

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume	№ / No.
24	3
2024	

ТЕМА НОМЕРА

**Разработка диагностических, лечебных
и профилактических препаратов противовирусного действия**



www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

Развитие современной медицинской науки невозможно без внедрения передовых методов диагностики и профилактики инфекционных болезней, включая систему иммунопрофилактики. Недавно человечество столкнулось с новым вызовом, связанным с пандемией нового инфекционного заболевания COVID-19, в борьбе с которым были мобилизованы современные технологии разработки лечебных и профилактических препаратов, в том числе с применением искусственного интеллекта, использованы новые подходы к противоэпидемическим мероприятиям, включая эпидемиологический надзор и молекулярную эпидемиологию. В последний раз вирусология как относительно молодая область медицинской науки испытала подобное бурное развитие в середине прошлого века с развитием технологии культивирования вирусов, в том числе на перевиваемых клеточных линиях, что дало возможность создать ряд вакцин от актуальных инфекционных заболеваний – кори, эпидемического паротита, краснухи, ветряной оспы.

В последние годы внедрение новых вирусологических и молекулярно-генетических методов позволило подтвердить эпидемиологическую значимость ряда инфекционных агентов и создать средства специфической профилактики вызываемых ими заболеваний, что еще несколько десятилетий назад не представлялось выполнимой задачей и сопровождалось рядом сложностей. Благодаря этому существенно сокращается путь от этапов разработки диагностических, профилактических и лечебных препаратов до их практического внедрения и доступности для конечного потребителя.

Настоящий выпуск журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» посвящен в первую очередь вопросам разработки диагностических систем, лечебных и профилактических препаратов противовирусного действия. В номере представлены обзорные статьи по изучению мирового опыта разработки современных вакцин и проблемам направленной противовирусной терапии, а также оригинальные прикладные исследования, наглядно демонстрирующие практические результаты разработки и совершенствования противовирусных профилактических препаратов и методов диагностики. Убежден, что представленные в выпуске материалы вызовут большой научный интерес не только у вирусологов, но и представителей других научных специальностей медицинской и биологической направленности.

С уважением,
кандидат медицинских наук

КОРОВКИН Алексей Сергеевич

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 24, № 3, 2024

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 0,860.

Журнал индексируется в базах данных: Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, 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 24, NO. 3, 2024

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 0.860.

The journal is indexed in the following databases: Russian Index of Science Citation (RISC), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, 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 the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (CC BY 4.0).

На обложке: Антитела, атакующие вирус папилломы человека (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX320220538/>)

Cover image: Antibodies attacking human papillomaviruses (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX320220538/>)

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

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

Хаитов 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)

Агафонов Александр Петрович, д-р биол. наук, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия)

Акоста Бас Кармен, PhD, проф., Latinoамериканский институт биотехнологий «Мечников» (Манагуа, Никарагуа)

Аракелов Сергей Александрович, канд. биол. наук, ФГУП «СПбНИИВС» ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, 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, MD, проф., Венский медицинский университет (Вена, Австрия)

Гасич Елена Леонидовна, д-р биол. наук, доц., ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (Минск, Республика Беларусь)

Гончаров Андрей Евгеньевич, канд. мед. наук, доц., ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» (Минск, Республика Беларусь)

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Дмитриев Игорь Павлович, канд. биол. наук, Университет Вашингтона в Сент-Луисе (Сент-Луис, штат Миссури, США)

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лакота Ян, д-р мед. наук, Институт нормальной и патологической физиологии Центра экспериментальной медицины Словацкой академии наук (Братислава, Словакия)

Логунов Денис Юрьевич, д-р биол. наук, академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (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)

Смит Елена, канд. биол. наук, Центр передовых мРНК-технологий Санофи (Бостон, штат Массачусетс, США)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф., АО «Генериум» (пос. Вольгинский, Владимирская область, Россия)

Шустов Александр Вячеславович, канд. биол. наук, Национальный центр биотехнологии (Астана, Казахстан)

Учредитель и издатель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Шеф-редактор

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

**Ответственные редакторы
тематического выпуска**

Игнатьев Георгий Михайлович,
д-р мед. наук, проф.
Коровкин Алексей Сергеевич,
канд. мед. наук

Научные редакторы

Гукасова Надежда Вадимовна,
канд. биол. наук
Ершов Павел Викторович,
канд. биол. наук

Редактор перевода

Балтина Любовь Александровна

Менеджер по развитию

Мжельский Александр Анатольевич

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

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

30.09.2024

Дата выхода в свет

01.10.2024

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,
2024

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера:

**Разработка диагностических, лечебных и профилактических
препаратов противовирусного действия**

А.С. Коровкин, Т.Н. Никитина, Т.Ю. Козлова, Д.В. Горенков,
А.Р. Волгин
**Вакцины против вируса папилломы человека: организация
и опыт проведения доклинических исследований**243

А.С. Коровкин, Д.В. Горенков, А.Р. Волгин
**Профилактика респираторно-синцитиальной
вирусной инфекции: современное состояние
и перспективы разработки вакцин**255

Н.А. Нетесова, М.А. Абдурашитов, Т.Г. Самарцева,
О.В. Климович, А.С. Оксанич, Е.В. Отрашевская, Г.М. Игнатьев
**Идентификация и генотипирование вируса Чикунгунья
с использованием полимеразной цепной реакции
с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин
рестрикционных фрагментов**270

А.С. Оксанич, Т.Г. Самарцева, К.В. Каа, Е.В. Отрашевская,
А.Г. Красько, А.Г. Лапутина, Н.А. Нетесова, Г.М. Игнатьев
**Молекулярно-генетические методы контроля качества
инактивированных вакцин на модели вируса Чикунгунья:
подлинность штамма и полнота инактивации вируса**279

Т.А. Ожаровская, О.В. Зубкова, О. Попова, А.В. Ковыршина,
П.П. Голдовская, И.В. Вавилова, И.В. Должикова, Е.И. Ермолова,
М.С. Кунда, Н.Н. Рыжова, О.Л. Воронина, Д.Н. Щербинин,
Д.В. Шебляков, Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург
**Иммуногенность различных вариантов гена гликопротеина
вирусов Эбола и Марбург в составе рекомбинантных
аденовирусных векторов**294

Д.С. Леонтьев, Ф.А. Урусов, Д.В. Глазкова, Б.В. Белугин,
О.В. Орлова, Р.Р. Минтаев, Г.М. Цыганова, Е.В. Богословская,
Г.А. Шипулин
**Исследование защитной эффективности препарата КомбиМаб-2
против вируса иммунодефицита человека типа 1 на мышах,
гуманизированных CD4⁺ Т-лимфоцитами**312

**Регулирование обращения биологических лекарственных
препаратов**

Д.С. Давыдов, Р.Л. Парфенюк, З.В. Дурманова, Р.Е. Казаков,
А.А. Мовсисянц
**Особенности регулирования обращения лекарственных
препаратов бактериофагов: международный опыт
и перспективы развития**322

Контроль качества

А.А. Солдатов, А.К. Яковлев, Ж.И. Авдеева, Д.В. Горенков,
А.С. Коровкин, В.В. Косенко
**Обзор современных регуляторных требований к изучению
стабильности биологических лекарственных препаратов**335

С.А. Алексеева, И.В. Касина, Т.И. Немировская
**Сравнительный анализ результатов испытаний вакцины
сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность»
иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим
методами**348

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

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (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)

Alexander P. Agafonov, Dr. Sci. (Biol.), State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector" (Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia)

Carmen Acosta Bas, PhD (Health Sci.), Prof., Latin-American Institute of Biotechnology MECHNIKOV (Managua, Nicaragua)

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)

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal Medical and Biological Agency (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, PhD, Prof., Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

Elena L. Gasich, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (Minsk, Republic of Belarus)

Andrei Y. Hancharou, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Minsk, Republic of Belarus)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (Moscow, Russia)

Igor P. Dmitriev, Cand. Sci. (Biol.), Washington University in St. Louis (Saint Louis, Missouri, United States)

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

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

Alexey S. Korovkin, Cand. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Ján Lakota, MD, PhD, Institute of Normal and Pathological Physiology at the Centre of Experimental Medicine of the Slovak Academy of Sciences (Bratislava, Slovakia)

Denis Y. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Academician of RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (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)

Elena Smith, Cand. Sci. (Biol.), Sanofi's mRNA Center of Excellence (Boston, Massachusetts, United States)

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

Alexandr V. Shustov, Cand. Sci. (Biol.), National Center for Biotechnology (Astana, Kazakhstan)

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

Guest editors for the special issue

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

Alexey S. Korovkin, Cand. Sci. (Med.)

Science Editors

Nadezhda V. Gukasova, Cand. Sci. (Biol.)

Pavel V. Ershov, Cand. Sci. (Biol.)

Translation Editor

Liubov A. Baltina

Development Manager

Alexander A. Mzhelsky

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

Contract publisher

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

Printing office

Triada Publishing House LLC:

9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver

170034

Print run

150 copies. Free price

Passed for printing

30 September 2024

Date of publication

1 October 2024

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941

Ural-Press agency catalogue: 57941

The journal is registered as a mass
medium 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, 2024

CONTENTS

Issue topic

**Development of medicinal products for diagnosis, treatment,
and prevention of viral infections**

A.S. Korovkin, T.N. Nikitina, T.Yu. Kozlova, D.V. Gorenkov,
A.R. Volgin

**Human papillomavirus vaccines: organisation and experience of
preclinical studies**243

A.S. Korovkin, D.V. Gorenkov, A.R. Volgin

**Prophylaxis of respiratory syncytial virus infection: current status
and prospects for vaccine development**255

N.A. Netesova, M.A. Abdurashitov, T.G. Samartseva, O.V. Klimovich,
A.S. Oksanich, E.V. Otrashesvskaia, G.M. Ignatyev

**Identification and genotyping of Chikungunya virus
using reverse transcription polymerase chain reaction
and restriction fragment length polymorphism methods**270

A.S. Oksanich, T.G. Samartseva, K.V. Kaa, E.V. Otrashesvskaia,
A.G. Krasko, A.G. Laputina, N.A. Netesova, G.M. Ignatyev

**Molecular genetic methods for quality control of inactivated
vaccines using a Chikungunya virus model: vaccine strain
identification and completeness of virus inactivation**279

T.A. Ozharovskaia, O.V. Zubkova, O. Popova, A.V. Kovyrshina,
P.P. Goldovskaya, I.V. Vavilova, I.V. Dolzhikova, E.I. Ermolova,
M.S. Kunda, N.N. Ryzhova, O.L. Voronina, D.N. Shcherbinin,
D.V. Shcheblyakov, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg

**Immunogenicity of various variants of Ebola and Marburg virus
glycoprotein genes in recombinant adenoviral vectors**294

D.S. Leontyev, F.A. Urusov, D.V. Glazkova, B.V. Belugin, O.V. Orlova,
R.R. Mintaev, G.M. Tsyganova, E.V. Bogoslovskaya, G.A. Shipulin

**Study of the protective efficacy of CombiMab-2
against human immunodeficiency virus type 1
in mice humanised with CD4⁺ T-lymphocytes**312

Regulation of biological medicinal products

D.S. Davydov, R.L. Parfenyuk, Z.V. Durmanova, R.E. Kazakov,
A.A. Movesyants

**Specific aspects of bacteriophage regulation:
international practices and future developments**322

Quality control

A.A. Soldatov, A.K. Yakovlev, Zh.I. Avdeeva, D.V. Gorenkov,
A.S. Korovkin, V.V. Kosenko

**Current regulatory requirements for stability studies
of biological medicinal products: a review**335

S.A. Alekseeva, I.V. Kasina, T.I. Nemirovskaya

**Comparative analysis of the results of live anthrax
vaccine identification by immunofluorescence and
immunochromatography**348



Вакцины против вируса папилломы человека: организация и опыт проведения доклинических исследований

А.С. Коровкин✉, Т.Н. Никитина, Т.Ю. Козлова, Д.В. Горенков, А.Р. Волгин

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

✉ Коровкин Алексей Сергеевич; korovkinas@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Основным мероприятием в первичной профилактике заболеваний, вызываемых вирусом папилломы человека (ВПЧ), является вакцинация. Разработка новых вакцин-кандидатов ведется во всем мире, в том числе и в Российской Федерации. В то же время серьезной проблемой на пути к внедрению новых ВПЧ-вакцин в практику здравоохранения является отсутствие четких и однозначных рекомендаций по проведению их доклинических исследований (ДКИ).

