добровольцы были разделены на 2 группы: группа дважды иммунизированных вакциной на основе штамма MVA с интервалом в 4 недели (ММ группа); группа, в которой при первом введении использовали плацебо, а следующую инъекцию проводили через четыре недели вакциной на основе штамма MVA (ПМ группа). Вакцинный препарат вводился подкожно в дозе  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub>. После каждой инъекции вакцины или плацебо в течение 8 сут регистрировали побочные реакции.

Результаты исследования выявили, что побочные реакции были схожими в обеих группах, причем в ММ группе их количество не увеличи-

вались при бустировании. Наиболее частой побочной реакцией была эритема, далее следуют болезненность и припухлость в месте введения. Миалгия, усталость и головная боль отмечались в обеих группах после каждой инъекции, однако их количество не увеличивались после бустирования в ММ группе. Результаты анализов крови после вакцинации не различались от таковых, сделанных до иммунизации. Случаев миоперикардита за время вакцинации не отмечено ни у одного из добровольцев.

Уровни сероконверсии, выявленные в ИФА при праймировании, наблюдались у 83,6% добровольцев в ММ группе (практически не изменялись при бустировании и равнялись 83,3%) и у 82,8% в ПМ группе; определенные в реакции нейтрализации – у 73,8% в ММ группе (после бустирования – 90,0%) и у 77,6% в ПМ группе.

Значения GMT, определенные через 2 недели после праймирования методом ИФА, составляли в ММ группе 622,5 и повышались до значений 804,1 после бустирования; в ПМ группе – 605,8. Значения GMT, установленные в реакции нейтрализации, после праймирования составляли в ММ группе 111,4 и 210,3 после бустирования, в ПМ группе – 126,7.

Таким образом, в этом КИ было показано, что и одна, и две дозы MVA вакцины были безопасны и иммуногенны для добровольцев в возрасте 56–80 лет, ранее вакцинированных оспенной вакциной. Показатели безопасности и иммуногенности MVA вакцины были подобны таковым, наблюдаемым у добровольцев в возрасте 18–55 лет [29]. Даже одна доза вакцины у данного контингента добровольцев приводила к формированию длительной В-клеточной памяти, индуцированной вакцинацией традиционными живыми противооспенными вакцинами.

**Возможность использования вакцины **IMVAMUNE®** для людей с отклонениями в состоянии здоровья**

С целью оценки эффективности MVA вакцины у людей с высоким риском осложнений при иммунизации вакцинами первого поколения было проведено КИ фазы I–II с участием 91 ВИЧ-инфицированного добровольца и 60 здоровых добровольцев [30]. Для КИ, которое проводилось в 5 центрах США, отбирались мужчины в возрасте 18–49 лет и женщины – 18–55 лет. Ранее вакцинированные оспенной вакциной добровольцы были в среднем на 10 лет старше невакцинированных. В группе ВИЧ-инфицированных добровольцев все участники получали антиретровирусную терапию; количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток составляло  $\geq 350$  клеток/мл, а количество ВИЧ-РНК в плаз-

ме <400 копий/мл. Группа ВИЧ-инфицированных добровольцев состояла из 61 человека, ранее вакцинированного оспенной вакциной, и 30 – невакцинированных. В группе здоровых добровольцев было по 30 человек, вакцинированных и не вакцинированных оспенной вакциной. Всех участников КИ иммунизировали MVA вакциной в дозе  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub> подкожно, а не вакцинированных ранее оспенной вакциной бустировали через 4 недели той же дозой.

Изучение безопасности вакцины IMVAMUNE® показало, что иммунизация не вызывала значительных изменений на ЭКГ, в биохимических показателях и количестве CD4<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с таковыми до иммунизации. Был зарегистрирован один случай кардиомиопатии, однако не была установлена его достоверная причинно-следственная связь с вакцинацией. Наиболее частыми побочными реакциями были головная боль и миалгия, а также зуд и болезненность в месте введения вакцины. В меньшей степени отмечались эритемы и припухлости, причем у ВИЧ-инфицированных добровольцев побочные реакции развивались значительно реже, чем у здоровых, хотя статистически достоверных различий выявлено не было. Различий в перечисленных симптомах в группах добровольцев, вакцинированных ранее оспенной вакциной, и невакцинированных не отмечено.

Через 2 недели после праймирования MVA вакциной уровни сероконверсии, определенные ИФА у ранее не вакцинированных оспенной вакциной ВИЧ-инфицированных и здоровых добровольцев почти не отличались и составляли 83 и 78% соответственно. Значения GMT равнялись 88 у ВИЧ-инфицированных и 98 – у здоровых. К исходу четвертой недели перед бустированием они повышались у здоровых добровольцев до значения 225, а у ВИЧ-инфицированных оставались на прежнем уровне. Пик иммунного ответа наступал через 2 недели после бустирования, и уровень значений GMT достигал 778 у ВИЧ-инфицированных и 1939 – у здоровых [30].

Наибольшие титры нейтрализующих антител определялись через 2 недели после бустирования, причем они почти не различались у ВИЧ-инфицированных и здоровых добровольцев.

У большинства ранее вакцинированных оспенной вакциной добровольцев, безотносительно их ВИЧ-статуса, перед испытанием выявлялись специфические антитела с уровнем значений GMT, равным 18–69, определенным обоими методами (ИФА и реакция нейтрализации), что подтверждает их статус ранее вакцинированных оспенной вакциной. Через 2 недели после бустерной вакцинации значения GMT

превышали в 16–17 раз таковые, выявленные перед началом исследования. Титры антител у здоровых и ВИЧ-инфицированных добровольцев значительно не различались. Следовательно, однократная иммунизация MVA вакциной обеспечивала бустирование предсуществующего иммунитета у здоровых и ВИЧ-инфицированных лиц. Клеточный иммунитет ни в этом, ни в последующих КИ не изучался.

Таким образом, в КИ I–II фаз R.N. Greenberg с соавт. [30] была показана безопасность MVA вакцины для лиц с иммунодефицитом. У всех добровольцев, ранее иммунизированных оспенной вакциной, бустирование MVA вакциной приводило к усилению предсуществующего иммунитета.

Безопасность и иммуногенность MVA вакцины для ВИЧ-инфицированных были показаны в КИ фазы II на здоровых и ВИЧ-инфицированных добровольцах [31]. КИ проводилось с июня 2006 по март 2009 г. в 36 центрах США и Пуэрто-Рико. Основным критерием для отбора здоровых добровольцев являлось отсутствие антител к ВИЧ и гепатиту С. ВИЧ-инфицированные добровольцы были отобраны при подтверждении заболевания СПИДом и количественном содержании CD4<sup>+</sup> Т-клеток равном 200–750 клеток/мл, вне зависимости от лечения антиретровирусными препаратами. Из 579 добровольцев в возрасте 18–55 лет 439 были не вакцинированы оспенной вакциной (88 здоровых, 351 ВИЧ-инфицированный) и 140 вакцинированы (9 здоровых, 131 ВИЧ-инфицированный). MVA вакцина вводилась подкожно в дозе  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub> дважды с перерывом в 4 недели.

У более чем 90% участников исследования отмечены побочные реакции легкой и средней тяжести в месте введения, в большей степени у ранее не вакцинированных оспенной вакциной. Побочные реакции были представлены болезненностью, припухлостью, эритемой в месте введения вакцины, а также головной болью, усталостью, тошнотой, ознобом, которые спонтанно проходили через 3–5 сут. Побочные реакции в большем количестве отмечались у добровольцев, ранее не вакцинированных оспенной вакциной. Отклонений на ЭКГ и в уровне тропонина в крови, связанных с вакцинацией, не наблюдалось. Количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток у ВИЧ-инфицированных добровольцев и уровень вирусной нагрузки были такими же, как и до вакцинации.

После иммунизации первой дозой вакцины 86% здоровых и 80% ВИЧ-инфицированных ранее невакцинированных оспенной вакциной добровольцев стали серопозитивными. После иммунизации второй дозой эти показатели выросли до 100 и 97,5% соответственно. Базовое

количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток не влияло на уровень серопозитивности у ВИЧ-инфицированных.

Титры вируснейтрализующих антител у добровольцев, ранее не вакцинированных оспенной вакциной, были низкими после введения первой дозы и повышались до уровня значений GMT равного 21,7 у здоровых и 13,1 – у ВИЧ-инфицированных. У ранее вакцинированных оспенной вакциной значения GMT, определенные ИФА, повышались после праймирования и составляли 461,1 у здоровых и 220,1 у ВИЧ-инфицированных добровольцев, увеличиваясь после бустирования до 612,9 и 588,4 соответственно. Значения GMT, определенные в реакции нейтрализации, после бустирования составляли 354,5 у здоровых и 88,9 – у ВИЧ-инфицированных.

Следовательно, у здоровых и ВИЧ-инфицированных добровольцев, ранее иммунизированных оспенной вакциной, введение вакцины на основе штамма *MVA* приводило к значительному бустированию предсуществующего иммунитета, что подтверждает сделанные ранее выводы, что оспенные вакцины индуцируют длительную В-клеточную память [31]. Стандартная доза вакцины на основе штамма *MVA* и режимы, установленные для здоровых субъектов, являются безопасными и иммуногенными у ВИЧ-инфицированных лиц, не иммунизированных и ранее иммунизированных оспенной вакциной [30, 31].

В дальнейшем было проведено КИ по определению иммуногенности и безопасности *MVA* вакцины по оценке риска развития миокардита. КИ проводилось в Германии с апреля 2006 по август 2007 г. с участием 745 добровольцев в возрасте 18–55 лет, здоровых, без клинических проявлений сердечных заболеваний, с нормальной ЭКГ и нормальными уровнями тропонина I в крови [32]. Все участники КИ были разделены на 4 группы. Добровольцы I–III групп ранее не были вакцинированы оспенной вакциной, IV группы – ранее однократно вакцинировались. Добровольцев I группы иммунизировали дважды *MVA* вакциной; II группы – один раз вакциной и один раз плацебо; III группы – дважды плацебо; IV группы – однократно *MVA* вакциной. *MVA* вакцина вводилась подкожно в дозе  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub>.

Через 10–15 сут после первой иммунизации и через 28–35 сут после второй оценивались побочные реакции: клинические кардиологические симптомы, изменения на ЭКГ и уровень содержания тропонина I.

В результате не выявлено различий на ЭКГ и в кардиологических симптомах между участниками КИ из всех четырех групп и не зафиксировано ни одного случая мио- или перикар-

дита. У добровольцев I, II и IV групп отмечались побочные реакции – у 98,9, 97,8, 97,0% соответственно, в то время как в III группе они наблюдались только у 56,9%. Эти побочные реакции развивались в месте введения вакцины: болезненность, эритема, припухлость, зуд, раздражение. У добровольцев III группы отмечены только болезненность и эритема. У добровольцев I группы наблюдались такие побочные реакции, как утомление, головная боль, миалгия и назофарингит, но развивались реже, чем у добровольцев из III группы, а в группе II частота этих побочных реакций не отличалась от группы III. Наиболее часто случаи утомления и миалгии фиксировались у участников КИ из группы IV. Хотя количество побочных реакций у добровольцев, иммунизированных *MVA* вакциной, было больше, чем у добровольцев после введения плацебо, все они были в основном связаны с реакциями в месте введения вакцины.

Таким образом, данные, полученные E.-M. Zitzman-Roth с соавт. [32], показали возможность применения *MVA* вакцины без риска развития осложнений со стороны сердца, включая миокардит.

Для оценки возможности иммунизации *MVA* вакциной людей с кожными заболеваниями в США и Мексике в 2009 г. было проведено КИ, включавшее 282 здоровых добровольца и 350 добровольцев с атопическим дерматитом (АД) [33]. Все участники КИ ранее не вакцинировались оспенной вакциной. Добровольцы были дважды вакцинированы *MVA* вакциной подкожно с интервалом в 4 недели дозой  $5 \times 10^7$  ЦПД<sub>50</sub>. В КИ проводилась оценка гуморального иммунного ответа через 1 и 4 недели после первой вакцинации и через 2 и 4 недели после второй.

Оценка безопасности иммунизации показала, что у добровольцев с АД побочные реакции проявлялись несколько чаще, чем у здоровых (67,4% против 59,6%). Как и предполагалось, у большинства участников КИ в обеих группах наблюдалось, по крайней мере, по одной побочной реакции в виде болезненности, эритемы или припухлости в месте введения. Такие побочные реакции, как повышение температуры тела, головная боль, миалгия, озноб, тошнота, усталость, чаще отмечались у добровольцев с АД (у 70,1%), чем у здоровых (56,4%). Реакции со стороны кожи и подкожной клетчатки также чаще отмечались в группе добровольцев с АД.

Уровни сероконверсии, определенные методами ИФА и PRNT, были сходны в обеих группах во всех временных точках. Пик сероконверсии через 2 недели после второй вакцинации, определяемый ИФА, наблюдался у 97,2% добровольцев

с АД и у 98,1% у здоровых, а в реакции нейтрализации – 88,0% у добровольцев с АД и 86,0% у здоровых. Уровни GMT были сходны в обеих группах, достигая к 6 неделе значений 516,0 в группе добровольцев с АД и 508,8 в группе здоровых. В других временных точках эти значения были схожими. Значения GMT вируснейтрализующих антител составляли 43,0 и 38,5 для добровольцев с АД и здоровых соответственно. Вакцинация не оказывала влияния на общее самочувствие добровольцев с АД, не ухудшала течения их заболевания, не влияла на показатели сердечной деятельности добровольцев обеих групп.

В данном КИ иммунизация MVA вакциной вызывала несколько большее количество побочных реакций у лиц с АД, чем у здоровых, при этом вакцинация не ухудшала течения заболевания добровольцев с АД, была равно иммуногенна для обеих групп и поэтому может применяться при АД.

Основные результаты клинического изучения вакцины на основе штамма MVA суммированы в *таблицах 1, 2*.

Анализ результатов проведенных КИ вакцины IMVAMUNE® показал, что основными побочными проявлениями при иммунизации являются реакции в месте введения вакцины: эритема, болезненность, зуд, припухлость. Из системных побочных реакций в редких случаях отмечены утомление, головная боль, миалгия, озноб; у незначительной части вакцинируемых – инфекция верхних дыхательных путей, тошнота, гастроэнтерит. Применение вакцины у лиц в возрасте 56–80 лет вызывало те же побочные реакции, что и у вакцинируемых в возрасте до 55 лет.

При оценке иммуногенности вакцины по уровню гуморального и клеточного иммунных ответов была выявлена линейная зависимость уровня сероконверсии от дозы вакцины и схемы введения. Наиболее оптимальной схемой введения является подкожное праймирование/бустирование дозой  $1 \times 10^8$  ЦПД<sub>50</sub> с интервалом 28 сут.

Предварительная иммунизация вакциной IMVAMUNE® уменьшала степень кожных поражений и вирусной диссеминации после последующего введения вакцины Dryvax, не препятствовала повышению уровня гуморального иммунного ответа и почти не влияла на индукцию Т-клеточного иммунитета.

В КИ с участием лиц в возрасте 56–80 лет установлено, что даже однократное введение

вакцины IMVAMUNE® способно бустировать ранее сформировавшийся противооспенный иммунитет. Двукратное введение вакцины индуцирует более высокий уровень иммунитета.

Безопасность и иммуногенность вакцины в группах ВИЧ-инфицированных и здоровых лиц была сходной, что позволяет применять ее у лиц с иммунодефицитными состояниями. Исследование вакцины с точки зрения кардиологической безопасности показало, что она может быть применена без риска развития нарушений сердечной деятельности, включая миоперикардит. Иммунизация не влияла на тяжесть протекания такого заболевания, как атопический дерматит, в связи с чем она может быть использована для лиц с этим заболеванием.

Вакцина на основе штамма MVA производства Bavarian Nordic под торговым названием Junneos™ была лицензирована Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) в сентябре 2019 г. и в настоящее время применяется для профилактики оспы обезьян у взрослых в возрасте 18 лет и старше<sup>3</sup>. Центрами по контролю и профилактике заболеваний (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) рекомендовано вводить вакцину не позднее 4 сут после заражения, что может предотвратить развитие болезни и уменьшить тяжесть симптомов [34].

В 2019 г. данная вакцина была одобрена для профилактики оспы обезьян [35, 36].

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора получен генетически стабильный [37] аттенуированный штамм VACΔ6 с делетированными генами вирулентности (C3L, N1L, J2R, A35R, A56R, B8R) для разработки на его основе живой культуральной аттенуированной вакцины против натуральной оспы (вакцина ОртопоксВак)<sup>4</sup>, которая была зарегистрирована 11 ноября 2022 г. [38]. Было показано, что вакцина защищает 100% мышей от заражения дозами 10 и 100 ЛД<sub>50</sub> вирулентного возбудителя (вирус экстремелии); при этом вирус не размножается в головном мозге, легких, печени, селезенке и крови и полностью выводится из организма. Вакцина характеризуется сниженной нейровирулентностью и более низкой реактивностью по воспалительно-некротическому тесту на коже кроликов. Вакцина на основе нового штамма прошла доклинические и клинические исследования и может

<sup>3</sup> FDA approves first live, non-replicating vaccine to prevent smallpox and monkeypox. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-live-non-replicating-vaccine-prevent-smallpox-and-monkeypox>  
<https://www.fda.gov/media/131078/download>

<sup>4</sup> Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>

Таблица 1. Характеристика клинических исследований (КИ) вакцин на основе штамма MVA  
Table 1. Characterisation of MVA-based vaccine clinical trials (CT)

№	Цель КИ CT aim	Место проведения Location	Возраст участников КИ, лет Age of CT subjects, years	Количество участ- ников КИ, человек Number of CT subjects, persons	Медицинский статус участников КИ Medical status of CT subjects	Источник Reference
1	Определение оптимальной дозы Determination of the optimal dose	Германия, США Germany, USA	18–30	164	Здоровые невакцинированные оспенной вакциной Healthy vaccinia-naive subjects	[20]
2	Определение схемы иммунизации Determination of the vaccination schedule	Германия, США Germany, USA	18–35	208	Здоровые невакцинированные оспенной вакциной Healthy vaccinia-naive subjects	[23]
3	Оценка способности бустировать пред- существующий иммунитет у доброволь- цев в возрасте 56–80 лет Evaluation of the ability to boost pre-existing immunity in volunteers aged 56–80	США USA	56–80	120	Здоровые вакцинированные оспенной вакциной Healthy vaccinia-experienced subjects	[29]
4	Оценка возможности применения у лиц с иммунодефицитом Evaluation of the possibility of use in subjects with immunodeficiency	США USA	18–55 женщины 18–49 мужчины Women, 18–55 Men, 18–49	91	ВИЧ-инфицированные и здоровые HIV-infected and healthy subjects	[30]
				60	Вакцинированные и невакцинированные оспенной вакциной Vaccinia-experienced and vaccinia-naive subjects	
5	Оценка возможности применения у лиц с иммунодефицитом Evaluation of the possibility of use in subjects with immunodeficiency	США, Пуэрто-Рико USA, Puerto Rico	18–55	579	ВИЧ-инфицированные и здоровые. Вакцинированные и невакцинированные оспенной вакциной HIV-infected and healthy subjects, Vaccinia-experienced and vaccinia-naive subjects	[31]
6	Оценка возможности применения у до- бровольцев с atopическим дерматитом Evaluation of the possibility of use in volunteers with atopic dermatitis	Германия Germany	18–40	350	С atopическим дерматитом и здоровые Patients with atopic dermatitis and healthy subjects	[33]
				282	Невакцинированные оспенной вакциной Vaccinia-naive subjects	
7	Влияние иммунизации на риск развития миоперикардита Influence of immunisation on the risk of myo- or pericarditis	Германия Germany	18–55	745	Здоровые Healthy subjects	[32]
8	Влияние иммунизации на последующее введение вакцины Dryvax Influence of immunisation on subsequent injection of the Dryvax vaccine	США USA	20–34	36	Здоровые Healthy subjects	[26]

Таблица 2. Результаты изучения иммуногенности вакцины IMVAMUNE® в клинических исследованиях  
Table 2. Results of IMVAMUNE® vaccine immunogenicity assessment in clinical trials

№	Доза вакцины, ЦПД <sub>50</sub> vaccine dose, TCID <sub>50</sub>	Интервал между праймированием и бустированием, сут Prime–boost interval, days	Наличие пред-варительной иммунизации традиционной оспенной вакциной Previous immunisation with a traditional vaccine	Индукированный гуморальный иммунный ответ, определенный методами Induced humoral immune response, determined by the following methods						Источник Reference		
				ИФА ELISA		Реакция нейтрализации PRNT						
				Сероконверсия, % Serococonversion, %		Значения GMT GMT values		Сероконверсия, % Serococonversion, %			Значения GMT GMT values	
1	2×10 <sup>7</sup> 5×10 <sup>7</sup> 1×10 <sup>8</sup>	28	Нет No	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	[20]		
				59,3 81,6 94,2	94,2	14,4 53,2 94,2	377,2 583,6 813,8	7–12 7–12 7–12	42,6 59,2 71,2		– – –	5,51 10,31 19,43
				– – 71,0	91,5 96,8	– – 56,6	108,7 501,7	– – 11,3	39,0 82,5		– – 8,1	10,8 30,2
2	1×10 <sup>8</sup>	7 28 Однократно Once	Нет No	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	[23]		
				– – 71,0	91,5 96,8	– – 56,6	108,7 501,7	– – 11,3	39,0 82,5		– – 8,1	10,8 30,2
3	1×10 <sup>8</sup>	28 (ММ группа MM group) Однократно Once (ПМ группа PM group)	Есть Yes	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	[29]		
				83,6	83,3	622,5	804,1	73,8	90,0		111,4	210,3
4	1×10 <sup>8</sup>	28	Нет No	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	[30]		
				83 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 78 (Здоровые Healthy)	–	88 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 98 (Здоровые Healthy)	778 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 1939 (Здоровые Healthy)	–	89 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 96 (Здоровые Healthy)		–	95 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 177 (Здоровые Healthy)
4	1×10 <sup>8</sup>	28	Есть Yes	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	После праймирования After priming	После бустирования After boosting	[30]		
				92 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 96 (Здоровые Healthy)	–	–	684 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 1176 (Здоровые Healthy)	–	91 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 95 (Здоровые Healthy)		–	336 (ВИЧ-инф. HIV-infect.) 761 (Здоровые Healthy)

Продолжение таблицы 2  
Table 2 (continued)

№	Доза вакцины, ЦПД <sub>50</sub> Vaccine dose, TCID <sub>50</sub>	Интервал между праймированием и бустированием, сут Prime-boost interval, days	Наличие пред-варительной иммунизации традиционной оспенной вакциной Previous immunisation with a traditional smallpox vaccine	Индукированный гуморальный иммунный ответ, определенный методами Induced humoral immune response, determined by the following methods						Источник Reference	
				ИФА ELISA			Реакция нейтрализации PRNT				
				Сероконверсия, % Seroconversion, %		Значения GMT GMT values	Сероконверсия, % Seroconversion, %		Значения GMT GMT values		
				После праймирования After priming	После бустирования After boosting		После праймирования After priming	После бустирования After boosting			
5	1×10 <sup>8</sup>	28	Нет No	86 (Здоровые Healthy) 80 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	100 (Здоровые Healthy) 97,5 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	- - -	19 (Здоровые Healthy) 30 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	81 (Здоровые Healthy) 61 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	- -	21,7 (Здоровые Healthy) 13,1 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	[31]
6	5×10 <sup>7</sup>	28	Нет No	100 (Здоровые Healthy) 93 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	99 (Здоровые Healthy) 99 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	461,1 (Здоровые Healthy) 220,1 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	80 (Здоровые Healthy) 80 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	100 (Здоровые Healthy) 90 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	- -	35,45 (Здоровые Healthy) 88,9 (ВИЧ-инф. HIV-infect.)	[33]

Примечание. «-» – нет данных, ИФА – иммуноферментный анализ, РН – реакция нейтрализации, ЦПД<sub>50</sub> – 50% цитопатическая доза, ММ группа – группа дважды иммунизированной вакциной с интервалом в 4 недели, ПМ группа – группа с введением одной инъекции плацебо и одной инъекции вакцины, ВИЧ-инф. – ВИЧ-инфицированные добровольцы, АД – добровольцы с atopическим дерматитом.

Note. -, no data; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; PRNT, plaque reduction neutralisation test; TCID<sub>50</sub>, 50% tissue culture infective dose; MM, two MVA vaccinations with a 4-week interval; MP group, one MVA vaccination and one placebo injection; HIV-inf., volunteers with human immunodeficiency virus infection; AD, volunteers with atopic dermatitis.

использоваться как безопасная эффективная вакцина четвертого поколения<sup>5</sup>.

## Заключение

Глобальная ликвидация натуральной оспы привела к отмене обязательного оспопрививания. В результате популяционный иммунитет населения большинства развитых стран к ортопоксвирусным инфекциям в настоящее время практически отсутствует. Однако постоянно циркулирующие в природе и вновь выявляемые ортопоксвирусы в любой момент могут привести к возникновению чрезвычайных ситуаций. Опыт прошлых лет показывает, что первичная иммунизация взрослых людей оспенными вакцинами может привести к развитию серьезных осложнений, вплоть до смертельных исходов. В связи с этим вопросы разработки и испытаний новых, более безопасных эффективных оспенных вакцин в настоящее время являются очень актуальными.

## Литература/References

1. Silva NIO, de Oliveira JS, Kroon EG, Trindade GS, Drumond BP. Here, there, and everywhere: the wide host range and geographic distribution of zoonotic orthopoxviruses. *Viruses*. 2020;13(1):43. <https://doi.org/10.3390/v13010043>
2. Gao J, Gigante C, Khmaladze E, Liu P, Tang S, Wilkins K, et al. Genome sequences of Akhmeta virus, an early divergent Old World Orthopoxvirus. *Viruses*. 2018;10(5):252. <https://doi.org/10.3390/v10050252>
3. Gruber CEM, Giombini E, Selleri M, Tausch SH, Andrusch A, Tyshaieva A, et al. Whole genome characterization of Orthopoxvirus (OPV) Abatino, a zoonotic virus representing a putative novel clade of Old World Orthopoxviruses. *Viruses*. 2018;10:546. <https://doi.org/10.3390/v10100546>
4. Gigante CM, Gao J, Tang S, McCollum A, Wilkins K, Reynolds MG, et al. Genome of Alaskapox virus, a novel orthopoxvirus isolated from Alaska. *Viruses*. 2019;11(8):708. <https://doi.org/10.3390/v11080708>
5. Lanave G, Dowgier G, Decaro N, Albanese F, Brogi E, Parisi A, et al. Novel orthopoxvirus and lethal disease in cat, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2018;24(9):1665–73. <https://doi.org/10.3201/eid2409.171283>
6. Fenner F, Henderson DA, Arita L, Ježek Z, Ladnyi ID. *Smallpox and its eradication*. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1988. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39485>
7. Rehm KE, Roper RL. Deletion of the A35 gene from Modified Vaccinia Virus Ankara increases immunogenicity and isotype switching. *Vaccine*. 2011;29(17):3276–83. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.023>
8. Nalca A, Zumbum EE. ACAM2000™: the new smallpox vaccine for United States Strategic National Stockpile. *Drug Des Devel Ther.* 2010;4:71–9. <https://doi.org/10.2147/dddt.s3687>
9. Wollenberg A, Engler R. Smallpox, vaccination and adverse reactions to smallpox vaccine. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4(4):271–5. <https://doi.org/10.1097/01.all.0000136758.66442.28>
10. Meseda CA, Atukorale V, Kuhn J, Schmeisser F, Weir JP. Percutaneous vaccination as an effective method of delivery of MVA and MVA-vectored vaccines. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149364>
11. Melamed S, Israely T, Paran N. Challenges and achievements in prevention and treatment of smallpox. *Vaccines*. 2018;6(1):8. <https://doi.org/10.3390/vaccines6010008>
12. Hermanson G, Chun S, Felgner J, Tan X, Pablo J, Nakajima-Sasaki R, et al. Measurement of antibody responses to Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) and Dryvax® using proteome microarrays and development of recombinant protein ELISAs. *Vaccine*. 2012;30(3):614–25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.021>
13. Guerra S, Gonsáles JM, Climent N, Reuburn H, López-Fernández LA, Nájera JL, et al. Selective induction of host genes by MVA-B, a candidate vaccine against HIV/AIDS. *J Virol.* 2010;84(16):8141–52. <https://doi.org/10.1128/JVI.00749-10>

<sup>5</sup> <https://pharmvestnik.ru/content/news/Centr-Vektor-poluchil-patent-na-vakcinu-ot-ospy-obezyan.html>

14. Mayr A, Stickl H, Müller HK, Danner K, Singer H. Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus. *Zentralbl Bakteriol B*. 1978;167:375–90.
15. Garsía AD, Meseda CA, Mayer AE, Kumar A, Merchlinsky M, Weir JP. Characterization and use of mammalian-expressed vaccinia virus extracellular membrane proteins for quantification of the humoral immune response to smallpox vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(8):1032–44. <https://doi.org/10.1128/CVI.00050-07>
16. Grandpre LE, Duke-Cohan JS, Ewald BA, Devoy C, Barouch DH, Letvin NL, et al. Immunogenicity of recombinant Modified Vaccinia Ankara following a single or multi-dose vaccine regimen in rhesus monkeys. *Vaccine*. 2009;27(10):1549–56. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.010>
17. Meseda CA, Garcia AD, Kumar A, Mayer AE, Manischewitz J, King LR, et al. Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology*. 2005;339(2):164–75. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.002>
18. Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Exp Med*. 2007;204(6):1405–16. <https://doi.org/10.1084/jem.20062363>
19. Volz A, Sutter G. Modified Vaccinia Virus Ankara: history, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv Virus Res*. 2017;97:187–243. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.07.001>
20. von Krempelhuber B, Vollmar J, Pokorny R, Rapp P, Wulff N, Petzold B, et al. A randomized, double-blind, dose-finding phase II study to evaluate immunogenicity and safety of the third generation smallpox vaccine candidate IMVAMUNE®. *Vaccine*. 2010;28(5):1209–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.030>
21. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, et al. Efficacy of prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women an interim analysis of a phase III double-blind, randomized controlled trial. *Lancet*. 2007;369(9580):2161–70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60946-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60946-5)
22. Damon IK, Davidson WB, Hughes CM, Olson VA, Smith SK, Holman RC, et al. Evaluation of smallpox vaccines using variola neutralization. *J Gen Virol*. 2009;90(8):1962–66. <https://doi.org/10.1099/vir.0.010553-0>
23. Frey SE, Winokur PL, Salata RA, El-Kamary SS, Turley CB, Walter EB Jr, et al. Safety and immunogenicity of IMVAMUNE® smallpox vaccine using different strategies for post event scenario. *Vaccine*. 2013;31(29):3025–33. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.04.050>
24. Frey SE, Winokur PL, Hill H, Goll JBN, Chaplin P, Belshe RB. Phase II randomized, double-blinded comparison of a single high dose ( $5 \times 10^8$ TCID<sub>50</sub>) of modified vaccinia Ankara compared to a standard dose ( $1 \times 10^8$ TCID<sub>50</sub>) in healthy vaccinia-naïve individuals. *Vaccine*. 2014;32(23):2732–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.043>
25. Frey SE, Newman FK, Kennedy JS, Sobek V, Ennis FA, Hill H, et al. Clinical and immunologic responses to multiple doses of IMVAMUNE® (Modified Vaccinia Ankara) followed by Dryvax® challenge. *Vaccine*. 2007;25(51):8562–73. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.017>
26. Seaman MS, Wilck MB, Baden LR, Walsh SR, Grandpre LE, Devoy C, et al. Effect of vaccination with modified vaccinia Ankara (ACAM3000) on subsequent challenge with Dryvax. *J Infect Dis*. 2010;201(9):1353–60. <https://doi.org/10.1086/651560>
27. Parrino J, McCurdy LH, Larkin BD, Gordon IJ, Rucker SE, Enama ME, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax challenge in vaccinia-naïve and vaccinia-immune individuals. *Vaccine*. 2007;25(8):1513–25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.047>
28. Pfister G, Savino W. Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(4–6):351–64. <https://doi.org/10.1159/000156477>
29. Greenberg RN, Hay CM, Stapleton JT, Marbury TC, Wagner E, Kreitmair E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial investigating the safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara smallpox vaccine (MVA-BN®) in 56–80-year-old subjects. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157335>
30. Greenberg RN, Overton ET, Haas DW, Frank I, Goldman M, von Krempelhuber A, et al. Safety, immunogenicity and surrogate markers of clinical efficacy for modified vaccinia Ankara as a smallpox vaccine in HIV-infected subjects. *J Infect Dis*. 2013;207(5):749–58. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis753>
31. Overton ET, Stapleton J, Frank I, Hassler S, Goepfert PA, Barker D, et al. Safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara-Bavarian Nordic smallpox vaccine in vaccinia-naïve and experienced human immunodeficiency virus-infected individuals: an open-label, controlled clinical phase II trial. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2(2):ofv040. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv040>
32. Zitzman-Roth E-M, von Sonnenburg F, de la Motte S, Arndtz-Wiedemann N, von Krempelhuber A, Uebler N, et al. Cardiac safety of modified vaccinia Ankara for vaccination against smallpox in a young, healthy study population. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122653>
33. Greenberg RN, Hurley MY, Dinh DV, Mraz S, Vera JG, von Bredow D, et al. A multicenter, open-label, controlled phase II study to evaluate safety and immunogenicity of MVA smallpox vaccine (IMVAMUNE) in

- 18–40 year old subjects with diagnosed atopic dermatitis. *PLoS One*. 2015;10(10): e0138348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138348>
34. Hraib M, Jouni S, Albitar M, Alaidi S, Alshehabi Z. The outbreak of monkeypox 2022: an overview. *Ann Med Surg (Lond)*. 2022;79:104069. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104069>
35. Velavan TP, Meyer CG. Monkeypox 2022 outbreak: an update. *Trop Med Int Health*. 2022;27(7):604–5. <https://doi.org/10.1111/tmi.13785>
36. Rizk JG, Lippi G, Henry BN, Forthal DN, Rizk Y. Prevention and treatment of monkeypox. *Drugs*. 2022;82(9):957–63. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01742-y>
37. Максюттов РА, Якубицкий СН, Колосова ИВ, Трегубчак ТВ, Швалов АН, Гаврилова ЕВ, Щелкунов СН. Стабильность генома вакцинного штамма VACΔ6. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):394–401. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-48>
38. Максюттов РА, Якубицкий СН, Колосова ИВ, Щелкунов СН. Сравнение кандидатных вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека. *Acta Naturae*. 2017;9(2):93–99. <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-88-93>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.Ф. Стовба** – формирование концепции статьи, написание текста рукописи, составление таблиц; **О.В. Чухраля** – анализ данных научной литературы по проблематике оспопрививания, переработка текста рукописи; **Н.К. Черникова** – критический пересмотр и редактирование текста рукописи; **А.Л. Хмелев** – редактирование текста рукописи; **С.В. Борисевич** – сбор и анализ научной литературы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

**Благодарности.** Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** С.В. Борисевич является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.F. Stovba** conceptualised the study, drafted the manuscript, and prepared the tables. **O.V. Chukhralya** analysed scientific literature on smallpox vaccination and revised the manuscript. **N.K. Chernikova** critically reviewed and corrected the manuscript. **A.L. Khmelev** edited the manuscript. **S.V. Borisevich** collected and analysed scientific literature and approved the final version of the manuscript for publication.

**Acknowledgements.** The study was performed without external funding.

**Conflict of interest.** S.V. Borisevich is a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

**Стовба Людмила Федоровна**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>  
[48cnii@mail.ru](mailto:48cnii@mail.ru)

**Чухраля Олег Васильевич**.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2603-0860>  
[48cnii@mail.ru](mailto:48cnii@mail.ru)

**Черникова Наталья Константиновна**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>  
[48cnii@mail.ru](mailto:48cnii@mail.ru)

**Хмелев Алексей Леонидович**, канд. мед. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6686-320X>  
[hmeleval@mail.ru](mailto:hmeleval@mail.ru)

**Борисевич Сергей Владимирович**, д-р биол. наук, проф., акад. РАН.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>  
[48cnii@mail.ru](mailto:48cnii@mail.ru)

**Lyudmila F. Stovba**, Cand. Sci. (Biol.).  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>  
[48cnii@mail.ru](mailto:48cnii@mail.ru)

**Oleg V. Chukhralya**.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2603-0860>  
[48cnii@mail.ru](mailto:48cnii@mail.ru)

**Natalya K. Chernikova**, Cand. Sci. (Biol.).  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>  
[48cnii@mail.ru](mailto:48cnii@mail.ru)

**Aleksey L. Khmelev**, Cand. Sci. (Med.).  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6686-320X>  
[hmeleval@mail.ru](mailto:hmeleval@mail.ru)

**Sergey V. Borisevich**, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>  
[48cnii@mail.ru](mailto:48cnii@mail.ru)

Поступила 27.07.2022

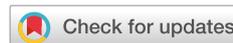
После доработки 08.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 27 July 2022

Revised 8 February 2023

Accepted 13 March 2023



## Прогресс в разработке вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья и перспективы появления на рынке

Е.В. Отрашевская<sup>1</sup>, В.П. Трухин<sup>1</sup>, В.А. Меркулов<sup>2</sup>, Г.М. Игнатъев<sup>3,✉</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства, ул. Свободы, д. 52, г. Красное Село, Санкт-Петербург, 198320, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

✉ Игнатъев Георгий Михайлович; [marburgman@mail.ru](mailto:marburgman@mail.ru)

### Резюме

Лихорадка Чикунгунья представляет собой острое инфекционное заболевание, которое вызывается вирусом Чикунгунья (ЧИКВ) и распространяется комарами. В последние десятилетия эта инфекция зарегистрирована в более чем 100 странах и превратилась в глобальную проблему для здравоохранения. В связи с тем что антигенные различия между генотипами ЧИКВ незначительны и повторные случаи инфицирования практически не регистрируют, вакцина могла бы не только предотвратить заболевание и возможную потерю трудоспособности, но и уменьшить эпидемическое распространение ЧИКВ среди населения.

**Цель работы** – анализ направлений разработки вакцинных препаратов для профилактики лихорадки Чикунгунья, оценка перспективных препаратов, вышедших на этапы доклинических (ДКИ) и клинических исследований (КИ), а также анализ перспектив и проблем вывода препаратов на фармацевтический рынок.

Анализ научной литературы показал, что при разработке вакцин, продолжающейся уже несколько десятилетий, используются как традиционные, так и новейшие технологические платформы. Каждая технологическая платформа имеет свои недостатки и преимущества. На данном этапе около 25 разработок достаточно успешно прошли этап ДКИ и более 7 находятся на разных стадиях КИ. Самыми популярными являются платформа живых аттенуированных вакцин, а также платформа вакцин с использованием векторных конструкций. Препараты, находящиеся в разных фазах КИ, представлены живыми аттенуированными вакцинами (четыре препарата), инактивированным (один препарат), содержащим вирусоподобные частицы (один препарат) и созданным на основе мРНК (один препарат). Для всех семи вакцин была продемонстрирована перекрестная защита от штаммов ЧИКВ разных генотипов или на стадии ДКИ *in vivo* и/или на стадии КИ *in vitro*. Исследования продолжаются, что подтверждает наличие не только научного интереса, но также ожиданий системы здравоохранения к выводу на фармацевтический рынок эффективных вакцин против лихорадки Чикунгунья.

**Ключевые слова:** вирус Чикунгунья; эпидемиология; вакцины; технологические платформы; вывод препарата на фармацевтический рынок

**Для цитирования:** Отрашевская Е.В., Трухин В.П., Меркулов В.А., Игнатьев Г.М. Прогресс в разработке вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья и перспективы появления на рынке. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):42–64. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-42-64>

## Chikungunya vaccines: advances in the development and prospects for marketing approval

E.V. Otrashevskaja<sup>1</sup>, V.P. Trukhin<sup>1</sup>, V.A. Merkulov<sup>2</sup>, G.M. Ignatyev<sup>3,✉</sup>

<sup>1</sup> The Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, 52 Svobody St., Krasnoe Selo, Saint Petersburg 198320, Russian Federation

<sup>2</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

<sup>3</sup> I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5a Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

✉ Georgy M. Ignatyev; [marburgman@mail.ru](mailto:marburgman@mail.ru)

### Abstract

Chikungunya fever is an acute infectious disease caused by the mosquito-borne *Chikungunya virus* (CHIKV). In the last decades, cases of the disease have been reported in more than 100 countries; therefore, CHIKV presents a global public health problem. CHIKV genotypes have limited antigenic diversity, and documented reinfection is very rare. Hence, a vaccine could prevent infection and potential disability, as well as reduce the epidemic spread of CHIKV in the population.

**The aim of the study** was to review approaches to the development of preventive vaccines against CHIKV, evaluate promising vaccine candidates in preclinical or clinical development stages, and analyse perspectives and challenges of bringing these vaccines to the pharmaceutical market.

According to the literature reviewed, both traditional and modern platforms are used in the development of CHIKV vaccines, which has been ongoing for several decades. Each platform has its advantages and limitations. The most popular platforms are live attenuated vaccines and vaccines with viral vector constructs. To date, about 25 vaccine candidates have successfully passed through preclinical studies, and more than 7 vaccine candidates have progressed to various phases of clinical studies. The preventive medicinal products that have reached the clinical development stage include 4 live attenuated vaccines, 1 inactivated vaccine, 1 vaccine containing virus-like particles, and 1 mRNA vaccine. All 7 candidates have demonstrated cross-protection against multiple genotypes of CHIKV at the level of either preclinical *in vivo* studies and/or clinical *in vitro* studies. The research continues, and this shows that not only the scientific community but also health systems are interested in bringing effective CHIKV vaccines to the pharmaceutical market.

**Key words:** *Chikungunya virus*; epidemiology; vaccines; technological platforms; bringing vaccines to the pharmaceutical market

**For citation:** Otrashevskaja E.V., Trukhin V.P., Merkulov V.A., Ignatyev G.M. Chikungunya vaccines: advances in the development and prospects for marketing approval. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):42–64. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-42-64>

## Введение

В последние десятилетия, следуя путем, положенным вирусом денге, другой арбовирус, Чикунгунья, превратился в серьезную глобальную угрозу для здоровья населения, распространяясь на запад и на восток, от Восточной Африки до Азии и в конце концов появившись в Новом Свете и Европе. Вирус Чикунгунья (ЧИКВ) известен с 1952 г., а в 1956 г. ЧИКВ был идентифицирован, отнесен к группе альфавирусов и получил свое название от слова «чикунгунья», которым в Танзании обозначают симптом поражения суставов, «то, что изгибается».

ЧИКВ имеет долгую историю со вспышками различных масштабов в эндемичных районах Африки и Юго-Восточной Азии. В Африке ЧИКВ характеризовался, как правило, ограниченным распространением. В Азии при низком уровне трансмиссии периодически наблюдались крупные вспышки среди городского населения. Крупные эпидемии заболевания появлялись и исчезали циклически, обычно с интервалом от 7 до 20 лет. Однако такие эпидемиологические закономерности остались в прошлом. После 2004 г. эпидемический процесс стал характеризоваться более частыми вспышками, адаптацией вируса к новым экологическим условиям и, соответственно, быстрым географическим распространением. В 2004–2009 гг. внезапная эпидемия лихорадки Чикунгунья затронула 31 млн человек в регионе Индийского океана [1].