ЦЕЛЬ. Анализ нормативных документов, изучение опыта проведения ДКИ ВПЧ-вакцин и обобщение подходов к ДКИ, которые могут быть рекомендованы разработчикам и заявителям при регистрации новых вакцин для профилактики папилломавирусной инфекции, в том числе разрабатываемых в Российской Федерации.

ОБСУЖДЕНИЕ. Изучены как нормативные правовые документы ВОЗ, ИСН, ЕЭК, так и результаты экспериментальной части в рамках проведения ДКИ ВПЧ-вакцин. Зарегистрированные и разрабатываемые ВПЧ-вакцины схожи по своим характеристикам и конструктивным особенностям, но могут различаться по спектру перекрываемых серотипов и методам получения капсидного белка L1 ВПЧ. В настоящее время подтверждена роль белка L1 в формировании специфического протективного иммунитета, поэтому отсутствует необходимость проведения тестов заражения с использованием животных моделей. Моделирование папилломатоза может потребоваться при выборе альтернативных иммунологических мишеней или при изучении иного пути введения вакцины, отличного от парентерального. В программу ДКИ могут быть включены отдельные этапы по проведению комплексной оценки новых адъювантов и иных дополнительных компонентов в составе новых ВПЧ-вакцин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. На основании изучения международного опыта систематизированы методы и подходы к проведению ДКИ ВПЧ-вакцин. Сформулированы рекомендации для разработчиков ВПЧ-вакцин по планированию и организации ДКИ, включая изучение иммуногенности, токсикологических свойств, местной переносимости, необходимых для государственной регистрации новых препаратов.

Ключевые слова: папилломавирусные вакцины; папилломавирусная инфекция; ВПЧ-вакцины; вакцинация; капсидные белки; белок L1; адъюванты; серотипы ВПЧ; животные; доклинические исследования

Для цитирования: Коровкин А.С., Никитина Т.Н., Козлова Т.Ю., Горенков Д.В., Волгин А.Р. Вакцины против вируса папилломы человека: организация и опыт проведения доклинических исследований. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2024;24(3):243–254. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-243-254>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. А.С. Коровкин является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2024 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© А.С. Коровкин, Т.Н. Никитина, Т.Ю. Козлова, Д.В. Горенков, А.Р. Волгин, 2024

Human papillomavirus vaccines: organisation and experience of preclinical studies

Alexey S. Korovkin ✉, Tatiana N. Nikitina, Tatiana Yu. Kozlova, Dmitry V. Gorenkov, Andrey R. Volgin

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

✉ Alexey S. Korovkin; korovkinas@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Vaccination is the main measure for the primary prevention of human papillomavirus (HPV)-related diseases. The development of novel vaccine candidates is underway worldwide, including in the Russian Federation. At the same time, the clinical introduction of new HPV vaccines is seriously hampered by the lack of clear and unambiguous recommendations for conducting preclinical studies of these vaccines.

AIM. This study aimed to analyse regulatory documents on HPV vaccines, to study the experience of conducting preclinical studies, and to summarise the preclinical approaches that could be recommended for developers and applicants seeking approval for new preventive HPV vaccines, including the vaccines being developed in the Russian Federation.

DISCUSSION. The authors have analysed regulatory documents issued by the World Health Organisation (WHO), the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), and the Council of the Eurasian Economic Commission (EEC). Additionally, the authors have reviewed the experimental results of preclinical studies of HPV vaccines. The known licensed and pipeline HPV vaccines are similar in terms of their characteristics and constructive features. However, there may be some differences in the HPV serotype coverage and the methods used to produce the HPV L1 capsid protein. To date, studies have confirmed the role of the HPV L1 capsid protein in the development of specific immunity, rendering challenge tests in animal models unnecessary. Papillomatosis modelling may be required for choosing an alternative immunological target or for studying an alternative (non-parenteral) route for vaccine administration. Preclinical study programmes may be supplemented with individual stages of comprehensive assessment of adjuvants and other additives included in novel HPV vaccine compositions.

CONCLUSIONS. The authors have studied the international experience and presented a systemic overview of the methods and approaches used in preclinical studies of HPV vaccines. The authors have formulated recommendations for developers for the planning and organisation of preclinical studies of HPV vaccines (including immunogenicity, toxicity, and local tolerance assessments required for licensing new vaccines).

Keywords: papillomavirus vaccines; papillomavirus infections; HPV vaccines; vaccination; capsid proteins; L1 protein; adjuvants; HPV serotypes; animals; preclinical studies

For citation: Korovkin A.S., Nikitina T.N., Kozlova T.Yu., Gorenkov D.V., Volgin A.R. Human papillomavirus vaccines: organisation and experience of preclinical studies. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):243–254. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-243-254>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. A.S. Korovkin has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) относят к группе глобально распространенных ДНК-содержащих вирусов, поражающих эпителий кожных покровов и слизистых оболочек [1]. Одним из тяжелейших заболеваний, вызываемых ВПЧ, является рак шейки матки (РШМ) [1, 2]. В настоящее время РШМ считается наиболее

распространенным раком у женщин во всем мире после рака молочной железы и ведущей причиной смерти от рака в некоторых из беднейших стран (например, в странах Африки) [2]. РШМ входит в число трех наиболее распространенных типов рака среди женщин моложе 45 лет в 146 странах из 185 (79%)¹, при этом, согласно данным исследования CONCORD-3, глобальная

¹ ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report on 10 March 2023. <https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>

5-летняя выживаемость при РШМ составляет 50–70% (период наблюдения 2000–2014 гг.) [3].

В мире было проведено много исследований по эпидемиологии ВПЧ-инфекции и изучению онкогенных свойств различных генотипов ВПЧ. В настоящее время хорошо известно и доказано, что наиболее вирулентными генотипами (далее — типы) высокого онкогенного риска являются 16 и 18 типы ВПЧ, вызывающие около 70% всех инвазивных форм РШМ [4–6]. ВПЧ 6 и 11 типов вызывают большинство наружных аногенитальных бородавок, рецидивирующий респираторный папилломатоз и изменения в эпителиальных тканях шейки матки по типу появления низкодифференцированных клеток [7, 8].

На Всемирной ассамблее здравоохранения в 2020 г. была утверждена глобальная стратегия по ускорению элиминации РШМ на период 2020–2030 гг.² Основными инструментами ее реализации являются вакцинация против ВПЧ и пожизненный регулярный скрининг шейки матки (не реже чем 1 раз в 5 лет) с первичным тестированием на наличие ВПЧ и последующим лечением предраковых поражений при их выявлении. Комплекс мер позволит предотвратить возникновение до 13,4 млн новых случаев РШМ в течение следующего полувека [9, 10]. Таким образом, вакцинация против ВПЧ как наиболее ранняя мера воздействия является «краеугольным камнем» стратегии элиминации и средством первичной профилактики РШМ.

Для профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний в мире применяется ряд вакцин, различающихся по своим конструктивным особенностям и перекрытию типов ВПЧ [11]. Распоряжением Правительства Российской Федерации от 29 марта 2021 г. № 774-р «Об утверждении Плана мероприятий по реализации Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней до 2035 года» начало массовой программы вакцинопрофилактики ВПЧ-инфекции в России было запланировано на 2024 г., однако данный срок был скорректирован распоряжением Правительства Российской Федерации от 15 февраля 2023 г. № 343-р, и начало массовых прививочных мероприятий запланировано на 2026 г. Таким образом, существует объективная необходимость разработки вакцин для профилактики ВПЧ-инфекции.

Цель работы — анализ нормативных документов, изучение опыта проведения доклинических исследований (ДКИ) ВПЧ-вакцин

и обобщение подходов к ДКИ, которые могут быть рекомендованы разработчикам и заявителям при регистрации новых вакцин для профилактики папилломавирусной инфекции, в том числе разрабатываемых в Российской Федерации.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Вакцины для профилактики ВПЧ-инфекции

В мире зарегистрировано несколько вакцин для профилактики ВПЧ-инфекции (табл. 1) [11]. Данные вакцины сконструированы на основе рекомбинантного (синтетического) капсидного белка L1 ВПЧ, собранного в неинфекционные вирусоподобные частицы (virus-like particles, далее VLP). Иммуногенный белок L1 получают путем его синтеза в генетически модифицированных дрожжах или в бакуловирусной системе экспрессии с использованием реассортантных вирусов и клеток насекомых. Иммунизация такими вакцинами проводится путем внутримышечного введения двух или трех доз препарата в течение 6 мес. в зависимости от возраста реципиента.

VLP ВПЧ обладают отличительными иммуногенными свойствами, способствуя стимуляции выраженного гуморального ответа на иммунизацию [12]. При введении в организм человека VLP стратегия выживаемости ВПЧ, заключающаяся в избегании воздействия на него иммунной системы организма, полностью отменяется и синтезируются противовирусные антитела в высоких концентрациях. Поствакцинальные антитела легко проникают в слизистую оболочку половых органов и обнаруживаются в женских половых выделениях [13]. Ранее было продемонстрировано, что поствакцинальные антитела взаимодействуют с вирионами, представленными инфицированным партнером, и препятствуют развитию инфекции [14, 15].

Российские фармпроизводители ведут разработки по созданию ВПЧ-вакцин. В частности, компания АО «НПО «Комбиотех» запатентовала способ получения рекомбинантных белков L1 ВПЧ типов 6, 11, 16 и 18 [16], а компания АО «Нанолек» ведет работы по коммерциализации данной вакцины, завершая в настоящее время программу клинических исследований (КИ) и осуществляя процедуру государственной регистрации³. Российский фармацевтический холдинг «Р-Фарм» объявил о партнерстве с китайской компанией для коммерциализации в Российской Федерации будущего продукта — 9-валентной

² Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Geneva: WHO; 2020. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/336583/9789240014107-eng.pdf?sequence=1>

³ <https://pharmvestnik.ru/content/news/Nanolek-zavershila-III-fazu-klinissledovaniy-pervoi-rossiiskoi-vakciny-ot-VPCh.html>

Таблица 1. Вакцины для профилактики ВПЧ-инфекции, доступные в мире
Table 1. Preventive HPV vaccines available worldwide

Вакцина <i>Vaccine</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Типы ВПЧ <i>HPV types</i>	Год регистрации** <i>Year of licensure**</i>
Церварикс <i>Cervarix</i>	GSK (Бельгия) <i>GSK (Belgium)</i>	16, 18	2007
Гардасил <i>Gardasil</i>	MSD (США) <i>MSD (USA)</i>	6, 11, 16, 18	2006
Гардасил 9* <i>Gardasil 9*</i>	MSD (США) <i>MSD (USA)</i>	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58	2014
Цервавак* <i>Cervavac*</i>	Serum Institute of India (Индия) <i>Serum Institute of India (India)</i>	6, 11, 16, 18	2022
Цеколин* <i>Cecolin*</i>	Xiamen Innovax Biotechnology (КНР) <i>Xiamen Innovax Biotechnology (China)</i>	16, 18	2020
Рекombинантная бивалентная ВПЧ-вакцина* <i>Recombinant bivalent HPV vaccine*</i>	Shanghai Zerun Biotechnology (КНР) <i>Shanghai Zerun Biotechnology (China)</i>	16, 18	2022

Таблица составлена авторами по материалам [11] с изменениями, лицензия CC BY / The table is adapted by the authors from [11] under CC BY

Примечание. * — вакцина не зарегистрирована в Российской Федерации; ** — год первой государственной регистрации.
Note. *, vaccine not licensed in Russia; **, year of the first approval.

ВПЧ-вакцины, разработка которой в настоящее время еще не завершена⁴.

Общие подходы к проведению доклинических исследований ВПЧ-вакцин

ДКИ являются важным этапом в разработке и оценке качества лекарственных препаратов (ЛП). Проведение ДКИ позволяет изучить фармакологические и токсикологические свойства ЛП, а также оценить их эффективность и безопасность. Материалы ДКИ составляют значительную часть регистрационного досье, которое формируется с целью государственной регистрации ЛП.

До начала КИ ВПЧ-вакцин проводятся ДКИ *in vitro* и *in vivo* на животных, как это происходит при разработке любых иммунобиологических ЛП. ДКИ позволяют первично сформулировать показания и потенциальные противопоказания к применению исследуемых препаратов, выявить возможные побочные эффекты, чтобы обосновать возможность реализации программ клинических разработок, а также виды и объем КИ.

Программы ДКИ папилломавирусных вакцин необходимо планировать и проводить

в соответствии с действующими требованиями правил надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP)⁵. Частичное несоответствие правилам GLP не может быть препятствием к проведению КИ и последующей регистрации ЛП. При формировании регистрационного досье необходимо указать области несоответствия и оценить степень их значимости по отношению к общей оценке безопасности⁶.

В процессе доклинической разработки можно выделить три основных направления: изучение фармакологической активности (фармадинамика), фармакокинетических и токсикологических свойств исследуемой вакцины и веществ, входящих в ее состав. При проведении исследований необходимо выбирать релевантные виды животных, наиболее чувствительные к фармакологическому и токсическому действию вакцины, включая физиологическое состояние и возраст экспериментальных животных⁷. Программа оценки безопасности, как правило, должна включать исследования на двух релевантных видах животных⁸ (млекопитающие), одним из которых должны быть негрызуны. Если исследуемый препарат фармакологически активен

⁴ https://newchina.mid.ru/ru/news/r_farm_i_beijing_health_guard_podpisali_soglashenie_po_razrabotke_vaktsiny_dlya_profilaktiki_vpch/

⁵ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики.
Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁷ Там же.

⁸ Там же.

только у конкретного вида животного, то для исследований общей токсичности допускается использование одного вида животного⁹.

В настоящее время в целях гуманного отношения к экспериментальным животным рекомендуется соблюдать принцип «3R» (replacement / refinement / reduction, замена / улучшение / сокращение), обеспечивающий благополучие животных в целом. Это позволит сократить объем исследований и существенно снизить в эксперименте число животных, подвергаемых эвтаназии [17]. В исследованиях должно быть использовано достаточное количество животных для достоверной оценки токсического действия препарата. Повышение частоты и продолжительности мониторинга за состоянием животных может частично компенсировать малый объем выборки, который нередко имеет место в исследованиях на нечеловекообразных приматах.

Важным вопросом при разработке программы исследования является выбор способа и объемов введения вакцины, расчет дозы, определение пути введения и режима дозирования. При выборе доз необходимо представить научное обоснование с учетом характеристик зависимости «доза — эффект». Следует учитывать фармакокинетические и фармакодинамические особенности препарата, а также его биодоступность у используемых видов животных¹⁰.

После проведения фармакологических и токсикологических исследований на животных необходимо предусмотреть период последующего наблюдения до тех пор, пока не будет продемонстрирована обратимость эффектов, имеющих потенциальное значение для развития нежелательных реакций у человека, возникающих в ответ на введение клинически значимых доз препарата.

Включение периода восстановления только с целью оценки иммуногенного потенциала исследуемого препарата не требуется¹¹.

Перед проведением КИ любой новой ВПЧ-вакцины на людях она должна быть максимально подробно охарактеризована. Необходимо провести предварительные исследования иммуногенности и безопасности

на животных. Объем ДКИ зависит от сложности технологического процесса изготовления вакцины и ее состава и должен определяться индивидуально для каждого случая.

В соответствии с руководством ВОЗ по доклинической оценке вакцин¹² при проведении ДКИ следует использовать формулировку¹³ вакцины, которую предполагается применять в КИ. Такие исследования необходимо проводить на соответствующих животных моделях, принимая во внимание предполагаемое клиническое использование вакцины. Они могут включать введение вакцины до и во время беременности¹⁴.

Особенности планирования и проведения доклинических исследований ВПЧ-вакцин Фармакодинамические исследования ВПЧ-вакцин и оценка иммуногенности

В зависимости от состава исследуемой вакцины допускается проведение испытаний в условиях *in vitro* и *in vivo*. Для оценки непосредственного влияния препарата на фенотип клеток и их пролиферацию допустимо использование клеточных линий и/или первичных клеточных культур. Для количественной оценки относительной чувствительности различных видов животных, а также человека, к данному биологическому ЛП и для прогнозирования активности в экспериментах *in vivo* могут быть также выполнены эксперименты *in vitro* на клеточных линиях, полученных из клеток млекопитающих.

Проведение ДКИ по изучению иммуногенных свойств вакцины подразумевает изучение типа и выраженности иммунного ответа с определением титра (концентрация) антител; определение количества животных, у которых обнаружена выработка антител (сероконверсия); изучение свойств индуцированных антител (нейтрализующая активность или отсутствие таковой, степень связывания с антигеном, специфичность взаимодействия).

В рамках реализации программы разработки 4-валентной вакцины [18] была проведена серия экспериментов по оценке иммуногенности моновалентных препаратов (VLP на основе белка L1 типов 6, 8, 16 и 18) и комплексного

⁹ ГОСТ Р 56699-2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации.

¹⁰ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

¹¹ Там же.

¹² WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO; 2005. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/annex1nonclinical.p31-63.pdf?sfvrsn=d11d7789_3&download=true

¹³ Под формулировкой понимается готовый препарат, имеющий определенный состав и технологию производства.

¹⁴ Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. WHO; 2014. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/trs_987_annex2.pdf?sfvrsn=ea91caca_3&download=true

квадривалентного препарата (объединенный препарат VLP на основе белков L1 типов 6, 8, 16 и 18), адсорбированных на гидроксифосфате алюминия, у шимпанзе. Была проведена оценка выработки антител, цитотоксических Т-лимфоцитов и цитокинового профиля (интерферон гамма, интерлейкин-5, фактор некроза опухоли альфа). Приматов иммунизировали трехкратно с интервалом 8 нед. между первой и второй дозами и 16 нед. между второй и третьей дозами. Антитела выявляли с помощью радиоиммунного анализа. Наивысшие значения титров сывороточных антител к типоспецифичным, нейтрализующим и конформационным эпитопам белка L1 ВПЧ типов 11 и 16 были достигнуты через 4 нед. после второй и третьей иммунизации. Антитела к белку L1 ВПЧ типов 11 и 16 также были обнаружены в соответствующие временные точки с помощью анализа нейтрализации ВПЧ с использованием псевдовироионов. Цитокиновые реакции, специфичные для различных типов ВПЧ, чаще всего наблюдали через 4 нед. после второй или третьей иммунизации и между 44–52 нед. наблюдения. Активность цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичную для белка L1 ВПЧ типа 16, регистрировали между 16 и 24 нед. наблюдения у 3 из 22 (13,6%) иммунизированных шимпанзе.

Анализ полученных результатов подтвердил, что иммунизация олиговалентными адсорбированными ВПЧ-вакцинами приводит к продукции нейтрализующих антител и цитокиновым реакциям в ответ на вакцинацию, однако индукция активности цитотоксических Т-лимфоцитов регистрируется редко [18]. Данное исследование можно отнести к пионерским ввиду того, что зарегистрированных вакцин против ВПЧ-инфекции на тот момент в мире не существовало и механизмы формирования иммунного ответа на иммунизацию экспериментальными препаратами на основе белка L1 ВПЧ, представленного в форме VLP, не были должным образом изучены.

Y. Gu с соавт. при доклинической разработке бивалентной ВПЧ-вакцины исследовали ее иммуногенность в сравнении с широко применяемыми 4-валентной ВПЧ-вакциной американского производства и 2-валентным бельгийским препаратом на мышах линии BALB/c и макаках-резус. Оценку иммуногенности проводили в реакции нейтрализации с псевдовиральными моделями ВПЧ типов 16 и 18. Высокие значения титров нейтрализующих антител были отмечены уже спустя 2 нед. после первичной вакцинации и ревакцинации. Все 3 препарата продемонстрировали сопоставимую иммуногенность в отношении обоих типов ВПЧ [19].

Моделирование папилломатоза у животных в доклинических исследованиях ВПЧ-вакцин

При изучении безопасности вакцин-кандидатов для профилактики папилломавирусной инфекции отдельно стоит вопрос выбора релевантных животных моделей, тем более что в настоящее время отсутствуют общепринятые модели, используемые для экспериментального воспроизведения ВПЧ-инфекции. Семейство вирусов *Papillomaviridae* обладает выраженной видовой и тканевой специфичностью, что существенно затрудняет моделирование инфекции при изучении вакцин-кандидатов [20]. По этой причине для доклинического изучения ВПЧ-вакцин предлагается использовать животных модели с видоспецифическими типами папилломавирусов, например кроликов, собак, мышей и крупного рогатого скота (КРС) [21].

Кролики представляют собой самую распространенную животную модель для доклинического изучения ЛП (профилактического и терапевтического назначения), разрабатываемых для борьбы с ВПЧ. В экспериментах используют вирус папилломы американского кролика (cottontail rabbit papillomavirus, CRPV) с моделированием папилломатоза Шоупа [22, 23]. Однако применение кроликов для изучения протективного действия профилактических вакцин, индуцирующих иммунный ответ к капсидным белкам папилломавируса, имеет ограничения из-за невозможности моделирования ВПЧ-инфекции, вызванной релевантными типами ВПЧ (например, типы 16 и 18), и в большей степени адаптировано для изучения терапевтического действия ЛП.

Моделирование папилломатоза у собак. Для моделирования развития папиллом и повреждений, сходных с повреждениями аногенитальной области человека и обычно вызываемых типами ВПЧ низкого онкогенного риска, может применяться инфицирование собак-биглей вирусом орального папилломатоза собак [24], что, собственно, и было использовано при реализации программ доклинической разработки профилактических ВПЧ-вакцин [25, 26].

Моделирование ВПЧ-ассоциированных инфекций у мышей. В качестве животной модели для изучения иммунопатогенеза ВПЧ-инфекции, вызываемой типами ВПЧ высокого онкогенного риска, может использоваться линия мышей C57BL/6 [27], при этом развитие инфекционного процесса, проявляющегося в виде карцином, воспроизводится посредством трансплантации опухолевых клеток линий C3 и TC-1 [28, 29].

Моделирование папилломатоза у крупного рогатого скота. Возбудители вирусного папилломатоза КРС так же, как и ВПЧ, относятся

к представителям семейства *Papillomaviridae* и обладают высоким онкогенным потенциалом. Вирус папилломы КРС вызывает образование кондилом (фибропапиллом) на коже и на слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта, рак желудочно-кишечного тракта и рак мочевого пузыря. Эти вирусы заражают кератиноциты и вызывают пролиферацию кератиноцитов и фибробластов, то есть различаются проявления инфекционного процесса, вызванные различными типами вируса папилломатоза КРС [30].

В области ветеринарии были опубликованы работы, посвященные моделированию инфекции с применением вируса папилломатоза КРС типа 4. Однако существенные различия в патогенезе заболевания, аутобредность животных и сложность оценки экспериментальных повреждений в динамике значительно ограничивают применение данной модельной системы для исследований вакцин, в том числе обладающих терапевтическим действием [27, 31].

Моделирование папилломатоза у обезьян. У нечеловекообразных приматов были выявлены 12 типов папилломавирусов макак-резус *Macaca mulatta* (RhPV) и 1 папилломавирус яванских макак *Macaca fascicularis* (MfPVa), поражающих урогенитальный тракт [32]. Половая система самок макак-резус по своему строению и физиологическим особенностям подобна человеческой. У самок макак-резусов встречается плоскоклеточная карцинома шейки матки, развитие которой ассоциировано с RhPV1, обладающим онкогенным потенциалом. У яванских макак также были выявлены эпизоды развития дисплазий шейки матки, ассоциированных с воздействием папилломавируса [33]. Повреждения имели морфологическое сходство с цервикальной интраэпителиальной неоплазией человека (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) [32].

Несмотря на то что приматы (макак-резус и яванский макак) используются для моделирования папилломавирусной инфекции и CIN в целях доклинического изучения профилактических и терапевтических папилломавирусных вакцин [33], ряд факторов (этические аспекты, высокая стоимость животных, особые требования к условиям содержания приматов в вивариях) могут существенно ограничить выбор данной животной модели.