В 2013 г. ЧИКВ получил беспрецедентно широкое распространение в Западном полушарии. После этого в течение двух лет вспышки лихорадки Чикунгунья были зарегистрированы в 45 странах Северной, Центральной и Южной Америки [2, 3]. В 2019 г. в Бразилии было зарегистрировано около 100 тысяч случаев лихорадки, кроме этого, отмечались случаи лихорадки Чикунгунья в Боливии, Никарагуа и Венесуэле [4]. Также были отмечены случаи в странах Индийского океана, таких как Таиланд, Малайзия и Индия, и в нескольких африканских странах, включая Эфиопию, Конго и Судан [5]. Способность ЧИКВ к внезапному появлению и быстрому распространению на новые регионы требует проведения постоянного и усиленного эпидемиологического мониторинга, а также постоянной готовности органов здравоохранения к действиям в случае вспышки заболевания. Необходимо иметь в виду, что путешественники могут выступать в качестве «перевозчиков» вируса [6]. Так, в 2007 г. в Италии, впервые в Европе, были зарегистрированы автохтонные случаи лихорадки Чикунгунья. А затем они были зарегистрированы в 114 странах Африки, Азии, Оке-

ании, Америки и Европы с тропическим и субтропическим климатом, где проживает более половины населения планеты [7]. В 2013 г. были подтверждены автохтонные случаи лихорадки Чикунгунья на острове Сен-Мартен и во французской Вест-Индии [2, 3].

Согласно филогенетическому анализу, выполненному S.M. Volk с соавт. [8], циркулирующие в настоящее время ЧИКВ имеют предка, который существовал в течение последних 500 лет. Таким образом, ЧИКВ является «старым», но вновь ставшим актуальным вирусом семейства *Togaviridae*. Нуклеокапсид ЧИКВ, диаметром 20–30 нм, состоит из молекулы РНК, защищенной от внешней среды белком С. Геномная РНК имеет такую же структуру, как и у других представителей рода *Alphavirus*, и состоит из четырех неструктурных и шести структурных протеинов: капсид (С), 6К, ТF и поверхностные (Е) Е1, Е2 и Е3. Нуклеокапсид вируса окружен двухслойной липидной мембраной, содержащей вставки трансмембранных гликопротеинов Е1 и Е2. Белок Е1 является белком слияния, белок Е2 взаимодействует с рецепторами клеток. Эпитопное картирование антигенных детерминант белка Е2 подтвердило, что данный протеин является главной мишенью для специфических нейтрализующих антител (АТ) при лихорадке Чикунгунья [9, 10].

Известны четыре генотипа ЧИКВ: западноафриканский (West African, Waf), восточно/центрально/южноафриканский (East/Central/Southern African, ECSA), азиатский (Asian), и некоторые исследователи выделяют генотип Индийского океана (Indian Ocean Lineage, IOL) [8, 11, 12]. Структурные расхождения между отдельными генотипами ЧИКВ в определенной степени отражают путь его глобальной трансмиссии [8]. Известны два разных цикла трансмиссии ЧИКВ: сивьватический (энзоотический) и эндемический/эпидемический городской цикл [6]. Сивьватический цикл трансмиссии поддерживается преимущественно в лесах Африки комарами определенных видов рода *Aedes* в качестве вектора и приматами, грызунами и птицами в качестве резервуара. Однако сивьватический цикл может время от времени затрагивать и местное население, вызывая небольшие вспышки инфекции [6, 13]. В основном трансмиссия при городском цикле поддерживается *A. aegypti*, кроме отдельных вариантов ЧИКВ генотипов ESCA и IOL, которые обладают адаптивными мутациями для эффективной трансмиссии *A. albopictus* [14, 15]. Филогенетический анализ ЧИКВ, участвующего в трансмиссивном цикле комар *A. albopictus*–человек в разных географических регионах, показал,

что они обладают общей мутацией в поверхностном гликопротеине E1 A226V. Благодаря этой *A. albopictus*-адаптивной мутации ЧИКВ смог попасть в Европу [14, 15]. Комары *A. albopictus* имеют более широкий ареал распространения (около 40% всей территории суши), чем *A. aegypti*. Таким образом, единственная аминокислотная замена в гликопротеине E1 оказалась достаточной для того, чтобы возбудитель, вызывающий локальные вспышки в ограниченных регионах, превратился в этиологического агента, представляющего угрозу для здравоохранения многих стран.

Вирусная инфекция Чикунгунья стала проблемой для системы здравоохранения также из-за отсутствия специфической профилактики и эффективных противовирусных препаратов. Летальность при лихорадке Чикунгунья невысокая, преимущественно среди новорожденных, лиц пожилого возраста, а также пациентов с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем [2, 6]. Бессимптомное течение наблюдается в 4–28% случаев, в зависимости от возраста пациента и генотипа ЧИКВ [16]. В типичных случаях инкубационный период составляет 2–12 суток, за которым следует острая фаза, сопровождающаяся у большинства пациентов лихорадкой, выраженными мышечными и суставными болями, а также сыпью. Инфекция, вызванная ЧИКВ, сопровождается персистенцией вируса в клетках лимфоидной, мышечной тканей, а также в фибробластах капсул суставов. Причиной артритического поражения суставов являются иммуноопосредованные механизмы, запускаемые выраженной продукцией провоспалительных медиаторов [17–20]. Критическая роль клеточного иммунитета для контроля и клиренса вируса при инфицировании ЧИКВ была доказана многими исследованиями [6, 17–20], однако его роль не до конца изучена. Так, например, экспериментально доказано, что ЧИКВ способен персистировать в клетках околосуставных тканей, уклоняясь от иммунного ответа CD8<sup>+</sup> Т-клеток [20], приводя к хронизации патологического процесса. Хроническое течение лихорадки может достигать 60%, как это, например, наблюдалось на французском Реюньоне [21]. Хронизация патологического процесса характеризуется выраженными персистирующими или рецидивирующими болями в мелких суставах конечностей по типу ревматоидного артрита и коленях. Боли могут беспокоить от нескольких месяцев до нескольких лет, значительно влияя на качество жизни, и нередко приводят к длительной утрате трудоспособности [20–22].

Перечисленные выше факторы делают вакцинацию необходимым и наиболее перспективным путем профилактики лихорадки Чикунгунья, а разработку эффективной вакцины крайне важной задачей. РНК ЧИКВ достаточно консервативна. Циркулирующие генотипы ЧИКВ генетически близки и составляют единый серотип [23]. Считается, что перенесенная инфекция, вызванная ЧИКВ, обеспечивает пожизненный иммунитет, повторные случаи инфицирования практически не регистрируются [1–3]. В экспериментах на мышах и макаках была подтверждена перекрестная защита между разными генотипами ЧИКВ, а также взаимная перекрестная защита среди других альфа-вирусов [24]. В качестве лабораторных животных на этапах доклинических исследований (ДКИ) используют белых мышей различных линий. Взрослые иммунодефицитные мыши, как, например, мыши AG129, используются для моделирования летальной инфекции [25–28]. Для изучения эффективности различных препаратов, а также вакцин в нелетальной модели используются иммунокомпетентные мыши C57BL/6, Swiss albino или BALB/c [29–32]. Для экспериментального изучения лихорадки Чикунгунья основной моделью являются низшие приматы, так как они являются естественными хозяевами ЧИКВ в природе. Патогенез заболевания у приматов имеет схожую клиническую картину, от лихорадки и сыпи вплоть до развития персистирующей инфекции с поражением суставов, как, например, у *Synomolgus macaques* [23, 32, 33].

Цель работы – анализ направлений разработки вакцинных препаратов для профилактики лихорадки Чикунгунья, оценка перспективных препаратов, вышедших на этапы доклинических и клинических исследований, а также анализ перспектив и проблем вывода препаратов на фармацевтический рынок.

## Вакцины против лихорадки Чикунгунья на стадии доклинических исследований

### Инактивированные вакцины

Технология производства инактивированных вакцин является традиционной и успешной для большого количества имеющихся на рынке препаратов. Данная технологическая платформа признана достаточно безопасной, и разработка таких вакцин не требует генетических манипуляций с вирусом.

Первая кандидатная вакцина для профилактики лихорадки Чикунгунья была разработана на основе традиционной технологии более 50 лет назад, когда V. Harrison, L. Binn и R. Randall,

используя инактивированный формалином штамм ЧИКВ 15561 и линию клеток почек зеленых обезьян (GMK 10915), разработали эффективный препарат. Вакцинный штамм ЧИКВ 15561 был получен путем выделения вируса от пациентов в Таиланде с последующим пассированием через куриные эмбрионы, мозг мыш-шей-сосунков и культур клеток GMK 10915 [34]. В ответ на введение вакцинного штамма ЧИКВ у обезьян *Rhesus macaques* были обнаружены специфические АТ, обладавшие защитой от гетерологичных штаммов ЧИКВ *in vivo*. В первой фазе клинических исследований (КИ) на 16 добровольцах после двукратной иммунизации было продемонстрировано отсутствие каких-либо реакций, местных и системных. У большинства добровольцев на 28 сутки в сыворотке крови были обнаружены нейтрализующие АТ. Однако, несмотря на результаты I фазы КИ, дальнейшая разработка препарата в те годы была прекращена из-за ограниченного финансирования и особенностей эпидемиологии ЧИКВ [35].

На данном этапе ДКИ успешно прошли два формалин-инактивированных препарата, произведенные с использованием клеточной линии Vero [36, 37]. Обе вакцины после введения стимулировали развитие специфического гуморального и клеточного иммунитета, а также продемонстрировали протективные свойства при заражении мыш-ей гетерологичными штаммами ЧИКВ. В относительно небольших сравнительных исследованиях на мыш-ах линии BALB/c было продемонстрировано преимущество инактивированного бета-пропиолактоном препарата ЧИКВ над формалин-инактивированным в формировании специфического иммунитета [37].

Следует отметить, что стабильность и безопасность инактивированных вакцин достижима исключительно за счет затрат на организацию производства, требующего для работы с ЧИКВ соблюдения определенных условий биобезопасности, а также постоянного контроля за полнотой инактивации вируса. Все это увеличивает стоимость производства и в определенной степени ограничивает доступность инактивированного препарата для широких масс населения. Поэтому неудивительно, что на данном этапе большинство кандидатных вакцинных препаратов разрабатываются на основе других технологических платформ с применением возможностей современной биотехнологии, и некоторые успешно прошли ДКИ.

### Субъединичные вакцины

В противоположность инактивированным вакцинам на основе «дикого» штамма ЧИКВ произ-

водство субъединичных препаратов не требует организации особых условий биобезопасности. Технология создания таких вакцин хорошо известна и широко используется, так как позволяет при необходимости быстро масштабировать производственный процесс. Использование отдельных белков ЧИКВ в разных комбинациях дает возможность разрабатывать и исследовать сразу несколько вариантов вакцины, подбирая наиболее эффективные композиции. Изучение иммуногенности поверхностных гликопротеинов E1 и/или E2 ЧИКВ привело сразу несколько научных групп к разработке разных вариантов вакцины [37–39]. Опубликованные данные демонстрируют необходимость введения нескольких или больших доз препарата, при этом эффективность вакцины зависела от природы адъюванта и от его объема. В целом у лабораторных животных после иммунизации наблюдалось развитие специфического иммунитета (формирование нейтрализующих антител) и регистрировалась частичная защита от заражения другими генотипами ЧИКВ [37–39]. Исследования по поиску наиболее эффективной конструкции субъединичной вакцины против лихорадки Чикунгунья продолжаются.

### Живые вакцины

Живые вакцины, разработанные для профилактики лихорадки Чикунгунья, содержат в основе вирус с модифицированной структурой, но с сохраненной иммуногенной активностью [25–27, 29]. По сравнению с инактивированными препаратами живые аттенуированные вакцины (ЖАВ) содержат «живой» ослабленный штамм ЧИКВ, который способствует формированию выраженного и длительного иммунитета после введения. Однако высокая иммуногенность сочетается с вынужденным компромиссом относительно безопасности таких вакцин. Так, одна из разработанных против лихорадки Чикунгунья вакцина уже на стадии I фазы КИ продемонстрировала высокую иммуногенность наряду с реактогенностью, в том числе за счет реверсии мутаций в гене белка E2 ЧИКВ [26]. Достижения обратной генетики альфавирусов позволяют «проектировать» рациональный дизайн аттенуированных вариантов ЧИКВ. Кандидатные вакцинные штаммы могут содержать очень специфические мутации и альтерации генома ЧИКВ для создания наилучшего профиля безопасности [32, 33, 40–45], а также повышения специфичности и уровня экспрессии, что в итоге позволяет достичь протективного уровня специфических АТ после однократного введения препарата [11, 46, 47]. Тем не менее вероятность

реверсии или компенсаторных мутаций ЧИКВ необходимо всегда иметь в виду. Разработка аттенуированных вакцин предусматривает тщательную проверку безопасности и на стадии ДКИ, и на I фазе КИ [28], что предполагает определенные затраты ресурсов и времени.

Платформа аттенуированных вакцин остается достаточно перспективной и может сочетаться с другими платформами и технологиями. Так, например, вызывает интерес разработка с заменой промотора в геноме ЧИКВ на IRES (internal ribosome entry site) вируса энцефаломиокардита. Такая конструкция препятствует трансмиссии живого аттенуированного арбовируса комарами [28, 48, 49] и тем самым усиливает профиль безопасности вакцины, что особенно важно в эндемичных регионах. Технология аттенуированных вакцин может сочетаться также с использованием систем доставки. Так, использованный высокостабильный наноллипидный носитель живой аттенуированной РНК ЧИКВ позволил E. Voigt с соавт. [50] значительно уменьшить влияние условий культивирования вируса на его биологическую активность и производить препарат в бесклеточной среде в любых масштабах, таким образом упрощая производство. В таблице 1 представлено краткое описание некоторых живых аттенуированных вакцин, результаты ДКИ которых были опубликованы.

#### **Вакцины, содержащие вирусоподобные частицы**

Вакцины с использованием вирусоподобных частиц (ВПЧ), как правило, являются достаточно иммуногенными и при этом более безопасными, чем инактивированные или субъединичные препараты. Гликопротеины в составе ВПЧ находятся в нативной конформации, следовательно, эпитопы на поверхности белков презентуются клеткам иммунной системы так же, как и на «живых» вирионах, что важно при клиническом применении ВПЧ. В отличие от вируса «дикого» типа ВПЧ не содержат вирусную РНК и поэтому являются неинфекционными. ВПЧ могут продуцироваться в различных экспрессионных системах. Каждая из систем клонирования и экспрессии имеет свои недостатки и преимущества. Несмотря на то что разработки препаратов ВПЧ против лихорадки Чикунгунья стартовали позже, чем разработки с использованием традиционных технологий, несколько препаратов прошли ДКИ, а наиболее успешные и перспективные уже находятся на разных стадиях КИ. Для продукции ВПЧ наиболее широко применяется бакуловирусная экспрессионная система в клетках насекомых [39, 51, 52]. Однако следует иметь в виду, что экспрессия в клетках насекомых белков

вируса приводит к накоплению в культуральной жидкости не только соответствующих ВПЧ, поэтому на дальнейших этапах производства требуется этап очистки. Из низших эукариот хорошо изучены и широко используются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* [30]. Дрожжи представляют собой один из важнейших промышленных микроорганизмов, поэтому интенсивная разработка исследований по созданию векторной дрожжевой системы продолжает быть актуальной в настоящее время. В таблице 1 представлена краткая характеристика некоторых вакцин против лихорадки Чикунгунья на основе ВПЧ, результаты ДКИ которых представляются перспективными.

#### **Векторные вакцины**

Одной из наиболее эксплуатируемых конструкций для производства высокоиммуногенных вакцин являются векторные конструкции, не патогенные для человека и эффективные для переноса генетических элементов ЧИКВ. Достаточное количество разнообразных векторных систем разработано и используется для производства различных вакцинных препаратов. Векторные вакцины обладают преимуществом стабильности генетической конструкции при многократном пассировании. Адекватно подобранные конструкции позволяют получить выраженный иммунный ответ на введение препарата. Более того, такие вакцины в подавляющем большинстве обладают повышенной безопасностью, так как содержат лишь части вирусных геномов, а некоторые векторы представляют собой аттенуированные вакцинные штаммы. Тем не менее риск появления АТ к вирусному вектору всегда следует учитывать при разработке таких вакцин, особенно если требуется бустерная вакцинация.

Чаще всего в качестве вектора для ЧИКВ используются вакцинный штамм вируса кори (ВК) [53, 54], вирус везикулярного стоматита (ВВС) [55], аденовирус (АВ) [56–59], вирус осповакцины, штамм Ankara [31, 60] (табл. 1).

Аденовирусы широко распространены в человеческой популяции, и по этой причине для преодоления уже имеющегося иммунитета к аденовирусам человека в разработках используют аденовирусы шимпанзе [58]. Также успешно используются аденовирусные векторы второго поколения с дефицитом репликации за счет делеций в генах гликопротеинов E1, E3 и E4 [56, 57]. Так же как аденовирусный вектор, широко используется в качестве вектора высокоаттенуированный модифицированный вирус осповакцины, штамм Ankara [31, 60, 61]. Одним из преимуществ данного вектора является профиль его

Таблица 1. Характеристика вакцин против лихорадки Чикунгунья и результатов их доклинических исследований  
Table 1. Description of CHIKV vaccines and their preclinical study results

Название вакцины Vaccine name	Антиген/мишень Antigen/target	Модель животного Animal model	Доза Dosage	Путь введения Route of administration	Результаты Results	Источник Reference
I. Живые аттенуированные вакцины (ЖАВ) I. Live attenuated vaccine (LAV)						
1	RH-ЧИКВ RH-CHIKV EV-ЧИКВ EV-CHIKV RHEV-ЧИКВ RHEV-CHIKV	Мутация R532H в nsP1 R532H mutation in nsP1 Мутация E515V в nsP2 E515V mutation in nsP2 Две мутации R532H в nsP1 и E515V в nsP2 Two mutations: R532H in nsP1 and E515V in nsP2	10 <sup>6</sup> БОЕ, однократно 10 <sup>6</sup> PFU, single injection	п.к. (плюсневая область) s.c. (metatarsal region of the footpad)	Варианты препарата RH-ЧИКВ и RHEV-ЧИКВ (ЕССА штам) содержат ли ЧИКВ со сниженной инфекционной активностью; у иммунизированных мышей после заражения вирусемия и поражение суставов были слабо выражены. Отмечена перекрестная защита против вируса О'nyong-nyong RH-CHIKV and RHEV-CHIKV (ЕССА strain) vaccine variants contained reduced-infectivity CHIKV. Immunised mice demonstrated low levels of viremia and mild joint symptoms. The study showed cross-protection against the O'nyong-nyong virus	[29]
2	181/25 штамм 15561 ЧИКВ (Asian) 181/25, CHIKV strain 15561 (Asian)	Две аминокислотные замены в позиции 12 и 82 гликопротеина E2 Two amino acid substitutions at positions 12 and 82 of the E2 glycoprotein	10 <sup>5</sup> БОЕ, однократно 10 <sup>5</sup> PFU, single injection	в.к. i.d.	Однократное введение препарата мышам AG129 предотвратило развитие инфекции при заражении «дикими» штаммом ЧИКВ. Отмечено формирование нейтрализующих АТ. Определена роль системы интерферонов в инфекционном процессе A single dose prevented infection in AG129 mice upon challenge with wild CHIKV. Neutralising Abs formed in immunised mice. The role of the IFN system in the infection process was identified	[25–27]
3	Δ5nsP3 (ЕССА штамм) Δ5nsP3 (ЕССА strain)	Большая делеция (Δ656–1717 в P1234 полипротеина) в nsP3 Large deletion (Δ656–1717 of the P1234 polyprotein) in nsP3	10 <sup>4-5</sup> БОЕ, однократно 10 <sup>4-5</sup> PFU, single injection	п.к. s.c.	Делеция стабильна. Препарат был безопасен, не вызывал подъема температуры, лимфопении, подъема цитокинов и поражения суставов. При последующем заражении животных высокими дозами «дикого» штамма ЧИКВ продемонстрирован защитный эффект (отсутствие вирусемия и отек суставов) The deletion was stable. The vaccine was safe and did not induce fever, lymphopenia, cytokine upregulation, or joint swelling. Upon subsequent challenge with a high dose of wild CHIKV, the vaccine showed a protective effect (no viremia and joint swelling)	[32, 33, 41]
4	ΔС-ЧИКВ (штамм ЕССА) ΔC-CHIKV (ЕССА strain)	Делеция в капсидном протеине Capsid deletion	10 <sup>4</sup> БОЕ, однократно 10 <sup>4</sup> PFU, single injection	п.к. s.c.	Стабильность генома ЧИКВ отмечена на протяжении 5 пассажей. Препарат был эффективен и безопасен. Однократное введение препарата мышам C57BL/6l и IFNAR <sup>-/-</sup> обеспечило защиту против ЧИКВ (отсутствие отек стоп, не наблюдалось потери массы тела) No detectable genomic changes were observed in CHIKV after five passages. The vaccine was effective and safe. A single dose protected C57BL/6l and IFNAR <sup>-/-</sup> mice against CHIKV (no footpad swelling or weight loss)	[42]
5	ЧИКВ-NoLS (ЕССА штамм) CHIKV-NoLS (ЕССА strain)	Мутация в N-концевом регионе капсидного белка Mutation of the nucleolar localisation sequence (NoLS) in the N-terminal region of capsid protein	10 <sup>4</sup> БОЕ, однократно 10 <sup>4</sup> PFU, single injection	п.к. s.c.	Препарат термостабилен и безопасен. Однократное введение предотвратило развитие инфекции ЧИКВ; отсутствовал отек стоп, значительно снижались вирусемия и экспрессия провоспалительных факторов; отмечена перекрестная защита против вируса Ross River The vaccine is thermostable and safe. A single dose protected from CHIKV infection: no footpad swelling developed, viremia and proinflammatory factor expression were reduced. The study showed cross-protection against the Ross River virus	[43, 44]

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Название вакцины <i>Vaccine name</i>	Антиген/мишень <i>Antigen/target</i>	Модель животных <i>Animal model</i>	Доза <i>Dosage</i>	Путь введения <i>Route of administration</i>	Результаты <i>Results</i>	Источник <i>Reference</i>
6 Стоп ЧИКВ / SuperStop ЧИКВ (штамм ECSA) Stop and SuperStop CHIKV (ECSA strain)	Множественные синонимичные мутации в геноме ЧИКВ <i>Multiple synonymous mutations in the CHIKV genome</i>	6-недельные мыши C57BL/6j <i>6-week C57BL/6j mice</i>	10 <sup>4</sup> БОЕ, однократно <i>10<sup>4</sup> PFU, single injection</i>	Ведение в стопу, п.к. <i>Footpad injection, s.c.</i>	Из-за сотен синонимичных мутаций риск реверсии вируса значительно снижен. Препарат безопасен. Отмечен высокий титр нейтрализующих АТ. После заражения у иммунизированных мышей отсутствовал отек стоп, вирусемия была незначительной <i>Hundreds of synonymous mutations significantly reduced the risk of the virus reversion. The vaccine was safe. High levels of neutralising Abs were detected. No foot swelling and minor viremia were observed upon challenge</i>	[45]
7 ЧИКВ-IRE5 (ECSA штамм) CHIKV-IRE5 (ECSA strain)	Замена промотора ЧИКВ на IRES (internal ribosome entry site) вируса энцефаломиокардита <i>Encephalomyocarditis internal ribosome entry site (IRES) substituted for the CHIKV promoter</i>	3–10- недельные мыши A129 <i>3–10-week A129 mice</i> 3-недельные мыши C57BL/6 <i>3-week C57BL/6 mice</i> Суполгогус <i>masaques</i>	10 <sup>4</sup> БОЕ, однократно <i>10<sup>4</sup> PFU, single injection</i> 10 <sup>5</sup> БОЕ, однократно <i>10<sup>5</sup> PFU, single injection</i> 10 <sup>5</sup> БОЕ, однократно <i>10<sup>5</sup> PFU, single injection</i>	в.к. п.к. <i>i.d.</i> <i>s.c.</i>  п.к. <i>s.c.</i>  в.к. или п.к. <i>i.c. or s.c.</i>	Препарат безопасен. Трансмиссия вакцинного штамма комарам невозможна. Отмечена протективность при заражении штаммом ECSA ЧИКВ и короткий период вирусемии при заражении штаммом IOL ЧИКВ <i>The vaccine was safe. Vaccine strain transmission to mosquitoes was impossible. The vaccine protected animal models upon ECSA strain challenge. Upon IOL CHIKV strain challenge, a short viremia period was observed</i>	[28, 48, 49]
8 ЧИКВ HR (WAF штамм) CHIKV HR (WAF strain)	Делеция в трансмембранном гликопротеине E2 <i>(HR – host range (диапазон хозяина))</i> <i>Truncation of the transmembrane domain of the E2 glycoprotein</i>	4-недельные мыши C57BL/6j <i>4-week C57BL/6j mice</i>	10 <sup>5</sup> БОЕ, однократно <i>10<sup>5</sup> PFU, single injection</i>	п.к. <i>s.c.</i>	Препарат безопасен, ареактогенен. Отмечена протективность препарата у иммунизированных мышей при заражении высоковирулентным «диким» штаммом ЧИКВ (отсутствовала вирусемия) <i>The vaccine was safe and nonreactogenic. Protection was observed in immunised mice upon challenge with highly virulent wild CHIKV (no viremia)</i>	[46]
9 ЧИКВ ЖАВ (ECSA штамм) CHIKV LAV (ECSA strain)	Мутация в позиции 79 или 82 E2 гликопротеина <i>Mutation at amino acid position 79 or 82 of the E2 glycoprotein</i>	3-недельные мыши CD-1 <i>3-week CD-1 mice</i>	10 <sup>5</sup> БОЕ, однократно <i>10<sup>5</sup> PFU, single injection</i>	п.к. <i>s.c.</i>	Отмечен высокий титр нейтрализующих АТ. Препарат протективен, однократная иммунизация полностью защищала мышей при заражении «диким» родителем штаммом ЧИКВ <i>High titres of neutralising Abs were observed. A single dose completely protected all the immunised mice upon parental wild CHIKV challenge</i>	[47]
10 ЧИКВ РНК гибридная вакцина CHIKV RNA hybrid vaccine	Полноразмерный аттенуированный геном ЧИКВ с системой доставки <i>Full-length, attenuated CHIKV genome with a delivery vehicle</i>	4-недельные мыши C57BL/6 <i>4-week C57BL/6 mice</i>	10 <sup>5</sup> БОЕ, однократно <i>10<sup>5</sup> PFU, single injection</i>	в.м. <i>i.m.</i>	Липидный наночастицель высокостабилен; технология позволяет производить препарат в бесклеточной среде; независимо от уровня аттенуации вируса позволяет избежать многих проблем с безопасностью препарата, характерных для ЖАВ. Однократная иммунизация привела к появлению высоких титров нейтрализующих АТ и полной защите с отсутствием отека стоп <i>The nanostructured lipid carrier is highly stable. This technology allows manufacturing in a cell-free environment; regardless of viral attenuation level, it allows avoiding many safety challenges of LAVs. Single-dose immunisation of mice induced high CHIKV-neutralising antibody titres and fully protected the mice from death and footpad swelling</i>	[50]

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Название вакцины Vaccine name	Антиген/мишень Antigen/target	Модель животных Animal model	Доза Dosage	Путь введения Route of administration	Результаты Results	Источник Reference	
II. Вирусоподобные частицы (ВПЧ) II. Virus-like particles (VLP)							
1	ЧИКВ-ВПЧ (ECSA штамм) CHIKV-VLPs (ECSA strain)	Структурные протеины ЧИКВ в экспрессирующей дрожжевой системе CHIKV structural proteins in a yeast expression system	4-недельные мыши BALB/c 4-week BALB/c mice	10, 20 и 40 мкг с адъювантом Фрейдса; с бустером на 14 и 28 сут 10, 20, 40 µg in Freund's adjuvant; boosted on days 14 and 28	п.к. s.c.	Препарат хорошо переносился мышами. Отмечен высокий уровень специфических АТ с высокой нейтрализующей активностью. Препарат вызывал формирование выраженного гуморального и клеточного иммунитета. Однократное введение бустерной минимальной дозы 10 мкг с адъювантом приводило к защите мышей от ЧИКВ инфекции The vaccine was tolerated well. High levels of specific Abs with high neutralising activity were detected. The vaccine induced strong humoral and cell-mediated immunity. A single booster dose of even 10 µg in the adjuvant was sufficient to protect mice from CHIKV infection	[30]
2	ЧИКВ-ВПЧ (ECSA штамм) CHIK VLP (ECSA strain)	С и Е1 протеины в экспрессирующей системе Baculovirus C and E1 proteins in a Baculovirus expression system	6-8-недельные мыши C57BL/6 6-8-week C57BL/6 mice	30 мкг с разными адъювантами; трехкратно 30 µg with different adjuvants; three injections	в.м. i.m.	После введения препарата даже без адъюванта выявлен иммунный ответ и протективность у взрослых мышей; однако у «возрастных» мышей (>18 недель) отмечено обострение инфекции In adult mice, vaccination, even without adjuvants, elicited immune responses and provided 100% protection; however, it exacerbated the disease in old mice (>18 weeks)	[52]
3	ЧИКВ-ВПЧ (ECSA штамм) CHIK VLP (ECSA strain)	С-Е1 протеины ЧИКВ в экспрессирующей системе Baculovirus C and E1 proteins of CHIKV in a Baculovirus expression system	6-12-недельные мыши C57BL/6 6-12-week C57BL/6 mice	0,1 мкг и 1 мкг, однократно 0.1 µg and 1 µg, single injection	п.к. s.c.	Однократное введение 1 мкг, даже без адъюванта, вызывало появление нейтрализующих АТ в значительных титрах; при заражении ЧИКВ обеспечивало полную защиту животного с отсутствием вирусемии и симптомов инфекции A single µg dose, even without adjuvants, induced significant neutralising antibody titres and provided complete protection against viremia and symptomatic disease upon challenge with CHIKV	[39]
4	ЧИКВ-ВПЧ (ECSA штамм) CHIKV-VLP (ECSA strain)	Е2 протеин ЧИКВ в экспрессирующей системе Baculovirus E2 protein of CHIKV in a Baculovirus expression system	6-недельные мыши AG129 6-week AG129 mice	1 мкг, двукратно 1 µg, two injections	п.к. s.c.	Двукратная иммунизация в дозе 1 мкг стимулировала образование нейтрализующих АТ и обеспечивала полную защиту от летального заражения ЧИКВ Two 1 µg doses induced neutralising Abs and provided complete protection from lethal CHIKV infection	[51]

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Название вакцины <i>Vaccine name</i>	Антиген/мишень <i>Antigen/target</i>	Модель животных <i>Animal model</i>	Доза <i>Dosage</i>	Путь введения <i>Route of administration</i>	Результаты <i>Results</i>	Источник <i>Reference</i>
III. Векторные вакцины (ВВ) <i>III. Viral vector vaccines (VVV)</i>						
Аденовирусный вектор (АВ) <i>Adenoviral vector (Ad)</i>						
1 САВВакс (ЕССА штамм) <i>CAAdVax (ECSA strain)</i>	Протеины С-Е1 ЧИКВ <i>C-E1 proteins of CHIKV</i>	8-недельные мыши CD-1 или C57BL/6 <i>8-week CD-1 or C57BL/6 mice</i>	10 <sup>8</sup> МЕ, однократно <i>10<sup>8</sup> IU, single injection</i>	в.б. <i>i.p.</i>	На модели новозеландских белых кроликов продемонстрировано отсутствие выраженных побочных эффектов. Формирование нейтрализующих АТ и клеточного Th1/Th2 иммунитета обеспечило защиту мышей при заражении разными генотипами ЧИКВ <i>No significant adverse events were observed in the sensitive New Zealand White rabbit model. Postvaccination neutralising Abs and Th1/Th2 cell immunity protected mice upon challenge with multiple CHIKV genotypes</i>	[56]
2 АВ-ЧИКВ-SG <i>Ad-CHIKV-SG</i> АВ-ЧИКВ-Е3/Е2/6К <i>Ad-CHIKV-E3/E2/6K</i> АВ-ЧИКВ-Е3/Е2/Е1 <i>Ad-CHIKV-E3/E2/E1</i>	Структурные протеины <i>Structural proteins</i>	6-8-недельные мыши BALB/c <i>6-8-week BALB/c mice</i> 4-недельные мыши C57BL/6 <i>4-week C57BL/6 mice</i>	10 <sup>7</sup> инфекционных единиц <i>10<sup>7</sup> infectious units</i> 10 <sup>8</sup> инфекционных единиц <i>10<sup>8</sup> infectious units</i>	и.н. <i>i.n.</i>	Все три варианта вакцины показали высокую иммуногенность. Но Ad-CHIKV-E3/E2/6K был несколько менее эффективным. Варианты Ad-CHIKV-SG и Ad-CHIKV-E3/E2/E1 успешно прошли испытания при оценке иммуногенности и протективности препаратов на мышах C57BL/6 после однократной иммунизации <i>All three vaccine candidates demonstrated high immunogenicity. Ad-CHIKV-E3/E2/6K had slightly lower efficacy. Ad-CHIKV-SG and Ad-CHIKV-E3/E2/E1 were successful in immunogenicity and protection tests in C57BL/6 mice after a single immunisation</i>	[57]
3 АВ (шимпанзе) Ox1-sЧИКВ <i>ChAdOx1-sCHIKV</i> АВ (шимпанзе) Ox1-sЧИКВ ΔС <i>ChAdOx1-sCHIKV ΔC</i>	Структурные протеины (С, Е3, Е2, 6К, Е1) <i>Structural proteins (C, E3, E2, 6K, E1)</i> Структурные протеины (Е3, Е2, 6К, Е1) <i>Structural proteins (E3, E2, 6K, E1)</i>	6-8-недельные мыши BALB/c <i>6-8-week BALB/c mice</i>	10 <sup>8</sup> инфекционных единиц с адьювантом и без него <i>10<sup>8</sup> infectious units with or without adjuvants, single injection</i>	в.м. <i>i.m.</i>	Оба варианта вакцины после однократного введения даже без адьюванта вызвали формирование выраженного гуморального и клеточного Т-клеточного иммунитета у мышей <i>Both vaccine candidates induced pronounced humoral and high T-cell immunity in mice after a single injection even without adjuvants</i>	[58]

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Название вакцины <i>Vaccine name</i>	Антиген/мишень <i>Antigen/target</i>	Модель животных <i>Animal model</i>	Доза <i>Dosage</i>	Путь введения <i>Route of administration</i>	Результаты <i>Results</i>	Источник <i>Reference</i>
Вектор – модифицированный вирус осповакцины, штамм Анкага (МВОА) <i>Modified vaccinia virus Ankara (MVA) as a vector</i>						
4	МВОА–ЧИКВ (IOL штамм) MVA-CHIKV (IOL strain)	5–8-недельные мыши C57BL/6 5–8-week C57BL/6 mice	10 <sup>7</sup> БОЕ, однократно или 10 <sup>7</sup> БОЕ, двукратно 10 <sup>7</sup> PFU, single injection or 10 <sup>7</sup> PFU, two injections	в.б. i.p.	Формирование нейтрализующих АТ и клеточного CD8 <sup>+</sup> иммунитета обеспечивало защиту мышей при заражении разными штаммами ЧИКВ даже после однократной иммунизации Upon challenge with different CHIKV strains, postvaccination neutralising Abs and CD8 <sup>+</sup> cell immunity protected mice even after single immunisation	[60]
5	МВОА–ЧИКВ (IOL штамм) MVA-CHIKV (IOL strain)	4–6-недельные мыши BALB/c; 6–10-недельные мыши A129 4–6-week BALB/c mice; 6–10-week A129 mice	10 <sup>7</sup> ТЦПД, однократно или 10 <sup>7</sup> ТЦПД, двукратно 10 <sup>7</sup> TCID, single injection or 10 <sup>7</sup> TCID, two injections	в.к. i.d.	После иммунизации по схеме с бустером продемонстрированы протективные свойства в обеих линиях мышей при отсутствии детектируемых нейтрализующих АТ Prime-boost immunisation protected both mouse models; no neutralising Abs were detected	[40]
6	МВОА–ЧИКВ (ECSA штамм) MVA-CHIKV (ECSA strain)	7-недельные мыши A129 7-week A129 mice	5×10 <sup>6</sup> ТЦПД, двукратно 5×10 <sup>6</sup> TCID, two injections	в.м. i.m.	Иммунизация вектором, экспрессирующим E3-E2 или E3-E2-6KE1, обеспечивала продукцию нейтрализующих АТ и 100% защиту против летальной инфекции, а конструкция 6K-E1 обеспечивала 75% защиту мышей от летальной инфекции Immunisation with MVA vectors expressing E3-E2 or E3-E2-6KE1 elicited neutralising Abs and provided 100% protection against lethal infection; 6K-E1 construct protected 75% of mice against lethal infection	[61]
Вектор – вирус везикулярного стоматита (ВВС) <i>Vesicular stomatitis virus (VSV) as a vector</i>						
7	ВВСΔG–ЧИКВ (WAF штамм) VSVΔG-CHIKV (WAF strain)	3-недельные C57BL/6 мыши 3-week C57BL/6 mice	10 <sup>6</sup> БОЕ, однократно 10 <sup>6</sup> PFU, single injection	в.м. i.m.	Отсутствие белка G у ВВС позволяло использовать этот вектор множество раз, так как не формировался иммунный ответ на сам вектор. Иммунные мыши демонстрировали только незначительную отечность стоп при заражении штаммом IOL ЧИКВ The lack of G protein in VSV makes it possible to use this vector multiple times, as no immunity is induced against it. Immunised mice demonstrated only slight foot swelling upon challenge with the IOL strain of CHIKV	[55]

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Название вакцины Vaccine name	Антиген/мишень Antigen/target	Модель животных Animal model	Доза Dosage	Путь введения Route of administration	Результаты Results	Источник Reference
Альфовирусный вектор (химера): вирус восточного энцефалита лошадей, южноамериканский тип (ВВЭЛ ю-а), вирус венецуэльского энцефалита лошадей (ВВЭЛ), Эйллатский вирус (ЭйлВ) <i>Alphaviruses—Eastern equine encephalitis virus (EEEV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), Eilat virus (EILV)—as a vector (chimera)</i>						
8 ВВЭЛ ю-а – ЧИКВ, ВВЭЛ –ЧИКВ С-Е1 (штамм ECSA) EEEV-CHIKV, VEEV-CHIKV, С-Е1 (ECSA strain)	Протеины С-Е1 ЧИКВ <i>C-E1 proteins of CHIKV</i>	>3-недельные мыши Swiss (NIH), C57BL/6; 6-недельные мыши CD-1; 6–9-недельные мыши A-129 >3-week Swiss (NIH) and C57BL/6 mice; 6-week CD-1 mice; 6–9-week A-129 mice	10 <sup>4</sup> –10 <sup>6</sup> БОЕ, однократно 10 <sup>4</sup> –10 <sup>6</sup> PFU, single injection	п.к. или в.м <i>s.c. or i.m.</i>	Химерные альфовирусы с заменой участка, кодирующего структурный ген, являются высокоаттенуированными и обеспечивают выраженный иммунный ответ. Иммунизация обеспечивала продукцию нейтрализующих АТ у всех мышей и защиту при интраназальном заражении мышей C57BL/6 штаммом ECSA <i>Chimeric alphaviruses with replaced structural gene coding regions are highly attenuated viruses eliciting strong immune responses. Immunisation induced neutralising Abs in all mice and protected C57BL/6 mice upon challenge with the ECSA strain</i>	[62, 63]
9 ЭйлВ –ЧИКВ (штамм Asian) EILV-CHIKV (Asian strain)	Протеины С-Е1 <i>C-E1 proteins</i>	4-недельные мыши C57BL/6 4-week C57BL/6 mice  6-недельные мыши IFN- $\alpha/\beta$ R <sup>-/-</sup> 6-week IFN- $\alpha/\beta$ R <sup>-/-</sup> mice  3–5-летние Сулотологус масаques 3–5-year-old Сулотологус масаques	8, 8 lg БОЕ, однократно 8,8 lg <sub>50</sub> PFU, single injection  8, 8 lg БОЕ, однократно 8,8 lg <sub>50</sub> PFU, single injection  8, 1 lg БОЕ, однократно, 8,1 lg <sub>50</sub> PFU, single injection	п.к. <i>s.c.</i>  п.к. <i>s.c.</i>  в.м. <i>i.m.</i>	ЭйлВ обеспечивал препарат дополнительным уровнем безопасности, не разножаясь в клетках позвоночных животных. После иммунизации отмечена сероконверсия у 80% мышей и обезьян. Протективные свойства препарата выражались в отсутствии вирусемии и симптоматики у животных после заражения штаммом ECSA <i>EILV inability to replicate in the cells of vertebrates contributed to the safety of the vaccine. Immunised mice and macaques showed an 80% seroconversion rate. Protection was characterised with no signs of viremia and disease upon challenge with the ECSA strain</i>	[64]
IV. ДНК-вакцины <i>IV. DNA vaccines</i>						
1 ДНК-вакцина <i>DNA vaccine</i>	ДНК плазмиды кодирует С, Е2 и Е1 протеины (усредненная структура, собранная из множества ЧИКВ штаммов NCBI) <i>DNA plasmid coding C, E1, and E2 proteins (consensus sequence from multiple NCBI CHIKV strains)</i>	6–8-недельные мыши C57BL/6 6–8-week C57BL/6 mice  8-недельные мыши BALB/c 8-week BALB/c mice  4–8-летние обезьяны (Macaca mulatta) 4–8-year-old Rhesus monkeys (Macaca mulatta)	25 мкг, трехкратно 25 $\mu$ g, three injections  25 мкг, трехкратно 25 $\mu$ g, three injections  1 мг, трехкратно 1 mg, three injections	в.м. <i>i.m.</i> в.к. <i>i.d.</i>  в.м. электропорирование <i>i.m. electroporation</i>	Введение конструкции с вектором рVax1 (Invitrogen) вакцины путем электропорации способствовало формированию ЧИКВ-специфических АТ и ИФН $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток. После трехкратной иммунизации отмечено образование нейтрализующих АТ, формирование CD8 Т-клеточного иммунитета у мышей и обезьян и защита аутобредных мышей при заражении <i>The pVax1 vector (Invitrogen) construct administered via electroporation elicited both CHIKV-specific antibodies and IFN<math>\gamma</math>-producing T cells. Three doses elicited neutralising Abs and CD8 T-cell immunity in immunised mice and monkeys and protected outbred mice upon challenge</i>	[67–69]

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Название вакцины <i>Vaccine name</i>	Антиген/мишень <i>Antigen/target</i>	Модель животных <i>Animal model</i>	Доза <i>Dosage</i>	Путь введения <i>Route of administration</i>	Результаты <i>Results</i>	Источник <i>Reference</i>
2 DREP-Env	ДНК плазида кодирует ЧИКВ репликон от nsP1 до nsP4 и от E1 до E3 <i>DNA-plasmid encoding the CHIKV replicon from nsP1 to nsP4 and from E1 to E3</i>	5-6-недельные мыши C57BL/6 <i>5-6-week C57BL/6 mice</i>	10 мкг, дважды или 20 мкг, однократно <i>10 µg, two injections or 20 µg, single injection</i>	в.к. <i>i.d.</i>	После двукратной иммунизации отмечены 100% сероконверсия, формирование нейтрализующих АТ и CD8 T-клеточного иммунитета, 100% защита от вирусемии и отека стоп при заражении <i>Two doses provided 100% seroconversion, neutralising Abs and CD8 T-cell immunity, as well as 100% protection from viremia and footpad swelling upon challenge</i>	[70]
3 ДНК-вакцина <i>DNA-vaccine</i>	ДНК плазида содержит полный геном штамма 181/25 ЧИКВ (Азиат) <i>DNA plasmid with the full-length genome of CHIKV strain 181/25 (Asian)</i>	3-недельные мыши BALB/c <i>3-week BALB/c mice</i>	10 мкг, однократно <i>10 µg, single injection</i>	в.м. <i>i.m.</i> в.к. <i>i.d.</i>	Отмечены 100% сероконверсия, формирование нейтрализующих АТ, 100% защита от вирусемии и отека стоп при заражении иммунных мышей <i>The study showed 100% seroconversion, neutralising Abs, and 100% protection from viremia and footpad swelling in immunised mice upon challenge</i>	[71]
V. мРНК-вакцины <i>V. mRNA vaccines</i>						
1 ЧИКВ E2-E1-ЛНЧ мРНК (Азиат штамм) <i>CHIKV E2-E1-LNP mRNA (Asian strain)</i>	мРНК-ЛНЧ (липидная наночастица), экспрессирующая E2-E1 гликопротеины ЧИКВ <i>mRNA-LNP (lipid nanoparticle) expressing E1-E2 proteins of CHIKV</i>	6-недельные мыши C57BL/6 <i>6-week C57BL/6 mice</i>	1, 5, 10 мкг, трехкратно <i>1, 5, or 10 µg, three injections</i>	в.м. <i>i.m.</i>	Высокая иммуногенность после трехкратного введения препарата подтверждена высокими титрами нейтрализующих АТ и выраженным ответом CD8 <sup>+</sup> клеток <i>High immunogenicity after three injections is confirmed by high titres of neutralising Abs and potent CD8<sup>+</sup> cell responses</i>	[72]

Примечание. ЧИКВ — вирус Чикунгуны; в.к. — внутримышечное введение; в.м. — внутримышечное введение; п.к. — подкожное введение; в.б. — внутрибрюшинное введение; АТ — антитела; БОЕ — بلاشوобразующие единицы; nsP — неструктурный протеин; С — капсид; Е — поверхностный гликопротеин; 6К — структурный протеин.

Note. CHIKV, *Chikungunya virus*; i.c., intracutaneous administration; i.m., intramuscular administration; s.c., subcutaneous administration; i.p., intraperitoneal administration; Abs, antibodies; PFU, plaque-forming units; nsP, nonstructural protein; C, capsid; E, envelope glycoprotein; 6K, structural protein.

безопасности, так как вектор экспрессирует чужеродные белки, сам при этом имеет значительно пониженную вирулентность в отношении клеток млекопитающих. Данный вектор также способен продуцироваться в перевиваемых клеточных линиях. Еще один вариант векторной вакцины был разработан А. Chattopadhyay с соавт. [55]. В своей разработке исследователи использовали в качестве вектора ВВС, иммунный ответ на который не формировался за счет отсутствия гликопротеина в геноме вектора, который заменили на поверхностный полипротеин ЧИКВ E3-E2-6K-E1.

Большинство вакцин имеют подкожный или внутримышечный пути введения. Интересный подход применили E. Dora с соавт. [57], которые в качестве вектора использовали аденовирус человека 5 типа с дефицитом репликации (rAd) и применили оральный путь введения. Иммунизированные путем интраназального введения препарата мыши C57BL/6 продемонстрировали формирование специфических нейтрализующих АТ и защиту при заражении генетически гомологичным генотипом ЧИКВ [57].

Для разработки эффективных вакцин против лихорадки Чикунгунья используются другие альфа-вирусы, такие как вирус Венесуэльского энцефалита лошадей (ВВЭЛ) [62] или южноамериканский тип Восточного энцефалита лошадей (ВВЭЛ ю-а) [63]. Химерные альфа-вирусы с заменами собственных структурных генов на структурные гены ЧИКВ являются высокоаттенуированными, оставаясь при этом высокоиммуногенными. Химерные альфа-вирусы являются репликативно компетентными. Следует отметить, что все химерные альфа-вирусы склонны к компенсаторно-адаптивным мутациям, которые могут изменять степень их аттенуации или приводить к реверсии вирулентности. Интересна разработка химерной вакцины на основе Эйллатского вируса (ЭйлВ), диапазон хозяев которого ограничен исключительно насекомыми [64, 65]. Данная разработка представляется перспективной, так как процесс производства не требует особых условий безопасности и отсутствует необходимость в инаktivации вируса.

#### **ДНК-вакцины**

Одним из новых подходов к созданию вакцин против лихорадки Чикунгунья является разработка ДНК-вакцин. Способность ДНК-вакцин вызывать формирование как гуморального, так и клеточного иммунитета представляет собой значительное преимущество перед традиционными технологическими подходами, особенно для тех инфекционных агентов, для которых

не до конца определены механизмы формирования защитного эффекта, одним из которых является ЧИКВ (табл. 1).

Основное преимущество этих препаратов в том, что ДНК-продукт сам по себе является безопасным, поэтому не требует особых условий безопасности ни при разработке, ни при производстве. ДНК-продукты менее чувствительны к температуре хранения и потенциально обладают более длительными сроками хранения, а соответственно, и удобством транспортировки на большие расстояния. Однако следует принимать во внимание сравнительно низкую иммуногенность ДНК-вакцин, что требует применения адъювантов, а также увеличения дозы введения и/или бустерной иммунизации [66]. Конструирование ДНК-вакцин против лихорадки Чикунгунья началось с создания серии плазмидных векторов, которые содержали структурные протеины (капсидный С и поверхностные E2 и E1) ЧИКВ [67–69]. Однако для формирования иммунного ответа данная конструкция требовала трехкратной иммунизации мышей. Во втором поколении ДНК-вакцин с целью усиления иммуногенности препарата используют плазмидный вектор с практически полной последовательностью (кДНК) аттенуированного ЧИКВ [70] или полную последовательность, например, аттенуированного штамма ЧИКВ 181/25 с цитомегаловирусным промотором [71]. Такие конструкции позволяют усилить иммуногенность препарата и уменьшить количество введений.

#### **мРНК вакцины**

В последнее время стала популярной технологическая платформа по созданию вакцин, содержащих мРНК. Одна из таких вакцин находится на стадии ДКИ (табл. 1). Преимуществом этой вакцины является индукция выраженного клеточного иммунитета, в особенности выраженного CD8<sup>+</sup> Т-клеточного иммунитета и умеренного CD4<sup>+</sup> Т-клеточного иммунитета, а также мощного гуморального иммунного ответа даже без добавления адъюванта, но с использованием липидного наноносителя [72]. Другая мРНК-вакцина mRNA-1388 (VAL-181388) компании Moderna Therapeutics (США) уже прошла I фазу КИ (табл. 2). В этой разработке исследователям удалось избежать формирования иммунного ответа на саму мРНК и обеспечить достаточный синтез иммунных белков [73].

#### **Вакцины против лихорадки Чикунгунья на стадии клинических исследований**

На текущем этапе несколько вакцин имеют перспективы завершения разработки

и получения одобрения FDA (Food and Drug Administration), США. В *таблице 2* представлена краткая характеристика вакцин, благополучно прошедших ДКИ и находящихся на разных этапах КИ. Достаточно близка к завершению разработка живой вакцины VLA-1553 компании Valneva (Австрия), так как в 2022 г. успешно была завершена III фаза КИ<sup>1</sup>. Эта вакцина еще на стадии ДКИ продемонстрировала полную защиту лабораторных животных от «диких» штаммов ЧИКВ [32, 33, 74]. На III фазе КИ в рандомизированном плацебо-контролируемом двойном слепом мультицентровом исследовании с участием около 4000 добровольцев была доказана безопасность и иммуногенность препарата после однократной иммунизации<sup>2</sup>. Важно отметить, что еще для одной вакцины, TSI-GSD-218, содержащей, как и вакцина VLA-1553, живой аттенуированный ЧИКВ, завершилась II стадия КИ. Однако на этой стадии КИ у 8% добровольцев, иммунизированных вакциной TSI-GSD-218, была отмечена умеренная артралгия [75]. Весьма вероятно, что аттенуированный штамм ЧИКВ 181/25 продемонстрировал недостаток, характерный для ЖАВ, – реверсию в инфекционный вариант.

На II стадии КИ находится векторная вакцина MV-CHIKV австрийской компании Themis Bioscience [54, 76]. В конструкции этой вакцины использовался вектор, который проявил «рекордный» профиль безопасности и эффективности, аттенуированный вирус кори [53]. На I стадии КИ вакцина MV-CHIKV продемонстрировала выраженную зависимость титра нейтрализующих АТ от дозы препарата [54], а на II стадии КИ были обнаружены высокие титры нейтрализующих АТ как после двукратной, так и однократной иммунизации [76].

Еще две ВПЧ-вакцины, VRC-CHIKVLP059-00-VP и PXVX-0317, по сути аналоги, но с разными схемами иммунизации, одна из которых предполагает использование адьюванта, успешно завершили II стадию КИ [77–81]. В одном из вариантов данной ВПЧ-вакцины применили алюминия гидроксид для усиления иммуногенного эффекта, так как в динамике наблюдалось некоторое снижение титров нейтрализующих АТ [80]. На стадии ДКИ данный препарат, содержащий ВПЧ VRC 311, продемонстрировал эффективность,

а также кросс-протективность против 9 «диких» штаммов ЧИКВ [79].

На I стадии КИ находится вакцина на основе аденовируса шимпанзе (ChAdOx1) [60]. Этот вектор успешно используется данной группой разработчиков в разных вакцинах. Так, на разных стадиях восемнадцати КИ с охватом более 18 тысяч добровольцев находятся вакцины не только против лихорадки Чикунгунья, но и против инфекций, вызываемых вирусами Зика, MERS и COVID-19 [70].

Еще для одной вакцины, содержащей инактивированный ЧИКВ [37], была завершена I стадия КИ<sup>3</sup>, результаты которой, однако, пока еще не опубликованы.

Проведенные КИ препаратов (*табл. 2*) подтвердили, что вакцины на разных технологических платформах и с использованием разных генотипов ЧИКВ могут обеспечить формирование специфического иммунитета, в том числе образование нейтрализующих АТ и их сохранение в течение определенного периода. Для всех указанных в *таблице 2* вакцин была продемонстрирована перекрестная защита от штаммов ЧИКВ разных генотипов на стадии ДКИ *in vivo* и/или на стадии КИ *in vitro*.

Продолжающиеся многочисленные исследования подтверждают наличие не только научного интереса, но также ожиданий системы здравоохранения и готовности рынка к появлению эффективных вакцин против лихорадки Чикунгунья. Однако тот факт, что за 50 лет после появления первой разработки V. Harrison с соавт. [34] ни один препарат так и не появился на фармацевтическом рынке, свидетельствует о том, что этот путь не простой и предполагает преодоление многочисленных препятствий.

Классический дизайн III фазы КИ (перспективный двойной слепой плацебо-контролируемый), который считается «золотым стандартом», не работает в случае вакцин для профилактики инфекции, вызванной ЧИКВ. Непредсказуемый, спорадический, очаговый и относительно короткий характер вспышек лихорадки Чикунгунья делает невозможным классические исследования, так как только планирование и подготовка КИ обычно занимают несколько месяцев. Дети, лица пожилого возраста и люди с хроническими заболеваниями являются наиболее уязвимыми

<sup>1</sup> Valneva Successfully completes pivotal Phase III trial of single-shot chikungunya vaccine candidate. <https://www.globenewswire.com/news-release/2022/03/08/2398469/0/en/Valneva-Successfully-Completes-Pivotal-Phase-3-Trial-of-Single-Shot-Chikungunya-Vaccine-Candidate.html>

<sup>2</sup> Там же.

<sup>3</sup> Phase-I open label, dose-escalation clinical trial to evaluate the safety, tolerability and immunogenicity of chikungunya vaccine in healthy adults of 18 to 50 years age. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04603131>

**Таблица 2.** Характеристика вакцин против лихорадки Чикунгунья на стадии клинических исследований  
**Table 2.** Description of CHIKV vaccines in clinical trials

№ п/п Item No.	Название Vaccine name	Организация/Компания Organisation/Company	Фаза (год) Phase (year)	Схема иммунизации Immunisation scheme	Назначение Indication	Краткое описание Short description	Источник Reference
1	ChAdOx1 CHIKV	Оксфордский Университет Oxford University (United Kingdom)	Фаза I Phase I (2019)	в.м., одно- кратно i.m., single injection	Для профилактики ЧИКВ у взрослых от 18 до 50 лет <i>Prevention of CHIKV infection in adults aged 18–50 years old</i>	Живая векторная вакцина на основе аденовируса шимпанзе, экспрессирующего структурные протеины ЧИКВ: капсидный (С), 6К и поверхностные гликопротеины Е1–Е3. Препарат показал себя как безопасный и хорошо переносимый. Все исследованные дозы препарата не вызывали серьезных поствакцинальных реакций. У всех добровольцев сформировался специфический гуморальный и клеточный иммунитет <i>This live vaccine is based on a simian adenoviral vector expressing CHIKV structural proteins (capsid (C), 6K, and envelope glycoproteins E1–E3). It demonstrated safety and tolerability; no serious adverse events following immunisation were reported at any of the test doses. All volunteers acquired specific humoral and cell-mediated immunity</i>	[59]
2	VAL-181388	Moderna Therapeutics (Кембридж, США) Moderna Therapeutics (USA)	Фаза I Phase I (2019)	в.м., дву- кратно i.m., two injections	Для профилактики ЧИКВ у взрослых от 18 до 49 лет <i>Prevention of CHIKV infection in adults aged 18–49 years old</i>	В основе препарата содержится мРНК, кодирующая протеины ЧИКВ: С, 6К и поверхностные гликопротеины Е1–Е3. Препарат показал себя как безопасный и хорошо переносимый. Все исследованные дозы препарата не вызывали серьезных поствакцинальных реакций. Отмечена 100% сероконверсия после двукратного введения в дозе 100 мкг <i>This vaccine is based on mRNA encoding CHIKV proteins (C, 6K, and envelope glycoproteins E1–E3). It demonstrated safety and tolerability; no serious adverse events following immunisation were reported at any of the test doses. Two 100 mg injections induced seroconversion in 100% of subjects</i>	[73]
3	BBV87	Bharat Biotech (Индия) Bharat Biotech (India)	Фаза I Phase I (2017–2018)	в.м., 3-крат- но i.m., three injections	Для профилактики ЧИКВ у взрослых от 18 до 50 лет <i>Prevention of CHIKV infection in adults aged 18–50 years old</i>	Инактивированная цельновирионная вакцина на основе штамма ECSA. I фаза завершена. Результаты не опубликованы <i>This inactivated whole-virion vaccine is based on a strain derived from the ECSA genotype. Phase 1 is completed, but the results have not been published yet</i>	[37]

Продолжение таблицы 2  
Table 2 (continued)

№ п/п Item No.	Название Vaccine name	Организация/Компания Organisation/Company	Фаза (год) Phase (year)	Схема иммунизации Immunisation scheme	Назначение Indication	Краткое описание Short description	Источник Reference
4	TSI-GSD-218	Медицинский исследовательский институт инфекционных болезней Армии США (США, Мериленд) US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USA)	Фаза II Phase II (2000)	п.к., однократно s.c., single injection	Для профилактики ЧИКВ у взрослых от 18 до 60 лет <i>Prevention of CHIKV infection in adults aged 18–60 years old</i>	Живой аттенуированный штамм 15561 (Asian) прошел 18 пассажей клонирования методом бляшек в клетках MRC-5. Аттенуация детерминирована двумя аминокислотными заменами в поверхностном E2 гликопротеине. У 98% добровольцев сформировались нейтрализующие АТ, которые сохранялись в течение одного года у 85% добровольцев. Подтверждена безопасность и иммуногенность вакцины <i>LAV strain 15561 (Asian) was subjected to 18 plaque-to-plaque passages in MRC-5 cells. It is attenuated by two amino acid substitutions in the E2 glycoprotein. 98% of volunteers developed neutralising Abs, and 85 % of those remained seropositive one year after immunisation. The vaccine proved safe and immunogenic</i>	[27, 35, 75]
5	VRC-CHIKVLP059-00-VP	Национальные институты здоровья, Национальный институт аллергии и инфекционных болезней (США) National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Emergent BioSolutions (USA)	Фаза II Phase II (2020)	в.м., двукратно i.m., two injections	Для профилактики ЧИКВ у взрослых от 18 до 60 лет <i>Prevention of CHIKV infection in adults aged 18–60 years old</i>	Вакцина состоит из вирусоподобных частиц, содержащих в своей структуре поверхностные гликопротеины E1, E2 и капсидный (С) протеин ЧИКВ, штамм 37997; нарабатывается в клетках млекопитающих VRC293. Протестирована безопасность и переносимость препарата, так же как и образование нейтрализующих АТ через 4 недели после второй иммунизации <i>This vaccine includes VLPs containing envelope glycoproteins E1 and E2 and protein C of CHIKV strain 37997. It is produced in mammalian cells (VRC293). Studies demonstrated the safety and tolerability of the vaccine and showed neutralising Abs 4 weeks after the second immunisation</i>	[78–81]
	PXVX-0317	Национальный институт аллергии и инфекционных болезней (США) National Institute of Allergy and Infectious Diseases, PaxVax (USA)	Фаза II Phase II (2022)	в.м., доза от 6 мг до 40 мг, одно- или двукратно i.m., 6–40 µg, one or two injections	Для профилактики ЧИКВ у взрослых от 18 до 45 лет <i>Prevention of CHIKV infection in adults aged 18–45 years old</i>	PXVX-0317 является аналогом VRC-CHIKVLP059-00-VP. Исследовались две формы препарата с адьювантом (алюминия гидроксид) и без него в разных схемах иммунизации. Вакцина хорошо переносилась и индуцировала выраженный и длительный иммунный ответ (нейтрализующие АТ против ЧИКВ) сроком до 2 лет. Наилучший результат продемонстрировала вакцина в дозе 40 мг с адьювантом, введенная однократно <i>PXVX-0317 is similar to VRC-CHIKVLP059-00-VP. Studies tested two vaccine formulations, adjuvanted (with aluminium hydroxide) and non-adjuvanted, and different immunisation schemes. The vaccine was well tolerated and induced robust and durable immunity (CHIKV-neutralising Abs), which lasted for up to 2 years. A single 40 µg dose of adjuvanted PXVX-0317 showed the best results</i>	[78–80]

№ п/п Item No.	Название Vaccine name	Организация/Компания Organisation/Company	Фаза (год) Phase (year)	Схема иммунизации Immunisation scheme	Назначение Indication	Краткое описание Short description	Источник Reference
6	MV-CE3E26 KE1 (MV-CHIKV)	Themis Bioscience (Австрия) Институт Пастера (Франция) Themis Bioscience (Austria), Institute Pasteur (France)	Фаза II Phase II (2019)	в.м., одно- или двукратно i.m., one or two injections	Для профилактики ЧИКВ у взрослых от 18 до 55 лет Prevention of CHIKV infection in adults aged 18–55 years old	Вакцина содержит рекомбинантный живой аттенуированный вирус кори, штамм Schwarz, несущий кон-струкцию структурных протеинов ЧИКВ штамма 06-49 (капсидного С и поверхностных гликопротеинов Е1, Е2 и двух небольших пептидов Е3 и 6К) и наработанный в клетках Vero. Препарат хорошо переносился, и серьезные побочные эффекты не были зарегистрированы. Отмечена хорошая иммуногенность препарата независимо от наличия предшествующих АТ к вирусу кори This CHIKV vaccine contains a recombinant live attenuated measles virus (MV-CHIKV), Schwarz strain, carrying a structural protein construct of CHIKV strain 06-49 (capsid protein C, envelope glycoproteins E1 and E2, and two small peptides (E3 and 6K)). The vaccine is propagated in Vero cells. It was well tolerated; no serious adverse events were reported. The vaccine showed good immunogenicity regardless of pre-existing immunity against measles	[53, 54, 76]
7	VLA-1553	Valneva (Австрия) Valneva (Austria)	Фаза III Phase III (2019–2022)	в.м., одно- кратно i.m., single injection	Для профилактики ЧИКВ у взрослых от 18 до 45 лет Prevention of CHIKV infection in adults aged 18–45 years old	Живой аттенуированный штамм ЧИКВ с делецией nsP3 (ns — неструктурный протеин). Протективные уровни нейтрализующих АТ зарегистрированы у 98,9% добровольцев через 1 месяц после иммунизации и у 96,3% через 6 месяцев. Подтвержден хороший профиль безопасности и переносимости вакцины This CHIKV LAV has an nsP3 (non-structural protein) deletion. Protective levels of CHIKV-neutralising Abs were registered in 98.9% of volunteers after one month and in 96.3% of volunteers after six months post immunisation. A good safety and tolerability profile was confirmed	[32, 33, 74]

Примечание: ЧИКВ — вирус Чикунгунья; в.м. — внутримышечное введение; п.к. — подкожное введение; АТ — антитела.

Note: CHIKV, Chikungunya virus; i.m., intramuscular administration; s.c., subcutaneous administration; Abs, antibodies; LAV, live attenuated vaccine.

группами в отношении тяжелых исходов инфекции. Следовательно, III фаза КИ должна учитывать особенности иммунного статуса этих групп, и потенциальные вакцины должны иметь улучшенный профиль безопасности. Признавая острую необходимость в эффективной вакцине и в то же время учитывая наличие объективных эпидемиологических проблем, ВОЗ опубликовала в 2017 г. отдельные принципы проведения II и III фаз КИ для вакцин против лихорадки Чикунгунья<sup>4</sup>.

Многочисленные исследования доказали эффективность нейтрализующих АТ для обеспечения защиты от инфекции ЧИКВ, однако минимальный протективный порог титров не определен из-за отсутствия стандартных протоколов. Так как инфекция ЧИКВ квалифицирована ВОЗ как тяжелое заболевание, в 2019 г. FDA (США) предположил возможность использования комбинации сероэпидемиологических исследований и использования модели приматов для определения протективного уровня нейтрализующих АТ к ЧИКВ. Было предложено применять такой путь в том случае, если ни традиционное, ни ускоренное одобрение новой вакцины невозможны. Рассмотрен также путь лицензирования, при котором эффективность вакцины может быть доказана с помощью хорошо охарактеризованной модели животных, если конечная точка исследования на животных четко связана с желаемым результатом для человека<sup>5</sup>. Оба альтернативных пути могут привести к лицензированию новых вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья без доказательства эффективности в КИ.

## Заключение

На данном этапе около 25 разработок препаратов для профилактики лихорадки Чикунгунья достаточно успешно прошли ДКИ, и 7 разработок находятся на разных стадиях КИ: живые аттенуированные вакцины (четыре препарата),

инактивированный (один препарат), содержащий вирусоподобные частицы (один препарат) и созданный на основе мРНК (один препарат). Из этих семи препаратов две вакцины VLA-1553 (живая аттенуированная) и PXVX-0317 (на основе вирусоподобных частиц) получили одобрение FDA на завершение КИ без доказательства эффективности на людях. Однако такая возможность не отменяет проведения КИ после лицензирования препарата и появления его на фармацевтическом рынке.

Существенной проблемой в разработках вакцин против лихорадки Чикунгунья также является необходимость в значительном финансировании разработки и вывода препарата на фармацевтический рынок. Такие факторы, как очаговый и спорадический характер вспышек инфекции, вызванной ЧИКВ, а также пожизненный иммунитет после перенесенного заболевания, являются определенными дестимуляторами для инвесторов. Более того, инвестиции в препараты, которые будут востребованы преимущественно в развивающихся странах, могут казаться сомнительными. Однако следует учитывать, что помимо контингента путешественников и специалистов, посещающих или работающих в эндемичных странах, имеется риск появления эндемичных для ЧИКВ регионов и в развитых странах из-за изменения климата и других непредвиденных факторов, которые могут способствовать появлению и распространению инфекции. Тот факт, что FDA (США) и EMA (European Medicines Agency, Нидерланды) предоставили статус препарата «для быстрого продвижения и приоритета» (Fast Track/Priority Medicine) для нескольких кандидатных вакцин для профилактики заболевания, вызванного ЧИКВ, должен внушать доверие коммерческим и государственным инвесторам к появлению потенциального рынка вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья.

## Литература/References

1. Okeoma CM, ed. *Chikungunya virus. Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment*. Springer; 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42958-8>
2. Weaver SC, Lecuit M. *Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease*. *N Engl J Med*. 2015;372:1231–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1406035>
3. Deeba F, Islam A, Kazim SN, Naqvi IH, Broor S, Ahmed A, Parveen S. *Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies*. *Pathogens Disease*. 2016;74(3):ftv119. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv119>
4. Schrauf S, Tschismarov R, Tauber E, Ramsauer K. Current efforts in the development of vaccines for the prevention of Zika and *Chikungunya virus* infections. *Front Immunol*. 2020;11:592–612. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00592>
5. Simo FBN, Bigna JJ, Well EA, Kenmoe S, Sado FBY, Weaver SC, et al. *Chikungunya virus infection*

<sup>4</sup> Там же.

<sup>5</sup> Code of Federal Regulations. Title 21. Section 601.91. Approval based on evidence of effectiveness from studies in animals. Washington DC: FDA; 2020.

- tion prevalence in Africa: a contemporaneous systematic review and meta-analysis. *Public Health*. 2019;166:79–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.puhe.2018.09.027>
6. Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordi L. *Chikungunya virus* infection: an overview. *New Microbiol*. 2013;36(3):211–27.
  7. Puntasecca CJ, King CH, LaBeaud AD. Measuring the global burden of Chikungunya and Zika viruses: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(3):e0009055.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009055>
  8. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, et al. Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol*. 2010;84(13):6497–504.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01603-09>
  9. Lum FM, Teo TH, Lee WW, Kam YW, Rénia L, Ng LF. An essential role of antibodies in the control of chikungunya virus infection. *J Immunol*. 2013;190(12):6295–302.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300304>
  10. Kam YW, Lum FM, Teo TH, Lee WW, Simarmata D, Harjanto S, et al. Early neutralizing IgG response to *Chikungunya virus* in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Mol Med*. 2012;4(4):330–43.  
<https://doi.org/10.1002/emmm.201200213>
  11. Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, Weaver SC. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J Virol*. 2001;75(21):10118–31.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.21.10118-10131.2001>
  12. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(5):319–27.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X)
  13. Peyrefitte CN, Rousset D, Pastorino BA, Pouillot R, Bessaud M, Tock F, et al. *Chikungunya virus*, Cameroon, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(5):768–71.  
<https://doi.org/10.3201/eid1305.061500>
  14. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007;3(12):e201.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
  15. Tsetsarkin KA, Chen R, Yun R, Rossi SL, Plante KS, Guerbois M, et al. Multi-peaked adaptive landscape for *Chikungunya virus* evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat Commun*. 2014;16(5):4084.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms5084>
  16. Gordon A, Gresh L, Ojeda S, Chowell G, Gonzalez K, Sanchez N, et al. Differences in transmission and disease severity between 2 successive waves of chikungunya. *Clin Infect Dis*. 2018;67(11):1760–7.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciy356>
  17. Chirathaworn C, Chansaenroj J, Poovorawan Y. Cytokines and chemokines in *Chikungunya virus* infection: protection or induction of pathology. *Pathogens*. 2020;9(6):415.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens9060415>
  18. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *J Infect Dis*. 2011;204(1):115–23.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiq006>
  19. Reddy V, Mani RS, Desai A, Ravi V. Correlation of plasma viral loads and presence of chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute *Chikungunya virus* infection. *J Med Virol*. 2014;86(8):1393–401.  
<https://doi.org/10.1002/jmv.23875>
  20. Davenport BJ, Bullock C, McCarthy MK, Hawman DW, Murphy KM, Kedl RM, et al. *Chikungunya virus* evades antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses to establish persistent infection in joint-associated tissues. *J Virol*. 2020;94(9):e02036-19.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>
  21. Schilte C, Staikovskiy F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, et al. *Chikungunya virus*-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2137.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002137>
  22. Marimoutou C, Ferraro J, Javelle E, Deparis X, Simon F. Chikungunya infection: self-reported rheumatic morbidity and impaired quality of life persist 6 years later. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(7):688–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.024>
  23. Erasmus JH, Rossi SL, Weaver SC. Development of vaccines for chikungunya fever. *J Infect Dis*. 2016;214(Suppl\_5):S488–96.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw271>
  24. Langsjoen RM, Haller SL, Roy CJ, Vinet-Oliphant H, Bergren NA, Erasmus JH, et al. *Chikungunya virus* strains show lineage-specific variations in virulence and cross-protective ability in murine and nonhuman primate models. *mBio*. 2018;9(2):e02449-17.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.02449-17>
  25. Partidos CD, Weger J, Brewoo J, Seymour R, Borland EM, Ledermann JP, et al. Probing the attenuation and protective efficacy of a candidate *Chikungunya virus* vaccine in mice with compromised interferon (IFN) signaling. *Vaccine*. 2011;29(16):3067–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.076>
  26. Gorchakov R, Wang E, Leal G, Forrester N, Plante K, Rossi SL, et al. Attenuation of *Chikungunya virus* vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein. *J Virol*. 2012;86(11):6084–96.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.06449-11>
  27. Levitt NH, Ramsburg HH, Hasty SE, Repik PM, Cole FE Jr, Lupton HW. Development of an attenuated strain of *Chikungunya virus* for use in vaccine production. *Vaccine*. 1986;4(3):157–62.  
[https://doi.org/10.1016/0264-410x\(86\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0264-410x(86)90003-4)
  28. Plante K, Wang E, Partidos CD, Weger J, Gorchakov R, Tsetsarkin K, et al. Novel chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. *PLoS Pathog*. 2011;7(7):e1002142.

- <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002142>
29. Chan YH, Teo TH, Utt A, Tan JJ, Amrun SN, Abu Bakar F, et al. Mutating *Chikungunya virus* non-structural protein produces potent live-attenuated vaccine candidate. *EMBO Mol Med*. 2019;11(6):e10092. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810092>
  30. Saraswat S, Athmaram TN, Parida M, Agarwal A, Saha A, Dash PK. Expression and characterization of yeast derived chikungunya virus like particles (CHIK-VLPs) and its evaluation as a potential vaccine candidate. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(7):e0004782. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004782>
  31. Weger-Lucarelli J, Chu H, Aliota MT, Partidos CD, Osorio JE. A novel MVA vectored chikungunya virus vaccine elicits protective immunity in mice. *PLoS Negl Tropic Dis*. 2014;8(7):e2970. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002970>
  32. Hallengård D, Kakoulidou M, Lulla A, Kümmerer BM, Johansson DX, Mutso M, et al. Novel attenuated chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice. *J Virol*. 2014;88(5):2858–66. <https://doi.org/10.1128/JVI.03453-13>
  33. Roques P, Ljungberg K, Kümmerer BM, Gosse L, Dereuddre-Bosquet N, Tchitchek N, et al. Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against *Chikungunya virus*. *JCI Insight*. 2017;2(6):e83527. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.83527>
  34. Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed chikungunya vaccine. *J Immunol*. 1971;107(3):643–7.
  35. Hoke CH Jr, Pace-Templeton J, Pittman P, Malinoski FJ, Gibbs P, Ulderich T, et al. US Military contributions to the global response to pandemic chikungunya. *Vaccine*. 2012;30(47):6713–20. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.025>
  36. Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Rao PV. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of *Chikungunya virus*. *Vaccine*. 2009;27(18):2513–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.062>
  37. Kumar M, Sudeep AB, Arankalle VA. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine*. 2012;30(43):6142–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.072>
  38. Khan M, Dhanwani R, Rao PVL, Parida M. Subunit vaccine formulations based on recombinant envelope proteins of *Chikungunya virus* elicit balanced Th1/Th2 response and virus-neutralizing antibodies in mice. *Virus Res*. 2012;167(2):236–46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.05.004>
  39. Metz SW, Gardner J, Geertsema C, Le TT, Goh L, Vlaskovic JM, Suhrbier A, Pijlman GP. Effective *Chikungunya virus*-like particle vaccine produced in insect cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2124. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002124>
  40. Weber C, Büchner SM, Schnierle BS. A small antigenic determinant of the chikungunya virus E2 protein is sufficient to induce neutralizing antibodies which are partially protective in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):e0003684. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003684>
  41. Szurgot I, Ljungberg K, Kümmerer BM, Liljeström P. Infectious RNA vaccine protects mice against *Chikungunya virus* infection. *Sci Rep*. 2020;10(1):21076. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78009-7>
  42. Zhang YN, Deng CL, Li JQ, Li N, Zhang QY, Ye HQ, Yuan ZM, Zhang B. Infectious *Chikungunya virus* (CHIKV) with a complete capsid deletion: a new approach for a CHIKV vaccine. *J Virol*. 2019;93(15):e00504-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00504-19>
  43. Taylor A, Liu X, Zaid A, Goh LY, Hobson-Peters J, Hall RA, et al. Mutation of the N-terminal region of chikungunya virus capsid protein: implications for vaccine design. *mBio*. 2017;8(1):e01970-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01970-16>
  44. Abeyratne E, Freitas JR, Zaid A, Mahalingam S, Taylor A. Attenuation and stability of CHIKV-NoLS, a live-attenuated chikungunya virus vaccine candidate. *Vaccines (Basel)*. 2018;7(1):2. <https://doi.org/10.3390/vaccines7010002>
  45. Carrau L, Rezelj VV, Noval MG, Levi LI, Megrian D, Blanc H, et al. *Chikungunya virus* vaccine candidates with decreased mutational robustness are attenuated *in vivo* and have compromised transmissibility. *J Virol*. 2019;93(18):e00775-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00775-19>
  46. Piper A, Ribeiro M, Smith KM, Briggs CM, Hutt E, Nanda K, et al. *Chikungunya virus* host range E2 transmembrane deletion mutants induce protective immunity against challenge in C57BL/6J mice. *J Virol*. 2013;87(12):6748–57. <https://doi.org/10.1128/JVI.03357-12>
  47. Gardner CL, Hritz J, Sun C, Vanlandingham DL, Song TY, Ghedin E, et al. Deliberate attenuation of Chikungunya virus by adaptation to heparan sulfate-dependent infectivity: a model for rational arboviral vaccine design. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2719. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002719>
  48. Chu H, Das SC, Fuchs JF, Suresh M, Weaver SC, Stinchcomb DT, et al. Deciphering the protective role of adaptive immunity to CHIKV/IRES a novel candidate vaccine against Chikungunya in the A129 mouse model. *Vaccine*. 2013;31(33):3353–60. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.059>
  49. Roy CJ, Adams AP, Wang E, Plante K, Gorchakov R, Seymour RL, et al. Chikungunya vaccine candidate is highly attenuated and protects nonhuman primates against telemetrically monitored disease following a single dose. *J Infect Dis*. 2014;209(12):1891–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu014>
  50. Voigt EA, Fuerte-Stone J, Granger B, Archer J, Van Hoven N. Live-attenuated RNA hybrid vaccine technology provides single-dose protection against *Chikungunya virus*. *Mol Ther*. 2021;29(9):2782–93. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.018>
  51. Metz SW, Martina BE, van den Doel P, Geertsema C, Osterhaus AD, Vlaskovic JM, Pijlman GP. *Chikungunya vi-*

- rus-like particles are more immunogenic in a lethal AG129 mouse model compared to glycoprotein E1 or E2 subunits. *Vaccine*. 2013;31(51):6092–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.045>
52. Arévalo MT, Huang Y, Jones CA, Ross TM. Vaccination with a *Chikungunya virus*-like particle vaccine exacerbates disease in aged mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(4):e0007316. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007316>
  53. Brandler S, Ruffié C, Combredet C, Brault JB, Najburg V, Prevost MC, et al. A recombinant measles vaccine expressing *Chikungunya virus*-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with *Chikungunya virus*. *Vaccine*. 2013;31(36):3718–25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.086>
  54. Ramsauer K, Schwameis M, Firbas C, Müllner M, Putnak R, Thomas SJ, et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(5):519–27. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70043-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70043-5)
  55. Chattopadhyay A, Wang E, Seymour R, Weaver SC, Rose JK. A chimeric vesiculo/alphavirus is an effective alphavirus vaccine. *J Virol*. 2013;87(1):395–402. <https://doi.org/10.1128/JVI.01860-12>
  56. Wang D, Suhrbier A, Penn-Nicholson A, Woraratanadharm J, Gardner J, Luo M, et al. A complex adenovirus vaccine against *Chikungunya virus* provides complete protection against viraemia and arthritis. *Vaccine*. 2011;29(15):2803–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.108>
  57. Dora EG, Rossi SL, Weaver SC, Tucker SN, Mateo R. An adjuvanted adenovirus 5-based vaccine elicits neutralizing antibodies and protects mice against *Chikungunya virus*-induced footpad swelling. *Vaccine*. 2019;37(24):3146–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.069>
  58. López-Camacho C, Kim YC, Blight J, Lazaro-Moreli M, Montoya-Diaz E, Huiskonen JT, et al. Assessment of immunogenicity and neutralisation efficacy of viral-vectored vaccines against *Chikungunya virus*. *Viruses*. 2019;11(4):322. <https://doi.org/10.3390/v11040322>
  59. Folegatti PM, Harrison K, Preciado-Llanes L, Lopez FR, Bittaye M, Kim YC, et al. A single dose of ChAdOx1 CHIK vaccine induces neutralizing antibodies against four *Chikungunya virus* lineages in a phase 1 clinical trial. *Nat Commun*. 2021;12(1):4636. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24906-y>
  60. García-Arriaza J, Cepeda V, Hallengård D, Sorzano CÓ, Kümmerer BM, Liljeström P, Esteban M. A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against chikungunya infection. *J Virol*. 2014;88(6):3527–47. <https://doi.org/10.1128/JVI.03418-13>
  61. van den Doel P, Volz A, Roose JM, Sewbalakasing VD, Pijlman GP, van Middelkoop I, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing glycoprotein E2 of *Chikungunya virus* protects AG129 mice against lethal challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3101. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003101>
  62. Wang E, Kim DY, Weaver SC, Frolov I. Chimeric *Chikungunya viruses* are nonpathogenic in highly sensitive mouse models but efficiently induce a protective immune response. *J Virol*. 2011;85(17):9249–52. <https://doi.org/10.1128/JVI.00844-11>
  63. Wang E, Volkova E, Adams AP, Forrester N, Xiao SY, Frolov I, Weaver SC. Chimeric alphavirus vaccine candidates for *Chikungunya*. *Vaccine*. 2008;26(39):5030–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.054>
  64. Erasmus JH, Auguste AJ, Kaelber JT, Luo H, Rossi SL, Fenton K, et al. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nat Med*. 2017;23(2):192–9. <https://doi.org/10.1038/nm.4253>
  65. Adam A, Luo H, Osman SR, Wang B, Roundy CM, Auguste AJ, et al. Optimized production and immunogenicity of an insect virus-based *Chikungunya virus* candidate vaccine in cell culture and animal models. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1):305–16. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1886598>
  66. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis*. 2011;53(3):296–302. <https://doi.org/10.1093/cid/cir334>
  67. Mallilankaraman K, Shedlock DJ, Bao H, Kawalekar OU, Fagone P, Ramanathan AA, et al. A DNA vaccine against *Chikungunya virus* is protective in mice and induces neutralizing antibodies in mice and non-human primates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1):e928. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000928>
  68. Muthumani K, Block P, Flingai S, Muruganatham N, Chaaithanya IK, Tingey C, et al. Rapid and long-term immunity elicited by DNA-encoded antibody prophylaxis and DNA vaccination against *Chikungunya virus*. *J Infect Dis*. 2016;214(3):369–78. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw111>
  69. Bao H, Ramanathan AA, Kawalakar O, Sundaram SG, Tingey C, Bian CB, et al. Nonstructural protein 2 (nsP2) of *Chikungunya virus* (CHIKV) enhances protective immunity mediated by a CHIKV envelope protein expressing DNA vaccine. *Viral Immunol*. 2013;26(1):75–83. <https://doi.org/10.1089/vim.2012.0061>
  70. Hallengård D, Lum FM, Kümmerer BM, Lulla A, Lulla V, García-Arriaza J, et al. Prime-boost immunization strategies against *Chikungunya virus*. *J Virol*. 2014;88(22):13333–43. <https://doi.org/10.1128/JVI.01926-14>
  71. Hidajat R, Nickols B, Forrester N, Tretyakova I, Weaver S, Pushko P. Next generation sequencing of DNA-launched *Chikungunya virus*. *Virology*. 2016;490:83–90. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.009>
  72. Ge N, Sun J, Liu Z, Shu J, Yan H, Kou Z, Wei Y, Jin X. An mRNA vaccine encoding *Chikungunya virus* E2-E1 protein elicits robust neutralizing antibody responses and CTL immune responses. *Viral Sin*. 2022;37(2):266–76. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.01.032>

73. Shaw C, Panther L, August A, Zaks T, Smolenov I, Bart S, Watson M. Safety and immunogenicity of a mRNA-based chikungunya vaccine in a phase 1 dose-ranging trial. *Int J Infect Dis.* 2019;79(S1):17. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.058>
74. Rossi SL, Comer JE, Wang E, Azar SR, Lawrence WS, Plante JA, et al. Immunogenicity and efficacy of a measles virus-vectored Chikungunya vaccine in non-human primates. *J Infect Dis.* 2019;220(5):735–42. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz202>
75. Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Bodison SA, Perry JG, Mangiafico JA. Phase II safety and immunogenicity study of live *Chikungunya virus* vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(6):681–5. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.681>
76. Reisinger EC, Tschismarov R, Beubler E, Wiedermann U, Firbas C, Loebermann M, et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored *Chikungunya virus* vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. *Lancet.* 2019;392(10165):2718–27. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32488-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32488-7)
77. Akahata W, Yang ZY, Andersen H, Sun S, Holdaway HA, Kong WP, et al. A virus-like particle vaccine for epidemic *Chikungunya virus* protects nonhuman primates against infection. *Nat Med.* 2010;16(3):334–8. <https://doi.org/10.1038/nm.2105>
78. Goo L, Dowd KA, Lin TY, Mascola JR, Graham BS, Ledgerwood JE, Pierson TC. A virus-like particle vaccine elicits broad neutralizing antibody responses in humans to all *Chikungunya virus* genotypes. *J Infect Dis.* 2016;214(10):1487–91. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw431>
79. Chang LJ, Dowd KA, Mendoza FH, Saunders JG, Sitar S, Plummer SH, et al. Safety and tolerability of *Chikungunya virus*-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet.* 2014;384(9959):2046–52. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61185-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61185-5)
80. Bennett SR, McCarty JM, Ramanathan R, Mendy J, Richardson JS, Smith J, et al. Safety and immunogenicity of PXVX0317, an aluminium hydroxide-adjuvanted *Chikungunya virus*-like particle vaccine: a randomised, double-blind, parallel-group, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(9):1343–55. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00226-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00226-2)
81. Chen GL, Coates EE, Plummer SH, Carter CA, Berkowitz N, Conan-Cibotti M, et al. Effect of a chikungunya virus-like particle vaccine on safety and tolerability outcomes: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2020;323(14):1369–77. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2477>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Отрашевская** – поиск, сбор и анализ научной литературы, подготовка научной информации, написание и редактирование текста рукописи, формирование таблиц; **В.П. Трухин** – критическое обсуждение научных материалов; **В.А. Меркулов** – критическое обсуждение текста рукописи; **Г.М. Игнатъев** – обоснование концепции исследования, подготовка, анализ и обсуждение научных материалов.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 22-14-00184.