В ДКИ с использованием различных животных моделей продемонстрировано, что VLP, содержащие белок L1, являются сильными иммуногенами, которые индуцируют образование высоких титров нейтрализующих антител и предотвращают образование вирус-ассоциированных папиллом [34–36].

На основании изложенных данных можно сформулировать следующие выводы относительно моделирования ВПЧ-инфекции у животных:

- нет необходимости в дальнейшем проведении тестов с заражением при исследовании моно- или поливалентных ВПЧ-вакцин, сконструированных на основе капсидных белковых антигенов;
- нейтрализующие антитела, вероятнее всего, являются первичными медиаторами иммунной защиты. Представляется маловероятным, что клеточно-опосредованный иммунитет напрямую связан с механизмами протективного действия; таким образом, данный аспект не нуждается в дальнейшем освещении для целей государственной регистрации.

Рекомендуется, чтобы фармакодинамические свойства ВПЧ-вакцин изучали в ходе исследований иммуногенности (например, на грызунах, кроликах и/или нечеловекообразных приматах) с рассмотрением следующих параметров:

- оценка и установление характеристик индуцированных сывороточных нейтрализующих антител к каждому типу VLP, содержащих белок L1 ВПЧ, включенных в состав предлагаемой вакцины в том случае, если ВПЧ-вакцина содержит новые типы в дополнение к типам, имеющимся в составе уже зарегистрированной вакцины, или была разработана новая лекарственная форма; в данном случае включение в дизайн исследования дополнительной группы (групп) животных позволит получить подтверждающие данные;
- при использовании в готовой лекарственной форме вакцины специфического адъюванта необходимо изучить дополнительный эффект и возможную пользу, которую предполагается получить в результате планируемого усиления иммунного ответа (гуморального и/или клеточного, например вовлечение в него Т-хелперов или индукция клеток специфической памяти), с использованием по крайней мере одного вида животных;
- получение данных, подтверждающих выбор оптимального состава вакцины-кандидата, включающих результаты возможной, но не обязательной, оценки сывороточных антител с перекрестной нейтрализующей активностью к широкому спектру типов ВПЧ, не включенных в состав вакцины-кандидата.

Фармакокинетические исследования ВПЧ-вакцин

Необходимо изучить механизмы абсорбции, распределения, метаболизма и выведения из организма веществ, входящих в состав

исследуемой вакцины, время начала и длительность фармакологических эффектов [37].

Токсикологические исследования ВПЧ-вакцин

Токсикологические исследования проводятся при однократном и многократном введении изучаемого препарата. Полученные результаты исследований при однократном введении могут быть использованы для выбора доз при исследовании токсичности при многократном введении. По возможности данные исследования должны включать изучение токсикокинетики.

Ввиду того что целевая популяция для ВПЧ-вакцин включает в себя женщин детородного возраста, исследования репродуктивной и онтогенетической токсичности являются обязательными. Оценка репродуктивной токсичности должна проводиться на видах животных, которые подходят по фармакологическим параметрам. Если препарат, который предполагается применять в клинике, проявляет свою фармакологическую активность у грызунов и кроликов, то оба вида этих животных должны использоваться в исследованиях эмбриофетальной токсичности за исключением случаев, когда для одного из видов животных установлена эмбриофетальная летальность или тератогенное действие.

Исследование онтогенетической токсичности на нечеловекообразных приматах допускается проводить только в случае, если они являются единственным релевантным видом животных¹⁵.

Исследования токсичности с многократным введением и онтогенетической токсичности должны включать оценку иммунного ответа в группе вакцинированных животных в дополнение к обязательно изучаемым токсикологическим параметрам, с учетом существующих руководств ВОЗ¹⁶.

Если для производства ВПЧ-вакцины, содержащей VLP, используется новый клеточный субстрат, который ранее не использовался на производстве зарегистрированных вакцин для человека или биологических препаратов, то необходимо исследовать соответствующие аспекты безопасности, такие как потенциальный иммунный ответ, вызванный остаточными количествами белков клеток-хозяина, на подходящей животной модели. В особенности подобные

исследования необходимо проводить, если финальный продукт содержит адъювант, который может повысить иммунный ответ на контаминирующие белки в препарате. Также важно учитывать возможную токсичность веществ, входящих в состав препарата, как по отдельности, так и при их сочетании и взаимодействии между собой.

При проведении исследований токсичности при многократном введении следует определять концентрацию антител, появление которых обусловлено введением препарата. Также необходимо при интерпретации результатов исследования учитывать влияние образования антител на фармакокинетические (фармакодинамические) параметры препарата, частоту развития и/или тяжесть проявления нежелательных явлений, активацию системы комплемента, появление новых токсических эффектов. Обязательной является оценка возможности появления патологических изменений, обусловленных образованием и отложением иммунных комплексов в тканях¹⁷.

В ходе проведения ДКИ и КИ прогнозируемый минимально допустимый порог иммуногенности вакцины может быть пересмотрен и ужесточен в соответствии с полученными результатами.

Изучение местной переносимости

При изучении местной переносимости необходимо использовать препарат, который имеет состав для применения у человека и в дальнейшем будет представлен к регистрации. Оценку местного действия осуществляют на основании данных осмотра, проводимого в течение срока введения препарата и последующих 7 сут, а также результатов гистологического исследования тканей в месте введения и регионарных лимфатических узлов. Местная переносимость изучаемого препарата может быть оценена в рамках исследований токсичности при однократном или многократном введении.

Изучение канцерогенности

Исследования канцерогенности экспериментального препарата проводятся только в случае, если существуют опасения относительно канцерогенного потенциала. Для оценки такого риска могут быть использованы различные подходы.

¹⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

¹⁶ Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. WHO; 2014. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/annex1nonclinical.p31-63.pdf?sfvrsn=d11d7789_3&download=true

¹⁷ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21.05.2020 № 10 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

Стандартные тесты на канцерогенность с использованием биологических систем, как правило, не проводятся для биотехнологических ЛП. Кроме того, иммунизация инактивированными вакцинами предполагает разовые введения (до трех доз) с длительными интервалами времени между иммунизирующими дозами, что позволяет обосновать отсутствие необходимости исследовать канцерогенный потенциал ВПЧ-вакцин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представители ВПЧ относятся к семейству *Papillomaviridae* и подразделяются на типы, подтипы и варианты в зависимости от последовательности нуклеотидов в геноме, при этом последовательности генов, кодирующие белки L1, должны отличаться друг от друга не менее чем на 10%, 2–10% и максимум на 2% соответственно [38]. К настоящему времени описано порядка 200 типов ВПЧ¹⁸ [39], которые в зависимости от их способности вызывать клинические проявления ВПЧ-инфекции у человека подразделяют на типы высокого и низкого онкогенного риска [5, 39]. Типы высокого риска включают в себя 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68 и 59. Типы низкого онкогенного типа — 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 [5, 10, 40]. Следует отметить, что инфицирование одним из типов ВПЧ не снижает риск инфицирования филогенетически родственным типом, тем более что ранее были описаны случаи коинфицирования несколькими типами ВПЧ одновременно [41, 42]. Считаем необходимым отметить тот факт, что за открытие роли ВПЧ в развитии онкологических заболеваний, в первую очередь РШМ, исследовательской группе под руководством профессора Гаральда цур Хаузена в 2008 г. была присуждена Нобелевская премия по медицине [43].

Согласно позиции ВОЗ, вакцинация против папилломавирусной инфекции является одним из глобальных приоритетов расширения национальных программ иммунизации [44]. Существующие в настоящее время ВПЧ-вакцины в целом схожи по своим характеристикам и конструктивным особенностям, однако могут различаться по спектру перекрываемых серотипов и методу получения капсидного белка L1 ВПЧ [11, 44]. Показатели специфического иммунного ответа к белку L1 в настоящее время определены, как и роль белка L1 в формировании специфического иммунитета к соответствующим вариантам ВПЧ, а также подтверждено длительное сохранение поствакцинального иммунитета [11, 45–47]. Таким образом, отсутствует

необходимость проведения тестов заражения на животных в дальнейшем, так как ранее проведенные эксперименты подтвердили правильно выбранную иммунологическую мишень.

В ряде случаев может потребоваться моделирование папилломатоза на животных — при выборе альтернативных иммунологических мишеней или при изучении иного пути введения вакцины, отличного от парентерального.

Принимая во внимание то, что новые вакцины потенциально будут разрабатываться с применением инновационных адъювантных систем, в программу ДКИ могут быть включены отдельные этапы по изучению комплексного действия антигенов и адъювантов, в первую очередь для подтверждения безопасности новых препаратов [48]. В частности, компания GSK (Бельгия) разработала адъювант AS04, представляющий собой комбинацию солей алюминия и 3-О-деацилированного монофосфорилипид А (МФЛ) — детоксицированного производного липида А с сохраненной иммуностимулирующей способностью. МФЛ индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов в значительно меньшей степени по сравнению с исходной молекулой липида А.

В соответствии с требованиями Европейского Союза и ВОЗ были проведены ДКИ безопасности на нескольких видах животных, результаты которых подтвердили отсутствие системной токсичности МФЛ и AS04. Включение AS04 в состав вакцин приводило к образованию более высоких концентраций антител и выраженной пролиферации В-лимфоцитов, а также формированию В-клеток памяти по сравнению с вакцинами, содержащими только соли алюминия в качестве адъюванта. Проведенные исследования, по оценке авторов, стали основой для успешного применения AS04, в первую очередь в вакцинах против вируса гепатита В и ВПЧ [49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целях реализации национальной программы иммунизации детей и подростков в Российской Федерации могут применяться только зарегистрированные в установленном порядке вакцины. Адекватно спланированные и организованные доклинические исследования, наряду с рандомизированными контролируемые клиническими исследованиями, важны и необходимы для разработки вакцин-кандидатов против ВПЧ, их последующей государственной регистрации и включения в национальный календарь профилактических прививок.

¹⁸ The papillomavirus episteme. https://pave.niaid.nih.gov/explore/reference_genomes/human_genomes

С учетом изученного мирового опыта проведения ДКИ ВПЧ-вакцин и ввиду отсутствия национальных методических рекомендаций по организации и проведению ДКИ папилломавирусных вакцин в Российской Федерации и странах Евразийского экономического союза нами были сформулированы следующие рекомендации по результатам обзора данных литературы.

1. Необходимо проведение фармакодинамических исследований с оценкой иммуногенности разрабатываемых ВПЧ-вакцин по показателям титров сывороточных антител к вариантам белка L1 в составе вакцин.
2. Требуется проведение ДКИ токсичности при однократном и многократном введении с оценкой репродуктивной и онтогенетиче-

ской токсичности ввиду особенностей целевой группы, подлежащей профилактической вакцинации против ВПЧ-инфекции.

3. При использовании новых адъювантных систем также необходимо включение в программу ДКИ этапов проведения комплексной оценки эффективности и безопасности.

Анализ требований нормативной документации и различных рекомендаций по проведению ДКИ на территории Российской Федерации, стран Европы и США в отношении вакцин, содержащих рекомбинантные белки ВПЧ, позволит в дальнейшем адаптировать используемые подходы и методы для качественного планирования ДКИ, результаты которых необходимы при государственной регистрации новых ВПЧ-вакцин.