**Конфликт интересов.** В.А. Меркулов является главным редактором, Г.М. Игнатъев – членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Otrasheskaja** searched, collected, and analysed scientific literature, prepared scientific information and tables, drafted and edited the manuscript. **V.P. Trukhin** participated in critical discussion of the scientific materials. **V.A. Merkulov** participated in critical discussion of the manuscript. **G.M. Ignatyev** substantiated the study concept and prepared, analysed, and discussed the scientific materials.

**Acknowledgements.** The work was supported by the Russian Science Foundation under grant 22-14-00184.

**Conflict of interest.** V.A. Merkulov is the Editor-in-Chief, and G.M. Ignatyev is a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

## Об авторах / Authors

**Отрашевская Елена Викторовна.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

[e.v.otrashevskaja@mail.ru](mailto:e.v.otrashevskaja@mail.ru)

**Трухин Виктор Павлович.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

**Игнатъев Георгий Михайлович**, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

[marburgman@mail.ru](mailto:marburgman@mail.ru)

**Elena V. Otrasheskaja.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

[e.v.otrashevskaja@mail.ru](mailto:e.v.otrashevskaja@mail.ru)

**Victor P. Trukhin.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

**Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

**Georgy M. Ignatyev**, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

[marburgman@mail.ru](mailto:marburgman@mail.ru)

Поступила 28.09.2022

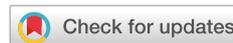
После доработки 27.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 28 September 2022

Revised 27 February 2023

Accepted 13 March 2023



## Анализ подходов к проведению испытания вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность»

С.М. Суханова, А.С. Тихонова , З.Е. Бердникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

 Тихонова Александра Сергеевна; [alehina@expmed.ru](mailto:alehina@expmed.ru)

### Резюме

В настоящее время в Российской Федерации пристальное внимание уделяется вопросам, связанным с вакцинопрофилактикой инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Повышение доверия населения к проведению вакцинации новыми препаратами в большой степени связано с гарантией отсутствия побочного действия, вызванного контаминацией. Высокий риск загрязнения биологических препаратов, в числе которых вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, обусловленный природой используемого сырья и свойствами препаратов, служит дополнительным фактором необходимости применения эффективных подходов к выявлению контаминирующих агентов.

**Цель работы** – оценить возможность усовершенствования процедуры проведения испытания на стерильность вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.

В статье представлены результаты анализа методик, предложенных разработчиками для проведения испытания по показателю «Стерильность» десяти зарегистрированных в нашей стране отечественных препаратов вакцин для профилактики COVID-19. Изучены специфические особенности препаратов, включая физико-химические свойства, наличие антимикробных компонентов и другие критически значимые факторы, влияющие на правильность постановки испытания. Показана возможность усовершенствования процедуры исследования препаратов по показателю «Стерильность». В качестве основных направлений авторами рассматривается предложение разработки альтернативной методики на основе второго фармакопейного метода (ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность, Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд.), а также применение универсальной питательной среды. Использование данных рекомендаций для усовершенствования утвержденных и разработки новых методик позволит повысить надежность и расширит возможности проведения испытания как в процессе производства, так и при экспертизе с целью регистрации обновленных вариантов вакцин для профилактики коронавирусной инфекции и последующего их ввода в гражданский оборот. Предложенные подходы могут быть применены для оценки качества по показателю «Стерильность» и других лекарственных средств.

**Ключевые слова:** стерильность; мембранная фильтрация; прямой посев; безопасность вакцин; оценка качества вакцин для профилактики COVID-19

**Для цитирования:** Суханова С.М., Тихонова А.С., Бердникова З.Е. Анализ подходов к проведению испытания вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):65–75. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-65-75>

## Analysis of approaches to sterility testing of COVID-19 prevention vaccines

S.M. Sukhanova, A.S. Tikhonova ✉, Z.E. Berdnikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Aleksandra S. Tikhonova; [alehina@expmed.ru](mailto:alehina@expmed.ru)

### Abstract

Preventive vaccination against SARS-CoV-2 infection is currently receiving close attention in the Russian Federation. Improving public confidence in immunisation with new vaccines largely depends on a guarantee of the absence of side effects caused by contamination. A high risk of contamination is inherent to biological products, including coronavirus prevention vaccines, due to their properties and the nature of raw materials used. This risk adds to the need for using effective contaminant detection approaches.

**The aim of the study** was to evaluate the possibility to improve sterility testing of preventive vaccines against SARS-CoV-2 infection.

This article presents an analysis of the procedures proposed by pharmaceutical developers for sterility testing of ten Russian vaccines approved in the country for COVID-19 prevention. The authors considered specific characteristics of these vaccines, including their physical and chemical properties, the presence of antimicrobial components, and other critical factors affecting the correctness of the experimental setup. The results suggest that it is possible to improve sterility testing. According to the authors, the main directions for its improvement are the proposal to develop an alternative procedure based on compendial method 2 (OFS.1.2.4.0003.15, Ph. Rus. XIV), as well as the use of a universal culture medium. If used for refining the established procedures and developing new ones, the authors' recommendations will improve the reliability and applicability of sterility testing during both manufacturing and pre-approval regulatory assessment of updated coronavirus vaccines for subsequent release to the market. The proposed approaches can be applied to testing other medicinal products for sterility.

**Key words:** sterility; membrane filtration; direct inoculation; safety of vaccines; quality assessment of COVID-19 prevention vaccines

**For citation:** Sukhanova S.M., Tikhonova A.S., Berdnikova Z.E. Analysis of approaches to sterility testing of COVID-19 prevention vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):65–75. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-65-75>

### Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), вспышка которой произошла в конце 2019 г. в Китайской Народной Республике (КНР) с эпицентром в городе Ухань и впоследствии принявшая характер пандемии, довольно длительно сохраняла высокие темпы распространения, несмотря на принимаемые во всем мире усиленные меры неспецифической профилактики и лечения<sup>1</sup>. Большой процент летальности среди заболевших был связан с высокой контагиозностью возбудителя и отсутствием врожденного иммунитета к новому высокопатогенному и смертельно опасному вирусу SARS-CoV-2 [1].

Отсутствие способов специфической профилактики и средств эффективного лечения вызвали во всем мире стремительный рост научных разработок жизненно необходимых лекарственных препаратов и тест-систем для *in vitro* диагностики новой инфекции. Учитывая, что вакцинация является наиболее эффективным и экономичным методом профилактики и борьбы с инфекционными заболеваниями, наибольшие усилия были направлены на разработку вакцин, вызывающих формирование приобретенного иммунитета [2, 3].

Только своевременно принятые строгие меры ограничения и массовая вакцинация различных

<sup>1</sup> Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 5 (08.04.2020) (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации).

возрастных групп населения, в первую очередь препаратами отечественного производства, стали решающими мерами для снижения смертности и уровня заболеваемости в нашей стране. Высокие темпы вакцинации против COVID-19 стали возможны благодаря созданию и производству в ускоренные сроки широкого спектра эффективных вакцин для профилактики вирусной инфекции [4].

В настоящее время в Российской Федерации внедрено в практику здравоохранения десять наименований препаратов вакцин, которые предназначены для парентерального (внутримышечного, в/м) или назального применения<sup>2</sup>.

Одним из наиболее важных показателей безопасности профилактических препаратов для данных способов введения является отсутствие микробной контаминации, подтверждение которого проводится в испытании по показателю «Стерильность». Учитывая ускоренные сроки разработки, сложность получения и выборочный характер контроля, огромную важность для здравоохранения, а также пристальное внимание и настороженность населения к вакцинам для профилактики коронавирусной инфекции<sup>3</sup>, поиск путей повышения надежности испытания по данному показателю принимает особое значение и актуальность.

Цель работы – оценить возможность усовершенствования процедуры проведения испытания на стерильность вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.

## Основная часть

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность<sup>4</sup> испытание на стерильность лекарственных препаратов проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения, которые должны быть учтены на стадии разработки методики испытания нового лекарственного средства (ЛС). Большинство исследователей, как правило, отдают предпочтение методу мембранной фильтрации, поскольку риск контаминирования испытуемого препарата и питательной среды в данном случае сведен к минимуму, а антимикробное действие препарата

без дополнительных манипуляций может быть достаточно легко устранено. Поэтому использование при испытании на стерильность вакцин метода мембранной фильтрации, снижающего вероятность получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов, является эффективным инструментом улучшения контроля качества продукта.

Вместе с тем для контроля труднорастворимых ЛС, к которым часто относятся биологические лекарственные препараты (БЛП), представляющие собой живые клетки, вязкие белковые суспензии или другие нефилтрующие субстанции, метод мембранной фильтрации не применим [5]. Дополнительным существенным ограничением для использования данного метода в настоящее время может оказаться отсутствие необходимого оборудования и расходных материалов.

Более простой и доступной альтернативой, особенно для проведения рутинного контроля при внутрипроизводственном мониторинге, может служить метод прямого посева. Однако в этом случае количество испытуемого материала согласно требованиям ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность будет лимитировано объемом питательной среды и нормами отбора образцов, что может вызвать затруднения при решении вопроса о способе устранения потенциального антимикробного действия препарата. Следствием неэффективной процедуры инактивации может стать получение недостоверных ложноположительных результатов. Кроме того, увеличение количества используемых вспомогательных материалов (пробирки, пробки, пипетки и др.), а также манипуляций с открытыми емкостями ведет к повышению риска контаминирования испытуемого образца и получения ложноотрицательного результата. Помимо этого, для правильной оценки результатов испытания БЛП, вызывающих изменение внешнего вида питательной среды, визуальное затрудняющее оценку наличия микробного роста, на 5–7 сут требуется проведение пересева исследуемого материала на свежую питательную среду. Введение дополнительной процедуры может увеличить риск получения ложноотрицательных результатов до 15% [5]. Поэтому метод прямого посева рекомендуется использовать для препаратов или материалов, испытание которых невозможно или экономично.

<sup>2</sup> Стопкоронавирус.рф. <https://xn--80aesfpebagmfb1c0a.xn--p1ai/>

<sup>3</sup> COVID-19: Vaccines to prevent SARS-CoV-2 infection. [https://www.uptodate.com/contents/covid-19-vaccines-to-prevent-sars-cov-2-infection?search=undefined&source=covid19\\_landing&usage\\_type=main\\_section#H204377381](https://www.uptodate.com/contents/covid-19-vaccines-to-prevent-sars-cov-2-infection?search=undefined&source=covid19_landing&usage_type=main_section#H204377381)

<sup>4</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

чески нецелесообразно выполнить методом мембранной фильтрации, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие которых можно устранить.

Для расширения возможностей проведения испытания и повышения надежности оценки качества наиболее рациональная и надежная схема выявления контаминации в вводимых людям препаратах, к которым относятся в том числе и вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, должна включать разработку адекватных методик, разработанных с учетом особенностей новых вакцин, на основе каждого из двух фармакопейных методов – метода прямого посева и мембранной фильтрации.

С целью определения возможности усовершенствования процедуры нами был проведен расширенный теоретический анализ методов и подходов, предложенных разработчиками для испытания по показателю «Стерильность» десяти зарегистрированных в нашей стране препаратов отечественных вакцин для профилактики COVID-19: Гам-КОВИД-Вак (в/м<sup>5</sup> и капли назальные<sup>6</sup>), Спутник Лайт<sup>7</sup>, Гам-КОВИД-Вак-Лио<sup>8</sup>, Гам-КОВИД-Вак-М<sup>9</sup>, Салнавак<sup>10</sup>, ЭпиВакКорона<sup>11</sup>, ЭпиВакКорона-Н<sup>12</sup>, Конвасэл<sup>13</sup> и КовиВак<sup>14</sup> (табл. 1).

Новые профилактические препараты по своему происхождению и составу условно можно отнести к следующим трем типам вакцин: векторные рекомбинантные (6 наименований), субъединичные/пептидные (3 наименования) и инактивированные (цельновирионные) (1 наименование). На первом этапе нами были рассмотрены критически значимые для правильности постановки испытания на стерильность как мето-

дом прямого посева, так и методом мембранной фильтрации, специфические особенности самих препаратов, в числе которых физико-химические свойства (прозрачность, pH, содержание белка), а также наличие в их составе антимикробных компонентов или других факторов, препятствующих прохождению образца через поры мембран (0,45 мкм) или мешающих однозначной интерпретации результатов (табл. 1).

Анализ данных показал, что, в отличие от готовых к применению форм препаратов векторных вакцин, представляющих собой прозрачный раствор, субъединичные (пептидные) и цельновирионная вакцины, выпускаемые в виде непрозрачной эмульсии или суспензии, при внесении в питательную среду методом прямого посева могут вызывать сходное с ростом контаминанта помутнение, затрудняющее интерпретацию результатов испытания. Вместе с тем низкое содержание белка (0,05–0,3 мг) при номинальном объеме первичных упаковок всех исследуемых препаратов не более 0,5–3 мл, согласно нашим ранее проведенным исследованиям [5], не станет ограничением для пропускания этих образцов через мембранные фильтры при испытании соответствующим методом. Установленное производителями нормативное требование pH в диапазоне нейтральных значений (6,0–8,0) является физиологическим и оптимальным для посева образцов в тиогликолевую (pH 7,1±0,2) и соево-казеиновую (pH 7,3±0,2) среды, а также для выявления в них возможного контаминанта любым из двух методов.

Сравнительное изучение состава исследуемых препаратов позволило установить особенности субъединичных (пептидных)

<sup>5</sup> Гам-КОВИД-Вак, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-006395. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>6</sup> Гам-КОВИД-Вак, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, капли назальные, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-008005. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>7</sup> Спутник Лайт, Векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-006993. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>8</sup> Гам-КОВИД-Вак-Лио, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-006423. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>9</sup> Гам-КОВИД-Вак-М, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РУ №: ЛП-007632. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>10</sup> Салнавак, Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия, РУ №: ЛП-008297. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>11</sup> ЭпиВакКорона, Вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19, ФБУН ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия, РУ №: ЛП-006504. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>12</sup> ЭпиВакКорона-Н, Вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19, ФБУН ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия, РУ №: ЛП-007326. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>13</sup> Конвасэл®, Вакцина субъединичная рекомбинантная для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, Россия, РУ №: ЛП-007967. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>14</sup> КовиВак (Вакцина коронавирусная инактивированная цельновирионная концентрированная очищенная), ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия, РУ №: ЛП-006800. <https://grls.rosminzdrav.ru>

**Таблица 1.** Сравнение свойств вакцин для профилактики коронавирусной инфекции и подходов к проведению их испытаний по показателю «Стерильность»  
**Table 1.** Comparison of prophylactic coronavirus vaccine characteristics and sterility testing approaches

Критерий <i>Criterion</i>	Наименование препарата <i>Name of the medicinal product</i>									
	Гам-КОВИД-Вак <i>Gam-COVID-Vac</i>	Гам-КОВИД-Вак – капли назальные <i>Gam-COVID-Vac (nasal drops)</i>	Гам-КОВИД-Вак-М <i>Gam-COVID-Vac-M</i>	Спутник Лайт <i>Sputnik Light</i>	Гам-КОВИД-Вак-Лео <i>Gam-COVID-Vac-Lyo</i>	Салнавак – спрей назальный <i>Salnavaс (nasal spray)</i>	Эпивоак Корона <i>EpiVac-Corona</i>	Эпивоак Корона-Н <i>EpiVac-Corona-N</i>	Конвасэл® <i>Convacell®</i>	КовиВак <i>CoviVac</i>
Тип <i>Type</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Векторная <i>Vector</i>	Пептидная <i>Subunit</i>	Пептидная <i>Subunit</i>	Субъединичная <i>Subunit</i>	Инактивированная <i>Inactivated</i>
Внешний вид <i>Appearance</i>	Раствор <i>Solution</i>	Раствор <i>Solution</i>	Раствор <i>Solution</i>	Раствор <i>Solution</i>	Лиофилизат <i>Lyophilisate</i>	Жидкость <i>Liquid</i>	Суспензия <i>Suspension</i>	Суспензия <i>Suspension</i>	Эмульсия <i>Emulsion</i>	Суспензия <i>Suspension</i>
Прозрачность <i>Clarity</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Прозрачный <i>Clear</i>	Не прозрачная <i>Turbid</i>	Не прозрачная <i>Turbid</i>	Не прозрачный <i>Turbid</i>	Не прозрачный <i>Turbid</i>
Особенности состава (антибиотики, сорбенты) <i>Specific components (antibiotics, sorbents)</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Отсутствуют <i>No</i>	Алюминия гидроксид 0,5–0,7 мг/доза <i>Aluminium hydroxide 0.5–0.7 mg/dose</i>	Алюминия гидроксид 0,5–0,7 мг/доза <i>Aluminium hydroxide 0.5–0.7 mg/dose</i>	Канамицин не более 50 нг/мл <i>Kanamycin not more than 50 ng/mL</i>	Алюминия гидроксид 0,3–0,5 мг/доза <i>Aluminium hydroxide 0.3–0.5 mg/dose</i>
pH	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,8–7,8	6,8–7,8	6,9–7,6	6,8–7,8
Белок <i>Protein</i>	Не более 50 мкг/доза <i>Not more than 50 µg/dose</i>	Не более 10 мкг/доза <i>Not more than 10 µg/dose</i>	Не более 50 мкг/доза <i>Not more than 50 µg/dose</i>	Не более 50 мкг/доза <i>Not more than 50 µg/dose</i>	Не более 50 мкг/доза <i>Not more than 50 µg/dose</i>	–	180–270 мкг/доза <i>180–270 µg/dose</i>	180–270 мкг/доза <i>180–270 µg/dose</i>	–	–
Антимикробное действие <i>Antimicrobial action</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>	Отсутствует <i>No</i>
Метод (прямой посев) (соотношение/пересев) <i>Method (direct inoculation) (sample-medium ratio / subculture)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	ПП (1:20) <i>DI (1:20)</i>	–	ПП (1:20)/пересев <i>DI (1:20)/subculture</i>	ПП (1:20)/пересев <i>DI (1:20)/subculture</i>	–	ПП (1:20)/пересев <i>DI (1:20)/subculture</i>

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Наименование препарата Name of the medicinal product																																																																									
Критерий Criterion	<table border="1"> <tr> <td>Гам-КОВИД-Вак</td> <td>Гам-КОВИД-Вак-М</td> <td>Спутник Лайт</td> <td>Гам-КОВИД-Вак-Лео</td> <td>Салнавак – спрей назальный</td> <td>Эпивак Корона</td> <td>Эпивак Корона-Н</td> <td>Конвасэл®</td> <td>КовиВак</td> </tr> <tr> <td>Gam-COVID-Vac</td> <td>Gam-COVID-Vac-M</td> <td>Sputnik Light</td> <td>Gam-COVID-Vac-Lyo</td> <td>Salnavac (nasal spray)</td> <td>EpiVac Corona</td> <td>EpiVac Corona-N</td> <td>Convacell®</td> <td>CoviVac</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>МФ/ 0,9% NaCl – 3×100 мл MF/ 0,9% NaCl, 3×100 ml</td> <td>-</td> <td>МФ/ 0,9% NaCl MF/ 0,9% NaCl</td> <td>МФ/ 0,9% NaCl MF/ 0,9% NaCl</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Метод (мембранная фильтрация)/особенности Method (membrane filtration), details</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)</td> </tr> <tr> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)</td> </tr> <tr> <td>МФ/ПП (1:10)</td> </tr> <tr> <td>MF/DI (1:10)</td> </tr> <tr> <td>Рекомендации (метод, соотношение, пересев, питательная среда) Recommendations (method, sample-medium ratio, subculture, culture media)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая среда (универсальная)</td> <td>Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)</td> </tr> </table>	Гам-КОВИД-Вак	Гам-КОВИД-Вак-М	Спутник Лайт	Гам-КОВИД-Вак-Лео	Салнавак – спрей назальный	Эпивак Корона	Эпивак Корона-Н	Конвасэл®	КовиВак	Gam-COVID-Vac	Gam-COVID-Vac-M	Sputnik Light	Gam-COVID-Vac-Lyo	Salnavac (nasal spray)	EpiVac Corona	EpiVac Corona-N	Convacell®	CoviVac	-	-	-	-	МФ/ 0,9% NaCl – 3×100 мл MF/ 0,9% NaCl, 3×100 ml	-	МФ/ 0,9% NaCl MF/ 0,9% NaCl	МФ/ 0,9% NaCl MF/ 0,9% NaCl	-	Метод (мембранная фильтрация)/особенности Method (membrane filtration), details	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)	МФ/ПП (1:10)	MF/DI (1:10)	Рекомендации (метод, соотношение, пересев, питательная среда) Recommendations (method, sample-medium ratio, subculture, culture media)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)																
Гам-КОВИД-Вак	Гам-КОВИД-Вак-М	Спутник Лайт	Гам-КОВИД-Вак-Лео	Салнавак – спрей назальный	Эпивак Корона	Эпивак Корона-Н	Конвасэл®	КовиВак																																																																	
Gam-COVID-Vac	Gam-COVID-Vac-M	Sputnik Light	Gam-COVID-Vac-Lyo	Salnavac (nasal spray)	EpiVac Corona	EpiVac Corona-N	Convacell®	CoviVac																																																																	
-	-	-	-	МФ/ 0,9% NaCl – 3×100 мл MF/ 0,9% NaCl, 3×100 ml	-	МФ/ 0,9% NaCl MF/ 0,9% NaCl	МФ/ 0,9% NaCl MF/ 0,9% NaCl	-																																																																	
Метод (мембранная фильтрация)/особенности Method (membrane filtration), details	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)																																																																	
Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)																																																																	
МФ/ПП (1:10)	МФ/ПП (1:10)	МФ/ПП (1:10)	МФ/ПП (1:10)	МФ/ПП (1:10)	МФ/ПП (1:10)	МФ/ПП (1:10)	МФ/ПП (1:10)	МФ/ПП (1:10)																																																																	
MF/DI (1:10)	MF/DI (1:10)	MF/DI (1:10)	MF/DI (1:10)	MF/DI (1:10)	MF/DI (1:10)	MF/DI (1:10)	MF/DI (1:10)	MF/DI (1:10)																																																																	
Рекомендации (метод, соотношение, пересев, питательная среда) Recommendations (method, sample-medium ratio, subculture, culture media)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая среда (универсальная)	Тюглицолевая/соево-казеиновая среда (универсальная)																																																																	

Примечание. МФ – мембранная фильтрация; ПП – прямой посев; «-» – не применимо.  
Note. MF, membrane filtration; DI, direct inoculation; -, not applicable.

и инактивированной вакцин, связанные с наличием дополнительных компонентов в виде минерального адъюванта алюминия гидроксида или антибиотика канамицина. При внесении в питательную среду адсорбированных препаратов, содержащих адъювант алюминия гидроксид, наблюдается локальное диффузное помутнение питательной среды, которое может вызывать определенную настороженность при выборе метода испытания и при последующей оценке результатов. Наличие антимикробного компонента потребует дополнительного изучения его влияния на возможную контаминацию в модельных условиях испытания и определения способа его устранения. Препараты векторных вакцин, напротив, не содержат антимикробных или других критичных для проведения испытания агентов любым из двух фармакопейных методов.

В ходе анализа представленных в нормативной документации (НД) методик установлено, что испытание вакцин всех типов проводится в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15. Стерильность преимущественно одним методом (90%), из них в 70% случаев методом прямого посева (рис. 1). Наиболее часто (83%) данный метод применяется для оценки качества препаратов векторного типа. Испытуемый образец вносят в питательную среду в соотношении 1:20 (табл. 1). Такой подход производителей к выбору одного метода может быть обусловлен, с одной стороны, необходимостью скорейшей регистрации и последующего внедрения вакцин в практику здравоохранения. С другой стороны, отсутствием в условиях проводимого испытания у данных препаратов антимикробного действия.

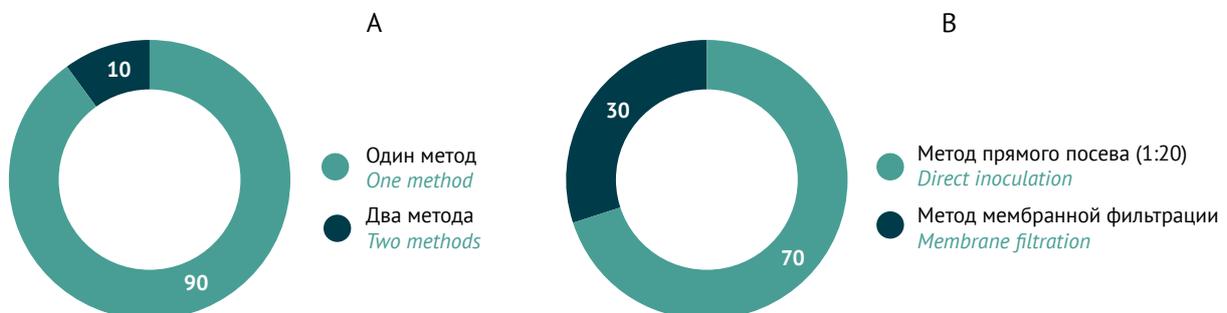
Вместе с тем более детальный анализ препаратов векторных вакцин, выпускаемых ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, имеющих сходное происхождение, состав и фи-

зико-химические свойства, небольшой объем первичной упаковки, не обладающих антимикробным действием и не вызывающих визуальных изменений питательной среды, свидетельствует об отсутствии критических факторов, препятствующих проведению испытания стерильности этих препаратов альтернативным методом – методом мембранной фильтрации. На рисунке 2 представлен пример инкубирования векторной вакцины в условиях, предусмотренных требованиями НД. Посевы – прозрачные, пересев не требуется.

Методика не потребует введения дополнительной процедуры разведения образца, а также подбора специфической жидкости для промывки мембран. Еще одним аргументом в пользу возможности оценки контаминации данных вакцин с использованием методики на основе метода мембранной фильтрации является утвержденная и успешно используемая процедура испытания аналогичной по физико-химическим свойствам зарегистрированной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции – Салнавак.

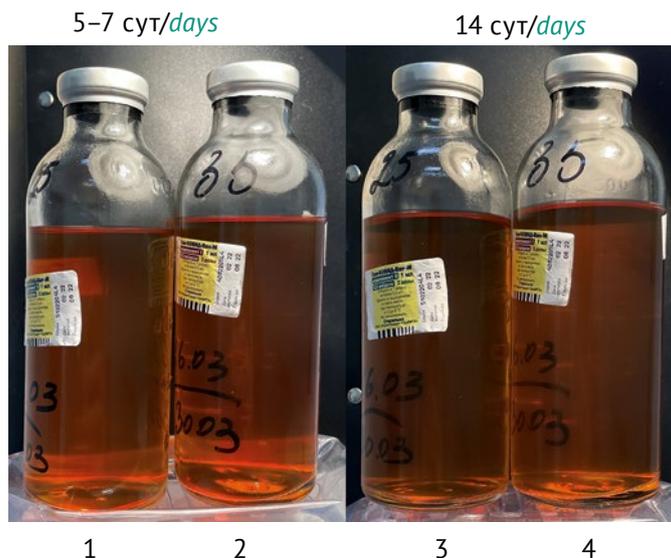
Испытание на стерильность единственной инактивированной вакцины КовиВак, представляющей собой очищенную концентрированную суспензию коронавируса SARS-CoV-2, согласно НД совершенно обоснованно проводят методом прямого посева в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность», используя соотношение количества испытуемого препарата и питательной среды 1:20. Для снижения эффекта помутнения питательной среды, связанного с наличием в составе препарата алюминия гидроксида, на 5–7 сут инкубирования проводят пересев на свежие питательные среды в том же соотношении (1:20) (рис. 3).

Многолетний опыт авторов в области экспертизы качества по показателю «Стерильность» адсорбированных инактивированных вирусных



**Рис. 1.** А – количество (%) методов испытания, используемых для оценки качества вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность»; В – соотношение методов испытания, используемых для оценки вакцин для профилактики COVID-19 по показателю «Стерильность».

**Fig. 1.** A, number of test methods (%) used to assess the quality of prophylactic COVID-19 vaccines in terms of sterility; B, ratio of test methods used to assess the sterility of prophylactic COVID-19 vaccines.



**Рис. 2.** Пример инкубирования образцов вакцины Гам-КОВИД-Вак-М на жидкой тиогликолевой среде на 5–7 и 14 сут при испытании на стерильность. 1, 3 – при температуре 25 °С и 2, 4 – при температуре 35 °С.

**Fig. 2.** Examples of incubation of Gam-COVID-Vac-M vaccine samples in a fluid thioglycollate medium observed on days 5–7 and day 14 of a sterility test. 1 and 3, at 25 °C; 2 and 4, at 35 °C.



**Рис. 3.** Пример инкубирования образцов вакцины КовиВак на 14 сут при испытании на стерильность. 1, 2 – посев и пересев при температуре 30–35 °С на жидкой тиогликолевой среде и 3, 4 – посев и пересев при температуре 20–25 °С на соево-казеиновой среде методом прямого посева.

**Fig. 3.** Examples of incubation of CoviVac vaccine samples observed on day 14 of a sterility test. 1 and 2, direct inoculation and subculture into a fluid thioglycollate medium at 30–35 °C; 3 and 4, direct inoculation and subculture into a soybean casein digest medium at 20–25 °C.

препаратов, в том числе таких, как Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая<sup>15</sup>,

Клещ-Э-Вак (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная)<sup>16</sup>, Вакцина

<sup>15</sup> Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая, ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия, РУ №: Р N002816/01. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>16</sup> Клещ-Э-Вак (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная), ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия, РУ №: ЛП-001584. <https://grls.rosminzdrav.ru>

гепатита В рекомбинантная дрожжевая<sup>17</sup>, в состав которых помимо инактивированных вирусных частиц входит также алюминия гидроксид, позволяет сделать вывод о теоретической возможности проведения испытания вакцины КовиВак методом мембранной фильтрации. Использование методики, разработанной на основе данного метода, исключит необходимость проведения процедуры пересева и значительно упростит учет результатов, поскольку компоненты препарата, вызывающие эффект помутнения, будут удалены в процессе фильтрации.

Адекватные методики на основе другого метода – метода мембранной фильтрации – разработаны для испытания двух препаратов: векторной и субъединичной вакцин, Салнавак и Конвасэл® соответственно. Выбор производителя вакцины Конвасэл® в пользу данного метода закономерно обусловлен непрозрачностью суспензии и наличием в составе препарата антибиотика, что требует особого внимания в случае использования метода прямого посева. Для устранения антимикробного действия препарата после фильтрации образца мембранные фильтры промывают раствором натрия хлорида 0,9%. Использование метода прямого посева для оценки микробиологического качества данных вакцин не предусмотрено. Однако, учитывая физико-химические свойства вакцины Салнавак и применимость этого метода для оценки качества рассмотренных нами аналогичных векторных вакцин, в случае необходимости возможна замена метода мембранной фильтрации и проведение испытания этого препарата по стандартной методике в рамках метода прямого посева.

Для контроля субъединичной вакцины Конвасэл® методика на основе метода прямого посева должна быть разработана более тщательно с учетом непрозрачности эмульсии и наличия в составе антибиотика канамицина. Логичным решением этих вопросов станет использование при посеве соотношения количества испытуемого образца и питательной среды 1:20 и проведение (при необходимости) процедуры пересева, позволяющей за счет снижения мутности более надежно интерпретировать результаты испытания.

Наиболее полно на сегодняшний день проведено исследование возможности проведения контроля на стерильность разработчиком препарата ЭпиВакКорона-Н. Испытание этого препарата согласно НД может быть проведено

любым из двух фармакопейных методов. Учитывая особенности состава, а именно наличие в суспензии препарата алюминия гидроксида, вызывающего диффузное помутнение питательной среды, при проведении испытания методом прямого посева в случае возникновения сомнений при предварительном учете результатов на 5–7 сут предусмотрен пересев на свежую тиогликолевую среду в соотношении 1:20. Наличие в составе препарата адсорбента не является препятствием для испытания препарата методом мембранной фильтрации, а возможное помутнение в этом случае устраняется промывкой мембранных фильтров стерильным 0,9% раствором натрия хлорида в количестве не более 100 мл, что позволяет исключить сомнения при учете результатов, когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов.

Очевидно, что, помимо утвержденного в НД метода прямого посева, аналогичный подход применим для оценки контаминации методом мембранной фильтрации идентичного по составу препарата того же производителя – ЭпиВакКорона, который был разработан и подан на регистрацию ранее. В настоящее время вакцина тестируется только методом прямого посева (рис. 4).

Наряду с определением возможности введения альтернативного метода в процедуру испытания исследуемых препаратов нами были рассмотрены способы усовершенствования уже разработанных методик, включая набор питательных сред и используемое при посеве соотношение количества испытуемого образца и питательной среды. В ходе анализа методик было установлено, что при выборе питательных сред для выявления аэробных бактерий и грибов большинство производителей (80%) справедливо отдают предпочтение только тиогликолевой среде, неоднократно подтвердившей свою более высокую чувствительность к обнаружению наиболее прихотливых микроорганизмов, и используют ее для инкубирования посевов при двух температурных режимах в качестве универсальной [6].

При подтверждении ростовых свойств в отношении тест-штаммов в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность<sup>18</sup> тиогликолевая среда такого качества позволяет выявлять контаминацию аэробными и анаэроб-

<sup>17</sup> Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая, ЗАО НПК «КОМБИОТЕХ», Россия, РУ №: Р N000738/01. <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>18</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.



**Рис. 4.** Пример инкубирования образцов вакцины ЭпиВакКорона на 14 сут при испытании на стерильность в жидкой тиогликолевой среде. 1, 3 – посев и пересев при температуре 35 °С и 2, 4 – посев и пересев при температуре 25 °С.

**Fig. 4.** Examples of incubation of EpiVacCorona vaccine samples in a fluid thioglycollate medium observed on day 14 of a sterility test. 1 and 3, inoculation and subculture at 35 °C; 2 and 4, inoculation and subculture at 25 °C.

ными бактериями и грибами. К тому же такой подход имеет определенные преимущества перед методикой, предполагающей применение соево-казеиновой среды, не выпускаемой отечественными производителями. Именно поэтому процедура, применяемая для испытания вакцин Солнавак и Ковивак, может быть пересмотрена в пользу процедуры посева на одну тиогликолевую среду, соответствующую по ростовым свойствам требованиям ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность, предусмотренным в случае использования среды в качестве универсальной.

Учитывая, что испытание на стерильность является выборочным, а не сплошным контролем всех образцов серии препарата, и носит статистический характер, для повышения выявляемости контаминации при проведении испытания векторных вакцин методом прямого посева также может быть предложено рассмотрение возможности изменения соотношения испытываемой пробы и питательной среды (1:10), которое установлено большинством фармакопей для испытания образцов, не обладающих антимикробным действием<sup>19</sup>. Основные рекомендации по повышению надежности методик и достоверности результатов испытания вакцин для профилактики COVID-19 обобщены и приведены в *таблице 1*.

Таким образом, при последующем пересмотре нормативных документов, рекомендуемом, в частности Европейским агентством

по лекарственным средствам (EMA)<sup>20</sup>, в случае обновления антигенного состава вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, производители после оценки пригодности дополнительных методик могут внести соответствующие изменения в раздел «Стерильность».

### Заключение

Анализ подходов к оценке качества зарегистрированных в Российской Федерации вакцин для профилактики COVID-19 свидетельствует о возможности усовершенствования процедуры их испытания по показателю «Стерильность». В качестве основных направлений рассматривается предложение разработки методики на основе альтернативного метода, и в первую очередь метода мембранной фильтрации, уменьшение соотношения объема препарата и питательной среды и применение для выявления бактерий и грибов одной универсальной тиогликолевой среды. Использование данных рекомендаций позволит повысить достоверность результатов и расширит возможности проведения испытания вакцин для профилактики коронавирусной инфекции как в процессе производства, так и при экспертизе с целью регистрации обновленных вариантов вакцин и при последующем их вводе в гражданский оборот. Предложенные подходы могут быть использованы для оценки качества по показателю «Стерильность» и других лекарственных средств.

<sup>19</sup> The International Pharmacopoeia (First and Second Supl.). Tenth Edition, 2020. <https://digicollections.net/phint/2020/index.html#d/b.1>

<sup>20</sup> Variantopdatering af COVID-19-vaccinerne er i process. 4. juli 2022. <https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/nyheder/2022/variantopdatering-af-covid-19-vaccinerne-er-i-proces/>

## Литература/References

1. Харченко ЕП. Коронавирус SARS-Cov-2: особенности структурных белков, contagiозность и возможные иммунные коллизии. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2020;19(2):13–30. Kharchenko EP. The coronavirus SARS-Cov-2: the characteristics of structural proteins, contagiousness, and possible immune collisions. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(2):13–30 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30>
2. Zhang J, Zeng H, Gu J, Li H, Zheng L, Zou Q. Progress and prospects on vaccine development against SARS-CoV-2. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(2):153.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines8020153>
3. Петров ВИ, Герасименко АС, Горбатенко ВС, Шаталова ОВ, Пономарева АВ. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики COVID-19. *Лексрственный вестник*. 2021;15(2):3–9. Petrov VI, Gerasimenko AS, Gorbatenko VS, Shatalova OV, Ponomareva AV. Efficacy and safety of vaccines for the prevention of COVID-19. *Lekarstvennyj vestnik*. 2021;15(2):3–9 (In Russ.).
4. Пахомов ДВ. Вакцинопрофилактика COVID-19. *Практическая пульмонология*. 2020;(3):74–9. Pakhomov DV. Vaccine prevention of COVID-19. *Practical pulmonology*. 2020;(3):74–9 (In Russ.).
5. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ. Разработка подходов к проведению испытания гетерологичных сывороточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(2):103–9. Sukhanova SM, Berdnikova ZE. Development of new approaches to sterility testing of heterologous serum products by membrane filtration method. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(2):103–9 (In Russ.).
6. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Захарова НЕ, Меркулов ВА. Испытание на стерильность иммунобиологических лекарственных препаратов в России. История вопроса и современные требования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):5–15. Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Zakharov NE, Merkulov VA. Sterility testing of immunobiological medicinal products in Russia. Historical background and current requirements. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):5–15 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-5-15>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.М. Суханова** – концепция исследования, написание текста рукописи, анализ и интерпретация материалов; формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **А.С. Тихонова** – анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи; работа с табличным и иллюстративным материалом; **З.Е. Бердникова** – критический пересмотр, редактирование и переработка текста рукописи.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.M. Sukhanova** conceptualised the study, drafted the manuscript, analysed and interpreted the material, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication. **A.S. Tikhonova** analysed and summarised literature data, drafted the manuscript, and prepared the tabular and graphical material. **Z.E. Berdnikova** critically reviewed the manuscript, edited and revised the text.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах/Authors

**Суханова Светлана Михайловна**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>  
[suhanovasm@expmed.ru](mailto:suhanovasm@expmed.ru)

**Тихонова Александра Сергеевна**.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>  
[alehina@expmed.ru](mailto:alehina@expmed.ru)

**Бердникова Зинаида Евтропиевна**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>  
[berdnikova@expmed.ru](mailto:berdnikova@expmed.ru)

**Svetlana M. Sukhanova**, Cand. Sci. (Biol.).  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>  
[suhanovasm@expmed.ru](mailto:suhanovasm@expmed.ru)

**Aleksandra S. Tikhonova**.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>  
[alehina@expmed.ru](mailto:alehina@expmed.ru)

**Zinaida E. Berdnikova**, Cand. Sci. (Biol.).  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>  
[berdnikova@expmed.ru](mailto:berdnikova@expmed.ru)

Поступила 29.11.2022

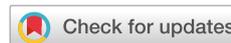
После доработки 02.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 29 November 2022

Revised 2 February 2023

Accepted 13 March 2023



## Получение и характеристика гомодимерной формы RBD S-белка SARS-CoV-2, обладающей повышенной авидностью к специфическим антителам

А.А. Деркаев, Е.И. Рябова, В.В. Прокофьев, И.А. Фаворская, Д.М. Гроусова, И.Б. Есмагамбетов✉, И.В. Должикова, Д.В. Щебляков

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

✉ Есмагамбетов Ильяс Булатович; [esmagambetovib@gmail.com](mailto:esmagambetovib@gmail.com)

### Резюме

Важным параметром, оцениваемым при мониторинге иммунной прослойки у населения и эффективности вакцинации населения, является уровень вируснейтрализующих антител. Разработка подхода к выявлению вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 с помощью безопасного, простого и быстрого метода, не требующего использования живых вирусов, имеет большое значение для борьбы с пандемией COVID-19. Для разработки тест-систем для проведения иммуноферментного анализа (ИФА), детектирующих потенциально вируснейтрализующие антитела, необходимо получение высокоочищенного рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка, обладающего высокой авидностью к специфическим антителам. **Цель работы:** получение и характеристика гомодимерной формы RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, а также клеточной линии, продуцирующей рекомбинантный RBD, для создания ИФА тест-системы для выявления потенциально вируснейтрализующих антител. **Материалы и методы:** дизайн генетической конструкции проводили *in silico*. Стабильную клеточную линию получали при помощи трансфекции клеток CHO-S, селекции на антибиотике и отбора оптимального клона. Рекомбинантный RBD очищали с использованием хроматографических методов, получали мономерную и гомодимерную формы RBD. Активность полученных форм анализировали с использованием методов Вестерн-блот, биослойной интерферометрии и непрямо ИФА. Для анализа использовали моноклональные антитела GamXRH19, GamP2C5 и h6g3, а также образцы сывороток крови добровольцев, вакцинированных препаратом Гам-КОВИД-Вак, и невакцинированных добровольцев. **Результаты:** получена клеточная линия CHO-S, стабильно продуцирующая рекомбинантный RBD S-белка вируса SARS-CoV-2. Показано, что при культивировании данной клеточной линии в режиме fed-batch более 7 суток рекомбинантный RBD способен образовывать гомодимеры за счет наличия неспаренных цистеинов. Количественный выход очищенного рекомбинантного RBD из культуральной жидкости составил 30–50 мг/л. Мономерная и гомодимерная формы RBD были разделены при помощи гель-фильтрации и охарактеризованы по способности взаимодействовать со специфическими моноклональными антителами, а также сыворотками крови от вакцинированных добровольцев. Продемонстрировано, что именно гомодимерная форма рекомбинантного RBD обладает повышенной авидностью к моноклональным антителам и антителам в сыворотке крови вакцинированных. **Выводы:** гомодимерная форма рекомбинантного RBD может являться более предпочтительной для анализа уровня антител к рецептор-связывающему домену S-белка вируса SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** рекомбинантный белок; коронавирусная инфекция; рецептор-связывающий домен; SARS-CoV-2; avidность

**Для цитирования:** Деркаев А.А., Рябова Е.И., Прокофьев В.В., Фаворская И.А., Гроусова Д.М., Есмагамбетов И.Б., Должикова И.В., Щебляков Д.В. Получение и характеристика гомодимерной формы RBD S-белка SARS-CoV-2, обладающей повышенной avidностью к специфическим антителам. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):76–89. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-450>

## Production and characterisation of a SARS-CoV-2 S-protein RBD homodimer with increased avidity for specific antibodies

A.A. Derkaev, E.I. Ryabova, V.V. Prokofiev, I.A. Favorskaya, D.M. Grousova,  
I.B. Esmagambetov✉, I.V. Dolzhikova, D.V. Shcheblyakov

N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, 18 Gamaleya St.,  
Moscow 123098, Russian Federation

✉ Ilyas B. Esmagambetov; [esmagambetovib@gmail.com](mailto:esmagambetovib@gmail.com)

### Abstract

Monitoring of the proportion of immune individuals and the effectiveness of vaccination in a population involves evaluation of several important parameters, including the level of virus-neutralising antibodies. In order to combat the COVID-19 pandemic, it is essential to develop approaches to detecting SARS-CoV-2 neutralising antibodies by safe, simple and rapid methods that do not require live viruses. To develop a test system for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that detects potential neutralising antibodies, it is necessary to obtain a highly purified recombinant receptor-binding domain (RBD) of the spike (S) protein with high avidity for specific antibodies. **The aim of the study** was to obtain and characterise a SARS-CoV-2 S-protein RBD homodimer and a recombinant RBD-expressing cell line, as well as to create an ELISA system for detecting potential neutralising antibodies. **Materials and methods:** the genetic construct was designed *in silico*. To generate a stable producer cell line, the authors transfected CHO-S cells, subjected them to antibiotic pressure, and selected the optimal clone. To isolate monomeric and homodimeric RBD forms, the authors purified the recombinant RBD by chromatographic methods. Further, they analysed the activity of the RBD forms by Western blotting, bio-layer interferometry, and indirect ELISA. The analysis involved monoclonal antibodies GamXRH19, Gamp2C5, and h6g3, as well as serum samples from volunteers vaccinated with Gam-COVID-Vac (Sputnik V) and unvaccinated ones. **Results:** the authors produced the CHO-S cell line for stable expression of the recombinant SARS-CoV-2 S-protein RBD. The study demonstrated the recombinant RBD's ability to homodimerise after fed-batch cultivation of the cell line for more than 7 days due to the presence of unpaired cysteines. The purified recombinant RBD yield from culture broth was 30–50 mg/L. Monomeric and homodimeric RBD forms were separated using gel-filtration chromatography and characterised by their ability to interact with specific monoclonal antibodies, as well as with serum samples from vaccinated volunteers. The homodimeric recombinant RBD showed increased avidity for both monoclonal and immune sera antibodies. **Conclusions:** the homodimeric recombinant RBD may be more preferable for the analysis of levels of antibodies to the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 S protein.