Литература/References

1. Steenbergen RD, Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(6):395–405. <https://doi.org/10.1038/nrc3728>
2. Garland SM, Stanley MA, Giuliano AR, Moscicki AB, Kaufmann A, Bhatla N, et al. IPVS statement on “Temporary HPV vaccine shortage: Implications globally to achieve equity”. *Papillomavirus Res*. 2020;9:100195. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2020.100195>
3. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*. 2018;391(10125):1023–75. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3)
4. Escobar-Escamilla N, González-Martínez BE, Araiza-Rodríguez A, Fragoso-Fonseca DE, Pedroza-Torres A, Landá-Flores MG, et al. Mutational landscape and intra-host diversity of human papillomavirus type 16 long control region and E6 variants in cervical samples. *Arch Virol*. 2019;164(12):2953–61. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04407-6>
5. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol*. 2019;40(5):602–8. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1674261>
6. Nelson CW, Mirabello L. Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity. *Tumour Virus Res*. 2023;15:200258. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2023.200258>
7. Skoczyński M, Goździcka-Józefiak A, Kwaśniewska A. Co-occurrence of human papillomavirus (HPV) in newborns and their parents. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):930. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4503-4>
8. Tumban E. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*. 2019;11(10):922. <https://doi.org/10.3390/v11100922>
9. Simms KT, Steinberg J, Caruana M, Smith MA, Lew JB, Soerjomataram I, et al. Impact of scaled up human papillomavirus vaccination and cervical screening and the potential for global elimination of cervical cancer in 181 countries, 2020–99: a modelling study. *Lancet Oncol*. 2019;20(3):394–407. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30836-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30836-2)
10. Singh D, Vignat J, Lorenzoni V, Eslahi M, Ginsburg O, Lauby-Secretan B, et al. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. *Lancet Glob Health*. 2023;11(2):e197–e206. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(22\)00501-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00501-0)
11. Illah O, Olaitan A. Updates on HPV vaccination. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(2):243. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020243>
12. Pasmans H, Berkowska MA, Diks AM, de Mooij B, Groenland RJ, de Rond L, et al. Characterization of the early cellular immune response induced by HPV vaccines. *Front Immunol*. 2022;13:863164. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.863164>
13. Pattyn J, Van Keer S, Tjalma W, Matheeuissen V, Van Damme P, Vorsters A. Infection and vaccine-induced HPV-specific antibodies in cervicovaginal secretions. A review of the literature. *Papillomavirus Res*. 2019;8:100185. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.100185>
14. Téblick L, Lipovac M, Molenberghs F, Delputte P, De Vos WH, Vorsters A. HPV-specific antibodies in female genital tract secretions captured via first-void urine retain their neutralizing capacity. *Hum Vaccin Immunother*. 2024;20(1):2330168. <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2330168>
15. Spinner C, Ding L, Bernstein DI, Brown DR, Franco EL, Covert C, Kahn JA. Human papillomavirus vaccine effectiveness and herd protection in young women. *Pediatrics*. 2019;143(2):e20181902. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-1902>
16. Крымский МА, Борисов ИА, Яковлев МС. Способ получения рекомбинантной вакцины для профилактики папилломавирусной инфекции человека, рекомбинантная вакцина. Патент Российской Федерации № 2681174; 2019. Krymskij MA, Borisov IA, Yakovlev MS. Method of obtaining a recombinant vaccine for prevention of human papilloma virus infection, recombinant vaccine. Patent of the Russian Federation No 2681174; 2019 (In Russ.). EDN: ZDZWYH
17. Franco NH, Kerton A, Lewis DI. Education in laboratory animal science and the 3Rs. *Lab Anim*. 2023;57(2):109–11. <https://doi.org/10.1177/00236772231162166>
18. Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, Smith JF, Cook JC, et al. Antibody, cytokine and cytotoxic

- T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine*. 2001;19(27):3733–43.
[https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00093-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00093-7)
19. Gu Y, Wei M, Wang D, Li Z, Xie M, Pan H, et al. Characterization of an *Escherichia coli*-derived human papillomavirus type 16 and 18 bivalent vaccine. *Vaccine*. 2017;35(35 Pt B):4637–45.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.084>
 20. Кухаренко АЕ, Гравель ИВ, Хамитов РА. Использование моделей in vivo для оценки иммуногенности терапевтических вакцин против ВПЧ на основе онкобелка E7. *Иммунология*. 2015;36(1):52–7
Kukharensko AE, Gravel IV, Khamitov RA. Use of models in vivo to assess the immunogenicity of therapeutic vaccines against HPV on the basis of the oncoprotein E7. *Immunology*. 2015;36(1):52–7 (In Russ.).
EDN: [TNIIGE](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.084)
 21. Christensen ND, Pickel MD, Budgeon LR, Kreider JW. In vivo anti-papillomavirus activity of nucleoside analogues including cidofovir on CRPV-induced rabbit papillomas. *Antivir Res*. 2000;48(2):131–42.
[https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(00\)00124-8](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(00)00124-8)
 22. Christensen ND. Cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) model system to test antiviral and immunotherapeutic strategies. *Antivir Chem Chemother*. 2005;16(6):355–62.
<https://doi.org/10.1177/095632020501600602>
 23. Rich LJ, Sexton S, Curtin L, Seshadri M. Spatiotemporal optoacoustic mapping of tumor hemodynamics in a clinically relevant orthotopic rabbit model of head and neck cancer. *Transl Oncol*. 2017;10(5):839–45.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.08.004>
 24. Nicholls PK, Moore PF, Anderson DM, Moore RA, Parry NR, Gough GW, Stanley MA. Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Virology*. 2001;283(1):31–9.
<https://doi.org/10.1006/viro.2000.0789>
 25. Bell JA, Sundberg JP, Ghim SJ, Newsome J, Jensen AB, Schlegel R. A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology*. 1994;62(4):194–8.
<https://doi.org/10.1159/000163910>
 26. Zhou D, Wang A, Maxwell S, Schlegel R, Yuan H. Long-term culture of canine ocular cells that maintain canine papillomaviruses. *Viruses*. 2022;14(12):2675.
<https://doi.org/10.3390/v14122675>
 27. Fausch SC, Da Silva DM, Eiben GL, Le Poole IC, Kast WM. HPV protein/peptide vaccines: from animal models to clinical trials. *Front Biosci*. 2003;8:s81–s91.
<https://doi.org/10.2741/1009>
 28. Accardi L, Paolini F, Mandarino A, Percario Z, Di Bonito P, Di Carlo V, et al. In vivo antitumor effect of an intracellular single-chain antibody fragment against the E7 oncoprotein of human papillomavirus 16. *Int J Cancer*. 2014;134(11):2742–7.
<https://doi.org/10.1002/ijc.28604>
 29. Maynard SK, Marshall JD, MacGill RS, Yu L, Cann JA, Cheng LI, et al. Vaccination with synthetic long peptide formulated with CpG in an oil-in-water emulsion induces robust E7-specific CD8 T cell responses and TC-1 tumor eradication. *BMC Cancer*. 2019;19(1):540.
<https://doi.org/10.1186/s12885-019-5725-y>
 30. Yamashita-Kawanishi N, Tsuzuki M, Wei Z, Kok MK, Ishiyama D, Chambers JK, et al. Identification of bovine papillomavirus type 1 and 2 from bovine anogenital fibropapillomas. *J Vet Med Sci*. 2019;81(7):1000–5.
<https://doi.org/10.1292/jvms.19-0017>
 31. Bassi PB, Araujo FF, Garcia GC, Costa E Silva MF, Bittar ER, Bertonha CM, et al. Haematological and immunophenotypic evaluation of peripheral blood cells of cattle naturally infected with bovine papillomavirus. *Vet J*. 2019;244:112–5.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.004>
 32. Wood CE, Chen Z, Cline JM, Miller BE, Burk RD. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. *J Virol*. 2007;81(12):6339–45.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00233-07>
 33. Wood CE, Borgerink H, Register TC, Scott L, Cline JM. Cervical and vaginal epithelial neoplasms in cynomolgus monkeys. *Vet Pathol*. 2004;41(2):108–15.
<https://doi.org/10.1354/vp.41-2-108>
 34. Roberts JN, Kines RC, Katki HA, Lowy DR, Schiller JT. Effect of Pap smear collection and carrageenan on cervicovaginal human papillomavirus-16 infection in a rhesus macaque model. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(9):737–43.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djr061>
 35. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(25):11553–7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11553>
 36. Park MH, You JW, Kim HJ, Kim HJ. IgG and IgM responses to human papillomavirus L1 virus-like particle as a function of dosing schedule and vaccine formulation. *J Microbiol*. 2019;57(9):821–7.
<https://doi.org/10.1007/s12275-019-9308-z>
 37. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Медуницын НВ, Лысикова СЛ, Меркулов ВА. Фармакокинетические свойства препаратов белковой природы. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(2):24–35.
Soldatov AA, Avdeeva ZH, Alpatova NA, Medunitsyn NV, Lysikova SL, Merkulov VA. Pharmacokinetic properties of the preparations of protein origin. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(2):24–35 (In Russ.).
EDN: [UCKKPR](https://doi.org/10.1007/s12275-019-9308-z)
 38. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17–27.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
 39. Shimizu A, Yamaguchi R, Kuriyama Y. Recent advances in cutaneous HPV infection. *J Dermatol*. 2023;50(3):290–8.
<https://doi.org/10.1111/1346-8138.16697>
 40. Nygård M, Hansen BT, Kjaer SK, Hortlund M, Tryggvadóttir L, Munk C, et al. Human papillomavirus genotype-specific risks for cervical intraepithelial lesions. *Hum Vaccin Immunother*. 2021;17(4):972–81.
<https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1814097>
 41. Zhang H, Zhang S. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection among female outpatients in Northeast China: a population-based survey of 110,927 women. *Arch Gynecol Obstet*. 2023;308(1):35–41.
<https://doi.org/10.1007/s00404-022-06653-7>
 42. Gaete S, Auguste A, Bhaknan B, Peruvien J, Herrmann-Storck C, Socrier Y, et al. Frequent high-risk HPV co-infections excluding types 16 or 18 in cervical neoplasia in Guadeloupe. *BMC Cancer*. 2021;21(1):281.
<https://doi.org/10.1186/s12885-021-07940-3>
 43. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260–5.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>
 44. World Health Organization. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017 – Recommendations. *Vaccine*. 2017;35(43):5753–5.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.069>
 45. Mariz FC, Gray P, Bender N, Eriksson T, Kann H, Apter D, et al. Sustainability of neutralising antibodies induced by bivalent or quadrivalent HPV vaccines and correlation with efficacy: a combined follow-up analysis of data from two randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trials.

- Lancet Infect Dis.* 2021;21(10):1458–68.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30873-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30873-2)
46. Hoes J, Pasmans H, Schurink-van't Klooster TM, van der Klis FRM, Donken R, Berkhof J, de Melker HE. Review of long-term immunogenicity following HPV vaccination: Gaps in current knowledge. *Hum Vaccin Immunother.* 2022;18(1):1908059.
<https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1908059>
47. Joshi S, Anantharaman D, Muwonge R, Bhatla N, Panicker G, Butt J, et al. Evaluation of immune response to single dose of quadrivalent HPV vaccine at 10-year post-vaccination. *Vaccine.* 2023;41(1):236–45.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.11.044>
48. Горенков ДВ, Комаровская ЕИ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Бондарев ВП. Современные нормативные требования к проведению доклинических исследований профилактических вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(1):7–25.
 Gorenkov DV, Komarovskaya EI, Soldatov AA, Avdeeva ZH, Bondarev VP. Current regulatory requirements for non-clinical evaluation of prophylactic vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2023;23(1):7–25 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-7-25>
49. Garçon N. Preclinical development of AS04. *Methods Mol Biol.* 2010;626:15–27.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-585-9_2

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Коровкин** — концепция работы, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **Т.Н. Никитина** — обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; **Т.Ю. Козлова** и **Д.В. Горенков** — критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; **А.Р. Волгин** — критическое обсуждение текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.S. Korovkin** conceptualised the study, approved the final version for publication. **T.N. Nikitina** reviewed and analysed literature data, and drafted the manuscript. **T.Yu. Kozlova** and **D.V. Gorenkov** participated in the critical discussion and editing of the manuscript. **A.R. Volgin** participated in the critical discussion of the manuscript.

Об авторах / Authors

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук / **Alexey S. Korovkin**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3241-1053>

Никитина Татьяна Николаевна, канд. мед. наук / **Tatiana N. Nikitina**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9344-5655>

Козлова Татьяна Юрьевна / **Tatiana Yu. Kozlova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0819-2978>

Горенков Дмитрий Витальевич / **Dmitry V. Gorenkov**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Волгин Андрей Рудольфович, канд. мед. наук / **Andrey R. Volgin**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8097-2680>

Поступила 21.05.2024

После доработки 21.08.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Received 21 May 2024

Revised 21 August 2024

Accepted 12 September 2024



Профилактика респираторно-синцитиальной вирусной инфекции: современное состояние и перспективы разработки вакцин

А.С. Коровкин , Д.В. Горенков, А.Р. Волгин

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

 Коровкин Алексей Сергеевич; korovkinas@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является одним из самых распространенных типичных возбудителей ОРВИ и инфекций нижних дыхательных путей у детей и взрослых. Уже долгое время применяются препараты моноклональных антител для проведения профилактической пассивной иммунизации недоношенных детей с бронхолегочной дисплазией, однако недавно были лицензированы вакцины для профилактической вакцинации лиц старшего возраста с наличием различных факторов риска тяжелого течения РСВ-инфекции, в первую очередь таких, как хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, дыхательной системы и сахарный диабет.