**Key words:** recombinant protein; coronavirus infection; receptor-binding domain; SARS-CoV-2; avidity

**For citation:** Derkaev A.A., Ryabova E.I., Prokofiev V.V., Favorskaya I.A., Grousova D.M., Esmagambetov I.B., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V. Production and characterisation of a SARS-CoV-2 S-protein RBD homodimer with increased avidity for specific antibodies. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):76–89. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-450>

## Введение

Коронавирусная инфекция 2019 (COVID-19) – тяжелое острое респираторное заболевание, впервые зарегистрированное в городе Ухань (Китай) в конце 2019 г.<sup>1</sup>; 11 марта 2020 г. была объявлена пандемия<sup>2</sup>. Возбудителем COVID-19 является новый коронавирус SARS-CoV-2, который относится к семейству *Coronaviridae*, роду *Betacoronavirus*. На ноябрь 2022 г. зарегистрировано более 630 млн подтвержденных случаев заболевания COVID-19 и более 6,5 млн летальных исходов по всему миру<sup>3</sup>. Важную роль в ограничении распространения вируса играют показатели иммунного статуса населения. Для детекции антител в сыворотках крови переболевших или вакцинированных людей применяют различные методы, среди которых – иммуноферментный анализ (ИФА) и реакция нейтрализации.

SARS-CoV-2 имеет четыре основных структурных белка: поверхностный шиповидный (spike) гликопротеин S (S-белок), оболочечный белок E, мембранный белок M и нуклеокапсидный белок N. Антитела, эффективно нейтрализующие вирус SARS-CoV-2, специфичны к поверхностному гликопротеину S. Данный белок играет ключевую роль в жизненном цикле вируса: S-белок взаимодействует с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (ACE2) на поверхности клетки, что приводит к интернализации вируса. S-белок состоит из двух субъединиц: S1 содержит N-концевой домен (NTD) и рецептор-связывающий домен (RBD), S2 содержит гептадный повтор 1 (HR1) и гептадный повтор 2 (HR2). Антитела, специфичные к различным областям S-белка, имеют разные механизмы ингибирования жизненного цикла вируса SARS-CoV-2. Например, антитела, связывающиеся с NTD, образуют комплекс белок–антитело, предотвращающий конформационные изменения в S-белке и блокирующий слияние мембран и проникновение вируса. Антитела, связывающиеся с RBD S-белка, образуют комплексы, ингибирующие взаимодействие RBD с рецептором ACE2, тем самым предотвращая интернализацию вируса [1]. Было показано, что около 90% антител, нейтрализующих SARS-CoV-2, специфичны к RBD [2].

Таким образом, RBD является важной мишенью при разработке препаратов для профилактики и терапии COVID-19, а также диагностических тест-систем для исследования иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2.

Цель работы – получение и характеристика гомодимерной формы RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, а также клеточной линии, продуцирующей рекомбинантный RBD, для создания ИФА тест-системы для выявления потенциально вируснейтрализующих антител.

## Материалы и методы

### Материалы

Гуманизированное моноклональное антитело GamXRH19 и тяжелоцепочечное моноклональное антитело GamP2C5 являются компонентами препарата ГамКовиМаб (лекарственный препарат для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, на основе гуманизированных моноклональных антител, раствор для инфузий, находящийся на II фазе клинических исследований<sup>4</sup>), производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Гуманизированное моноклональное антитело h6g3 – компонент препарата ГамЭзуМаб (лекарственный препарат для этиотропной терапии и экстренной профилактики лихорадки Эбола, прошедший I фазу клинических исследований<sup>5</sup>), производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

В работе были использованы образцы сыворотки крови добровольцев, вакцинированных препаратом Гам-КОВИД-Вак (4 образца), а также образцы сыворотки крови невакцинированных добровольцев в качестве контроля (2 образца). Образцы сывороток крови были получены в рамках исследования уровня вируснейтрализующих антител, проводимого совместно с Департаментом здравоохранения города Москвы.

Исследование было одобрено комитетом по биоэтике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 17 от 03.12.2021). Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

<sup>1</sup> Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. WHO. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

<sup>2</sup> WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. WHO. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>

<sup>3</sup> WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. WHO. <https://covid19.who.int/>

<sup>4</sup> <https://clintline.ru/reestr-klinicheskikh-issledovanij/630-28.10.2022.html>

<sup>5</sup> <https://clintline.ru/reestr-klinicheskikh-issledovanij/588-21.10.2020.html>

## Методы

**Дизайн генетической конструкции.** Аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного S-белка вируса SARS-CoV-2 (аминокислотная последовательность из 319–541 аминокислотных остатков (а.о.), UniProtKB: locus SPIKE\_SARS2, accession P0DTC2<sup>6</sup>) модифицировали с N-конца сигнальным пептидом щелочной фосфатазы SEAP (MLLLLLLGLRLQLSLGI) и с C-конца последовательностью глицин-серинового линкера и гистидинового метки (GSHHHHHHHH). Модификации *in silico* проводили при помощи программы Geneious Prime<sup>7</sup>. Кодонный состав нуклеотидной последовательности полученного полипептида адаптировали для экспрессии в клетках CHO; синтез нуклеотидной последовательности проведен ЗАО «Евроген» (Россия). Нуклеотидную последовательность клонировали в плазмиду pCEP4 (Invitrogen, США) по сайтам рестрикции *Xba*I (Thermo Fisher Scientific, США) и *Hind*III (Thermo Fisher Scientific, США), получая таким образом плазмиду pCEP-RBD-SARS-CoV-2. Далее плазмиду нарабатывали в препаративных количествах, как описано авторами ранее [3], и очищали при помощи коммерческого набора Plasmid Midiprep 2.0 (ЗАО «Евроген», Россия).

**Трансфекция культуры клеток и селекция трансфицированных клонов.** Плазмиду CEP-RBD-SARS-CoV-2, подвергали гидролизу по сайту рестрикции *Ahd*I. Линеаризованную плазмиду очищали из рестрикционной смеси при помощи набора Cleanup Standard (ЗАО «Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Культуру клеток CHO-S (Thermo Fisher Scientific, США) трансфицировали линеаризованной плазмидой pCEP-RBD-SARS-CoV-2 с использованием системы CHOgro (Mirus Bio, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали в 6-луночных культуральных планшетах (Corning, США) при 5% CO<sub>2</sub>, 80% влажности, 37 °С. Спустя 24 часа после трансфекции питательную среду заменяли на среду SFM4CHO (Cytiva, США) и добавляли антибиотик гигромицин В (InvivoGen, США) в концентрации 400 мкг/мл. Клетки культивировали в течение 7 сут, после чего концентрацию антибиотика увеличивали до 600 мкг/мл и продолжали культивирование в течение 7 сут; затем увеличивали концентрацию антибиотика до 800 мкг/мл и далее культивировали клетки еще неделю. Питательную среду в лунках заменяли свежей по мере закисления. Изменение pH культуральной жидкости оценивали визуально

при помощи красителя фенолового красного (Sigma Aldrich, США). Периодически оценивали жизнеспособность клеток в лунках с использованием автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-Rad, США). Для этого 20 мкл клеточной суспензии смешивали в соотношении 1:1 с 0,4% раствором трипанового синего (Bio-Rad, США). В качестве контролей селекции использовали интактные клетки без добавления антибиотика (контроль условий культивирования) и интактные клетки с добавлением антибиотика (контроль активности антибиотика).

**Получение суспензии клонов-продуцентов.** Клеточную суспензию после трансфекции и культивирования с антибиотиком гигромицином В высевали в 96-луночные планшеты (Corning, США) в концентрации 7 клеток/мл (100 мкл суспензии в лунку) в среде SFM4CHO с добавлением 20% кондиционированной культуральной жидкости. Описанным выше способом проводили высевание клеток в десять планшетов. Клетки культивировали при 5% CO<sub>2</sub>, 80% влажности, 37 °С в течение 14 сут, затем культуральную жидкость отбирали для анализа продукции рекомбинантного RBD и взамен добавляли свежую питательную среду SFM4CHO. Моноклональность оценивали визуально, под микроскопом, по наличию в лунках единичных фокусов роста клеток. При достижении высокой плотности культуральной суспензии отобранные клоны-продуценты пересеивали в 6-луночные планшеты и культивировали в среде SFM4CHO при 5% CO<sub>2</sub>, 80% влажности, 37 °С. При достижении концентрации клеток в лунках 10<sup>6</sup> клеток/мл суспензию клонов пересеивали в культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup>. При достижении концентрации клеток в лунках 10<sup>6</sup> клеток/мл суспензию клонов пересеивали в культуральные колбы Эрленмейера объемом 125 мл (Corning, США). Количество и выживаемость клеток оценивали при помощи счетчика клеток TC20, как описано в предыдущем подразделе.

**Культивирование клонов-продуцентов в культуральных колбах.** Культивирование клонов-продуцентов в культуральных колбах Эрленмейера осуществляли при 5% CO<sub>2</sub>, 80% влажности, 37 °С, при постоянном перемешивании с использованием шейкера-инкубатора Multitron (Infors HT, Швейцария) со скоростью 120 об/мин. Культивирование в колбах объемом 125 мл осуществляли с рабочим объемом клеточной суспензии 25 мл, в колбах объемом 500 мл – с рабочим объемом клеточной суспензии 100 мл и в колбах

<sup>6</sup> <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC2/entry>

<sup>7</sup> <https://www.geneious.com/prime/>

объемом 1000 мл – с рабочим объемом клеточной суспензии 200 мл по мере необходимости масштабирования. Клеточную суспензию пересевали при достижении концентрации клеток  $(4-5) \times 10^6$  клеток/мл (как правило, через 2–3 сут культивирования). Количество и выживаемость клеток оценивали при помощи счетчика клеток TC20. При культивировании отобранного клона-продуцента в стадии продукции (режим культивирования с подпиткой, fed-batch), ежедневно к клеточной суспензии добавляли 3 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия) и 1 ммоль глутамина («ПанЭко», Россия). Определение концентрации нутриентов (глюкоза, глутамат, глутамин) и метаболитов (лактат и аммоний) проводили при помощи анализатора метаболитов Cedex Bio Analyzer (Roche CustomBiotech, Швейцария). Культивирование в стадии продукции проводили в течение 7–10 сут. Завершение процесса культивирования осуществляли при падении выживаемости клеточной культуры до 70%.

**Очистка рекомбинантного RBD из культуральной жидкости.** Первичную очистку рекомбинантного RBD из культуральной жидкости осуществляли при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии [4]. Хроматографию проводили в режиме связывание-элюция (bind-elute mode) на приборе AKTA Start, Cytiva, с использованием 1 мл колонки HisTrap HP, Cytiva. Элюцию проводили в изократическом режиме при скорости потока один объем колонки в минуту раствором: 20 мМ Трис, 500 мМ хлорид натрия, 500 мМ имидазол, pH 8. Дополнительную очистку, замену буфера и разделение мономерных и димерных форм рекомбинантного RBD осуществляли при помощи гель-фильтрации с использованием колонки XK 26/100 (Cytiva, США), упакованной сорбентом Superdex 200 pg (Cytiva, США) [5, 6], а также концентрирования с использованием Vivaspin 20 10 000 MWCO (Sartorius Stedim Biotech, Германия).

**Определение концентрации и продукции рекомбинантного RBD в культуральной жидкости.** Определение концентрации рекомбинантного RBD в культуральной жидкости осуществляли методом биослойной интерферометрии при помощи прибора Octet RED96 (Pall Biotech, США) и сенсоров Ni-NTA Dip and Read Biosensors (Pall Biotech, США) согласно протоколам фирмы-производителя.

Производство целевого белка на разные сутки культивирования контролировали, используя метод электрофореза в полиакриламидном геле [7, 8]. Электрофорез проводили как в невосстанавливающих, так и в восстанавливающих условиях с добавлением β-меркаптоэтанола.

**Непрямой иммуноферментный анализ и Вестерн-блот.** Непрямой иммуноферментный ана-

лиз (ИФА) и Вестерн-блот проводили, как описано авторами ранее [4–6, 9]. Полученные антигены сорбировали на поверхность ячеек 96-луночных иммунологических планшетов в концентрации 100 нг/луночка в течение 16 ч при 4 °C в карбонатно-калиевом буфере. Далее, после блокировки лунок планшетов раствором сухого обезжиренного молока (Sigma Aldrich, США), вносили моноклональные антитела GamP2C5 и GamXRH19 или образцы сыворотки крови вакцинированных (4 образца) и невакцинированных (2 образца) добровольцев. В качестве отрицательного контроля использовали антитело h6g3, специфичное к гликопротеину GP вируса Эбола.

В качестве вторичных антител применяли антитела NA933 (Amersham ECL HRP-Conjugated Antibodies, Cytiva, США), специфичные к IgG человека и конъюгированные с пероксидазой хрена. Определение концентрации рекомбинантного RBD для анализа проводили спектрофотометрически при длине волны 280 нм с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Каждый образец антител и сывороток крови, использованных в непрямом ИФА, вносился в трех повторах. Обработку результатов Вестерн-блот проводили при помощи прибора Amersham Imager 600 (GE Healthcare, США). Для обработки результатов непрямого ИФА использовали программное обеспечение Microsoft Excel 2010 (Microsoft, США).

**Определение равновесных констант диссоциации антител с рекомбинантным RBD.** Определение равновесных констант диссоциации осуществляли с использованием метода биослойной интерферометрии с помощью прибора Octet RED96 (Pall Biotech, США) и сенсоров Anti-Human IgG Fc Capture (AHC) Dip and Read Biosensors (Pall Biotech, США), как описано в работе D. Shcheblyakov с соавт. [7]. Измерения проводили в кинетическом буфере. Связывание антител с сенсорами осуществляли в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный RBD вносили в концентрации 100, 50 и 25 нг/мл соответственно. Обсчет результатов проводили в программе ForteBio Data Analysis 10.0 (ForteBio, США). Концентрацию RBD и моноклональных антител определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с помощью прибора Nanodrop 2000 с последующим учетом уникальных коэффициентов экстинкции для каждого моноклонального антитела. Каждый эксперимент проводили в трех повторах.

## Результаты и обсуждение

В настоящее время оценка уровня вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу SARS-CoV-2 в плазме крови вакцинированных

и переболевших людей является актуальной задачей. Уровень ВНА может служить косвенным показателем защиты организма от инфицирования вирусом SARS-CoV-2 и, как следствие, защиты от заболевания COVID-19 [8]. Вируснейтрализующими являются в основном антитела, специфичные к определенным эпитопам рецептор-связывающего домена RBD гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 [9]. Таким образом, о количестве ВНА в организме можно косвенно судить по количеству антител, специфичных к RBD [10].

Самым простым и удобным количественным методом определения уровня антител, специфичных к RBD, является непрямой метод ИФА [11, 12]. ИФА проводится в несколько этапов: сорбция рекомбинантного RBD на 96-луночный планшет; добавление испытуемых образцов сывороток или плазмы крови, а также референсных образцов; внесение конъюгированных вторичных антител. Уровень RBD-специфических антител определяют относительно уровня сигнала оптической плотности при длине волны 450 нм. Такой способ оценки уровня RBD-специфических антител, которые потенциально могут быть вируснейтрализующими, является более быстрым и безопасным, чем прямая реакция нейтрализации *in vitro* с использованием живого или псевдотипированного вируса. Кроме того, данный подход можно применять для изучения специфической активности препаратов для терапии и экстренной профилактики COVID-19. В частности, уровень специфического сигнала к рекомбинантному RBD в непрямом ИФА являлся одним из критериев отбора однодоменных антител [4] при разработке препарата ГамКовиМаб, успешно прошедшего первую фазу клинических исследований.

Ключевым компонентом для разработки метода определения RBD-специфических антител в реакции непрямого ИФА является очищенный препарат рекомбинантного RBD. Следовательно, для получения производственных серий ИФА тест-систем необходимо разработать технологию получения рекомбинантного RBD, имеющего высокую степень чистоты и, главное, обладающего специфической активностью. В данной работе нами была разработана технология получения гомодимерной формы рекомбинантного RBD, обладающей большей авидностью к специфическим антителам и, как следствие, большими уровнями сигнала по сравнению с мономерной формой в реакции непрямого ИФА.

#### **Получение клеточной линии, стабильно продуцирующей рекомбинантный RBD**

При получении клеточной линии, стабильно продуцирующей рекомбинантный RBD, основ-

ными параметрами являются выход целевого продукта и его качество. Поскольку RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 имеет четыре сайта гликозилирования, из которых два сайта O-гликозилирования [13] и два сайта N-гликозилирования [14, 15], а также несколько дисульфидных связей [14], необходимо было использовать точную линию, способную обеспечивать данные модификации белка. Учитывая это, нами была выбрана культура клеток CHO-S, позволяющая достигать высокий уровень экспрессии трансгена, а также обеспечивать гликозилирование и образование дисульфидных связей [16]. В качестве экспрессирующего вектора была использована плазмида рСЕР4, обеспечивающая высокий уровень экспрессии трансгена под контролем CMV-промотора, а также обладающая возможностью селекции клона-продуцента на антибиотике гигромицин В.

Аминокислотную последовательность RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 (319–541 а.о.) модифицировали *in silico* с N-конца сигнальным пептидом щелочной фосфатазы SEAP и с C-конца последовательностью глицин-серинового линкера и гистидиновой метки для секреции белка в культуральную жидкость и возможности очистки с помощью металл-хелатной аффинной хроматографией соответственно. Схема конструкции представлена на *рисунке 1*. Аминокислотная и нуклеотидная последовательности полученной конструкции представлены на *рисунке 2*.

Далее нуклеотидную последовательность, кодирующую созданную *in silico* конструкцию, синтезировали и клонировали в вектор рСЕР4, получая таким образом вектор рСЕР-RBD-SARS-CoV-2. Схематичное изображение плазмиды рСЕР-RBD-SARS-CoV-2 представлено на *рисунке 3*.

Далее проводили трансфекцию клеток CHO-S полученным вектором, селекцию и отбор трансфицированных клонов. Изучение продукции рекомбинантного RBD в культуральную жидкость отдельными клонами оценивали методом биослойной интерферометрии, позволяющим определять концентрацию белков, содержащих гистидиновую метку. В результате был отобран оптимальный клон-продуцент, обеспечивающий выход рекомбинантного белка RBD около 30–50 мг/л культуральной жидкости. В процессе культивирования было обнаружено, что при длительном культивировании (более 7 сут) отобранного клона-продуцента в культуральных колбах в режиме fed-batch с добавлением глюкозы и глутамина постепенно происходит накопление гомодимерных форм рекомбинантного RBD, которые впоследствии можно выделить при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии (*рис. 4*).



**Рис. 1.** Схематическое изображение генетической конструкции, экспрессирующей рецептор-связывающий домен вируса SARS-CoV-2. SP – сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию белка в культуральную жидкость; RBD – рецептор-связывающий домен S-белка вируса SARS-CoV-2; His-tag – гистициновая метка, обеспечивающая очистку белка аффинной хроматографией.

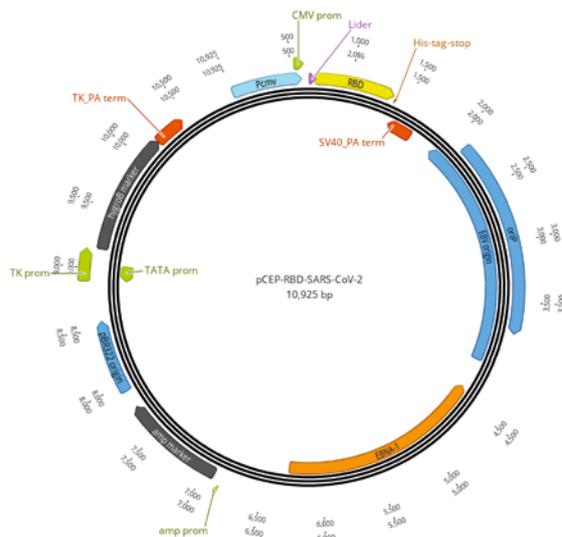
**Fig. 1.** Schematic representation of the RBD-expressing genetic construct. SP—signal peptide enabling protein secretion to culture broth; RBD—SARS-CoV-2 S-protein receptor-binding domain; His-tag—histidine tag for protein purification by affinity chromatography.

A  
**MLLLLLLLGLRLQLSLGIRVQPTESIVRFPNITNL-  
 CPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYN-  
 SASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRG-  
 DEVROIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN-  
 LDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGST-  
 PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLS-  
 FELLHAPATVCGPKKSTNLVKNCVNF****GSHHHHHHHH-  
 HHH**

B  
**ATGCTGCTGCTCCTGTTGCTGTTGGGACTGAGACT-  
 GCAACTGTCTCTTGGCATCCGGGTGCAGCCCAC-  
 CGAATCCATCGTGCGGTTCCCAATATACCAATCT-  
 GTGCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTC-  
 GCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAG-  
 CAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACCTC-  
 CGCCAGCTTACGACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTC-  
 CCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTACAAACGT-  
 GTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGT-  
 GCGGCAGATTGCCCTGGACAGACAGGCAAGATC-  
 GCCGACTACAACATAAGCTGCCGACGACTTAC-  
 CGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTG-  
 GACTCCAAAGTCGGCGCAACTACAATTACCTGTAC-  
 CGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGC-  
 GGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCAC-  
 CCCTTGTAACGGCGTGAAGGCTTCAACTGCTACTTC-  
 CCACTGCAGTCTACGGCTTTCAGCCACAATGGCGT-  
 GGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGTGAGCTTC-  
 GAACTGCTGCATGCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTA-  
 AGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAATGCGT-  
 GAACTTC**GGAAGTACCACCATCATCACCACCACCAT-  
 CATCACTGATAA****

**Рис. 2.** Аминокислотная (А) и нуклеотидная (В) последовательности разработанной генетической конструкции. Синим цветом обозначена последовательность SP, красным цветом – последовательность His-tag.

**Fig. 2.** Amino acid (A) and nucleotide (B) sequences of the developed genetic construct. The signal peptide sequence is shown in blue; the His-tag sequence, in red.



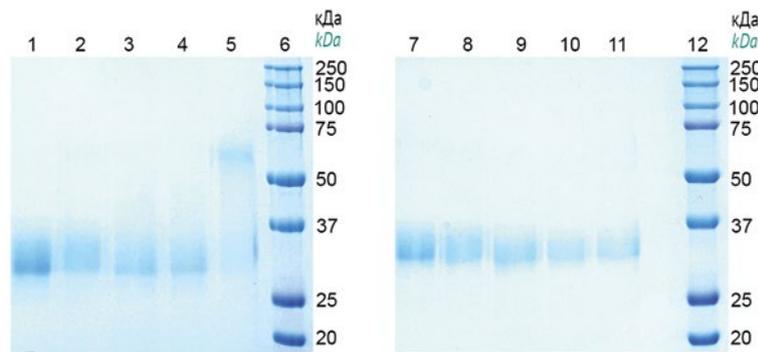
**Рис. 3.** Схематическое изображение плазмиды pCEP-RBD-SARS-CoV-2.

**Fig. 3.** Schematic representation of the pCEP-RBD-SARS-CoV-2 plasmid.

На 7 сут культивирования происходит образование и накопление гомодимерных форм RBD с молекулярной массой около 60 кДа (рис. 4, дорожка 5). Подвижность мономера RBD на электрофореграмме около 30 кДа (рис. 4, дорожки 1–4) может быть объяснена гликозилированием RBD. По всей видимости, данное явление связано с тем, что в аминокислотной последовательности RBD (319–541 а.о.) присутствует неспаренный остаток цистеина, вакантный для образования S–S связи и, таким образом, способный инициировать образование гомодимера из двух молекул RBD. Результаты электрофореза в невосстанавливающих условиях показали, что в образце очищенного рекомбинантного RBD на 7 сут культивирования отчетливо выявляется гомодимерная форма с молекулярной массой около 60 кДа (рис. 4, дорожка 5), а при электрофорезе в восстанавливающих условиях детектируется преимущественно мономерная форма этого образца RBD (рис. 4, дорожка 11). Данные, полученные при проведении электрофореза, подтверждают гипотезу образования димера RBD за счет дисульфидных связей неспаренных цистеинов, так как при восстановлении β-меркаптоэтанолом данная связь разрушается и в образце наблюдается преимущественно мономерная форма.

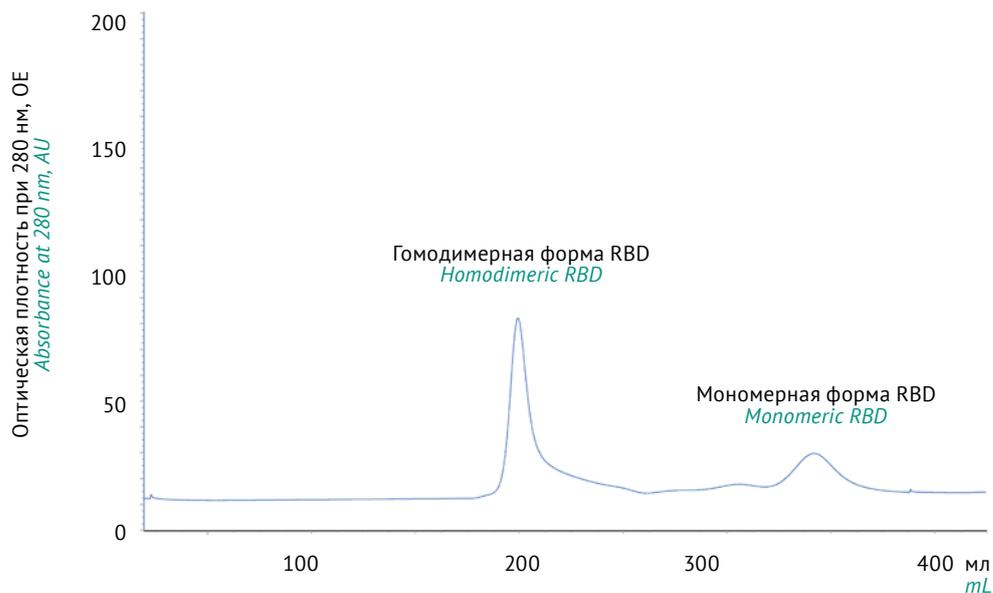
#### **Очистка и разделение мономерных и гомодимерных форм рекомбинантного RBD**

Отобранный клон-производитель культивировали в культуральных колбах Эрленмейера объемом 1000 мл в рабочем объеме 200 мл в течение 7 сут,



**Рис. 4.** Электрофореграмма образцов рекомбинантного RBD, очищенных металл-хелатной аффинной хроматографией в разные сутки культивирования. Электрофорез проводили в невосстанавливающих (дорожки 1–5) и в восстанавливающих условиях (дорожки 7–11). Дорожки на электрофореграмме: образец, очищенный на 3 сут культивирования, – дорожки 1, 7; образец, очищенный на 6 сут – дорожки 2, 8; образец, очищенный на 4 сут, – дорожки 3, 9; образец, очищенный на 5 сут, – дорожки 4, 10; образец, очищенный на 7 сут – дорожки 5, 11; маркер молекулярной массы (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, США) – дорожки 6, 12.

**Fig. 4.** Electropherogram of recombinant RBD samples purified by metal-chelate affinity chromatography on different days of cultivation. Electrophoresis was performed under non-reducing (lanes 1–5) and reducing conditions (lanes 7–11). Electropherogram lanes represent samples purified on cultivation day 3 (lanes 1, 7), day 4 (lanes 3, 9), day 5 (lanes 4, 10), day 6 (lanes 2, 8), and day 7 (lanes 5, 11); lanes 6 and 12 show the molecular weight marker (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, USA).

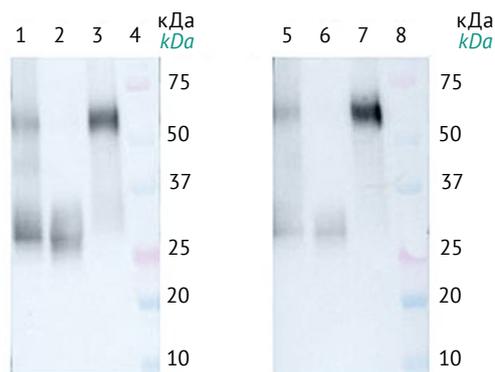


**Рис. 5.** Хроматограмма рекомбинантного RBD. Хроматографическую очистку проводили с помощью гель-фильтрации с использованием колонки XK 26/100, упакованной сорбентом Superdex 200 pg.

**Fig. 5.** Chromatogram of the recombinant RBD purified by gel-filtration chromatography using an XK 26/100 column packed with Superdex 200 prep-grade resin.

после чего культуральную жидкость отделяли от клеток и очищали при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием колонки HisTrap HP. При хроматографировании культуральную жидкость наносили частями по 30–40 мл; при этом с одного нанесения на колонку получали около 1 мг целевого белка RBD.

Собранные фракции, содержащие RBD, объединяли, концентрировали до объема 10 мл с использованием центрифужных концентраторов и далее проводили гель-фильтрацию. В результате гель-фильтрации происходило разделение мономерной и гомодимерной форм рекомбинантного RBD (рис. 5).



**Рис. 6.** Результаты вестерн-блот анализа различных фракций рекомбинантного RBD с использованием специфических моноклональных антител GamP2C5 (дорожки 1–3) и GamXRH19 (дорожки 5–7): дорожки 1, 5 – рекомбинантный RBD до гель-фильтрации; дорожки 2, 6 – мономерный рекомбинантный RBD; дорожки 3, 7 – гомодимерный рекомбинантный RBD; дорожки 4, 8 – маркер молекулярной массы (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, США).

**Fig. 6.** Western blots of recombinant RBD fractions, obtained with specific monoclonal antibodies GamP2C5 (lanes 1–3) and GamXRH19 (lanes 5–7); lanes 1 and 5—recombinant RBD before gel-filtration chromatography, lanes 2 and 6—monomeric recombinant RBD, lanes 3 and 7—homodimeric recombinant RBD, lanes 4 and 8—molecular weight marker (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, USA).

Таким образом, в результате гель-фильтрации получили фракции, содержащие преимущественно гомодимерную форму RBD (первый пик) и преимущественно мономерную форму (второй пик). Далее полученные фракции анализировали по взаимодействию со специфическими антителами с использованием методов Вестерн-блот, биослойной интерферометрии и непрямого ИФА, а также с сыворотками крови от вакцинированных Гам-КОВИД-Вак с помощью метода непрямого ИФА.

#### **Изучение взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD со специфическими антителами методом Вестерн-блот**

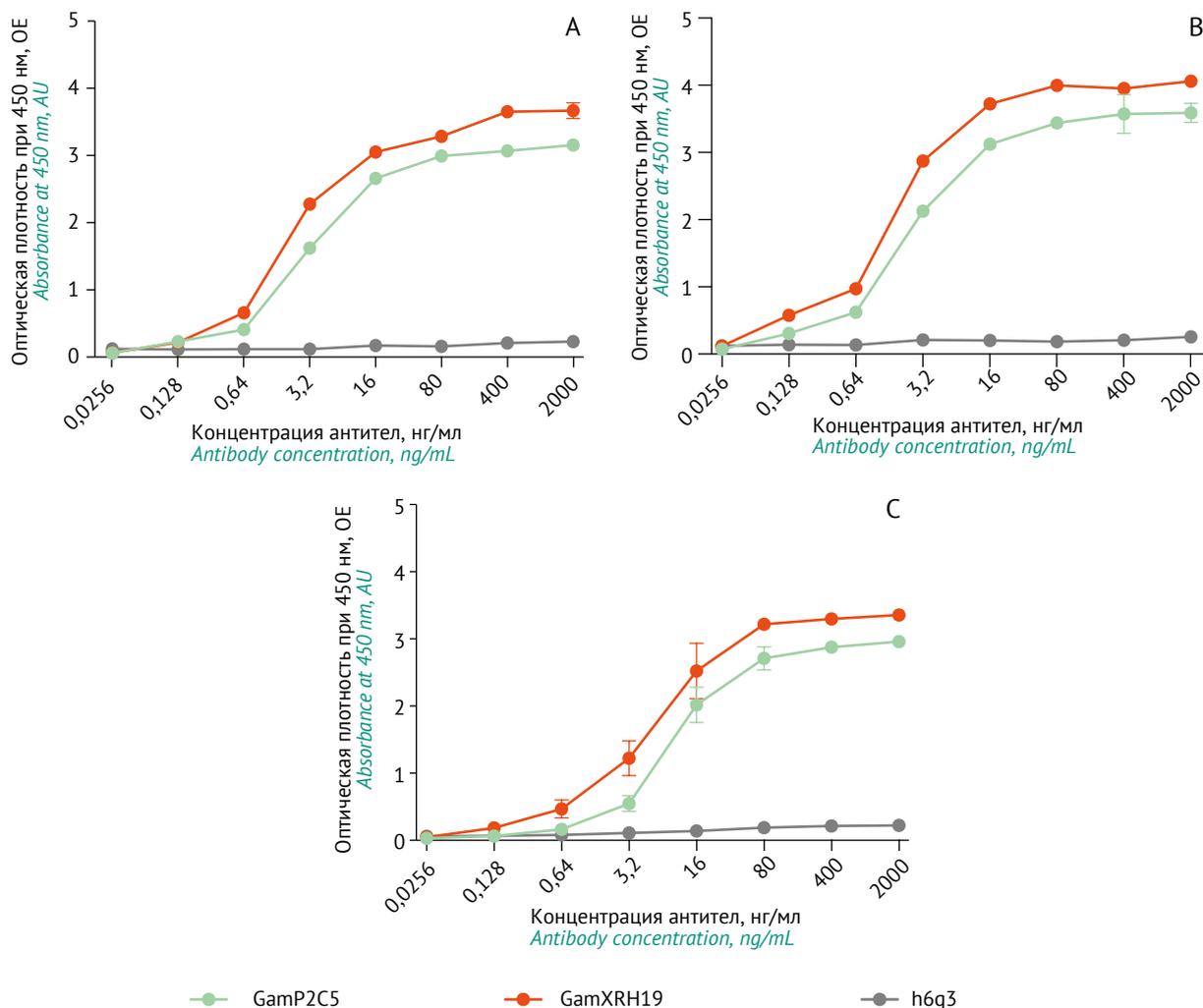
Разделенные при помощи гель-фильтрации фракции с гомодимерной и мономерной формами рекомбинантного RBD исследовали с помощью Вестерн-блот анализа на способность

связываться со специфическими моноклональными антителами (рис. 6). В качестве специфических моноклональных антител использовали антитела GamP2C5 и GamXRH19, являющиеся компонентами препарата ГамКовиМаб, предназначенного для терапии заболевания COVID-19. В качестве контроля использовали образец рекомбинантного RBD до разделения с помощью гель-фильтрации.

Результаты, полученные с помощью Вестерн-блот анализа, показали, что и мономерная, и гомодимерная формы рекомбинантного RBD взаимодействуют со специфическими антителами. Полученные данные свидетельствуют о том, что и мономерная, и гомодимерная формы рекомбинантного RBD являются функционально активными молекулами, способными связываться со специфическими антителами, и не являются посторонними примесями.

**Таблица 1.** Данные определения равновесных констант диссоциации ( $K_D$ )  
**Table 1.** Data on the determination of equilibrium dissociation constants ( $K_D$ )

Форма рекомбинантного RBD <i>Recombinant RBD form</i>	$K_D$ моноклональных антител GamP2C5 <i>GamP2C5 monoclonal antibody <math>K_D</math></i>	$K_D$ моноклональных антител GamXRH19 <i>GamXRH19 monoclonal antibody <math>K_D</math></i>
Мономерная форма RBD <i>Monomeric RBD</i>	$(1,60 \pm 0,25) \times 10^{-8}$ М	$(1,20 \pm 0,58) \times 10^{-8}$ М
Гомодимерная форма RBD <i>Homodimeric RBD</i>	$(2,10 \pm 0,45) \times 10^{-8}$ М	$(3,20 \pm 0,45) \times 10^{-8}$ М
Исходный образец RBD до гель-фильтрации (смесь мономерной и гомодимерной форм RBD) <i>Initial RBD sample before gel filtration (mix of monomeric and homodimeric forms)</i>	$(1,80 \pm 0,79) \times 10^{-8}$ М	$(1,80 \pm 0,30) \times 10^{-8}$ М



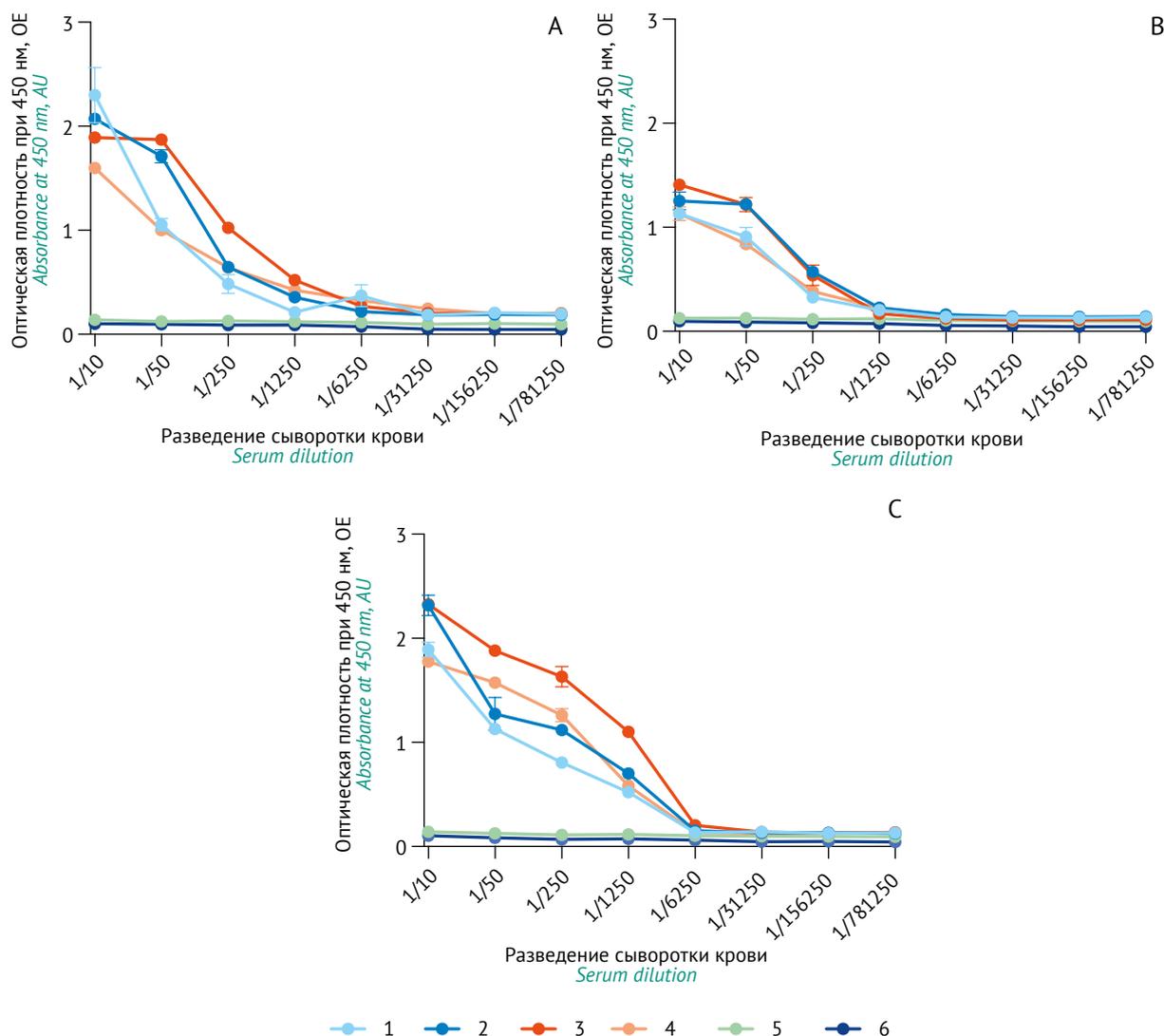
**Рис. 7.** Результаты изучения взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD (А – смеси мономерной и гомодимерной форм RBD, В – мономерной формы RBD, С – гомодимерной формы RBD) со специфическими моноклональными антителами GamP2C5 и GamXRH19 методом иммуноферментного анализа. В легенде представлены обозначения использованных антител: GamP2C5 – тяжелопепочное моноклональное антитело, компонент препарата GamКовиМаб; GamXRH19 – гуманизированное моноклональное антитело, компонент препарата GamКовиМаб; h6g3 – гуманизированное моноклональное антитело, компонент препарата GamЭзуМаб (отрицательный контроль).

**Fig. 7.** ELISA analysis of interactions between the obtained recombinant RBD forms (A—monomeric and homodimeric RBD mix, B—monomeric RBD, C—homodimeric RBD) and specific monoclonal antibodies (GamP2C5 and GamXRH19). The legend shows the antibodies used: GamP2C5 is a heavy chain monoclonal antibody, a component of GamCoviMab; GamXRH19 is a humanised monoclonal antibody, a component of GamCoviMab; and h6g3 is a humanised monoclonal antibody, a component of GamEzuMab (negative control).

### Изучение взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD со специфическими антителами методом биослойной интерферометрии

Количественную оценку взаимодействия гомодимерной и мономерной форм рекомбинантного RBD со специфическими антителами GamP2C5 и GamXRH19 изучали при помощи определения равновесных констант диссоциации ( $K_D$ ) методом биослойной интерферометрии с использованием прибора Octet RED96 и сенсоров Anti-Human Fc Capture. Полученные в результате данные представлены в *таблице 1*.

Установлено, что гомодимерная форма RBD обладает повышенным сродством к моноклональным антителам, что может быть следствием наличия большего количества эпитопов в одной молекуле для связывания с паратопами моноклональных антител. Так, антитела GamP2C5 и GamXRH19 имеют по два паратопа в каждой молекуле, которые предположительно могут одновременно взаимодействовать с двумя эпитопами в молекуле гомодимерного рекомбинантного RBD и таким образом увеличивать avidность антител.



**Рис. 8.** Результаты изучения взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD (А – смеси мономерной и гомодимерной форм RBD, В – мономерной формы RBD, С – гомодимерной формы RBD) с иммунными сыворотками крови от людей, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, методом иммуноферментного анализа. В легенде представлены обозначения использованных образцов сыворотки крови: 1, 2, 3, 4 – образцы сывороток крови вакцинированных добровольцев; 5, 6 – образцы сывороток крови невакцинированных добровольцев (отрицательный контроль).

**Fig. 8.** ELISA analysis of interactions between the obtained recombinant RBD forms (A—monomeric and homodimeric RBD mix, B—monomeric RBD, C—homodimeric RBD) and immune sera from vaccinated volunteers. The legend shows the serum samples used: 1, 2, 3, 4—sera of volunteers vaccinated with Gam-COVID-Vac; 5, 6—sera of non-vaccinated volunteers (negative control).

### Изучение взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD со специфическими антителами и иммунными сыворотками крови в реакции непрямого ИФА

Проводили анализ взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD (мономерной формы RBD; гомодимерной формы RBD; исходного образца RBD до гель-фильтрации – смеси мономерной и гомодимерной форм RBD) с моноклональными антителами GamP2C5 и GamXRH19 или образцами сыворотки крови вакцинированных лиц. В качестве отрицательных контролей

использовали антитело h6g3, специфичное к гликопротеину GP вируса Эбола, а также сыворотку крови невакцинированных добровольцев. Результаты представлены на рисунках 7 и 8.

Полученные в ИФА данные коррелируют с результатами предыдущих исследований. Показано, что уровень специфического сигнала (оптическая плотность при 450 нм) и значения титров как специфических моноклональных антител, так и иммунных сывороток крови наиболее высокие в случае использования гомодимерной формы рекомбинантного RBD, ниже

в случае использования исходного образца RBD (смесь неразделенных мономерной и гомодимерной форм RBD) и самые низкие при использовании мономерной формы RBD. Полученные данные также подтверждают, что гомодимерная форма RBD обладает большей avidностью к специфическим моноклональным антителам и специфическим антителам в сыворотке крови вакцинированных добровольцев. Представленные результаты позволяют утверждать, что гомодимерная форма RBD более предпочтительна для создания ИФА тест-систем для оценки специфической активности препаратов моноклональных антител, а также оценки уровня RBD-специфичных антител (потенциально вируснейтрализующих) в сыворотке крови вакцинированных и переболевших людей.

## Выводы

1. Получена клеточная линия, стабильно продуцирующая рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2.

## Литература/References

1. Yang Y, Du L. SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):95. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00523-5>
2. Piccoli L, Park Y-J, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell.* 2020;183(4):1024–42.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
3. Рябова ЕИ, Деркаев АА, Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Довгий МА, Бырихина ДВ и др. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(4):266–78. Ryabova EI, Derkaev AA, Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Dovgiy MA, Byrikhina DV, et al. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021;21(4):266–78 (In Russ). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>
4. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV, Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-domain antibodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 variants of concern. *Front Immunol.* 2022;13:822159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822159>
5. Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Егорова ДА, Воронина ОЛ, Деркаев АА, Воронина ДВ и др. Наноклетка – потенциальный терапевтический

2. Показано, что в процессе культивирования полученной клеточной линии происходит димеризация рекомбинантного RBD за счет наличия неспаренных цистеинов.
3. Отработаны схемы очистки и разделения мономерной и гомодимерной форм RBD при помощи металл-аффинной хроматографии и гель-фильтрации.
4. Изучена способность мономерной и гомодимерной форм RBD взаимодействовать со специфическими антителами в Вестерн-блоте, биослойной интерферометрии и ИФА. Продемонстрировано, что гомодимерная форма RBD обладает более высокой avidностью к специфическим антителам по сравнению с мономерной формой.
5. Гомодимерная форма RBD является более предпочтительной для создания ИФА тест-систем для анализа уровня антител к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, а также оценки уровня потенциально вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2.

- препарат против лихорадки Эбола. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Egorova DA, Voronina OL, Derkaev AA, Voronina DV, et al. Nanobodies are potential therapeutic agents for the Ebola virus infection. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>
6. Воронина ДВ, Щебляков ДВ, Есмагамбетов ИБ, Деркаев АА, Попова О, Щербинин ДН. Получение нейтрализующих наноклеток к стеблевому домену гемагглютинаина вируса гриппа типа А. *Acta Naturae.* 2021;13(4):33–41. Voronina DV, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Derkaev AA, Popova O, Shcherbinin DN. Development of neutralizing nanobodies to the hemagglutinin stem domain of influenza A viruses. *Acta Naturae.* 2021;13(4):33–41. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11495>
7. Pang NY-L, Pang AS-R, Chow VT, Wang D-Y. Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice. *Mil Med Res.* 2021;8(1):47. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00342-3>
8. Shcheblyakov D, Esmagambetov I, Simakin P, Kostina L, Kozlov A, Tsibezov V, et al. Development and characterization of two GP-specific monoclonal antibodies, which synergistically protect non-human primates against Ebola lethal infection. *Antiviral Res.* 2019;172:104617. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104617>
9. Dogan M, Kozhaya L, Placek L, Gunter C, Yigit M, Hardy R, et al. SARS-CoV-2 specific antibody and neutralization assays reveal the wide range of the humoral immune response to virus. *Commun Biol.* 2021;4(1):129. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01649-6>

10. Takheaw N, Liwsrisakun C, Chaiwong W, Laopajon W, Pata S, Inchai J, et al. Correlation analysis of anti-SARS-CoV-2 RBD IgG and neutralizing antibody against SARS-CoV-2 Omicron variants after vaccination. *Diagnostics*. 2022;12(6):1315. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061315>
11. Luo S, Xu J, Cho CY, Zhu S, Whittaker KC, Wang X, et al. Quantitative detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies using indirect ELISA. *Lab Med*. 2022;53(3):225–34. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmab085>
12. Mehdi F, Chattopadhyay S, Thiruvengadam R, Yadav S, Kumar M, Sinha SK, et al. Development of a fast SARS-CoV-2 IgG ELISA, based on receptor-binding domain, and its comparative evaluation using temporally segregated samples from RT-PCR positive individuals. *Front Microbiol*. 2021;11:618097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618097>
13. Shajahan A, Supekar NT, Gleinich AS, Azadi P. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*. 2020;30(12):981–8. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa042>
14. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281–92.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
15. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020;369(6501):330–3. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
16. Kim JY, Kim Y-G, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):917–30. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE (внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку рукописи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы). **А.А. Деркаев, Е.И. Рябова, В.В. Прокофьев, И.А. Фаворская** — сбор, анализ, интерпретация результатов работы; **Д.М. Гроусова, И.В. Должикова** — написание текста рукописи и критический пересмотр его содержания; **И.Б. Есмагамбетов** — существенный вклад в концепцию и дизайн работы, написание текста и критический пересмотр его содержания; **Д.В. Щебляков** — существенный вклад в концепцию и дизайн работы, написание текста и критический пересмотр его содержания.

**Соответствие принципам этики.** Исследование было одобрено комитетом по биоэтике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, протокол № 17 от 03.12.2021. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках гранта № 01-04-413 от 28.04.2020. Департамента здравоохранения города Москвы «Создание тест-системы для оценки активности плазмы крови «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship (all the authors made significant contributions to the conception, research, and drafting of the manuscript; they read and approved the final version before publication and agreed to be accountable for all aspects of the work). **A.A. Derkaev, E.I. Ryabova, V.V. Prokofiev, I.A. Favorskaya** collected, analysed, and interpreted the study results. **D.M. Grousova, I.V. Dolzhikova** drafted and critically revised the manuscript. **I.B. Esmagambetov** made a significant contribution to conception and design of the study, drafted and critically revised the manuscript. **D.V. Shcheblyakov** made a significant contribution to conception and design of the study, drafted and critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

**Ethics approval.** The study was approved by the bioethics committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology under meeting minutes No. 17 of 03.12.2021. The study was performed in accordance with the requirements of the Helsinki Declaration.

**Acknowledgements.** The study was supported by grant No. 01-04-413 “Development of the SARS-CoV-2-RBD-ELISA-Gamaleya test system for plasma activity assessment” of 28.04.2020 by the Moscow Department of Health.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

**Деркаев Артем Алексеевич.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>  
[derkaev.a@yandex.ru](mailto:derkaev.a@yandex.ru)

**Рябова Екатерина Игоревна.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>  
[ryabovaei96@gmail.com](mailto:ryabovaei96@gmail.com)

**Прокофьев Владимир Владимирович.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>  
[vladimir.prokofev2609@gmail.com](mailto:vladimir.prokofev2609@gmail.com)

**Artem A. Derkaev.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>  
[derkaev.a@yandex.ru](mailto:derkaev.a@yandex.ru)

**Ekaterina I. Ryabova.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>  
[ryabovaei96@gmail.com](mailto:ryabovaei96@gmail.com)

**Vladimir V. Prokofiev.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>  
[vladimir.prokofev2609@gmail.com](mailto:vladimir.prokofev2609@gmail.com)

**Фаворская Ирина Алексеевна**, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-8390>

[irina.favorskaya@gmail.com](mailto:irina.favorskaya@gmail.com)

**Гроусова Дарья Михайловна**.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3299-4818>

[dgrousova@gmail.com](mailto:dgrousova@gmail.com)

**Есмагамбетов Ильяс Булатович**, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

[esmagambetovib@gmail.com](mailto:esmagambetovib@gmail.com)

**Должикова Инна Вадимовна**, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

[dolzhikova@gamaleya.org](mailto:dolzhikova@gamaleya.org)

**Щебляков Дмитрий Викторович**, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

[sdmitryv@yahoo.com](mailto:sdmitryv@yahoo.com)

**Irina A. Favorskaya**, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-8390>

[irina.favorskaya@gmail.com](mailto:irina.favorskaya@gmail.com)

**Daria M. Grousova**.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3299-4818>

[dgrousova@gmail.com](mailto:dgrousova@gmail.com)

**Ilias B. Esmagambetov**, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

[esmagambetovib@gmail.com](mailto:esmagambetovib@gmail.com)

**Inna V. Dolzhikova**, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

[dolzhikova@gamaleya.org](mailto:dolzhikova@gamaleya.org)

**Dmitry V. Shcheblyakov**, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

[sdmitryv@yahoo.com](mailto:sdmitryv@yahoo.com)

*Поступила 11.08.2022*

*После доработки 21.11.2022*

*Принята к публикации 07.12.2022*

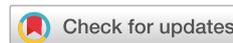
*Online first 31.12.2022*

*Received 11 August 2022*

*Revised 21 November 2022*

*Accepted 7 December 2022*

*Online first 31 December 2022*



## Оценка диагностической эффективности набора реагентов для *in vitro* диагностики лихорадки Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией

Е.В. Прохвятилова<sup>✉</sup>, Г.А. Ткаченко, А.А. Батурин, Л.И. Белицкая, А.В. Топорков

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Голубинская, д. 7, Волгоград, 400131, Российская Федерация

✉ Прохвятилова Елена Валерьевна; [flashlight28@mail.ru](mailto:flashlight28@mail.ru)

### Резюме

Лихорадка Западного Нила — зоонозная природно-очаговая арбовирусная инфекция с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. Заболевание протекает в виде острого лихорадочного интоксикационного синдрома, в тяжелых случаях — с развитием нейроинфекции. Выделяют несколько генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила, ВЗН (*West Nile virus*, WNV), циркулирующих на территории Российской Федерации и имеющих разную патогенность для человека. В связи с этим разработка и внедрение в клиническую лабораторную практику диагностического набора реагентов для дифференциации генотипов ВЗН является актуальной задачей.

**Цель работы:** проведение технических и клинических испытаний для оценки качества, эффективности и безопасности диагностического набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» для выявления РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией.

**Материалы и методы:** определение диагностической чувствительности и специфичности набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) проводили методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием 216 образцов клинического и 204 образцов биологического материала. В качестве метода сравнения применяли секвенирование по Сенгеру. Статистическую обработку результатов клинических испытаний проводили в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008.

**Результаты:** в ходе испытаний установлено, что аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ с набором реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» составила  $1 \times 10^4$  ГЭ/мл при выявлении кДНК ВЗН генотипов 1, 2, 4. При оценке специфичности набора положительных результатов с кДНК гетерологичных вирусов в пробах с концентрацией  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл не выявлено. Диагностическая чувствительность набора реагентов составила не менее 98,5%, диагностическая специфичность — не менее 99%, при доверительной вероятности 90% при анализе каждого из показателей.

**Выводы:** набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» может быть рекомендован для применения в клинической лабораторной диагностике для обнаружения РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила.

**Ключевые слова:** вирус Западного Нила; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; гибридационно-флуоресцентная детекция; ОТ-ПЦР-РВ; генотипирование; диагностический набор реагентов

**Для цитирования:** Прохвятилова Е.В., Ткаченко Г.А., Батулин А.А., Белицкая Л.И., Топорков А.В. Оценка диагностической эффективности набора реагентов для *in vitro* диагностики лихорадки Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):90–101. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-90-101>

## Evaluation of the diagnostic efficacy of a reagent kit for *in vitro* diagnosis of West Nile fever using reverse transcription polymerase chain reaction with fluorescent probe-based detection

E.V. Prokhvatilova ✉, G.A. Tkachenko, A.A. Baturin, L.I. Belitskaya, A.V. Toporkov

Volgograd Research Institute for Plague Control, 7 Golubinskaya St., Volgograd 400131, Russian Federation

✉ Elena V. Prokhvatilova; [flashlight28@mail.ru](mailto:flashlight28@mail.ru)

### Abstract

West Nile fever is a vector-borne zoonotic arbovirus infection with natural foci. Its clinical course is similar to that of acute febrile syndrome, and severe cases may result in neuroinvasive disease. Several genetic lineages (1, 2, and 4) of the *West Nile virus* (WNV) with different pathogenicity for humans are circulating in the Russian Federation. Therefore, it is an urgent task to develop a diagnostic reagent kit for differentiating between WNV genetic lineages and to implement the kit in clinical laboratory practice.

**The aim of the study** was to conduct technical and clinical tests and evaluate the quality, efficacy, and safety of the Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 diagnostic reagent kit for detecting WNV RNA and differentiating between WNV genetic lineages 1, 2, and 4 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with fluorescent probe-based detection.

**Materials and methods.** The authors determined the diagnostic sensitivity and specificity of the Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit (Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia) by real-time RT-PCR with 216 clinical samples and 204 biological samples. Sanger sequencing was used as a reference method. Statistical analysis of clinical test results was carried out in accordance with the Russian national standard for clinical laboratory tests (GOST R 53022.3-2008).

**Results.** When tested with the Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit, real-time RT-PCR demonstrated the analytical sensitivity of  $1 \times 10^4$  GEq/mL for the detection of WNV cDNA of genetic lineages 1, 2, and 4. The assessment of its analytical specificity showed no positive results for cDNA samples of heterologous viruses at a concentration of  $1 \times 10^6$  GEq/mL. The diagnostic sensitivity with the reagent kit was at least 98.5%, and the diagnostic specificity was at least 99%, with 90% confidence levels for both parameters.

**Conclusions.** The Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit can be recommended for use in clinical laboratory diagnostics to detect WNV RNA and differentiate between WNV genetic lineages 1, 2, and 4.

**Key words:** *West Nile virus*; reverse transcription polymerase chain reaction; fluorescent probe-based detection; real-time RT-PCR; genotyping; diagnostic reagent kit

**For citation:** Prokhvatilova E.V., Tkachenko G.A., Baturin A.A., Belitskaya L.I., Toporkov A.V. Evaluation of the diagnostic efficacy of a reagent kit for *in vitro* diagnosis of West Nile fever using reverse transcription polymerase chain reaction with fluorescent probe-based detection. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):90–101. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-90-101>

## Введение

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) является опасной природно-очаговой арбовирусной инфекцией с трансмиссивным механизмом передачи. Возбудитель ЛЗН – вирус Западного Нила, ВЗН (*West Nile virus*, WNV) рода *Flavivirus*, принадлежит к антигенному комплексу японского энцефалита семейства *Flaviviridae*. Природными резервуарами инфекции служат птицы, а основными переносчиками – орнитофильные комары, иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи [1, 2]. В естественных условиях инфицирование человека, в основном, происходит при укусе комаров и клещей. Зарегистрированы отдельные случаи заражения людей при трансплантации органов, переливании крови и грудном вскармливании [1, 3]. В соответствии с классификацией патогенов для человека биологических агентов ВЗН относят ко II группе<sup>1</sup>.

ЛЗН – труднодиагностируемое инфекционное заболевание, протекающее с комплексом неспецифических симптомов. Спектр клинических проявлений ЛЗН широко варьирует от бессимптомной инфекции до развития тяжелых нейтроинвазивных (менингеальная, менингоэнцефалитическая) форм заболевания [1, 4, 5]. Ввиду полиморфизма клинических проявлений ЛЗН для своевременной постановки клинического диагноза необходимо использовать лабораторные методы исследования, в том числе полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ), которая позволяет выявлять РНК ВЗН в различных пробах [2, 6].

Геном ВЗН обладает высокой генетической вариативностью [6]. В Российской Федерации преимущественно циркулирует ВЗН 2 генотипа [7, 8]. Кроме того, в Астраханской и Волгоградской областях обнаружены 1, 4 генотипы ВЗН [8, 9]. Штаммы ВЗН генотипов 1 и 2 являются патогенными для человека, птиц и некоторых видов млекопитающих, а патогенность ВЗН 4 генотипа для данных организмов пока не установлена [6, 8, 9]. Генотипирование ВЗН имеет важное значение при проведении эпидемиологического мониторинга за возбудителем ЛЗН [8, 10]. Это предопределяет необходимость разработки и внедрения в лабораторную практику новых диагностических наборов реагентов.

В целях расширения перечня средств диагностики ЛЗН специалистами Референс-центра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора<sup>2</sup> разработан «Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила (*West Nile virus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019» («Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4») [8].

Контрольные (предварительные) лабораторные испытания разработанного набора были проведены на базе лаборатории молекулярной эпидемиологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и лаборатории генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в 2019 г. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ при выявлении генотипов 1, 2, 4 ВЗН составила не менее  $1 \times 10^4$  ГЭ/мл. При определении показателя аналитической специфичности установлено, что набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» не выявляет РНК гетерологичных вирусов (Чикунгунья (*Chikungunya virus*), денге (*Dengue virus*) 1–3 типов, клещевого энцефалита (*Tick-borne encephalitis virus*), желтой лихорадки (*Yellow fever virus*), краснухи (*Rubella virus*)) и бактерий (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) в пробах с концентрацией  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл.

Дополнительно в ходе предварительных испытаний была проведена оценка влияния некоторых потенциально интерферирующих веществ на характеристики набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4», в результате чего установлено, что отдельные компоненты, которые могут содержаться в клиническом и биологическом материале или применяться на этапах пробоподготовки и выделения нуклеиновых кислот, не влияют на его эффективность. Однако результаты предварительных испытаний не давали возможности объективно оценить диагностическую эффективность разработанного набора реагентов. В связи с этим важной задачей было изучение диагностической чувствительности и специфичности набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4».

<sup>1</sup> СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4).

<sup>2</sup> Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

Цель работы – проведение технических и клинических испытаний для оценки качества, эффективности и безопасности диагностического набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» для выявления РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

## Материалы и методы

При выполнении работы использовали диагностический набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4», производства ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора<sup>3</sup>. Область применения набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг. Согласно конструкторской документации набор реагентов предназначен для качественного обнаружения РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) ВЗН в пробах клинического материала (кровь, плазма и сыворотка крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча, аутопсийный материал (головной мозг, печень, селезенка, почки)), а также биологического материала от животных (головной мозг, печень, селезенка, почки, кровь), комаров и клещей методом ОТ-ПЦР-РВ.

В состав набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» входили следующие компоненты: смеси для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО, ОТ-ПЦР-смесь-2, ОТ-ПЦР-смесь-3), ферменты (ревертаза *MMIv*, *Taq-F*-ДНК-полимераза), положительные контрольные образцы (ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4), внутренний контрольный образец (ВКО), отрицательные контрольные образцы (ОКО выделения, ОКО ОТ-ПЦР).

Аналитическую чувствительность и специфичность набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» подтверждали в ходе технических испытаний с использованием образцов для кон-

троля, содержащих кДНК ВЗН 1, 2, 4 генотипов, выделенную из стандартных образцов предприятия (СОП): СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4, а также кДНК вируса желтой лихорадки (*Yellow fever virus*, *YFV*) – СОП кДНК *YFV*, кДНК вируса краснухи (*Rubella virus*, *RUBV*) – СОП кДНК *RUBV*.

В клинических испытаниях набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» использовали материал от пациентов, полученный при проведении диагностических мероприятий, без непосредственного участия человека в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России от 09.01.2014 № 2н<sup>4</sup>. Всего было исследовано 420 образцов (табл. 1) – 216 проб клинического материала и 204 пробы биологического материала, полученных из Референс-центра по мониторингу за возбудителем ЛЗН на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 05.04.2019). Исследования проводили, соблюдая безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности согласно требованиям нормативных документов<sup>5</sup>.

Наличие РНК ВЗН в положительных и отсутствие в отрицательных образцах было подтверждено с помощью набора реагентов «АмплиСенс *WNV*-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (регистрационное удостоверение на медицинское изделие ФСР 2011/11503).

Для приготовления образцов, искусственно контаминированных ВЗН 1, 2, 4 генотипов, использовали 50 мкл препарата СОП (СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4) в концентрации  $1 \times 10^4$  ГЭ/мл и 50 мкл подготовленной пробы клинического или биологического материала.

Для приготовления образцов, искусственно контаминированных гетерологичными вирусами, использовали 50 мкл препарата СОП (СОП

<sup>3</sup> [http://vniptchi.rosпотребнадзор.ru/s/203/files/directions/production/commercial/74237\\_493.pdf](http://vniptchi.rosпотребнадзор.ru/s/203/files/directions/production/commercial/74237_493.pdf)

<sup>4</sup> Приказ Минздрава России от 09.01.2014 № 2н «Об утверждении порядка проведения оценки соответствия медицинских изделий в форме технических испытаний, токсикологических исследований, клинических испытаний в целях государственной регистрации медицинских изделий».

<sup>5</sup> СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4). МУ 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 3.1.3012-12. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней.

Таблица 1. Образцы клинического и биологического материала, используемые в испытаниях набора реагентов «Амплиген-ВНУ-генотип-1/2/4»  
 Table 1. Clinical and biological samples used in the testing of Ampigen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit

Вид клинического и биологического материала <i>Type of clinical and biological material</i>	Количество образцов <i>Number of samples</i>														
	ВЗН генотипа 1 <i>WNV lineage 1</i>	ВЗН генотипа 2 <i>WNV lineage 2</i>	ВЗН генотипа 4 <i>WNV lineage 4</i>	Вирус денге типа 1 <i>DENV type 1</i>	Вирус денге типа 2 <i>DENV type 2</i>	Вирус денге типа 3 <i>DENV type 3</i>	Вирус ККТЛ <i>CCHFV</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	<i>Neisseria meningitidis</i>	СОП кДНК WNV-1 <i>In-house cDNA WNV-1 RS</i>	СОП кДНК WNV-2 <i>In-house cDNA WNV-2 RS</i>	СОП кДНК WNV-4 <i>In-house cDNA WNV-4 RS</i>	СОП кДНК YFV <i>In-house cDNA RS</i>	СОП кДНК RVBV <i>In-house cDNA RVBV RS</i>	Всего <i>Total</i>
Проба крови человека <i>Human blood sample</i>	3	24	0	6	3	3	3	0	0	0	0	3	0	3	48
Проба плазмы крови человека <i>Human plasma sample</i>	3	0	0	3	3	3	0	0	0	3	3	0	0	3	21
Проба сыворотки крови человека <i>Human serum sample</i>	3	27	0	3	3	3	3	0	0	0	3	0	0	0	45
Проба лейкоцитарной фракции крови человека <i>Human leucocyte fraction sample</i>	3	3	0	3	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	15
Проба спинномозговой жидкости человека <i>Human cerebrospinal fluid sample</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	12
Проба мочи человека <i>Human urine sample</i>	3	3	0	3	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0	18
Проба суспензии ткани головного мозга человека <i>Human brain suspension sample</i>	3	12	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	21
Проба суспензии ткани печени человека <i>Human liver suspension sample</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	12
Проба суспензии ткани селезенки человека <i>Human spleen suspension sample</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	12
Проба суспензии ткани почки человека <i>Human kidney suspension sample</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	12

Продолжение таблицы 1  
Table 1 (continued)

Вид клинического и биологического материала <i>Type of clinical and biological material</i>	Количество образцов <i>Number of samples</i>													Всего <i>Total</i>	
	ВЗН генотипа 1 <i>WNV lineage 1</i>	ВЗН генотипа 2 <i>WNV lineage 2</i>	ВЗН генотипа 4 <i>WNV lineage 4</i>	Вирус денге типа 1 <i>DENV type 1</i>	Вирус денге типа 2 <i>DENV type 2</i>	Вирус денге типа 3 <i>DENV type 3</i>	Вирус ККГЛ <i>CCHFV</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	<i>Neisseria meningitidis</i>	СОП кДНК WNV-1 <i>In-house cDNA WNV-1 RS</i>	СОП кДНК WNV-2 <i>In-house cDNA WNV-2 RS</i>	СОП кДНК WNV-4 <i>In-house cDNA WNV-4 RS</i>	СОП кДНК YFV <i>In-house cDNA RS</i>		СОП кДНК RUBV <i>In-house cDNA RUBV RS</i>
Образцы биологического материала <i>Biological samples</i>	Проба суспензии ткани головного мозга птицы <i>Bird brain suspension</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	0	12
	Проба суспензии ткани печени птицы <i>Bird liver suspension sample</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	0	12
	Проба суспензии ткани селезенки птицы <i>Bird spleen suspension sample</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	0	12
	Проба суспензии ткани почки птицы <i>Bird kidney suspension sample</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	12
	Проба крови птицы <i>Bird blood sample</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	0	12
	Проба суспензии пула комаров <i>Mosquito pool suspension sample</i>	3	72	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	81
Проба суспензии пула клещей <i>Tick pool suspension sample</i>	0	3	0	0	0	0	51	3	0	3	3	0	0	63	
Всего <i>Total</i>	33	171	3	18	12	12	60	3	3	18	3	48	30	6	420 <sup>a</sup>

Примечание. ВЗН, WNV – вирус Западного Нила; DENV – вирус денге; вирус ККГЛ, CCHFV – вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки; YFV – вирус желтой лихорадки; RUBV – вирус краснухи; СОП – стандартный образец предприятия.

<sup>a</sup> 140 индивидуальных образцов клинического и биологического материала, исследованных в трех повторях каждый с использованием двух серий испытуемого набора реагентов.

Note. WNV, West Nile virus; DENV, Dengue virus; CCHFV, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus; YFV, Yellow fever virus; RUBV, Rubella virus.

<sup>a</sup> 140 individual clinical and biological samples were tested in triplicate each using two batches of the reagent kit.

кДНК *YFV*, СОП кДНК *RUBV*) в концентрации  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл и 50 мкл подготовленной пробы клинического или биологического материала.

Для экстракции РНК из проб сыворотки и плазмы крови, ликвора, а также кДНК из СОП применяли набор реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Экстракцию РНК из образцов лейкоцитарной фракции крови, цельной крови, мочи и суспензий тканей внутренних органов, суспензий пулов членистоногих проводили в два этапа с использованием наборов реагентов «РИБО-золь-С» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и «РИБО-преп». Работу проводили в соответствии с инструкциями производителя. На этапе экстракции РНК/кДНК к исследуемым образцам добавляли 10 мкл ВКО. Лизис проб в присутствии ВКО осуществляли при 65 °С в течение 20 мин<sup>6</sup>.

Постановку ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием термоциклера Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). Готовили три реакционные смеси, содержащие специфичные праймеры и зонды для выявления 1, 2 и 4 генотипов ВЗН. При проведении амплификации использовали следующий режим: обратная транскрипция при температуре 50 °С – 30 мин; предварительная денатурация при температуре 95 °С – 15 мин; циклирование при температуре 95 °С – 5 с, при 56 °С – 25 с, при 72 °С – 15 с (40 повторений). Результаты ОТ-ПЦР-РВ детектировали путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов при накоплении ампликонов. По каналу флуоресценции FAM/Green проводили детекцию продукта амплификации кДНК ВЗН 1 генотипа, по каналу ROX/Orange – кДНК ВЗН 2 генотипа, по каналу JOE/Yellow – кДНК ВЗН 4 генотипа, по каналу Cy5/Red – ВКО [8].

Учет результатов проводили в случае прохождения положительных контрольных образцов, ПКО (ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4) и отрицательных контрольных образцов, ОКО (ОКО выделения и ОКО ОТ-ПЦР).

Для определения межпостановочной и межсерийной воспроизводимости положитель-

ные и отрицательные образцы исследовали повторно с использованием двух серий набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». Внутрипостановочную воспроизводимость определяли при исследовании одинаковых положительных проб в пяти повторах с использованием двух серий набора «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4».

Дифференциацию генотипов (1, 2, 4) ВЗН подтверждали с использованием метода сравнения – секвенирования по Сенгеру, принцип которого заключался в определении нуклеотидных последовательностей с помощью генетического анализатора «НАНОФОР 05» (ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Для секвенирования исследуемых проб использовали набор реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва). Анализ результатов секвенирования осуществляли с применением программного обеспечения Unipro UGENE (ООО «НЦИТ УНИПРО», Россия)<sup>7</sup>.

В качестве референтных последовательностей вируса Западного Нила использовали нуклеотидные последовательности СОП кДНК *WNV-1* (Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, № КМ 2049), СОП кДНК *WNV-2* (Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, № КМ 2050), СОП кДНК *WNV-4* (Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, № КМ 2051).

Технические и клинические испытания набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» проводили на базе клинко-диагностической лаборатории ООО «Вымпел-Медцентр» и ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Статистическую обработку результатов клинических испытаний набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» проводили в соответствии с требованиями нормативных документов<sup>8</sup>. Достоверность полученных результатов оценивали в зависимости от числа параллельных опытов при доверительной вероятности 90%,

<sup>6</sup> МУ 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности.

<sup>7</sup> <https://unipro.ru>

<sup>8</sup> Методические рекомендации по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации (утв. ФГБУ «ЦМИКЭЭ» Росздравнадзора и ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора от 24.08.2018).

ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

используя формулу биномиального распределения Бернулли<sup>9</sup>.

## Результаты и обсуждение

При проведении технических испытаний набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» были подтверждены заявленные разработчиками функциональные характеристики: аналитическая чувствительность и специфичность. Показано, что набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» выявляет и дифференцирует в ОТ-ПЦР-РВ кДНК ВЗН генотипа 1 с концентрацией не менее  $1 \times 10^4$  ГЭ/мл, кДНК ВЗН генотипа 2 с концентрацией не менее  $1 \times 10^4$  ГЭ/мл, кДНК ВЗН генотипа 4 с концентрацией не менее  $1 \times 10^4$  ГЭ/мл; набор реагентов не дает положительных результатов с кДНК гетерологичных вирусов в пробах с концентрацией  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019. В ходе проведения испытаний были согласованы вид, класс потенциального риска применения данного набора в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий (МИ)<sup>10</sup>. В результате испытаний проведена доработка технической и эксплуатационной документации.

При проведении испытаний набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» с использованием 276 положительных образцов, содержащих РНК/кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, был получен положительный результат в 100% случаев; при анализе 144 отрицательных образцов, содержащих РНК/кДНК/ДНК близкородственных и гетерологичных вирусов и бактерий, был получен отрицательный результат в 100% случаев (табл. 2, 3). Результаты проведенных испытаний свидетельствовали о том, что внутривидовая, межвидовая и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составляла 100%.

В ходе проведения испытаний выполнена оценка функциональных характеристик набора реагентов «Амплиген *WNV*-генотип-1/2/4» методом сравнения. Поскольку аналогичных наборов реагентов в настоящее время не существует, использовали другой молекулярно-генетический метод – секвенирование по Сенгеру.

По результатам секвенирования РНК/кДНК ВЗН 1 генотипа обнаружена в 17 образцах, определена степень гомологии с СОП ВЗН 1 генотипа (СОП кДНК *WNV*-1) от 98,03 до 100%. РНК/кДНК ВЗН 2 генотипа обнаружена в 58 образцах, опре-

делена степень гомологии с СОП ВЗН 2 генотипа (СОП кДНК *WNV*-2) от 98,28 до 100%. РНК/кДНК ВЗН 4 генотипа обнаружена в 17 образцах, определена степень гомологии с СОП ВЗН 4 генотипа (СОП кДНК *WNV*-4), равная 100%.

При использовании референтного метода на 92 образцах РНК/кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов получен положительный результат в 100% случаев, на 48 пробах, содержащих РНК/кДНК близкородственных и гетерологичных вирусов (вирусы денге 1, 2, 3 типов, Крымской-Конго геморрагической лихорадки, желтой лихорадки, краснухи) и ДНК бактерий (*Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi* s.l.), был получен отрицательный результат в 100% случаев.

Результаты испытаний подтвердили воспроизводимость исследований, проводимых с набором реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» для всех образцов. Доказана диагностическая эффективность набора «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» в лабораторных условиях: диагностическая чувствительность составила не менее 98,5% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность составила не менее 99% с доверительной вероятностью 90%.

При проведении испытаний были оценены эксплуатационные характеристики набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» как положительные. Недостатков конструкции и упаковки набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» при использовании в условиях практической лаборатории не выявлено.

Проведена оценка соответствия условий работы с набором «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» требованиям по обеспечению безопасности. Поскольку исследуемые образцы (пробы клинического или биологического материала) необходимо рассматривать как инфекционно-опасные, были представлены данные об оценке рисков и мерах предосторожности при работе с набором «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». Сведения об инфекционных или микробных, физических, экологических рисках для оператора, а также рисках, связанных с применением набора, приводящих к ошибочным результатам ОТ-ПЦР-РВ, внесены в эксплуатационную документацию производителя.

Таким образом, в рамках клинических испытаний доказана диагностическая эффективность и безопасность набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». Установлено, что набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» может

<sup>9</sup> Зарядов ИС, ред. Статистический пакет R: теория вероятностей и математическая статистика: учебно-методическое пособие. М.: Издательство Российского университета дружбы народов; 2010.

<sup>10</sup> Приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».

**Таблица 2.** Результаты испытаний набора реагентов «Амплиген WNV-генотип-1/2/4» с использованием проб клинического материала

**Table 2.** Test results for the Ampligen WNV-genotype-1/2/4 reagent kit and clinical samples

Наименование пробы <i>Sample name</i>	Число проб <i>Number of samples</i>	Число образцов, имеющих положительный результат при анализе <i>Number of samples with positive results</i>			Метод сравнения <sup>а</sup> <i>Reference method<sup>a</sup></i>
		«Амплиген WNV-генотип-1/2/4» <i>Ampligen WNV-genotype-1/2/4</i>			
		Серия 6/21 <i>Batch 6/21</i>	Серия 7/21 повтор 1 <i>Batch 7/21 replicate 1</i>	Серия 7/21 повтор 2 <i>Batch 7/21 replicate 2</i>	
Проба клинического материала, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 1 <i>Clinical samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 1</i>	10	10	10	10	10
Проба клинического материала, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 2 <i>Clinical samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 2</i>	28	28	28	28	28
Проба клинического материала, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 4 <i>Clinical samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 4</i>	10	10	10	10	10
Проба клинического материала, содержащая РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий <i>Clinical samples containing RNA/cDNA of heterologous viruses and DNA of bacteria</i>	24	0	0	0	0
Всего положительных проб, содержащих РНК/кДНК ВЗН генотипов 1, 2, 4 <i>Total positive samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 1, 2, 4</i>	48	48	48	48	48
Всего отрицательных проб, содержащих РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий <i>Total negative samples containing RNA/cDNA of heterologous viruses and DNA of bacteria</i>	24	0	0	0	0

*Примечание.* ВЗН, WNV – вирус Западного Нила.

<sup>а</sup> Метод сравнения – секвенирование по Сенгеру.

*Note.* WNV, West Nile virus.

<sup>а</sup> The comparison method is Sanger sequencing.

использоваться в клинической лабораторной диагностике ЛЗН, а также в ходе эпидемиологического мониторинга специалистами лабораторий: клинко-диагностических, специализированных по проведению санитарно-эпидемиологических исследований и экспертиз, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней, центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности, центров верификации диагностической деятельности, научных лабораторий.

В соответствии с регламентированными Правилами регистрации медицинских изделий<sup>11</sup> в Федеральной службе по надзору

в сфере здравоохранения проведена регистрация набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» в качестве медицинского изделия на основании результатов технических и клинических испытаний, а также экспертизы документов регистрационного досье. Подтверждено, что набор реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» может быть использован по назначению. В 2022 г. Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения выдано регистрационное удостоверение на МИ «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» (№ РЗН 2022/17020)<sup>12</sup> и разрешены производство, реализация и применение МИ.

<sup>11</sup> Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».

<sup>12</sup> [http://vnipchi.rosпотребнадзор.ru/s/203/files/directions/production/commercial/74237\\_493.pdf](http://vnipchi.rosпотребнадзор.ru/s/203/files/directions/production/commercial/74237_493.pdf)

**Таблица 3.** Результаты испытаний набора реагентов «Амплиген WNV-генотип-1/2/4» с использованием проб биологического материала**Table 3.** Test results for the Ampligen WNV-genotype-1/2/4 reagent kit and biological samples

Наименование пробы <i>Sample name</i>	Число проб <i>Number of samples</i>	Число образцов, имеющих положительный результат при анализе <i>Number of samples with positive results</i>			Метод сравнения <sup>а</sup> <i>Reference method<sup>а</sup></i>
		«Амплиген WNV-генотип-1/2/4» <i>Ampligen WNV-genotype-1/2/4</i>			
		Серия 6/21 <i>Batch 6/21</i>	Серия 7/21 повтор 1 <i>Batch 7/21 replicate 1</i>	Серия 7/21 повтор 2 <i>Batch 7/21 replicate 2</i>	
Проба биологического материала от животных, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 1 <i>Biological samples from animals, mosquitoes, and ticks containing RNA/cDNA of WNV lineage 1</i>	7	7	7	7	7
Проба биологического материала от животных, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 2 <i>Biological samples from animals, mosquitoes, and ticks containing RNA/cDNA of WNV lineage 2</i>	30	30	30	30	30
Проба биологического материала от животных, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 4 <i>Biological samples from animals, mosquitoes, and ticks containing RNA/cDNA of WNV lineage 4</i>	7	7	7	7	7
Проба биологического материала от животных, содержащая РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий <i>Biological samples from animals, mosquitoes, and ticks containing RNA/cDNA of heterologous viruses and DNA of bacteria</i>	24	0	0	0	0
Всего положительных проб, содержащих РНК/кДНК ВЗН генотипов 1, 2, 4 <i>Total positive samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 1, 2, 4</i>	44	44	44	44	44
Всего отрицательных проб, содержащих РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий <i>Total negative samples containing RNA/cDNA of heterologous viruses and DNA of bacteria</i>	24	0	0	0	0

Примечание. ВЗН, WNV – вирус Западного Нила.

<sup>а</sup> Метод сравнения – секвенирование по Сенгеру.

Note. WNV, West Nile virus.

<sup>а</sup> The comparison method is Sanger sequencing.

## Заключение

Разработка и внедрение в практику лабораторий новых наборов реагентов для *in vitro* диагностики, обеспечивающих с высокой чувствительностью и специфичностью выявление маркеров вируса Западного Нила, являются важными направлениями деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Проведенные испытания доказали диагностическую эффективность и безопасность набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4».

Диагностическая чувствительность набора составила не менее 98,5%, диагностическая специфичность – не менее 99%; внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составила 100%. Применение разработанного набора реагентов обеспечит в короткие сроки выявление и дифференциацию 1, 2, 4 генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР-РВ в клиническом и биологическом материале, что позволит изучить распространение данных вариантов вируса на территории Российской Федерации при проведении эпидемиологического мониторинга.