ЦЕЛЬ. Обзор состояния разработки вакцин для активной иммунизации против РСВ-инфекции, включающий эпидемиологическое обоснование разработки, результаты клинических исследований зарегистрированных вакцин, рекомендации по вакцинации населения и обзор перспективных разработок вакцин для профилактики РСВ-инфекции.

ОБСУЖДЕНИЕ. Создать вакцину для профилактики РСВ-инфекции долгое время не удавалось в первую очередь из-за особенностей иммунопатогенеза РСВ-инфекции и генетической гипервариабельности РСВ. Зарубежным исследователям удалось идентифицировать консервативную мишень для нейтрализующих антител, способную индуцировать специфический иммунитет. Такой мишенью является стабилизированный префузжн (pre-F) капсидный белок РСВ, который при изменении конформационного состояния до F-белка отвечает за проникновение вируса в клетку. На основе рекомбинантных pre-F-белков были созданы субъединичные вакцины, успешно прошедшие ряд клинических исследований (КИ) и одобренные для иммунизации лиц старшего возраста. Также одна из вакцин рекомендована для применения во время беременности с целью профилактики РСВ-инфекции у новорожденных и младенцев. В настоящее время реализуются программы разработки новых РСВ-вакцин на основе мРНК и нереплицирующихся аттенуированных гриппозных векторов. В результате проведенного исследования были изучены и суммированы показатели эффективности и безопасности двух РСВ-вакцин, одобренных к применению в различных странах мира. Оба препарата обладают удовлетворительным профилем безопасности и сопоставимыми показателями профилактической эффективности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Предрегистрационные КИ новых РСВ-вакцин, в том числе разрабатываемых в Российской Федерации, должны включать оценку профилактической эффективности в целевых группах пациентов. При регистрации в Российской Федерации вакцин, уже получивших одобрение ведущих зарубежных регуляторных органов, потребуется проведение ограниченных связующих исследований для подтверждения иммуногенности и безопасности препаратов.

Ключевые слова: РСВ-инфекция; респираторно-синцитиальный вирус; РСВ-вакцина; F-белок; вакцинация; иммунопрофилактика; инфекции нижних дыхательных путей; клинические исследования

Для цитирования: Коровкин А.С., Горенков Д.В., Волгин А.Р. Профилактика респираторно-синцитиальной вирусной инфекции: современное состояние и перспективы разработки вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):255–269. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-255-269>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. А.С. Коровкин является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2024 г.). Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Prophylaxis of respiratory syncytial virus infection: current status and prospects for vaccine development

Alexey S. Korovkin✉, Dmitry V. Gorenkov, Andrey R. Volgin

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

✉ Alexey S. Korovkin; korovkinas@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the most widespread pathogens that typically cause acute upper and lower respiratory tract infections in children and adults. Monoclonal antibody products have long been used for passive immunoprophylaxis in premature infants with bronchopulmonary dysplasia. However, vaccines have recently been licensed for the prophylactic immunisation of older adults with various risk factors for severe RSV infection (primarily, chronic cardiovascular and respiratory diseases and diabetes mellitus).

AIM. This study aimed to review the current status of the development of vaccines for active immunisation against RSV infection, including the epidemiological rationale for their development, clinical trial results for licensed vaccines, recommendations for vaccination, and promising pipeline vaccines for RSV prevention.

DISCUSSION. Initially hindered by the unique immunopathogenesis of RSV infection and the genetic hypervariability of RSV for a long time, attempts to develop an RSV vaccine succeeded when international researchers managed to identify a conservative neutralising antibody target capable of inducing specific immunity against RSV. This target, the RSV capsid protein stabilised in its prefusion (pre-F) conformation, can mediate viral entry into the cell following a conformational change. Several subunit vaccines based on recombinant pre-F proteins have successfully passed clinical trials and have been approved for the immunisation of older adults. In addition, one of these vaccines has been recommended for use during pregnancy to prevent RSV infection in newborns and infants. Currently, programmes are being implemented to develop novel RSV vaccines based on messenger RNA (mRNA) and non-replicating attenuated influenza vectors. This article examines and summarises the efficacy and safety parameters of two RSV vaccines approved in multiple countries around the world. Both vaccines have satisfactory safety profiles and comparable prophylactic efficacy parameters.

CONCLUSIONS. Preliminary clinical trials of novel RSV vaccines, including those being developed in the Russian Federation, should include prophylactic efficacy assessments in target patient populations. For vaccines approved by leading international regulators, clinical trials required for approval in the Russian Federation will be limited to bridging studies confirming the immunogenicity and safety of the vaccines.

Keywords: RSV infection; respiratory syncytial virus; RSV vaccine; F-protein; vaccination; immunoprophylaxis; lower respiratory tract infections; clinical trials

For citation: Korovkin A.S., Gorenkov D.V., Volgin A.R. Prophylaxis of respiratory syncytial virus infection: current status and prospects for vaccine development. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):255–269. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-255-269>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. A.S. Korovkin has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекция, вызываемая респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ-инфекция), является повсеместно распространенным инфекционным заболеванием нижних дыхательных путей у детей и взрослых¹. РСВ-инфекции более подвержены лица старше 65 лет, а также пациенты с хроническими заболеваниями (хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), хроническая сердечная недостаточность, бронхиальная астма, сахарный диабет) [1]. Высокая заболеваемость РСВ-инфекцией и ее клиническая значимость вызывают закономерный вопрос об осуществлении профилактических мероприятий. Для недоношенных детей на 1-м году жизни [2] и детей в возрасте до 2 лет с иммунокомпromетирующими состояниями существует возможность пассивной иммунизации с применением препаратов моноклональных антител, в частности наиболее изученного среди них паливизумаба [3]. Вакцины для применения у взрослых в настоящее время активно разрабатываются [4, 5], регистрируются и внедряются в практику систем здравоохранения [6]. В то же время исторически разработка профилактических вакцин против РСВ-инфекции была связана с определенными сложностями, в том числе с развитием эффекта «вакцино-ассоциированного усиления респираторного заболевания» (vaccine-associated enhanced respiratory disease) после введения экспериментальных инактивированных РСВ-вакцин [7].

В последнее время в мире были одобрены вакцины для профилактики РСВ-инфекции у взрослых. Вакцина, разработанная бельгийской компанией GSK, предназначена для применения у лиц старше 60 лет, вторая вакцина от американской компании Pfizer – у лиц старше 50 лет, а также беременных женщин с 32 по 36 нед. гестации для обеспечения защиты у новорожденных².

Актуальность настоящей работы обусловлена завершением разработки и внедрением в практическое использование современных вакцин для иммунопрофилактики РСВ-инфекции у взрослых, которые, очевидно, будут востребованы и в нашей стране с учетом повсеместного распространения заболевания.

Цель работы – обзор состояния разработки вакцин для активной иммунизации против

РСВ-инфекции, включающий эпидемиологическое обоснование разработки, результаты клинических исследований зарегистрированных вакцин, рекомендации по вакцинации населения и обзор перспективных разработок вакцин для профилактики РСВ-инфекции.

Для получения необходимых сведений нами проводился поиск информации о клинических исследованиях РСВ-вакцин через базу данных ClinicalTrials.gov. Поиск научных публикаций, содержащих результаты проведенных клинических исследований, осуществляли через систему National Library of Medicine NIH (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) с учетом идентификаторов, присвоенных каждому из исследований в базе данных ClinicalTrials.gov.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Общая характеристика респираторно-синцитиального вируса

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) человека относится к роду *Pneumovirus* семейства *Paramyxoviridae*. Существуют также варианты РСВ, поражающие различных животных, например крупный рогатый скот и мышей [8]³. Родственным РСВ человека является также метапневмовирус человека [9], выявленный впервые в Нидерландах в 2001 г. [10].

Вирион РСВ представляет собой асимметричную сферу и содержит несегментированную однонитевую минус-РНК, содержащую 10 генов, которые кодируют синтез 11 структурных белков (N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2, L) [11] и двух неструктурных белков (NS1 и NS2), не входящих в состав зрелого вириона и выполняющих регуляторную функцию, а также подавляющих продукцию и функцию интерферонов I и III типов [12]. Вирусный капсид состоит из липидной оболочки, в которую включены 3 гликопротеина: F (fusion protein, белок слияния), G (attachment protein, белок присоединения) и SH (small hydrophobic protein, малый гидрофобный белок) [11, 12]. Выделяют 2 основные серогруппы РСВ – А и В, представители которых имеют существенные различия в антигенных свойствах, обусловленные в первую очередь различиями в структуре белка G, а также других вирусных белков⁴. Как и другие РНК-содержащие вирусы, РСВ подвержен высокой мутационной изменчивости [13], в частности в структуре белка G,

¹ Respiratory Syncytial Virus (RSV). CDC; 2024. <https://www.cdc.gov/rsv/site.html>

² Respiratory Syncytial Virus. FDA; 2014. <https://www.fda.gov/consumers/covid-19-flu-and-rsv/respiratory-syncytial-virus-rsv>

³ Respiratory Syncytial Virus (RSV). CDC; 2024. <https://www.cdc.gov/rsv/site.html>

⁴ Virus taxonomy. The ICTV Report on virus classification and taxon nomenclature. Pneumoviridae Chapter. ICTV; 2023. <https://ictv.global/report/chapter/pneumoviridae/pneumoviridae>

⁴ Respiratory Syncytial Virus (RSV). CDC; 2024. <https://www.cdc.gov/rsv/site.html>

изменчивость которого может влиять на способность вируса взаимодействовать с клетками респираторного тракта и тем самым обуславливать тяжесть заболевания [14, 15].

Основной мишенью РСВ являются эпителиальные клетки респираторного тракта. Вирус проникает в клетку в результате слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной. В этом процессе G-белок, выполняя роль вирусного рецептора, обеспечивает взаимодействие вируса с клеточными рецепторами, а F-белок обеспечивает проникновение вируса в клетку и слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной, а также мембран соседних инфицированной и неинфицированной клеток [11] с образованием многоядерных гигантских конгломератов — клеточных синцитиев [16].

Эпидемиология РСВ-инфекции

Эпидемиологический процесс при РСВ-инфекции носит вспышечный характер и характеризуется выраженной сезонностью в холодное время года, хотя случаи заболевания могут регистрироваться круглогодично [17]. Эпидемиологический сезон по РСВ-инфекции, как правило, совпадает с таковым по гриппу и другими респираторными вирусными инфекциями. Механизм передачи РСВ — аэрозольный, путь передачи — воздушно-капельный. Взрослые чаще переносят заболевание бессимптомно благодаря многократной встрече с возбудителем, однако остаются резервуаром для передачи и поддержания циркуляции РСВ⁵.

Учитывая, что перенесенная РСВ-инфекция не приводит к формированию стойкого иммунитета, повторные эпизоды инфицирования происходят в течение всей жизни. Тяжесть РСВ-инфекции возрастает с возрастом и наличием сопутствующих патологических состояний [1]. Осложнения при заболевании РСВ-инфекцией наиболее подвержены лица старше 65 лет. В США ежегодно госпитализируются до 177 тыс. пациентов с диагнозом РСВ-инфекции, а смертность в возрастной группе ≥65 лет достигает 14,7 на 100 тыс. человек, что составляет 14 тыс. в абсолютном значении⁶ [18].

Также в североамериканской популяции частота встречаемости РСВ, по данным литературы, оставалась значительной. Так, по данным J. Johnstone с соавт. [19], среди 193 пациентов, средний возраст которых составил 71 год, госпитализированных с диагнозом «внебольничная

пневмония» (ВП), возбудитель был идентифицирован у 39% пациентов, из них в 15% случаев возбудитель был вирусной природы, в 20% — бактериальной, в 4% — смешанной. Из возбудителей вирусной природы, вирус гриппа был идентифицирован у 24% пациентов, метапневмовирус — у 24%, РСВ — у 17%, риновирус — у 14%, парагрипп — у 10%, коронавирусы — у 14%, аденовирус — у 10% пациентов. Отдельного внимания заслуживает факт того, что пациенты с вирусными пневмониями были старше пациентов с бактериальными пневмониями. Также пациенты с вирусными пневмониями чаще имели патологию сердечно-сосудистой системы (66% против 32%) и синдром старческой астении («хрупкие пациенты») (48% против 21%).

Другое проспективное исследование было выполнено в течение 4 эпидемиологических сезонов в США в больнице Рочестер (Нью-Йорк) [2]. В него были включены 1388 госпитализированных пациентов, из которых 540 отнесены к группе высокого риска (пациенты с хроническими заболеваниями сердца или легких), а 608 являлись здоровыми людьми пожилого возраста. Всего в ходе исследования было проанализировано 2514 эпизодов внебольничной пневмонии. РСВ был выявлен у 102 пациентов в проспективных когортах и у 142 госпитализированных пациентов. Таким образом, ежегодно РСВ-инфекцию переносили 3–7% здоровых лиц пожилого возраста и 4–10% пациентов из группы высокого риска. Частота госпитализаций в палату интенсивной терапии пациентов с РСВ и гриппом составила 15 и 12% соответственно, а частота летальности была в целом сопоставимой (8% против 7%) [1]. Также было продемонстрировано, что тяжесть клинического течения РСВ-инфекции существенно увеличивается с возрастом и при наличии сопутствующих заболеваний (например, ХОБЛ, хроническая сердечная недостаточность, астма) [1].

Российскими исследователями по результатам анализа данных эпидемиологического надзора за заболеваемостью и госпитализацией при гриппе и ОРВИ в разных возрастных группах населения, а также с применением вирусологических, молекулярно-генетических и статистических методов была показана значимая этиологическая роль РСВ в эпидемиологическом сезоне 2019–2020 гг. Так, долевое участие РСВ в структуре возбудителей ОРВИ негриппозной этиологии составило 20,1% (на 1660

⁵ Respiratory Syncytial Virus (RSV). CDC; 2024. <https://www.cdc.gov/rsv/site.html>

⁶ Respiratory Syncytial Virus-Associated Mortality (RSV-Associated Mortality) 2019 Case Definition. CDC; 2019. <https://ndc.services.cdc.gov/case-definitions/respiratory-syncytial-virus-associated-mortality-2019/>

положительных случаев), уступая риновирусам (28,7%) и опережая парагрипп (17,2%) [20].

Сложности в разработке вакцин против РСВ-инфекции

При попытке создания РСВ-вакцин в 1960-х годах (например, инактивированная формалином цельновирионная РСВ-вакцина) было продемонстрировано, что при иммунизации серонегативных детей раннего возраста при последующей встрече с возбудителем РСВ-инфекции развивался эффект «вакцино-ассоциированного усиления респираторного заболевания» [21]. Механизмы, ответственные за развитие данного феномена, до сих пор остаются неизученными. Однако они могут быть связаны с неадекватной выработкой нейтрализующих антител, несмотря на увеличение общего титра антител и усиленный ответ Th2 на последующее инфицирование натуральным патогеном [7].

Обзор результатов клинической разработки зарегистрированных вакцин

Поверхностный гликопротеин G РСВ является чрезвычайно антигенно разнообразным, в то время как белок слияния F имеет в своей структуре множественные относительно стабильные антигенные детерминанты [22], что определило его первичный выбор в качестве потенциальной антигенной мишени. В структуре вириона F-белок существует в метастабильном состоянии, активируясь и переходя в стабильное состояние при слиянии вируса с клеткой-мишенью [23, 24]. В Национальном институте здравоохранения США были изучены конформационные состояния F-белка, ставшие основой для разработки иммуногена в стабилизированной конформации пре-фьюжн, способного обеспечивать формирование нейтрализующих антител [25, 26]. В предварительном клиническом исследовании (КИ) фазы I было продемонстрировано превосходство препарата стабилизированного иммуногена (pre-F-белок) над препаратом очищенного субъединичного F-белка [27] по уровню нейтрализующих антител. Концепция использования pre-F-белка была выбрана двумя ведущими международными разработчиками вакцин — GSK (Бельгия) и Pfizer (США) — для создания собственных препаратов, которые были зарегистрированы в 2023 г.

Различие концепций между двумя зарегистрированными вакцинами заключается в первую очередь в том, что сотрудники GSK, став создателями первой зарегистрированной вакцины,

сочли, что pre-F-белок является в достаточной степени стабильным и в должной мере способствует формированию нейтрализующих антител после вакцинации [28]. Сотрудники Pfizer, чья вакцина была зарегистрирована несколько позже, использовали подход к созданию бивалентной вакцины на основе pre-F-белка субтипов А и В РСВ, считая, что такая конструкция вакцинного препарата способна обеспечить максимальную защиту от циркулирующих штаммов РСВ [29].

Вакцина, разработанная GSK (вакцина 1), представляет собой рекомбинантный pre-F-белок, получаемый методом гетерологичной экспрессии в генетически модифицированных перевиваемых клетках яичника китайского хомячка (клеточная линия CHO). Одна прививочная доза в объеме 0,5 мл содержит 120 мкг рекомбинантного pre-F-белка с адъювантом AS01E⁷. Препарат Pfizer (вакцина 2) представляет собой смесь рекомбинантных pre-F-белков РСВ типов А и В, также экспрессируемых в клеточной линии CHO. Одна прививочная доза в объеме 0,5 мл содержит по 60 мкг обоих белков. Вакцина поставляется в лиофилизированной форме и комплектуется растворителем — водой для инъекций, препарат не содержит адъюванта⁸.

В *таблице 1* представлен краткий сводный обзор проведенных базовых КИ вакцин для профилактики РСВ-инфекции у взрослых. Очевидно, что для обеих вакцин программы клинической разработки были довольно последовательными и стандартными для инновационных иммунобиологических препаратов, хотя имелись и определенные особенности.

Программа клинической разработки моновалентной РСВ-вакцины

Бельгийскими разработчиками вакцины исследование фазы I/II (*табл. 1*) было выполнено в 2 этапа: на первом этапе были включены 48 участников в возрасте от 18 до 40 лет. Они были распределены случайным образом в 4 группы и получали исследуемую вакцину без адъюванта в дозировках 30, 60, 120 мкг соответственно или плацебо. На втором этапе в исследование были включены 1005 участников в возрасте от 60 до 80 лет, которых распределили случайным образом в 10 групп. Они получали вакцину без адъюванта в дозировках 30, 60, 120 мкг соответственно; вакцину с адъювантом AS01E в тех же дозировках; вакцину с адъювантом AS01B в тех же дозировках; или получали плацебо [30].

⁷ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/arexvy-epar-product-information_en.pdf

⁸ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/abrysvo-epar-product-information_en.pdf

Таблица 1. Основные клинические исследования зарегистрированных вакцин для профилактики РСВ-инфекции у взрослых
Table 1. Main clinical trials of approved preventive RSV vaccines

Вакцина <i>Vaccine</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Фаза и дизайн исследования <i>Study phase and design</i>	Идентификатор <i>ClinicalTrials.gov ID</i>	Сроки проведения исследования <i>Study timeframes</i>	Возрастная популяция <i>Age-based population</i>	Основные цели исследования <i>Main objectives</i>
Моновалентная РСВ-вакцина с адьювантом AS01E <i>Monovalent AS01E-adjuvanted RSV-vaccine</i>	GSK (Бельгия) <i>GSK (Belgium)</i>	Фаза I/II Рандомизированное, плацебо- контролируемое, простое слепое исследование [30] <i>Phase I/II Randomised, placebo-controlled, single-blind trial [30]</i>	NCT03814590	Январь – август 2019 г. <i>January – August 2019</i>	18–40 лет (n=48) 60–80 лет (n=1005) <i>18–40 years (n=48) 60–80 years (n=1,005)</i>	Оценка безопасности и иммуногенности <i>Safety and immunogenicity assessment</i>
		Фаза III Двойное слепое исследование 3 серий вакцин [31] <i>Phase III Double-blind trial of 3 vaccine lots [31]</i>	NCT05059301	Октябрь 2021 – июнь 2022 гг. <i>October 2021 – June 2022</i>	≥60 лет (n=708) <i>≥60 years (n=708)</i>	Оценка стабильности 3 серий вакцин в отношении иммуногенности и безопасности <i>Evaluation of lot-to-lot consistency of 3 vaccine lots from immunogenicity and safety standpoints</i>
		Фаза III Двойное слепое плацебо- контролируемое исследование [4] <i>Phase III Double-blind placebo-controlled trial [4]</i>	NCT04886596	Май 2021 – январь 2022 гг. <i>May 2021 – January 2022</i>	≥60 лет (n=24966; 12466 – в группе вакцины, 12494 – в группе плацебо) <i>≥60 years (n=24,966; 12,466 in the vaccine group, 12,494 in the placebo group)</i>	Оценка безопасности и эпидемиологической эффективности в предотвращении эпизодов РСВ-инфекции в течение 1 эпидемиологического сезона <i>Assessment of safety and epidemiological effectiveness in preventing episodes of RSV infection during 1 epidemic season</i>
Бивалентная рекомбинантная РСВ-вакцина <i>Bivalent recombinant RSV- vaccine</i>	Pfizer (США) <i>Pfizer (USA)</i>	Фаза I/II Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование [29] <i>Phase I/II Randomised, double-blind, placebo- controlled trial [29]</i>	NCT03529773	Апрель 2018 – ноябрь 2019 гг. <i>April 2018 – November 2019</i>	18–49 лет (n=618) <i>18–49 years (n=618)</i>	Оценка эффективности и иммуногенности разных дозировок с адьювантом или без адьюванта <i>Evaluation of the efficacy and immunogenicity of different dosages with or without adjuvant</i>
		Фаза IIa Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование [32] <i>Phase IIa Randomised, double-blind, placebo- controlled trial [32]</i>	NCT04785612	Ноябрь 2020 – август 2021 гг. <i>November 2020 – August 2021</i>	18–50 лет (n=70) <i>18–50 years (n=70)</i>	Оценка профилактической эффективности в тесте экспериментального заражения <i>Evaluation of preventive efficacy in an experimental challenge test</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Вакцина <i>Vaccine</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Фаза и дизайн исследования <i>Study phase and design</i>	Идентификатор <i>ClinicalTrials.gov ID</i>	Сроки проведения исследования <i>Study timeframes</i>	Возрастная популяция <i>Age-based population</i>	Основные цели исследования <i>Main objectives</i>
Бивалентная рекомбинантная РСВ-вакцина <i>Bivalent recombinant RSV- vaccine</i>	Pfizer (США) <i>Pfizer (USA)</i>	Фаза III Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование [5] Идентификатор <i>Phase III Randomised, double-blind, placebo- controlled trial [5]</i>	NCT05035212	Сентябрь 2021 г. – по н.в. <i>September 2021 – present</i>	≥60 лет (17215 – в группе вакцины, 17069 – в группе плацебо) <i>≥60 years (17,215 in the vaccine group, 17,069 in the placebo group)</i>	Оценка безопасности и эпидемиологической эффективности в предотвращении эпизодов РСВ-инфекции <i>Evaluation of safety and epidemiological effectiveness in preventing episodes of RSV infection</i>
		Фаза III Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование [33] <i>Phase III Randomised, double-blind, placebo- controlled trial [33]</i>	NCT05301322	Апрель – октябрь 2022 г. <i>April – October 2022</i>	≥65 лет (n=1403) <i>≥65 years (n=1,403)</i>	Оценка безопасности и эквивалентности иммунного ответа на сочетанную вакцинацию инактивированной вакциной против сезонного гриппа и бивалентной вакциной против РСВ-инфекции <i>Assessing the safety and equivalence of the immune response to combined vaccination with an inactivated seasonal influenza vaccine and a bivalent vaccine against RSV infection</i>
		Фаза III Двойное слепое плацебо- контролируемое исследование [34] <i>Phase III Double-blind placebo-controlled trial [34]</i>	NCT04424316	Июнь 2020 – октябрь 2022 г. <i>June 2020 – October 2022</i>	Беременные женщины в возрасте до 49 лет, на сроке гестации 24–36 нед. (3682 – в группе вакцины, 3676 – в группе плацебо) <i>Pregnant women up to 49 years at 24–36 weeks of gestation (3,682 in the vaccine group, 3,676 in the placebo group)</i>	Оценка безопасности вакцинации и профилактической эффективности бивалентной РСВ-вакцины в предотвращении эпизодов РСВ-инфекции у детей, рожденных от привитых матерей <i>Assessing the safety of vaccination and the prophylactic effectiveness of the bivalent RSV vaccine in preventing episodes of RSV infection in children born to vaccinated mothers</i>
		Фаза III Двойное слепое плацебо- контролируемое исследование [35] <i>Phase III Double-blind placebo-controlled trial [35]</i>	NCT05096208	Октябрь 2021 – апрель 2022 гг. <i>October 2021 – April 2022</i>	18–49 лет (n=992) <i>18–49 years (n=992)</i>	Оценка стабильности 3 промышленных серий вакцины в отношении иммуногенности и безопасности <i>Evaluation of lot-to-lot consistency of 3 vaccine lots from immunogenicity and safety standpoints</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Общая продолжительность наблюдения для каждого участника исследования на первом этапе составляла 91 сут, а на втором этапе — 14 мес. с целью оценки сохранения циркулирующих поствакцинальных антител. Нежелательные явления (НЯ) после вакцинации носили в основном умеренный характер и самостоятельно разрешались, хотя частота их была выше в когорте старших возрастных групп, получивших вакцину с адъювантом AS01B. Несмотря на то что к концу периода наблюдения (14 мес.) концентрация специфических поствакцинальных антител снижалась, она сохранялась на достаточно высоком уровне [30]. Вариант вакцины в дозировке 120 мкг с адъювантом AS01E был выбран для дальнейшей клинической разработки в качестве вакцины для однократного введения на основании ее способности формировать иммунный ответ, а также ее клинически приемлемого профиля безопасности.