## Литература/References

1. Львов ДК, ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.  
Lvov DK, ed. *Guide to virology. Viruses and viral infections of humans and animals*. Moscow: MIA; 2013 (In Russ.).
2. Habarugira G, Suen WW, Hobson-Peters J, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. *West Nile virus: an update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and «One health» implications*. *Pathogens*. 2020;9(7):589. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070589>
3. Ferrarini I, Rigo A, Gandini A, Vinante F. *West Nile virus encephalitis in haematological setting: report of two cases and a brief review of the literature*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019;11(1):e2019033. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.033>
4. Popescu CP, Florescu SA, Cotar AI, Badescu D, Ceianu CS, Zaharia M, et al. Re-emergence of severe *West Nile virus* neuroinvasive disease in humans in Romania, 2012 to 2017—implications for travel medicine. *Travel Med Infect Dis*. 2018;22:30–5. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.03.001>
5. Byas AD, Ebel GD. Comparative pathology of *West Nile virus* in humans and non-human animals. *Pathogens*. 2020;9(1):48. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010048>
6. Топорков АВ, ред. *Лихорадка Западного Нила*. Волгоград: Волга-Пресс; 2017.  
Toporkov AV, ed. *West Nile fever*. Volgograd: Volga-Press; 2017 (In Russ.).
7. Путинцева ЕВ, Удовиченко СК, Бородай НВ, Никитин ДН, Батурин АА, Молчанова ЕВ и др. Особенности эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз ее развития в 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(1):63–72.  
Putintseva EV, Udovichenko SK, Boroday NV, Nikitin DN, Baturin AA, Molchanova EV, et al. Peculiarities of epidemiological situation on the West Nile fever in the Russian Federation in 2020 and forecast for its development in 2021. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(1):63–72 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-63-72>
8. Батурин АА, Ткаченко ГА, Леденева МЛ, Лемасова ЛВ, Бондарева ОС, Кайсаров ИД и др. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 2021;98(3):308–18.  
Baturin AA, Tkachenko GA, Ledeneva ML, Lemasova LV, Bondareva OS, Kaysarov ID, et al. Molecular genetic analysis of *West Nile virus* variants circulating in European Russia between 2010 and 2019. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(3):308–18 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-85>
9. Платонов АЕ, Карань ЛС, Шопенская ТА, Федорова МВ, Колясникова НМ, Русакова НМ и др. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011;88(2):29–37.  
Platonov AE, Karan LS, Shopenskaya TA, Fedorova MV, Kolyasnikova NM, Rusakova NM, et al. Genotyping of *West Nile virus* strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;88(2):29–37 (In Russ.).
10. Жуков КВ, Топорков АВ, Викторов ДВ. Эпидемиологические аспекты и современная эволюция глобально распространяющихся арбовирусов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(6):94–102.  
Zhukov KV, Toporkov AV, Viktorov DV. Epidemiological aspects and modern evolution of globally spreading arboviruses. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(6):94–102 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-94-102>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Прохватилова** — анализ и систематизация экспериментальных данных, разработка нормативных документов на технологию производства и контроля набора реагентов, подготовка графического материала, написание, редактирование и оформление текста рукописи; **Г.А. Ткаченко** — разработка концепции и дизайна исследования, планирование этапов разработки и испытаний набора реагентов, руководство при проведении этапов испытаний (контрольных, технических, клинических), разработка технической и эксплуатационной документации на набор реагентов, анализ и обобщение результатов исследований, формулировка выводов, систематизация данных исследований, редактирование текста рукописи; **А.А. Батурин** — разработка дизайна и проведение экспериментальных исследований молеку-

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Prokhvatilova** analysed and systemised the experimental data; developed manufacturing and control specifications for the reagent kit; worked with the graphic material; drafted, edited, and formatted the manuscript. **G.A. Tkachenko** conceptualised and designed the study; planned reagent kit development and testing stages; supervised control, technical, and clinical testing; developed technical and operational documentation for the reagent kit; analysed and summarised the study results; formulated the conclusions; systemised the study data; and edited the manuscript. **A.A. Baturin** designed and conducted the experiments (control, technical, and clinical tests) using molecular genetics methods, analysed and interpreted the study results, formulated the conclusions, developed technical and operational documentation for the reagent kit, collected and sys-

лярно-генетическими методами (контрольных, технических, клинических испытаний), анализ и интерпретация результатов исследований, формулировка выводов, разработка технической и эксплуатационной документации на набор реагентов, сбор и систематизация данных научной литературы, редактирование текста рукописи; **Л.И. Белицкая** – выполнение этапов работы по разработке технической документации на набор реагентов, редактирование текста рукописи; **А.В. Топорков** – руководство при проведении испытаний и регистрации набора реагентов, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

**Соответствие принципам этики.** Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 05.04.2019).

**Согласие пациентов.** Получено информированное добровольное согласие пациентов на обработку персональных данных и их использование с научной и образовательной целью.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (номер НИР 086-2-16) и отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней» (номер НИР 093-2-19).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

temised scientific literature data, and edited the manuscript. **L.I. Belitskaya** participated in the development of technical documentation for the reagent kit and edited the manuscript. **A.V. Toporkov** supervised the testing and registration of the reagent kit and approved the final version of the manuscript for publication.

**Ethics approval.** The study was conducted in full compliance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Volgograd Research Institute for Plague Control (Protocol No. 3 of 05.04.2019).

**Informed consent.** The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health information for scientific and educational purposes.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of the research programme of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being (Rospotrebnadzor) for 2016–2020 “Problem-oriented scientific research in the field of epidemiological surveillance of infectious and parasitic diseases” (R&D project No. 086-2-16) and the research programme of Rospotrebnadzor for 2021–2025 “Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases” (R&D project No. 093-2-19).

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

**Прохватилова Елена Валерьевна**, канд. мед. наук, доц.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9947-7711>  
[flashlight28@mail.ru](mailto:flashlight28@mail.ru)

**Ткаченко Галина Александровна**, канд. мед. наук, доц.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>  
[tkachenko\\_g@mail.ru](mailto:tkachenko_g@mail.ru)

**Батурин Артем Александрович.**  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>  
[chemistry1987@mail.ru](mailto:chemistry1987@mail.ru)

**Белицкая Людмила Ивановна.**  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1803-9443>  
[ludmila.belitzkaya@yandex.ru](mailto:ludmila.belitzkaya@yandex.ru)

**Топорков Андрей Владимирович**, д-р мед. наук, доц.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>  
[vari2@sprint-v.com.ru](mailto:vari2@sprint-v.com.ru)

**Elena V. Prokhvatilova**, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9947-7711>  
[flashlight28@mail.ru](mailto:flashlight28@mail.ru)

**Galina A. Tkachenko**, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>  
[tkachenko\\_g@mail.ru](mailto:tkachenko_g@mail.ru)

**Artem A. Baturin.**  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>  
[chemistry1987@mail.ru](mailto:chemistry1987@mail.ru)

**Liudmila I. Belitskaya.**  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1803-9443>  
[ludmila.belitzkaya@yandex.ru](mailto:ludmila.belitzkaya@yandex.ru)

**Andrey V. Toporkov**, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>  
[vari2@sprint-v.com.ru](mailto:vari2@sprint-v.com.ru)

Поступила 17.06.2022

После доработки 02.03.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 17 June 2022

Revised 2 March 2023

Accepted 13 March 2023



## Характеристика чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к вирусам *Coxsackievirus B5* и *Herpes simplex virus-1*

Ю.А. Захарова✉, А.В. Остапчук, В.В. Василевский✉, О.С. Федотова, Н.А. Шмелева

Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций  
Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Летняя, д. 23, Екатеринбург, 620030, Российская Федерация

✉ Захарова Юлия Александровна; [z.y.alexandrovna@mail.ru](mailto:z.y.alexandrovna@mail.ru)

✉ Василевский Валентин Валентинович; [vasilevskiy\\_vv@eniivi.ru](mailto:vasilevskiy_vv@eniivi.ru)

### Резюме

Расширение номенклатуры клеточных культур для вирусологии и биотехнологии повышает вероятность успешного реагирования на угрозы, связанные со вспышками известных и новых инфекционных заболеваний человека. Поиск восприимчивых к широкому спектру вирусов клеточных культур является актуальной задачей.

**Цель работы:** изучить чувствительность новых диплоидных клеточных культур животного происхождения (фибробласты почки и гортани плода свиньи) к вирусам *Coxsackievirus B5* (CVB5) и *Herpes simplex virus-1* (HSV-1).

**Материалы и методы:** клеточные культуры фибробластов почки и гортани плода здоровой свиноматки получены методом щадящей трипсинизации. Чувствительность новых клеточных культур фибробластов почки и гортани плода свиньи (ФППС и ФГПС) к указанным вирусам определяли по степени цитопатического действия (ЦПД), выраженной в процентном соотношении. Изучение инфекционной активности вируса CVB5 проводили методом ПЦР в режиме реального времени с оценкой относительной величины порогового цикла амплификации (C<sub>t</sub>); HSV-1 – количественным титрованием вирусосодержащей жидкости (ВСЖ), значение показателя выражали в 50% тканевой цитопатической дозе (ТЦД<sub>50</sub>).

**Результаты:** получены диплоидные клеточные культуры ФППС и ФГПС. Выявлены высокая чувствительность клеток ФППС к вирусу CVB5 с ЦПД 87,5±3,3% на 3 пассаже и удовлетворительная концентрация энтеровирусной РНК в ВСЖ, характеризующаяся значением порогового цикла на уровне 22–24 C<sub>t</sub>. Чувствительность клеточной культуры ФППС к HSV-1 соответствовала 92,1±5,5% ЦПД, инфекционная активность – 10<sup>4,25</sup> ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл. У клеток ФГПС к изучаемым вирусам определены низкие показатели ЦПД и инфекционной активности.

**Выводы:** новая диплоидная клеточная культура ФППС с подтвержденной чувствительностью к тестируемым вирусам (CVB5 штамма CB5-8100 и HSV-1 штамма HSV-1/L-2) с высоким уровнем ЦПД имеет перспективы использования в вирусологии и биотехнологии. Клеточная культура ФГПС может быть кандидатом для тестирования других представителей CVB5 и HSV-1.

**Ключевые слова:** диплоидная клеточная культура животного происхождения; фибробласты почки плода свиньи; фибробласты гортани плода свиньи; *Coxsackievirus B5*; *Herpes simplex virus-1*; CVB5; HSV-1

**Для цитирования:** Захарова Ю.А., Остапчук А.В., Василевский В.В., Федотова О.С., Шмелева Н.А. Характеристика чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к вирусам *Coxsackievirus B5* и *Herpes simplex virus-1*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):102–110. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-102-110>

## Characterisation of new animal cell cultures' sensitivity to *Coxsackievirus B5* and *Herpes simplex virus-1*

Yu.A. Zakharova✉, A.V. Ostapchuk, W.W. Wasielewski✉, O.S. Fedotova, N.A. Shmeleva

Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", 23 Letnyaya St., Ekaterinburg, 620030 Russian Federation

✉ Yulia A. Zakharova; [z.y.alexandrovna@mail.ru](mailto:z.y.alexandrovna@mail.ru)

✉ Walentin W. Wasielewski; [vasilevskiy\\_vv@eniivi.ru](mailto:vasilevskiy_vv@eniivi.ru)

### Abstract

The increase in the number of cell cultures for virology and biotechnology enhances the chances of a successful response to threats related to outbreaks of well-known and new human infectious diseases. It is a vital task to search for cell cultures sensitive to a wide spectrum of viruses. **The aim of the study** was to investigate the sensitivity of new diploid animal cell cultures (fibroblasts of a foetal pig's kidneys and larynx) to *Coxsackievirus B5* (CVB5) and *Herpes simplex virus-1* (HSV-1).

**Materials and methods.** The cultures of porcine foetal kidney fibroblasts (PFKF) and porcine foetal larynx fibroblasts (PFLF) were derived from a foetus of a healthy pig by mild trypsinisation. The study determined the sensitivity of these new PFKF and PFLF cultures to the above-mentioned viruses by the cytopathic effect (CPE) expressed as a percentage. The infectious activity of CVB5 was studied using real-time polymerase chain reaction (PCR) with the determination of amplification cycle threshold values ( $C_t$ ); that of HSV-1 was studied using quantitative titration of the virus-containing liquid (VCL). Infectious activity values were expressed as tissue culture 50% infective doses ( $TCID_{50}$ ).

**Results.** The authors developed diploid PFKF and PFLF cell cultures. PFKF cells demonstrated high sensitivity to CVB5, with a CPE of  $87.5 \pm 3.3\%$  after passage 3 and a satisfactory concentration of enterovirus RNA in the VCL of 22–24  $C_t$ . The sensitivity of PFKF cells to HSV-1 corresponded to a CPE of  $92.1 \pm 5.5\%$ . In these cells, the infectious activity of HSV-1 corresponded to  $10^{4.25} TCID_{50}/0.2 \text{ mL}$ . The experiments with PFLF cells showed low CPE and infectious activity values for both viruses.

**Conclusions.** The study demonstrated high CPE values with the CVB5 (CB5-8100) and HSV-1 (HSV-1/L-2) strains as examples and confirmed the sensitivity of the new diploid PFKF cell culture to these test viruses. Thus, the PFKF cell culture offers potential applications in virology and biotechnology and may be a candidate for testing other strains of CVB5 and HSV-1.

**Key words:** diploid animal cell culture; porcine foetal kidney fibroblasts; porcine foetal larynx fibroblasts; *Coxsackievirus B5*; *Herpes simplex virus-1*; CVB5; HSV-1

**For citation:** Zakharova Yu.A., Ostapchuk A.V., Wasielewski W.W., Fedotova O.S., Shmeleva N.A. Characterisation of new animal cell cultures' sensitivity to *Coxsackievirus B5* and *Herpes simplex virus-1*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):102–110. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-102-110>

### Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции обозначила широкие масштабы экономических и социальных рисков в условиях глобализации современного мира. Для организации эффективных противоэпидемических, профилактических и лечебных мероприятий лабораторная диагностика все чаще опирается на экспресс-методы и быстрое обнаружение вирусных патогенов. Современные методы диагностики преимущественно основаны на полимеразной цепной

реакции (ПЦР), секвенировании и генной инженерии [1, 2]. Вместе с тем индикация вирусных патогенов с помощью экспресс-методов в полной мере не может заменить диагностику, основанную на работе с живой культурой клеток.

Отличительной особенностью способов выделения вирусных частиц с использованием культур клеток является возможность их детального изучения, что чрезвычайно важно для понимания биологии и эволюции патогенных биологических агентов, проведения научных эксперимен-

тов с целью разработки новых лекарственных и профилактических средств, в частности, современных противовирусных препаратов, антисептиков, дезинфектантов и вакцин [3, 4].

Оценку эффективности того или иного способа вирусологической диагностики оптимально проводить на определенные группы вирусов, характеризующихся различными механизмами действия, путями и факторами передачи и входными воротами инфекции. Для этих целей существуют определенные тест-штаммы и (или) актуальные клинические изоляты, как правило, кишечной и респираторной групп вирусных инфекций.

Активация эпидемического процесса кишечных инфекций, преимущественно норовирусной, ротавирусной и энтеровирусной (неполио) этиологии, в последние годы отмечается во всех регионах мира, включая Российскую Федерацию, что диктует необходимость создания оперативной системы их мониторинга. *Coxsackievirus B5* (CVB5) является одним из наиболее известных представителей неполиомиелитной группы энтеровирусов. Известно, что у человека заболевание, обусловленное CVB5, связано с серьезными неврологическими симптомами, в частности асептическим менингитом, реже – кардиомиопатией и диабетом [5]. Классические подходы к обнаружению и количественной оценке энтеровирусов основаны на наблюдении их цитопатического действия (ЦПД) в клеточных культурах [6]. В настоящее время отсутствует универсальная культура клеток для выделения вируса CVB5. Чаще используют культуру клеток рабдомиосаркомы человека (RD). Некоторые штаммы вируса могут быть выделены исключительно с использованием чувствительных лабораторных животных или эмбриональных клеток человека. Ввиду законодательных ограничений в Российской Федерации на использование эмбрионального материала человека, получение таких клеток серьезно ограничено<sup>1</sup>.

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) к 2016 г. вирусом герпеса человека *Herpes simplex virus-1* (HSV-1), относящимся к респираторной группе вирусных инфекций, в мире инфицированы порядка 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет (67% населения)<sup>2</sup>. В настоящее время отмечается необходимость разработки улучшенных мер терапии и профилактики герпесвирусной инфекции, создание эффективной вакцины. По данным ряда авто-

ров, в зависимости от цели исследования чувствительными к HSV-1 являются лишь первичные клетки фибробластов куриного эмбриона (ККЭ), перевиваемые культуры клеток почек зеленой мартышки (Vero) [7] и легкие эмбриона человека (ЛЭЧ-4(81)) [8].

Таким образом, поиск новых клеточных культур человека и животных для воспроизведения вирусной инфекции в первичных и перевиваемых культурах клеток является актуальной задачей в области практической вирусологии и биотехнологии. В этом направлении проведены экспериментальные сравнительные исследования клеток человеческого и животного происхождения, в результате которых установлено, что клетки свиньи имеют сопоставимые характеристики и функциональность с человеческими, что позволяет соотносить данные исследований на клеточных культурах свиньи с данными исследований на клеточных культурах человека [9, 10]. Следовательно, получение новой клеточной культуры животного происхождения и оценка ее чувствительности с использованием актуальных вирусных изолятов кишечной и респираторной группы (CVB5 и HSV-1), весьма перспективно [11].

Цель работы – изучить чувствительность новых диплоидных клеточных культур животного происхождения (фибробласты почки и гортани плода свиньи) к вирусам CVB5 и HSV-1.

## Материалы и методы

### Клеточные культуры

Клеточные культуры фибробластов почки и гортани плода свиньи (ФППС и ФГПС) были получены от эмбрионов здоровой свиноматки из животноводческого хозяйства Свердловской области и использовались также в исследовании А.В. Алимова с соавт. [12]. Принципы этического кодекса «Международных рекомендаций по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» (Council for International Organisations of Medical Sciences, CIOMS)<sup>3</sup> были соблюдены при изъятии и транспортировке матки животного.

Первично-трипсинизированные клетки фибробластов плода свиньи получали методом щадящей трипсинизации [13]. При вскрытии матки эмбрионы помещали в раствор Хенкса («ПанЭко», Россия). В последующем из них извлекали органы (почки, гортань). Деагрегацию ткани проводили на магнитной мешалке

<sup>1</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

<sup>2</sup> <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>

<sup>3</sup> International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. CIOMS; 1985. <https://cioms.ch/publications/product/international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals-2/>

при 37 °С с использованием 0,25% раствора трипсина с солями Хенкса и средой с 0,5% содержанием гидролизата лактальбумина («ПанЭко», Россия). Полученный материал центрифугировали при 350 g в течение 10 мин, сливали супернатант, а клеточный осадок культивировали в полной среде, состоящей из смеси питательных сред (0,5% раствор гидролизата лактальбумина и Игла MEM в соотношении 1:1 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) производства Biotest, Франция) в пластиковых флаконах с площадью культивирования 175 см<sup>2</sup> (Corning, США) по традиционной методике [14]. Из стабилизированных культур клеток готовили цитологические препараты, окрашивали гематоксилин-эозином. Кариологические исследования хромосомных пластинок проводили с использованием 0,1% раствора колхицина («ПанЭко», Россия) по методу Мурхеда [15] после четвертого пассажа.

Полученные первичные культуры ФППС и ФГПС были субкультивированы и достигли фенотипической гомогенности на третьем пассаже, их пределы культивирования составили 26 и 22 пассажа соответственно.

### Вирусы

В качестве актуальных патогенов [6] использовали вирусы различных таксономических групп: неполиомиелитный энтеровирус группы В *Coxsackievirus B5* (CVB5) как представителя вирусных кишечных инфекций и вирус простого герпеса первого типа *Herpes simplex virus-1* (HSV-1) как представителя респираторных инфекций.

В эксперименте использовали штамм CVB5-8100 вируса CVB5, выделенный от больного серозным менингитом на первичной культуре клеток фибробластов эмбриона человека ЛЭЧ-4(81); показатель инфекционной активности вируса, выраженный в 50% тканевой цитопатической дозе (ТЦД<sub>50</sub>), составил 10<sup>6</sup> ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл. Штамм выделен в лаборатории энтеральных вирусных инфекций ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Музейный штамм HSV-1/L-2 вируса HSV-1, полученный из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, культивировали на клетках фибробластов эмбриона человека ЛЭЧ-3; инфекционная активность вируса в вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) составила 10<sup>5,75</sup> ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл.

Видовая принадлежность обоих штаммов CVB5-8100 и HSV-1/L-2 к вирусам CVB5 и HSV-1 подтверждена молекулярно-генетическим методом: полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени с использованием набора

реагентов с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Enterovirus-FL» и «АмплиСенс® HSV I, II-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

### Учет результатов

Чувствительность клеточных культур ФППС и ФГПС к исследуемым вирусам оценивали на 10 пассаже роста клеточной культуры, в стадии активной пролиферации. Клеточную культуру выращивали в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (с концентрацией CO<sub>2</sub> 5%) при 37 °С в виде монослоя в пластиковых культуральных плоскодонных пробирках (TFS, США) объемом 15 мл. Плотность посева клеток составляла 180–200 тыс. кл/мл в среде роста объемом 3,0 мл. В качестве среды роста использовали смесь питательных сред 0,5% гидролизата лактальбумина и коммерческой среды Игла MEM в соотношении 1:1 с добавлением 10% ФБС. Полученный клеточный монослой после отмывки от полной среды заражали дозой 200 мкл ВСЖ в среде поддержания (среда роста без ФБС) объемом 1,8 мл и инкубировали в стандартных условиях до 5 сут. В контрольную пробирку (для наблюдения клеточной культуры без вируса) после отмывки от полной среды добавляли 2,0 мл среды поддержания (не содержащей дозы 200 мкл ВСЖ), инкубировали в тех же условиях. Визуальную оценку признаков ЦПД проводили ежедневно с 1 по 5 сут инкубации как описано ранее [12], включая округление клеток, дегенерацию монослоя, отделение от поверхности пластика. Степень ЦПД оценивали по количеству клеток (%) монослоя с характерными для воздействия вирусов изменениями по условной четырехбалльной шкале и выражали в уровне (%) ЦПД: «–» (0% ЦПД); «+» (<25% ЦПД); «++» (от 25 до 50% ЦПД); «+++» (от 50 до 75% ЦПД) и «++++» (от 75 до 100% ЦПД). При отсутствии ЦПД на 5 сут предполагали латентное размножение вируса. С целью обнаружения вируса в последующих генерациях разрушали предположительно зараженные клетки методом «замораживания–оттаивания», получали суспензию разрушенных клеток, которую использовали в качестве ВСЖ для последующих «слепых» пассажей на монослое интактных клеток. При 0% ЦПД после третьего слепого пассажа клеточную культуру считали нечувствительной к вирусу.

Для определения концентрации энтеровирусной РНК штамма CVB5-8100 в ВСЖ использовали метод ПЦР в реальном времени с применением набора реагентов «АмплиСенс® Enterovirus-FL». Величина порогового цикла амплификации (C<sub>t</sub>) в пробах позволяет оценивать концентрацию

энтеровирусной РНК. Значения  $C_t$  в пробах, не превышающие 40 циклов, были интерпретированы как положительные согласно инструкции производителя набора реагентов.

Для выявления инфекционной активности вируса HSV-1/L-2, полученного при культивировании с использованием монослоя клеточной культуры, выращенной в 96-луночных культуральных планшетах, проводили титрование ВСЖ путем десятикратного последовательного разведения (от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ ). Результаты учитывали по выявлению характерного ЦПД после совместного культивирования в течение 5 сут в условиях  $CO_2$ -инкубатора при 37 °С. Расчет титра вируса в ВСЖ проводили по методу Спирмена–Кербера [16].

### Статистическая обработка результатов

Оценку статистической значимости различий средних значений ЦПД на клеточных культурах при инфицировании клеток ФППС и ФГПС в экспериментах проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Доказательство гипотезы  $H_0$  о несущественности различий отвергалось при  $p < 0,05$ . Оценку соответствия нормальному распределению осуществляли с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Доказательство гипотезы  $H_0$  о выборке, в которой распределение соответствовало нормальному, принимали при  $p > 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Клетки диплоидной клеточной культуры ФППС, характеризующиеся ориентированным ростом, морфологически были представлены как эпителиоподобные клетки с четкими границами. ФППС стабильно сохраняли модальное число хромосом в кариотипе ( $2n=38$ ) на протяжении полного периода культивирования. Количество клеток с аномальными формами интерфазного ядра не превышало 2,1% от числа делящихся клеток. Уровень митотической активности ФППС на 3 сут роста составлял  $14,0 \pm 1,0\%$ .

Диплоидная клеточная культура ФГПС была представлена фибробластоподобными клетками с четкими границами. Модальное число хромосом в кариотипе  $2n=38$ . Количество клеток с аномальными формами интерфазного ядра не превышало 1,7%. Уровень митотической активности клеток составлял  $14,8 \pm 1,56\%$  на 3 сут роста.

Клеточные культуры исследовали на присутствие микоплазменной инфекции методом люминесцентной микроскопии. Неспецифическая дегенерация монослоя клеток начиналась не ра-

нее 10 сут, что указывало на отсутствие контаминации клеточной культуры посторонними агентами. На полученные клеточные культуры ФППС и ФГПС разработаны паспорта<sup>4</sup>.

Первая серия экспериментов с двумя диплоидными клеточными культурами ФППС и ФГПС состояла в изучении их чувствительности к энтеровирусу CVB5 (штамм CB5-8100). Высокая чувствительность к вирусу выявлена у ФППС на третьем пассаже (табл. 1), что характеризует эту клеточную культуру как высокочувствительную [12]. Цитопатическое действие штамма CB5-8100 вируса CVB5 на культуру ФГПС составило  $37,5 \pm 4,8\%$  ЦПД, что характеризует культуру клеток как слабочувствительную.

С целью выявления репликации РНК CVB5 в исследуемых клеточных культурах определена относительная концентрация энтеровирусной РНК штамма CB5-8100 в ВСЖ, полученной в цикле «замораживания–оттаивания» проб после третьего пассажа на клеточных культурах. Полученные результаты (табл. 2) подтверждают репликацию РНК энтеровируса штамма CB5-8100 в клетках ФППС и ФГПС, при этом наибольшая относительная концентрация копий энтеровирусной РНК зарегистрирована в культуре клеток ФППС [12].

Результаты указывают на возможность использования диплоидной культуры ФППС для репродукции энтеровируса CVB5. Установлены высокие показатели цитопатического действия вируса ( $87,5 \pm 3,3\%$  ЦПД), подтвержденные низкой величиной порогового цикла ( $22,0–24,0 C_t$ ), указывающей на удовлетворительную концентрацию копий вируса при амплификации энтеровирусной РНК (1000–4000 копий в пробе 0,2 мл). Клеточная культура ФГПС показала слабую чувствительность к штамму CB5-8100 ( $37,5 \pm 4,8\%$  ЦПД;  $33,4–36,6 C_t$  и 1–5 копий соответственно).

Вторая серия экспериментов с клеточными культурами ФППС и ФГПС состояла в изучении их чувствительности к штамму HSV-1/L-2 герпес-вируса HSV-1. Уровень  $92,1 \pm 5,5\%$  ЦПД вируса на клеточную культуру выявлен у ФППС на третьем пассаже, что характеризует эту клеточную культуру как высокочувствительную (табл. 3). Показатель цитопатического действия штамма HSV-1/L-2 на клеточной культуре ФГПС составил  $45,7 \pm 5,9\%$  ЦПД и характеризует ее как слабочувствительную.

С целью подтверждения достоверности результатов, а также выявления инфекционной

<sup>4</sup> Паспорт культуры ФППС (идентификатор «20180503»). ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; Екатеринбург. Паспорт культуры ФГПС (идентификатор «20180716»). ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; Екатеринбург.

**Таблица 1.** Уровень цитопатического действия (ЦПД) энтеровируса CVB5 штамма CB5-8100 на культурах клеток (по А.В. Алимову с соавт. [12] с изменениями)

**Table 1.** Cytopathic effect (CPE) of enterovirus CVB5 strain CB5-8100 on cell cultures (adapted from A.V. Alimov et al. [12])

Культура клеток <i>Cell culture</i>	ЦПД CB5-8100, %±m <i>CPE of CB5-8100, %±m</i>		
	1 пассаж <i>Passage 1</i>	2 пассаж <i>Passage 2</i>	3 пассаж <i>Passage 3</i>
Фибробласты почки плода свиньи (ФППС) <i>Porcine foetal kidney fibroblasts (PFKF)</i>	25,0±4,3	37,5±4,8	87,5±3,3
Фибробласты гортани плода свиньи (ФГПС) <i>Porcine foetal larynx fibroblasts (PFLF)</i>	12,5±3,3	25±4,3	37,5±4,8

*Примечание.* *m* – ошибка репрезентативности. Статистически значимые различия средних значений ЦПД при инфицировании клеток ФППС и ФГПС вирусом CB5-8100 в экспериментах подтверждены с использованием *t*-критерия Стьюдента. Доказательство гипотезы  $H_0$  о несущественных различиях отвергнута при  $p=0,00001$  ( $p<0,05$ ). Нормальное распределение данных подтверждено при  $p=0,10$  для ФППС и  $p=0,28$  для ФГПС (гипотеза  $H_0$  подтверждается для  $p>0,05$ ).

*Note.* *m*, selecting bias. The statistical significance of differences in mean CPE values observed in experiments with PFKF and PFLF cells infected with CB5-8100 was confirmed using Student's *t*-test. The null hypothesis ( $H_0$ ) of insignificant difference was rejected at  $p=0.00001$  ( $p<0.05$ ). Normal data distribution was confirmed at  $p=0.10$  for PFKF cells and  $p=0.28$  for PFLF cells ( $H_0$  is confirmed for  $p>0.05$ ).

**Таблица 2.** Концентрация копий вирусной РНК в пробах энтеровируса CVB5 штамма CB5-8100 на культурах клеток (по А.В. Алимову с соавт. [12] с изменениями)

**Table 2.** Concentration of viral RNA copies in the samples of enterovirus CVB5 strain CB5-8100 in cell cultures (adapted from A.V. Alimov et al. [12])

Культура клеток <i>Cell culture</i>	Проба <i>Sample</i>	$C_t$	Концентрация копий вирусной РНК в пробе 0,2 мл <i>Concentration of viral RNA copies in a 0.2 mL sample</i>
Фибробласты почки плода свиньи (ФППС) <i>Porcine foetal kidney fibroblasts (PFKF)</i>	1	24,0	1000
	2	22,0	4000
Фибробласты гортани плода свиньи (ФГПС) <i>Porcine foetal larynx fibroblasts (PFLF)</i>	1	33,4	5
	2	36,6	1

*Примечание.*  $C_t$  – величина порогового цикла амплификации.

*Note.*  $C_t$ , threshold amplification cycle value.

активности штамма HSV-1/L-2 вируса HSV-1 проводили титрование ВСЖ после 3 пассажа путем десятикратного последовательного разведения (от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ ) для определения показателя ТЦД<sub>50</sub> как наибольшего разведения ВСЖ, при котором вирус способен вызвать ЦПД у 50% инфицированных клеток (*табл. 4*).

Уровень инфекционной активности штамма HSV-1/L-2 в клетках ФППС признан как удовлетворительный, а в клетках ФГПС как низкий относительно исходной инфекционной активности вируса в ВСЖ музейного штамма HSV-1/L-2, культивированного на клетках ЛЭЧ-3 ( $10^{5,75}$  ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл) (*табл. 4*).

Полученные данные указывают на возможность использования диплоидной культуры ФППС для репродукции HSV-1: установлены высокие показатели цитопатического действия ( $92,1\pm 5,5\%$  ЦПД) на фоне удовлетворительного уровня инфекционной активности ( $10^{4,25}$  ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл). Клеточная культура ФГПС показала слабую чувствительность к штамму HSV-1/L-2 ( $45,7\pm 5,9\%$  ЦПД и  $10^{2,75}$  ТЦД соответственно).

Таким образом, в серии экспериментов, посвященных изучению чувствительности диплоидных клеточных культур животного происхождения (ФГПС и ФППС) к вирусам кишечной группы CVB5 и респираторной группы HSV-1, установлено, что культура клеток ФППС характеризуется удовлетворительной восприимчивостью в отношении этих вирусов, отвечает заявленным целям и будет востребована в вирусологической практике с целью выделения и изучения актуальных и наиболее распространенных на территории Российской Федерации вирусных патогенов. Клеточная культура ФГПС имела низкую чувствительность к изучаемым штаммам вирусов, однако ввиду отсутствия полной резистентности может быть кандидатом для оценки спектра чувствительности к другим представителям CVB5 и HSV-1. Клеточные культуры ФГПС и ФППС паспортизированы для вирусологического применения. Главный банк клеток культуры ФППС (56 ампул, 224 млн клеток, идентификатор «20180503») и культуры ФГПС (56 ампул, 180 млн клеток, идентифика-

**Таблица 3.** Уровень цитопатического действия (ЦПД) герпесвируса HSV-1 штамма HSV-1/L-2 на культурах клеток  
**Table 3.** Cytopathic effect (CPE) of herpesvirus HSV-1 strain HSV-1/L-2 on cell cultures

Культура клеток <i>Cell culture</i>	ЦПД HSV-1/L-2, %±m <i>CPE of HSV-1/L-2, %±m</i>		
	1 пассаж <i>Passage 1</i>	2 пассаж <i>Passage 2</i>	3 пассаж <i>Passage 3</i>
Фибробласты почки плода свиньи (ФППС) <i>Porcine foetal kidney fibroblasts (PFKF)</i>	35,6±5,3	54,6±5,9	92,1±5,5
Фибробласты гортани плода свиньи (ФГПС) <i>Porcine foetal larynx fibroblasts (PFLF)</i>	19,9±5,6	30,5±5,7	45,7±5,9

*Примечание.* *m* – ошибка репрезентативности. Статистически значимые различия средних значений ЦПД при инфицировании клеток ФППС и ФГПС вирусом HSV-1/L-2 в экспериментах были подтверждены с использованием *t*-критерия Стьюдента при  $p=0,0001$  (гипотеза  $H_0$  опровергнута для  $p<0,05$ ); распределение данных выборки соответствует нормальному при  $p=0,11$  для ФППС и  $p=0,12$  для ФГПС (гипотеза  $H_0$  подтверждена для  $p>0,05$ ).

*Note.* *m*, selecting bias. The statistical significance of differences in mean CPE values observed in experiments with PFKF and PFLF cells infected with HSV-1/L-2 was confirmed using Student's *t*-test at  $p=0.0001$  ( $H_0$  was rejected at  $p<0.05$ ); the sample data distribution corresponded to normal at  $p=0.11$  for PFKF and  $p=0.12$  for PFLF ( $H_0$  was confirmed at  $p>0.05$ ).

**Таблица 4.** Инфекционная активность герпесвируса HSV-1 штамма HSV-1/L-2 в вирусосодержащей жидкости (ВСЖ), полученной при культивировании вируса на культурах клеток

**Table 4.** Infectious activity of herpesvirus HSV-1 strain HSV-1/L-2 in the virus-containing liquid (VCL) from virus cultivation in cell cultures

Культура клеток <i>Cell culture</i>	Инфекционная активность HSV-1/L-2 после 3 пассажа, ТЦД <sub>50</sub> /0,2 мл <i>Infectious activity of HSV-1/L-2 after passage 3, TCID<sub>50</sub>/0.2 ml</i>
Фибробласты почки плода свиньи (ФППС) <i>Porcine foetal kidney fibroblasts (PFKF)</i>	10 <sup>4,25</sup>
Фибробласты гортани плода свиньи (ФГПС) <i>Porcine foetal larynx fibroblasts (PFLF)</i>	10 <sup>2,75</sup>

*Примечание.* ТЦД<sub>50</sub> – тканевая цитопатическая доза: наибольшее разведение ВСЖ, в которой вирус способен вызвать цитопатическое действие у 50% инфицированных клеток.

*Note.* TCID<sub>50</sub> (tissue cytopathic dose): the highest VCL dilution at which the virus is able to cause a cytopathic effect in 50% of the infected cells.

тор «20180716») депонирован в криохранилище банка-музея клеточных культур ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора г. Екатеринбург, входящего в состав «Коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных медицинского назначения» Российской коллекции клеточных культур (РККК)<sup>5</sup>.

## Выводы

1. Получены новые диплоидные культуры клеток ФГПС и ФППС. ФППС представляют собой эпителиоподобные клетки с четкими границами, уровнем митотической активности 14,0±1,0% при патологии митоза не более 2,1% от числа делящихся клеток и модалным числом хромосом в кариотипе 2n=38. ФГПС – фибробластоподобные клетки с четкими границами, уровнем митотической активности 14,8±1,56% с патологией митоза не более 1,7% и аналогичным модалным числом хромосом (2n=38).

2. Установлен высокий уровень цитопатического действия вирусов CVB5 (штамм CVB5-8100) – 87,5±3,3% и HSV-1 (штамм HSV-1/L-2) – 92,1±5,5% на клеточную культуру ФППС при более низких показателях (37,5±4,8% и 45,7±5,9%) цитопатического действия тестируемых вирусов на клеточную культуру ФГПС.

3. Высокая чувствительность диплоидной клеточной культуры ФППС подтверждена значительной концентрацией в ВСЖ энтеровируса CVB5 (штамм CVB5-8100) – от 1000 до 4000 копий вирусной РНК/0,2 мл и инфекционной активностью HSV-1 (штамм HSV-1/L-2) – 10<sup>4,25</sup> ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл. Чувствительность диплоидной клеточной культуры ФГПС к CVB5-8100 не превысила 1–5 копий вирусных РНК/0,2 мл, к HSV-1/L-2 – 10<sup>2,75</sup> ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл, что характеризует изучаемую культуру как слабочувствительную.

<sup>5</sup> Российская коллекция клеточных культур ФБУН Институт цитологии Российской академии наук. <https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/rossijskaja-kollekcija-kletocnyh-kultur/>

## Литература/References

- Ogilvie M. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol.* 2001;11(6):351–4. <https://doi.org/10.1002/rmv.335>
- Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):49–78. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-06>
- Genzel Y. Designing cell lines for viral vaccine production: where do we stand? *Biotechnol J.* 2015;10(5):728–40. <https://doi.org/10.1002/biot.201400388>
- Aubrit F, Perugi F, Léon A, Guéhenneux F, Champion-Arnaud P, Lahmar M, Schwamborn K. Cell substrates for the production of viral vaccines. *Vaccine.* 2015;33(44):5905–12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.110>
- Chen P, Wu X, Su Y, Hao X, Mao Q, Liang Z. Development of a pseudovirus based assay for measuring neutralizing antibodies against *Coxsackievirus B5*. *J Virol Methods.* 2017;246:21–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.005>
- Dolskiy AA, Grishchenko IV, Yudkin DV. Cell cultures for virology: usability, advantages, and prospects. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7978. <https://doi.org/10.3390/ijms21217978>
- Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, Taherikalani M, Nasrolahi A, Amraei M, Ghafourian S. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong Public Health Res Perspect.* 2016;7(2):77–82. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>
- Глинских НП, Колесникова ГГ, Устьянцев ВП, Закирова СФ, Власова ЛВ, Станиславская ВК. Штамм диплоидных клеток легкого эмбриона человека ЛЭЧ-4(81), используемый для диагностики вирусных инфекций. Патент СССР № SU 1147748 A1; 1985. Glinskikh NP, Kolesnikova GG, Ustyantsev VP, Zakirova SF, Vlasova LV, Stanislavskaya VK. Diploid human embryo lung cell strain, LECh-4(81), for diagnosis of viral infections. Patent of the USSR No. SU 1147748 A1; 1985 (In Russ.).
- Noort WA, Oerlemans MI, Rozemuller H, Feyen D, Jaksani S, Stecher D, et al. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *J Cell Mol Med.* 2012;16(8):1827–39. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01455.x>
- Schweizer R, Waldner M, Oksuz S, Zhang W, Komatsu C, Plock JA, et al. Evaluation of porcine versus human mesenchymal stromal cells from three distinct donor locations for cytotherapy. *Front Immunol.* 2020;11:826. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00826>
- Виколов ГХ. ОРВИ, грипп и герпес: что общего и в чем разница при диагностике и терапии. Взгляд клинического иммунолога и инфекциониста. *PMЖ «Медицинское обозрение».* 2015;23(17):1032–7. Vikulov GH. URTI, influenza and herpes: common aspects and differences in diagnosis and therapy. A clinical immunologist's and infectologist's viewpoint. *Russian Medical Journal.* 2015;23(17):1032–7 (In Russ.).
- Алимов АВ, Федотова ОС, Шмелева НА, Бахарев АА, Резайкин АВ, Усольцева ПС и др. Определение чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к клиническим изолятам энтеровируса человека *Echovirus 11* и *Coxsackievirus B5*. *Медицинский алфавит.* 2020;(18):17–9. Alimov AV, Fedotova OS, Shmelyova NA, Bakharev AA, Rezaykin AV, Usoltseva PS, et al. Determining sensitivity of novel animal derived cell cultures to clinical isolates of human enterovirus *Echovirus 11* and *Coxsackievirus B5*. *Medical alphabet.* 2020;(18):17–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-18-17-19>
- Глинских НП, Бахарев АА, Устьянцев ПВ, Устьянцев ИВ. Способ получения стабильных клеточных культур. Патент Российской Федерации № 2392318; 2008. Glinskikh NP, Bakharev AA, Ustyantsev PV, Ustyantsev IV. A method for obtaining stable cell cultures. Patent of the Russian Federation No. 2392318; 2008 (In Russ.).
- Адамс Р. *Методы культуры клеток для биохимиков.* М.: Мир; 1983. Adams RLP. *Cell culture for biochemists.* Amsterdam: Elsevier/North-Holland; 1980.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960;20:613–6. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90138-5)
- Husson-van Vliet J, Roussel P. Pipetting errors in viral titrations: a useful approach. *J Virol Methods.* 1988;22(2–3):183–90. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(88\)90101-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(88)90101-2)

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Ю.А. Захарова** — общее руководство, концепция работы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **А.В. Остапчук** — экспериментальные исследования, написание текста рукописи; **В.В. Василевский** — написание и оформление текста рукописи; **О.С. Федотова** — дизайн работы, экспериментальные исследования; **Н.А. Шмелева** — экспериментальные исследования.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **Yu.A. Zakharova** supervised the research, conceptualised the study, and approved the final version of the manuscript for publication. **A.V. Ostapchuk** conducted the experiments and drafted the manuscript. **W.W. Wasielewski** drafted and formatted the manuscript. **O.S. Fedotova** designed the study and conducted the experiments. **N.A. Shmeleva** conducted the experiments.

**Соответствие принципам этики.** Исследование проводилось в соответствии с принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных».

**Благодарности.** Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Ethics approval.** The study complied with International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals by the Council for International Organisations of Medical Sciences, CIOMS.

**Acknowledgements.** The study was conducted without sponsorship.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

---

## Об авторах / Authors

**Захарова Юлия Александровна**, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>  
[z.y.alexandrovna@mail.ru](mailto:z.y.alexandrovna@mail.ru)

**Остапчук Анна Владимировна.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8157-6866>  
[ostapchuk\\_av@eniivi.ru](mailto:ostapchuk_av@eniivi.ru)

**Василевский Валентин Валентинович.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-2184>  
[vasilevskiy\\_vv@eniivi.ru](mailto:vasilevskiy_vv@eniivi.ru)

**Федотова Ольга Семеновна**, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1928-8211>  
[fedotova\\_os@eniivi.ru](mailto:fedotova_os@eniivi.ru)

**Шмелева Наталья Анатольевна.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8922-0792>  
[shmeleva\\_na@eniivi.ru](mailto:shmeleva_na@eniivi.ru)

**Yulia A. Zakharova**, Dr. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3416-0902>  
[z.y.alexandrovna@mail.ru](mailto:z.y.alexandrovna@mail.ru)

**Anna V. Ostapchuk.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8157-6866>  
[ostapchuk\\_av@eniivi.ru](mailto:ostapchuk_av@eniivi.ru)

**Walentin W. Wasielewski.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-2184>  
[vasilevskiy\\_vv@eniivi.ru](mailto:vasilevskiy_vv@eniivi.ru)

**Olga S. Fedotova**, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1928-8211>  
[fedotova\\_os@eniivi.ru](mailto:fedotova_os@eniivi.ru)

**Natalya A. Shmeleva.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8922-0792>  
[shmeleva\\_na@eniivi.ru](mailto:shmeleva_na@eniivi.ru)

*Поступила 30.05.2022*

*После доработки 16.01.2023*

*Принята к публикации 13.03.2023*

*Received 30 May 2022*

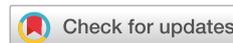
*Revised 16 January 2023*

*Accepted 13 March 2023*

УДК 615.012.6:578.7:578.833.1

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>

Оригинальная статья | Original article



## Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья и подбор метода наработки вирусного материала в промышленных объемах

К.В. Каа ✉, Г.М. Игнатьев, А.А. Синюгина, А.А. Ишмухаметов

Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселение Московский, поселок Института полиомиелита, вл. 8, к. 1, Москва, 108819, Российская Федерация

✉ Каа Константин Владимирович; [kaa\\_23@mail.ru](mailto:kaa_23@mail.ru)

### Резюме

Рост случаев заболевания лихорадкой Чикунгунья регистрируется в странах Карибского бассейна, Центральной и Южной Америки и Юго-Восточной Азии. Специфического лечения против этого заболевания нет, лечение проводится симптоматическое, что делает разработку вакцин против лихорадки Чикунгунья весьма актуальной. Для разработки инактивированной цельновирионной вакцины против лихорадки Чикунгунья важен выбор чувствительной культуры клеток, которая обеспечивает высокую продукцию вируса, а также используется в производстве вакцинных препаратов.

**Цель работы:** изучение чувствительности различных линий клеток к заражению вирусом Чикунгунья и подбор метода культивирования клеток для максимального накопления и сбора вируса с монослоя.

**Материалы и методы:** в работе использовали вирус Чикунгунья штамм CHIKV\_Nic, линии клеток ФЭК, MRC-5, Vero и 4647; титрование проводили на клетках линии С6/36. При подборе метода культивирования использовали культуральный флакон, клеточную фабрику, роллерную бутылку. Чувствительность клеточных линий к репродукции вируса выявляли по степени накопления инфекционного агента в культуральной жидкости (КЖ). Результат титрования учитывали на 5 сут по выраженному цитопатическому действию вируса.

**Результаты:** наибольшую чувствительность к заражению и максимальное накопление вируса в КЖ продемонстрировали клеточные линии 4647 и Vero. Клетки линий ФЭК и MRC-5 накапливали вирус в меньших концентрациях. Максимальные титры накопления вируса в КЖ клеточной линии Vero (7,10–7,75 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл) отмечались через 48 ч с момента заражения; оптимальной является множественность заражения (MOI) в диапазоне 0,001–0,0001 MOI/кл. При множественности заражения 0,0001 MOI/кл накопление вируса в клетках линии Vero при роллерном культивировании происходит на 2 сут с максимальным титром вируса 8,6±0,2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

**Выводы:** линия клеток Vero соответствует требованиям стабильности и безопасности при производстве вакцины против лихорадки Чикунгунья. Определена минимальная множественность заражения культуры клеток вирусом Чикунгунья. Применение роллерного метода позволяет получить наиболее высокий выход клеточной культуры и, соответственно, наиболее высокое значение титра вируса в КЖ.

**Ключевые слова:** линия клеток; вирус Чикунгунья; вакцина; множественность заражения; инфекционный титр вируса; подбор минимальной инфицирующей дозы; Vero; С6/36; MRC-5; ФЭК; 4647

**Для цитирования:** Каа К.В., Игнатьев Г.М., Синюгина А.А., Ишмухаметов А.А. Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья и подбор метода наработки вирусного материала в промышленных объемах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):111–120. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>

© К.В. Каа, Г.М. Игнатьев, А.А. Синюгина, А.А. Ишмухаметов, 2023

# Susceptibility of various cell lines to the *Chikungunya virus* and method selection for commercial-scale production of viral material

K.V. Kaa ✉, G.M. Ignatyev, A.A. Sinyugina, A.A. Ishmukhametov

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 8/1 Village of the Institute of Poliomyelitis, Moskovsky settlement, Moscow 108819, Russian Federation*

✉ Konstantin V. Kaa; [kaa\\_23@mail.ru](mailto:kaa_23@mail.ru)

## Abstract

An increase in cases of chikungunya fever is reported in the Caribbean, Central and South America, and Southeast Asia. As there is no specific treatment for this disease and the only available treatment is symptomatic, it is very relevant to develop vaccines against chikungunya fever. To develop an inactivated whole-virion vaccine against the disease, it is important to choose a susceptible cell culture that both provides high virus yields and is used for vaccine production.

**The aim of the study** was to evaluate the susceptibility of multiple cell lines to *Chikungunya virus* infection and to select the monolayer culture method with the highest virus accumulation and yield.

**Materials and methods.** The study used the CHIKV\_Nic strain of the *Chikungunya virus* and cell lines C6/36 (for virus titration), CEF, MRC-5, Vero, and 4647. While choosing the culture method, the authors used culture flasks, a cell factory, and roller bottles. The authors determined the susceptibility of the cell lines to viral infection by the degree of accumulation of the infectious agent in the culture fluid. The results of virus titration were calculated on day 5 on the basis of a pronounced viral cytopathic effect.

**Results.** The Vero and 4647 cell lines demonstrated the highest susceptibility to infection and virus concentrations in the culture fluid. The CEF and MRC-5 cell lines accumulated the virus at lower concentrations. The maximum virus titres ( $7.10-7.75 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ) were observed in the culture fluid 48 h after infection. The optimal multiplicity of infection (MOI) ranged between 0.001 and 0.0001 MOI/cell. At 0.0001 MOI/cell, the virus accumulated in the Vero cells cultured in roller bottles on day 2, with the maximum virus titre being  $8.6 \pm 0.2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ .

**Conclusions.** Vero cells meet the safety and stability requirements set for the production of chikungunya vaccines. The study determined the minimum MOI of the *Chikungunya virus* for cell culture. The roller bottle culture method provides the highest cell culture yield and the highest titre of the virus in the culture fluid.

## Key words:

cell line; *Chikungunya virus*; vaccine; multiplicity of infection; virus infectious titre; selection of the minimum infective dose; Vero; C6/36; MRC-5; FEK; 4647

## For citation:

Каа К.В., Игнатьев Г.М., Синюгина А.А., Ишмухаметов А.А. Susceptibility of various cell lines to the *Chikungunya virus* and method selection for commercial-scale production of viral material. *Biological Products. Prevention, diagnosis, treatment*. 2023;23(1):111–120. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>

## Введение

Вирус Чикунгунья, относящийся к семейству *Togaviridae* (род *Alfavirus*), имеет повсеместное распространение в странах с тропическим и субтропическим климатом [1]. Вирус передается человеку инфицированными комарами видов *Aedes aegypti* и *A. albopictus*. За последние 15 лет отмечались вызванные этим вирусом эпидемии на полуострове Индостан (2004–2009 гг.), в странах Карибского бассейна (2013–2014 гг.),

после чего вирус распространился в странах Центральной и Южной Америки [1–3]. Массового применения эффективных противовирусных препаратов не отмечается, нет данных о применении профилактических препаратов.

Заболевание характеризуется поражением скелетно-мышечной системы, что может приводить к длительной утрате работоспособности. Летальность при лихорадке Чикунгунья невысокая – преимущественно среди пациентов

с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной системы, среди новорожденных и лиц престарелого возраста. Таким образом, лихорадка Чикунгунья является как социальной, так и медицинской проблемой [1, 4]. Перенесенная инфекция формирует пожизненный иммунитет, информация о повторных случаях заболевания отсутствует [5]. Все это делает разработку и применение профилактических препаратов (вакцин) против лихорадки Чикунгунья весьма перспективными.

Технология производства инактивированных вакцин является традиционной и успешной для большого количества вирусных вакцин. Данная технологическая платформа признана одной из наиболее безопасных [6], и разработка таких вакцин не требует генетических манипуляций с вирусом. Результаты разработки прототипа вакцины культуральной очищенной инактивированной формалином против лихорадки Чикунгунья показывают в эксперименте формирование клеточного и гуморального иммунитета у мышей [7]. Для разработки инактивированной цельновирионной вакцины против лихорадки Чикунгунья важен выбор чувствительной культуры клеток, которая может обеспечить высокую продукцию вируса, а также используется в производстве вакцинных препаратов.

Цель работы – изучение чувствительности различных линий клеток к заражению вирусом Чикунгунья и подбор метода культивирования клеток для максимального накопления и сбора вируса с монослоя.

В задачи исследования входило проведение выбора линии клеток, которая соответствует требованиям стабильности и безопасности при производстве вакцины против лихорадки Чикунгунья; определение минимальной множественности заражения культуры клеток вирусом Чикунгунья; подбор метода культивирования клеток для максимального накопления вируса в культуральной жидкости для разработки цельновирионной инактивированной вакцины.

## Материалы и методы

### Материалы

**Вирус.** В работе использовали штамм CHIKV\_Nic вируса Чикунгунья, полученный из рабочей коллекции вирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». История выделения и пассирования штамма CHIKV\_Nic описана ранее [8]. Нуклео-

тидная последовательность штамма CHIKV\_Nic представлена в GenBank, Acc. No. MN271691 и MN271692<sup>1</sup>.

**Линии клеток.** В работе использовали линии клеток C6/36, ФЭК, MRC-5, Vero и 4647. На всех используемых пассажах данные культуры были свободны от бактериального заражения и микоплазмы. Подсчет клеток осуществляли в гемоцитометре по общепринятой методике [9].

Линии клеток Vero (клетки почки зеленой мар- тышки) и 4647 получены из банка посевных клеток, прошедших контроль согласно требованиям ВОЗ к линиям перевиваемых клеток, используемых в качестве субстратов для производства медицинских препаратов, отдела оральной полиомиелитной вакцины ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

Линия клеток Vero получена из Европейской коллекции клеточных культур на уровне 134 пассажа (Vero WHO); создан рабочий банк культуры на уровне 139 пассажа. В работе использовали культуру клеток Vero на уровне 141 пассажа. В ходе международной аттестации банка клеток установлено, что максимальный уровень пассажа клеток линии Vero, при котором их биологические характеристики остаются стабильными и соответствуют требованиям безопасности, составляет 150 пассажей [10].

Линия клеток 4647 лицензирована в качестве первой отечественной перевиваемой линии клеток, разрешенной для использования при изготовлении медицинских иммунобиологических препаратов [11]. Культура клеток 4647 обладает стабильными биологическими и кариологическими свойствами на уровне 43–150 пассажей, является свободной от посторонних контаминантов и неонкогенной. В работе использовали линию клеток 4647 на уровне 106 пассажа.

Линия клеток MRC-5 предоставлена ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на уровне 28 пассажа. В коллекцию культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора штамм диплоидных клеток поступил в 2015 г. из коллекции АТСС. В работе использовали культуру клеток MRC-5 на уровне 30 пассажа.

Линия клеток ФЭК (фибробласты эмбрионов кур) получена из отделения по производству энцефалитной вакцины ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

Линия клеток C6/36 (клетки комара *Aedes albopictus*) получена на уровне 13 пассажа из лаборатории арбовирусных инфекций ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

<sup>1</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN271691>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN271692>

**Другие материалы и питательные среды:**

- культуральный флакон 25 см<sup>2</sup> с наклонным горлышком и вентиляционной крышкой (Corning, кат. № 430639);
- культуральный флакон 75 см<sup>2</sup> с наклонным горлышком и вентиляционной крышкой (Corning, кат. № 430641U);
- культуральный флакон с площадью ростовой поверхности 175 см<sup>2</sup> (Corning, кат. № 431080);
- клеточная фабрика для культивирования клеток имеет 10 культуральных полок для выращивания клеток с общей площадью ростовой поверхности 1720 см<sup>2</sup> (High Yielding PERformance Flask (HYPER Flask), Corning, кат. № 10031);
- роллерная бутылка объемом 2,0 л площадью ростовой поверхности 850 см<sup>2</sup> (Corning, кат. № 431133);
- 96-луночные прозрачные полистироловые микропланшеты с плоским дном, обработанные ТС, в индивидуальной упаковке, с крышкой, стерильные (Corning кат. № 3599);
- питательные среды и растворы производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»: среда Игла MEM, раствор Хенкса, L-15 (Leibovitz L-15 Medium). Для выращивания клеточных культур в питательную среду (450 мл) добавляли 150 мг L-глутамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед/мл пенициллина, 100 Ед/мл стрептомицина. Для среды поддержки при получении вирусосодержащей жидкости в питательную среду (450 мл) добавляли 150 мг L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 Ед/мл стрептомицина.

**Методы**

**Пересев клеточных линий.** Пересев клеток линии С6/36 проводили по мере формирования монослоя, в среднем на 4–5 сут. Рассев клеток осуществляли в культуральные флаконы (Corning, США) с площадью ростовой поверхности 25 см<sup>2</sup>. Во флаконы добавляли заранее подготовленную и нагретую до температуры 32 °С питательную среду L-15 с 10% ЭТС, затем добавляли суспензию клеток С6/36 из расчета 200 тыс. кл/мл питательной среды. Далее флаконы инкубировали в термостате при 32 °С и 5% CO<sub>2</sub>.

Линия клеток ФЭК была получена в виде суспензии первично трипсинизированных клеток, и для посева во флаконы суспензия была разбавлена питательной средой Игла MEM с добавлением 10% ЭТС, L-глутамин до посадочной концентрации 200 тыс. кл/мл. Клетки рассевали в культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> (Corning, США) и инкубировали в термостате при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>.

Линии клеток Vero, MRC-5, 4647 инкубировали в термостате (Sanyo, Япония) при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Культивирование всех клеточных линий проводили в культуральных флаконах с площадью ростовой поверхности 25 см<sup>2</sup> (Corning, США) с использованием питательной среды Игла MEM с добавлением 10% ЭТС и L-глутамин. Монослой клеток формировался в среднем на 2–4 сут. Клеточный монослой промывали два раза 0,02% раствором Версена и один раз смесью 0,02% раствора Версена и 0,25% раствора трипсина (1:1), помещали в термостат при температуре 37 °С. Через 5 мин инкубации контролировали отделение клеток от поверхности флакона и разрушение межклеточных связей с помощью микроскопа; добавляли 10 мл питательной среды Игла MEM для нейтрализации действия трипсина и отбирали пробу 100 мкл для подсчета клеток в гемоцитометре. Концентрация клеток при посеве для формирования монослоя клеток на 2 сут составляла 0,2×10<sup>6</sup> кл/мл. При культивировании клеток Vero в роллерных бутылках и клеточной фабрике посевная концентрация клеток оставалась неизменной.

**Заражение клеточных линий вирусом.**

Перед заражением клеточный монослой промывали два раза 5 мл раствора Хенкса и добавляли 0,5 мл суспензии вируса Чикунгунья с соответствующей множественностью заражения. Для адсорбции вируса на клетках флаконы переносили в термостат на 1 ч при температуре 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>, затем добавляли среду поддержки Игла MEM с 2% ЭТС. Флаконы с зараженными клетками хранили в термостате при 37 °С и содержанием 5% CO<sub>2</sub>. Наблюдение за клеточными линиями проводили ежедневно под микроскопом до появления видимых морфологических изменений в структуре клеточного монослоя. Из культуральных сосудов отбирали пробу для определения титра и замораживали при минус 70 °С до дальнейших исследований.

Титрование вируса Чикунгунья проводили на линии клеток С6/36 и Vero в 96-луночных культуральных планшетах. Посев клеток осуществляли за 48 ч до начала титрования. Концентрация клеток при посеве 3×10<sup>4</sup> кл/200 мкл. Готовили десятикратные разведения вируса от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-9</sup> в питательной среде L-15 (для линии клеток С6/36) или Игла MEM (для линии клеток Vero). Удаляли питательную среду из планшета с клетками и вносили по 25 мкл каждого разведения вируса на одну лунку с клеточным монослоем (на одно разведение вируса использовали 8 лунок). Далее в каждую лунку добавляли 175 мкл поддерживающей питательной среды с 2% ЭТС. В контрольные лунки с клетка-

ми вносили по 200 мкл питательной среды с 2% ЭТС. Планшеты переносили в инкубатор с температурой 32 °C и 5% CO<sub>2</sub>.

Результат титрования учитывали на 5 сутки по выраженному цитопатическому действию и рассчитывали показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток (ТЦД<sub>50</sub>), по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали его в lg ТЦД<sub>50</sub>/мл [12].

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (*M*) и ошибку среднего арифметического значения (*m*). Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента; достоверно значимыми считались результаты при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья

Для выбора линии клеток, перспективной для создания вакцинного препарата, было проведено исследование чувствительности клеточных линий к заражению вирусом Чикунгунья. В исследовании использовались линии клеток Vero, 4647, MRC-5, ФЭК, которые наиболее часто применяются для производства вирусных вакцин<sup>2</sup>.

Линия клеток С6/36 не применяется в производстве вакцинных препаратов. В данном исследовании клеточная линия использовалась для определения инфекционного титра [8].

Использованные в работе линии клеток выращивали в культуральных флаконах с площадью ротовой поверхности 25 см<sup>2</sup>. Всего было приготовлено по 6 флаконов каждой исследуемой линии клеток: 3 флакона для определения чувствительности к вирусу и 3 флакона для подсчета среднего значения количества клеток. Клетки инфицировали вирусом с множественностью заражения 0,01 MOI/кл (множественность заражения, multiplicity of infection, MOI). Картина цитопатического действия (ЦПД) вируса Чикунгунья на линиях клеток Vero, MRC-5, ФЭК, 4647 представлена на *рисунке 1*.

Уровень накопления вируса определяли методом титрования на клетках С6/36 (*табл. 1*). За титр вируса принимали величину, обратную

разведению, в котором поражение клеточного монослоя в лунках составляет 50%. Значение титра вируса, полученное в результате заражения линии клеток Vero, было равно 7,6±0,2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл; уровень накопления вируса в линии клеток 4647 по итогу титрования составил 7,8±0,2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Остальные клеточные линии показали менее выраженную чувствительность. В линии клеток MRC-5 проявление ЦПД вируса наступало через 72 ч после заражения; титр вируса был равен 3,2±0,2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. В клетках линии ФЭК проявление ЦПД вируса не было выявлено. Значение титра вируса на клетках С6/36 было равно 1,2±0,2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

При множественности заражения 0,01 MOI/кл на 1 млн клеток необходимо взять 10000 MOI, что в пересчете на значение антилогарифмов равно 4,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/флакон. Таким образом, в данном исследовании для заражения культур инфицирующая доза вируса составила 4,9–5,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/флакон в зависимости от количества клеток при заражении в каждой исследуемой линии.

Клеточные линии Vero и 4647 дают более высокий урожай вируса Чикунгунья; показатель инфекционного титра при сравнении не имеет достоверных различий,  $p > 0,05$ . При оценке полученных результатов титр вируса на культурах клеток Vero и 4647 достоверно выше, чем на линиях клеток ФЭК и MRC-5,  $p < 0,05$ .

Для дальнейших исследований нами была использована линия клеток Vero как наиболее подходящая для наработки и титрования вирусного материала. С целью определения оптимальных сроков культивирования вируса Чикунгунья изучали динамику накопления вируса в культуральной жидкости в течение первых двух суток после заражения клеточного монослоя.

### Подбор минимальной инфицирующей дозы вируса Чикунгунья

Одним из путей увеличения концентрации вируса в культуральной жидкости является оптимизация множественности заражения монослоя клеток [13].

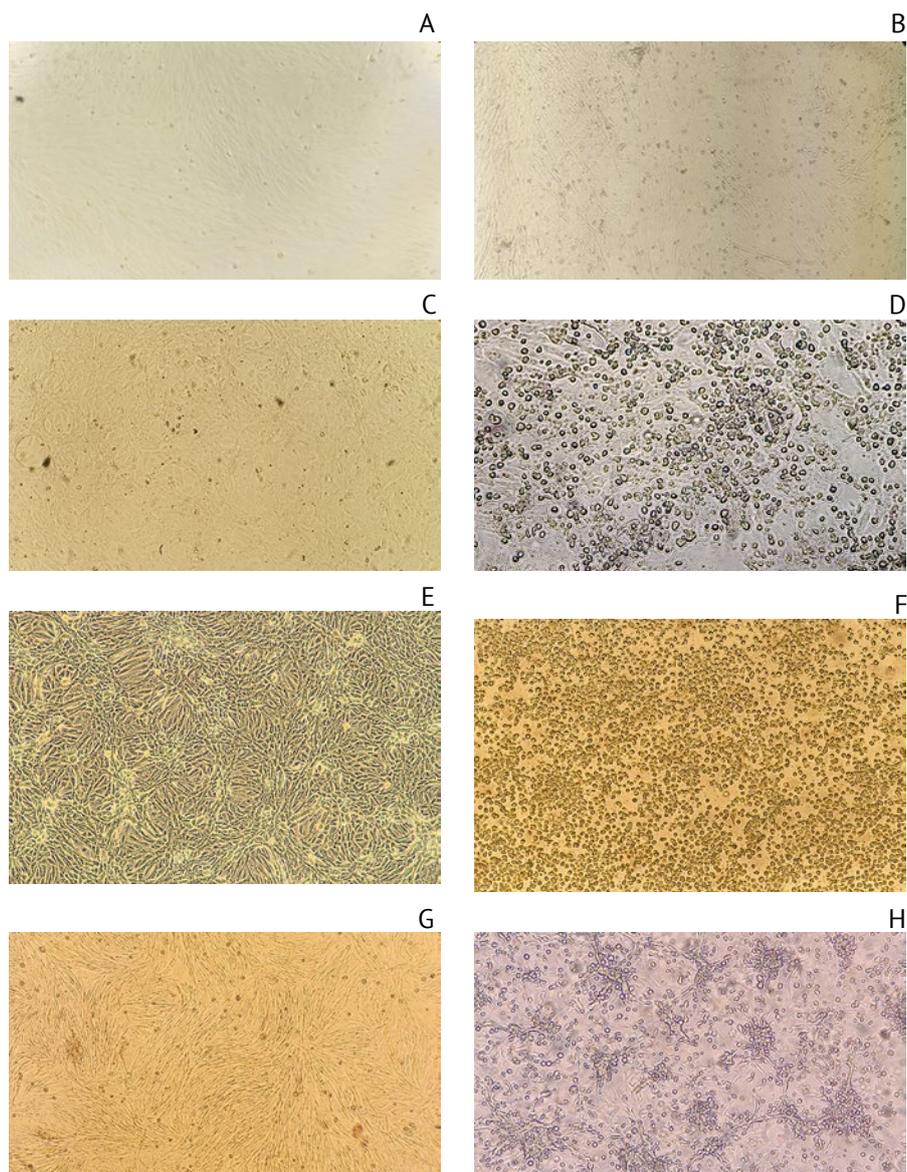
Множественность заражения является решающим фактором для развития продуктивной вирусной инфекции [13, 14]. Определе-

<sup>2</sup> Фармакопейная статья 3.3.1.0037.15 Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0024.15 Вакцина против краснухи культуральная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Вакцина гепатита А культуральная очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая «Аль-ГАВАК®М». <https://grls.rosminzdrav.ru/>

Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая. <https://grls.rosminzdrav.ru/>



**Рис. 1.** Клеточные линии до и после заражения вирусом Чикунгунья. А, С, Е, G – линии клеток ФЭК, 4647, Vero, MRC-5 до заражения; В – линия клеток ФЭК через 72 ч после заражения; D – линия клеток 4647 через 48 ч после заражения; F – линия клеток Vero через 48 ч после заражения; H – линия клеток MRC-5 через 72 ч после заражения. Увеличение  $\times 200$ .

**Fig. 1.** Cell lines before and after infection with the *Chikungunya virus*. A, C, E, and G show CEF, 4647, Vero, and MRC-5 cell lines before infection, respectively; B, CEF cell line 72 h after infection; D, 4647 cell line 48 h after infection; F, Vero cell line 48 h after infection; H, MRC-5 cell line 72 h after infection (200 $\times$  magnification).

ние оптимальной заражающей дозы вируса Чикунгунья при культивировании в линии клеток Vero являлось необходимым условием для проведения дальнейших экспериментов по получению и наработке вакцинного препарата. В работе А.Г. Куслия с соавт. [15] при разработке вакцины против венесуэльского энцефаломиелита лошадей, который так же, как и вирус Чикунгунья, относится к роду *Alphavirus*, заражали клеточную линию диплоидных клеток фибробластов эмбрионов человека Л-68 инфицирующей дозой вируса 0,1–0,01 БОЕ/кл. В нашем эксперименте

заражение культуры клеток Vero во флаконах с площадью ростовой поверхности 25 см<sup>2</sup> проводили разными дозами вируса Чикунгунья (0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,000001 МОI/кл) с дальнейшей заморозкой флаконов при минус 70 °С через 24, 48, 72 и 96 ч. На каждую инфицирующую дозу использовали по 3 флакона и дополнительно 3 контрольных флакона для определения количества клеток перед заражением. Для заражения клеток использовали вирус Чикунгунья, полученный на линии клеток Vero, с титром  $7,6 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ .

**Таблица 1.** Результаты оценки титра вируса Чикунгунья, полученного с разных клеточных линий  
**Table 1.** Results of the assessment of *Chikungunya virus* titres obtained in different cell lines

Линия клеток <i>Cell line</i>	Количество клеток во флаконе при заражении, $\times 10^6$ <i>Number of cells per vial at infection, <math>\times 10^6</math></i>	Множественность заражения, MOI/кл <i>Multiplicity of infection, MOI/cell</i>	Время проявления ЦПД, ч <i>CPE manifestation time, h</i>	Титр вируса при титровании на линии клеток C6/36, $\lg$ ТЦД <sub>50</sub> /мл ( $M \pm m$ ) <i>Virus titre determined on C6/36 cells, <math>\log_{10}</math> TCID<sub>50</sub>/mL (<math>M \pm m</math>)</i>
C6/36	8,0 $\pm$ 0,3	0,01	72	6,2 $\pm$ 0,2
MRC-5	8,5 $\pm$ 0,3		72	3,2 $\pm$ 0,2
ФЭК <i>CEF</i>	7,5 $\pm$ 0,3		–	1,2 $\pm$ 0,2
Vero	10,0 $\pm$ 0,3		48	7,6 $\pm$ 0,2
4647	9,8 $\pm$ 0,3		48	7,8 $\pm$ 0,2

*Примечание.* ЦПД – цитопатическое действие вируса, ТЦД<sub>50</sub> – тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток. «–» – значение не определяли, клеточный монослой полностью разрушен.

*Note.* CPE, cytopathic effect of the virus, TCID<sub>50</sub>, tissue culture infective dose causing 50% cell death; –, not determined because of complete destruction of the cell monolayer.

Результаты эксперимента представлены в таблице 2. Разрушение клеточного монослоя при множественности заражения 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 MOI/кл наблюдалось через 48 ч после внесения вируса, при множественности заражения 0,00001 и 0,000001 MOI/кл дегенерация клеточного монослоя проявилась через 72 ч.

Как следует из полученных данных, при множественности заражения 0,0001 MOI/кл титр вируса равен 7,75 $\pm$ 0,2  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл, накопление вируса в культуральной жидкости происходит на вторые сутки. При множественности заражения 0,00001 MOI/кл максимальное накопление вируса наблюдается на третьи сутки, титр вируса равен 7,4 $\pm$ 0,2  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл, что достоверно не отличается от дозы 0,0001 MOI/кл,  $p \geq 0,05$ . Заражение клеток дозой 0,000001 MOI/кл обеспечивает накопление вируса на порядок ниже по сравнению с дозой 0,00001 MOI/кл: 6,55 $\pm$ 0,2  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл против 7,4 $\pm$ 0,2  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл (различия статистически достоверны,  $p \leq 0,05$ ). Следует отметить, что даже при столь малой дозе заражения 0,000001 MOI/кл отмечается накопление вируса. При заражении дозами 0,1 и 0,01 MOI/кл накопление вируса происходит через 24 ч после заражения и далее идет снижение.

Исходя из полученных данных, оптимальными для заражения являются дозы в диапазоне 0,001–0,0001 MOI/кл; накопление вируса Чикунгунья в линии клеток Vero наступает через 48 ч после заражения.

#### **Подбор оптимального метода культивирования клеточной линии Vero для накопления вируса Чикунгунья в культуральной жидкости**

Разные методы культивирования позволяют повысить концентрацию клеток на единицу объема питательной среды за счет увеличения

соотношения ростовой поверхности к объему культурального сосуда [16]. В работе использовали линии клеток Vero, выращенные в разных культуральных сосудах, с возможностью дальнейшего заражения вирусом Чикунгунья дозой 0,0001 MOI/кл. Культуральные сосуды были выбраны по критерию наибольшей практичности в производстве; при этом они сочетают такие показатели, как высокий урожай клеток, доступность для лабораторий, безопасность и простота в использовании. В опыте использовали по 3 наименования каждого флакона и дополнительно 3 контрольных флакона каждого вида для определения количества клеток перед заражением. Были выбраны следующие культуральные сосуды:

- культуральный флакон с площадью ростовой поверхности 175 см<sup>2</sup>;
- клеточная фабрика с площадью ростовой поверхности 1720 см<sup>2</sup>;
- роллерная бутылка объемом 2,0 л с площадью ростовой поверхности 850 см<sup>2</sup>.

Культуральные флаконы с сформированным монослоем клеток Vero заражали вирусом Чикунгунья дозой 0,0001 MOI/кл. Перед заражением клеточный монослой промывали раствором Хенкса (2 раза по 100 мл) и добавляли 5 мл суспензии вируса Чикунгунья; в случае с клеточной фабрикой дозу вируса добавляли в объеме 50 мл. Флаконы и клеточные фабрики с зараженными клетками переносили в термостат с температурой 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Роллеры переносили в специальный роллерный термостат (Bellco) с температурой 37 °C. Оценку состояния клеточного монослоя до проявления ЦПД проводили ежедневно с помощью микроскопа. Монослой клеток полностью разрушался под действием вируса через 48 ч. Из культуральных сосудов

**Таблица 2.** Влияние множественности заражения клеток вирусом Чикунгунья на уровень накопления вируса в линии клеток Vero  
**Table 2.** Influence of the *Chikungunya virus* multiplicity of infection on the level of virus accumulation in the Vero cell culture

Множественность заражения, MOI/кл <i>Multiplicity of infection, MOI/cell</i>	Количество клеток во флаконе при заражении, $\times 10^6$ <i>Number of cells per vial at infection <math>\times 10^6</math></i>	Доза вируса при заражении клеток, lg ТЦД <sub>50</sub> /флакон <i>Dose of the virus at infection, log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/vial</i>	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл ( $M \pm m$ ), полученный через (часы культивирования) <i>Virus titre, log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL (<math>M \pm m</math>), obtained after (hours of cultivation)</i>			
			24	48	72	96
0,1	10,9 $\pm$ 0,1	6,0–6,1	7,6 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,2	–	–
0,01		5,0–5,1	7,4 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,2	–	–
0,001		4,0–4,1	7,06 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,5	–	–
0,0001		3,0–3,1	6,2 $\pm$ 0,5	7,75 $\pm$ 0,2	–	–
0,00001		2,0–2,1	3,4 $\pm$ 0,2	4,85 $\pm$ 0,2	7,4 $\pm$ 0,2	–
0,000001		1,0–1,1	3,3 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,2	6,55 $\pm$ 0,2	–

*Примечание.* ТЦД<sub>50</sub> – тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток; MOI – множественность заражения; «–» – значение не определяли, клеточный монослой полностью разрушен.

*Note.* TCID<sub>50</sub>, tissue culture infective dose causing 50% cell death; MOI, multiplicity of infection; –, not determined because of complete destruction of the cell monolayer.

отбирали пробу для определения титра и замораживали при минус 70 °С. Результаты титрования представлены в *таблице 3*.

Анализ экспериментальных данных (*табл. 3*) показал, что культивирование клеток с использованием роллерных бутылей позволяет достигать высокой урожайности клеток и, соответственно, высокого титра вируса 8,6 $\pm$ 0,2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. При накоплении вирусосодержащей жидкости на клетках Vero в культуральном флаконе значение титра вируса было на порядок ниже (7,65 $\pm$ 0,2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл). Различия статистически достоверны между титром вируса в вирусосодержащей жидкости, собранной при роллерном культивировании, и при культивировании вируса в культуральном флаконе ( $p < 0,05$ ). Культивирование клеток линии Vero с использованием клеточной фабрики дает схожие результаты по значению титра вируса, как и при роллерном культивировании, но имеет ряд недостатков, главный из которых – невозможность микроскопической оценки разрушения клеточного монослоя на культуральных поверхностях, используемых в клеточной фабрике, так как в поле зрения микроскопа просматривается только нижняя поверхность. Значение вирусного титра, полученное при культивировании и заражении клеток Vero в клеточной фабрике, было равно 8,2 $\pm$ 0,2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл; достоверных различий между значениями титра вируса, полученными при заражении клеток Vero в роллере и клеточной фабрике, не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что роллерный метод культивирования

культуры клеток Vero является легкоприменимым и универсальным в производстве, подходит для наработки вирусного материала в больших объемах с высоким значением титра, что в дальнейшем может быть применимо для разработки вакцинного препарата против лихорадки Чикунгунья.

## Выводы

1. Наибольшую чувствительность к заражению и накоплению вируса Чикунгунья в культуральной жидкости продемонстрировали линии клеток 4647 и Vero. Уровень накопления вируса в линиях клеток ФЭК и MRC-5 был ниже.
2. Оптимальными для заражения линии клеток Vero вирусом Чикунгунья являются дозы в диапазоне 0,001–0,0001 MOI/кл. Максимальные титры накопления вируса в культуральной жидкости отмечались через 48 ч с момента заражения – значение титра было равно 7,1–7,75 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.
3. При сравнении разных методов культивирования клеток линии Vero с использованием различных культуральных сосудов (культуральный флакон, клеточная фабрика, роллерная бутылка) с дальнейшим заражением одинаковой дозой, равной 0,0001 MOI/кл, накопление вируса и полное разрушение монослоя клеток проявлялось через 48 ч независимо от выбранного метода культивирования. Роллерный метод культивирования клеток линии Vero является легкоприменимым и универсальным в производстве, подходит для наработки вируса Чикунгунья в больших объемах с высоким значением титра вируса.

**Таблица 3.** Уровень накопления вируса Чикунгунья в культуральной жидкости, полученной при использовании линии клеток Vero с применением различных методов культивирования

**Table 3.** Level of *Chikungunya virus* accumulation in the culture fluid obtained using the Vero cell line and various cultivation methods

Культуральный сосуд <i>Culture vial</i>	Количество клеток при заражении <i>Number of cells at infection</i>	Множественность заражения, MOI/кл <i>Multiplicity of infection, MOI/cell</i>	Время проявления ЦПД, ч <i>CPE manifestation time, h</i>	Объем вирусосодержащей жидкости, мл <i>Volume of the virus-containing fluid, mL</i>	Титр вируса, lg TCID <sub>50</sub> /мл (M±m) <i>Virus titre log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL (M±m)</i>
Культуральный флакон, площадь поверхности 175 см <sup>2</sup> <i>Culture flask, surface area 175 cm<sup>2</sup></i>	(84,0±0,2)×10 <sup>6</sup>	0,0001	48	70	7,65±0,2
Клеточная фабрика, площадь поверхности 1720 см <sup>2</sup> <i>Cell factory, surface area 1720 cm<sup>2</sup></i>	(53,0±0,1)×10 <sup>7</sup>			560	8,2±0,2
Роллерная бутылка, площадь поверхности 850 см <sup>2</sup> <i>Roller bottle, surface area 850 cm<sup>2</sup></i>	(45,1±0,2)×10 <sup>7</sup>			450	8,6±0,2

Примечание. ЦПД — цитопатическое действие вируса, TCID<sub>50</sub> — тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток; MOI — множественность заражения.

Note. CPE, cytopathic effect of the virus; TCID<sub>50</sub>, tissue culture infective dose causing 50% cell death; MOI, multiplicity of infection.

### Литература/References

- Weaver SC, Lecuit M. *Chikungunya virus* and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med*. 2015;372:1231–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>
- Deeba F, Islam A, Kazim SN, Naqvi IH, Broor Sh, Ahmed A, Parveen S. *Chikungunya virus*: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. *Pathog Dis*. 2016;74(3):ftv119. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv119>
- Staples JE, Breiman RF, Powers AM. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin Infect Dis*. 2009;49(6):942–8. <https://doi.org/10.1086/605496>
- Caglioti C, Lalle T, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordini L. *Chikungunya virus* infection: an overview. *New Microbiol*. 2013;36(3):211–27.
- Galatas B, Ly S, Duong V, Baisley K, Nguon K, Chan S, et al. Long-lasting immune protection and other epidemiological findings after Chikungunya emergence in a Cambodian Rural Community, April 2012. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):e0004281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004281>
- Erasmus JH, Rossi SL, Weaver SC. Development of vaccines for Chikungunya fever. *J Inf Dis*. 2016;214(S5):S488–96. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw271>
- Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Rao PV. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of *Chikungunya virus*. *Vaccine*. 2009;27(18):2513–22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.062>
- Игнатьев ГМ, Каа КВ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мэфед КМ и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(3):227–32. Ignatyev GM, Kaa KV, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mefed KM, et al. Indication and identification of Dengue and *Chikungunya viruses* in *Aedes* spp. mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(3):227–32 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
- Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: Stoddart M, ed. *Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 740. Humana Press; 2011. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2)
- Грачев ВП, Хапчаев ЮХ. Применение перевиваемых линий клеток человека и животных для изготовления вирусных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008;(1):82–90. Grachev VP, Khapchaev YuKh. Use of continuous human and animal cell lines for the production of viral vaccines. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;(1):82–90 (In Russ.).
- Миронова ЛЛ, Грачев ВП, Кузнецова НВ, Попова ВД. Способ культивирования вирусов. Авторское свидетельство СССР № 770195; 1981. Mironova LL, Grachev VP, Kuznetsova NV, Popova VD. Virus cultivation method. Patent of the USSR No. 770195; 1981 (In Russ.).
- Ашмарин ИП, Воробьев АА. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Медгиз, Ленинградское отделение; 1962.

- Ashmarin IP, Vorobyov AA. *Statistical methods in microbiological research*. Leningrad: Medgiz, Leningrad branch; 1962 (In Russ.).
13. Стрельцова МА, Агафонов АП, Игнатьев ГМ. Чувствительность культур клеток различных линий к вирусу Марбург. *Вопросы вирусологии*. 1991;36(5):437–8.  
Streltsova MA, Agafonov AP, Ignat'ev GM. The sensitivity of different cell culture lines to the Marburg virus. *Problems of Virology*. 1991;36(5):437–8 (In Russ.).
14. Хапчаев ЮХ, Хоретоненко МВ, Тимофеев АВ, Грачев ВП. Репродукция штамма Софьин вируса клещевого энцефалита в клетках линии Vero, культивируемых на микроносителях в условиях псевдосuspензии. *Биотехнология*. 2003;5:32–9.  
Kharпчаev YuKh, Khoretonenko MV, Timofeev AV, Grachev VP. Reproduction of the Sofyin strain of tick-borne encephalitis virus in Vero cells cultured on microcarriers under pseudosuspension conditions. *Russian Journal of Biotechnology*. 2003;5:32–9 (In Russ.).
15. Куслий АГ, Волчков ВЕ, Рыжиков АБ, Михайлова ТВ, Сергеев АН. Инактивированная вакцина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей и способ ее получения. Патент Российской Федерации № 2035191; 1995.  
Kusliy AG, Volchkov VE, Ryzhikov AB, Mikhailova TV, Sergeev AN. Inactivated vaccine against Venezuelan equine encephalomyelitis and method for its production. Patent of the Russian Federation No. 2035191; 1995 (In Russ.).
16. Spier RE, Maroudas N. Microcarriers for animal cell biotechnology: an unfulfilled potential. *Biotechnology*. 1991;17:191–212.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-409-90123-8.50014-8>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **К.В. Каа** – проведение исследований, обработка полученных результатов, обсуждение результатов исследований, написание и критическое обсуждение текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** – разработка дизайна исследования, проведение исследований, обсуждение результатов исследований, критическое обсуждение текста рукописи; **А.А. Синюгина** – обеспечение проведения исследований, обсуждение результатов исследования; **А.А. Ишмухаметов** – концепция исследования, обсуждение результатов исследования. **Благодарности.** Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Г.М. Игнатьев является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Диагностика, профилактика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **K.V. Kaa** conducted the experiments, analysed the obtained results and participated in their discussion, drafted and critically reviewed the manuscript. **G.M. Ignatyev** developed the study design, conducted the experiments and participated in the discussion of their results, and critically reviewed the manuscript. **A.A. Sinyugina** facilitated the study and participated in the discussion of the experiment results. **A.A. Ishmukhametov** conceptualised the study and participated in the discussion of the experiment results.

**Acknowledgements.** This study was carried out with no external funding.

**Conflict of interest.** G.M. Ignatyev is a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

**Каа Константин Владимирович.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>  
[kaa\\_23@mail.ru](mailto:kaa_23@mail.ru)

**Игнатьев Георгий Михайлович**, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>  
[marburgman@mail.ru](mailto:marburgman@mail.ru)

**Синюгина Александра Александровна.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7251-6570>  
[sinyugina@chumakovs.su](mailto:sinyugina@chumakovs.su)

**Ишмухаметов Айдар Айратович**, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>  
[ishmukhametov@chumakovs.su](mailto:ishmukhametov@chumakovs.su)

**Konstantin V. Kaa.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>  
[kaa\\_23@mail.ru](mailto:kaa_23@mail.ru)

**George M. Ignatyev**, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>  
[marburgman@mail.ru](mailto:marburgman@mail.ru)

**Alexandra A. Sinyugina.**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7251-6570>  
[sinyugina@chumakovs.su](mailto:sinyugina@chumakovs.su)

**Aydar A. Ishmukhametov**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corr. Member of RAS.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>  
[ishmukhametov@chumakovs.su](mailto:ishmukhametov@chumakovs.su)

Поступила 14.07.2022

После доработки 06.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 14 July 2022

Revised 6 February 2023

Accepted 13 March 2023





ISSN 2221-996X



9 772221 996004