Следующим важным этапом разработки стало проведение КИ с целью сравнительной оценки профилей иммуногенности и безопасности трех промышленных серий моновалентной вакцины на основе pre-F-белка в дозировке 120 мкг с адъювантом AS01E [31]. Всего в исследование были включены 757 участников в возрасте ≥ 60 лет, разделенных на 3 группы (234, 237 и 237 человек соответственно). По результатам исследования была подтверждена сходимость показателей иммуногенности трех промышленных серий вакцины: зафиксирован 11,84-кратный, 11,29-кратный и 12,46-кратный прирост концентрации антител после однократной вакцинации. Соотношение среднегеометрических значений концентраций поствакцинальных антител между парами серий 1/2, 1/3 и 2/3 составило 1,06 (95% ДИ 0,94–1,21), 0,92 (95% ДИ 0,81–1,04) и 0,87 (95% ДИ 0,77–0,99) соответственно.

Системные НЯ после вакцинации носили в основном легкий характер и самостоятельно разрешались в течение ≤ 2 сут. Наиболее частыми НЯ были миалгия (частота встречаемости в группах — 31,3, 34,3, 33,7%) и утомляемость (28,1, 25,9, 27,8%). В среднем у 73,1% участников исследования были зарегистрированы местные НЯ, связанные с болезненностью в месте введения вакцины, покраснением и отеком [31]. В целом по результатам исследования был сделан вывод о сопоставимости профилей иммуногенности и безопасности трех промышленных серий вакцины для профилактики РСВ-инфекции.

В исследование по оценке профилактической эффективности моновалентной РСВ-вакцины в дозировке 120 мкг с адъювантом

AS01E были включены 24966 участников в возрасте ≥ 60 лет, из которых 12467 получили однократную вакцинацию исследуемым препаратом, а 12499 — однократное введение плацебо (табл. 1). Исследование было запущено до начала эпидемиологического сезона подъема заболеваемости ОРВИ. Целью данного исследования являлась оценка профилактической эффективности РСВ-вакцины в предотвращении развития РСВ-инфекции нижних дыхательных путей с подтверждением методом ПЦР [4]. Средний период наблюдения за привитыми составил 6,7 мес. В исследование были включены лица с сопутствующими заболеваниями, относящимися к факторам риска РСВ-инфекции, включая кардиореспираторные заболевания (20% в группе привитых и 19,4% в группе плацебо), а также имеющие эндокринные или метаболические нарушения (25,7% в группе привитых и 25,9% в группе плацебо).

По результатам исследования профилактическая эффективность моновалентной РСВ-вакцины в отношении ПЦР-подтвержденных эпизодов РСВ-инфекции нижних дыхательных путей составила 82,6% (96,96% ДИ 57,9–94,1). При этом профилактическая эффективность в отношении эпизодов РСВ-инфекции нижних дыхательных путей тяжелой степени составила 94,1% (95% ДИ 62,4–99,9), и 71,7% (95% ДИ 56,2–82,3) в отношении ОРВИ, вызванных РСВ. Профилактическая эффективность вакцинации для предотвращения развития РСВ-инфекции, вызванной обоими типами вируса, была сопоставимой: в отношении РСВ-инфекции нижних дыхательных путей — 84,6 и 80,9% соответственно; в отношении ОРВИ, вызванных РСВ, — 71,9 и 70,6% соответственно [4]. Высокая профилактическая эффективность вакцинации была отмечена во всех возрастных группах (при стратификации участников исследования по возрасту на группы 60–69, 70–79 лет, ≥ 70 и ≥ 80 лет) и у участников с наличием сопутствующих хронических заболеваний. Исследуемый препарат был более реактогенным, чем плацебо. Большинство НЯ после вакцинации были легкой или средней степени выраженности и самостоятельно разрешались. Частота развития серьезных НЯ была сопоставимой в обеих исследуемых группах [4].

Таким образом, было подтверждено, что однократная вакцинация моновалентной РСВ-вакциной с адъювантом AS01E эффективно способствует предотвращению развития ОРВИ и инфекций нижних дыхательных путей, вызванных РСВ, у лиц старше 60 лет при общем удовлетворительном профиле безопасности,

что позволило одобрить данную вакцину к медицинскому применению⁹.

Программа клинической разработки бивалентной РСВ-вакцины

Компанией Pfizer было выполнено исследование фазы I/II в период с апреля 2018 по ноябрь 2019 г. [29]. В исследовании изучали варианты вакцин-кандидатов в дозировках 60, 120 и 240 мкг с адъювантом (гидроксид алюминия) либо без адъюванта. Исследование проводили в 2 этапа. На первом этапе 168 участников «сигнальной» когорты были случайным образом распределены в 3 группы в соотношении 1:3:3 в зависимости от исследуемых дозировок, наличия адъюванта, возрастной группы (18–49 или 50–86 лет) или назначения плацебо. Рандомизация была начата с назначения вакцин-кандидатов в дозировке 60 мкг с последующим переходом на дозировки 120 и 240 мкг спустя 14 сут после сбора данных по безопасности и переносимости и признания их приемлемыми. На втором этапе 1014 участников исследования в возрасте 18–49 и 65–85 лет (расширенная когорта) равномерно распределили случайным образом в 2 группы: получившие либо плацебо, либо один из исследуемых составов вакцины-кандидата (совместно с сезонной инактивированной гриппозной вакциной (СИГВ) или без нее). Участники второго этапа были привиты дважды с интервалом 1 мес.

Лица, которые одновременно получали РСВ-вакцину и СИГВ при введении первой дозы, получали плацебо при введении второй дозы; те, кто получил только РСВ-вакцину или плацебо при введении первой дозы, получали СИГВ при повторной вакцинации через 1 мес. Был продемонстрирован благоприятный профиль безопасности бивалентной вакцины-кандидата для профилактики РСВ-инфекции. Титры нейтрализующих поствакцинальных антител сохранялись выше исходных в течение 12 мес. после введения первой дозы. Среднегеометрические приросты титров антител спустя 1 мес. после вакцинации составляли 10,6–16,9 против РСВ типа А и 10,3–19,8 против РСВ типа В. Наивысшие титры антител были достигнуты при введении бивалентной вакцины в дозировке 240 мкг, при этом наличие адъюванта гидроксида алюминия не способствовало усилению иммунного ответа на вакцинацию. Завершение данного исследования позволило перейти к дальнейшим стадиям разработки бивалентной РСВ-вакцины.

Следующим этапом клинической разработки бивалентной РСВ-вакцины стало исследование фазы III по иммунизации беременных женщин с целью оценки безопасности РСВ-вакцины и эффективности в профилактике РСВ-инфекции у новорожденных и младенцев, родившихся от привитых матерей [34]. В исследование были включены 7358 беременных женщин до 49 лет на сроке гестации от 24 по 36 нед. включительно: 3682 женщины получили однократную вакцинацию исследуемым препаратом, 3676 – однократное введение плацебо.

Эффективность вакцинации в профилактике РСВ-инфекции у младенцев, рожденных от привитых матерей, в течение 90 сут с момента рождения составила 81,8% (95% ДИ 40,6–96,3). Всего было зарегистрировано 6 эпизодов у младенцев, рожденных привитыми матерями, и 33 эпизода у младенцев, рожденных матерями, получившими плацебо. Эффективность вакцинации на 180 день снизилась и составила 69,4% (97,58% ДИ 44,3–84,1), при этом было зарегистрировано 24 эпизода РСВ-инфекции у младенцев, рожденных привитыми матерями, и 56 эпизодов у младенцев, рожденных матерями, получившими плацебо. Не было отмечено сигналов безопасности при двухлетнем мониторинге как привитых матерей, так и рожденных ими детей. Частота НЯ, зарегистрированных у матери (в течение 1 мес. после вакцинации) или у младенца (в течение 1 мес. после рождения) была одинаковой в группе привитых (13,8% женщин и 37,1% младенцев) и группе плацебо (13,1% женщин и 34,5% младенцев) [34].

В сентябре 2021 г. до начала эпидемического сезона по ОРВИ и РСВ-инфекции было начато базовое исследование фазы III (табл. 1) по оценке безопасности и эпидемиологической эффективности в предотвращении эпизодов РСВ-инфекции у лиц старше 60 лет [5]. Всего в исследование были включены 34284 участника (17215 в группе вакцинированных и 17069 в группе плацебо), получивших однократную вакцинацию исследуемой вакциной или плацебо. Примерно половина (51,6%) участников имели по крайней мере один из факторов риска при включении в исследование: табакокурение – 15,2%, сахарный диабет – 19%, хронические заболевания легких – 11,7%, бронхиальная астма – 8,9%, ХОБЛ – 6,1%, хроническая сердечная недостаточность – 1,8%.

По результатам промежуточного анализа данных эпизоды ПЦР-подтвержденной РСВ-инфекции нижних дыхательных путей были

⁹ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/arexvy-epar-product-information_en.pdf

зарегистрированы у 11 привитых и 33 участников, получивших плацебо. Расчетная эффективность вакцинации составила 66,7% (96,66% ДИ 28,8–85,8). Эпизоды РСВ-инфекции тяжелой степени с тремя и более симптомами были зарегистрированы у 2 участников (группа привитых) и 14 участников (группа плацебо); расчетная эффективность вакцинации составила 85,7% (96,66% ДИ 32,0–98,7). Частота местных НЯ была выше в группе привитых (12%), чем при в группе плацебо (7%); частота системных НЯ была одинаковой в обеих исследуемых группах (26–27%). Частота зарегистрированных НЯ в течение 1 мес. после инъекции в обеих группах была сопоставимой (привитые – 9,0%; плацебо – 8,5%), при этом 1,4 и 1,0% НЯ соответственно были расценены исследователями как связанные с инъекцией. Тяжелые и жизнеугрожающие НЯ были зарегистрированы у 0,5% привитых и 0,4% участников, получивших плацебо. Серьезные НЯ были зарегистрированы у 2,3% участников в каждой группе до даты окончания сбора данных [5]. Полученные результаты КИ позволили одобрить данную вакцину к медицинскому применению для вакцинации лиц старше 60 лет, а также беременных женщин в 3 триместре для защиты новорожденных от РСВ-инфекции¹⁰.

Также для оценки совместимости применения бивалентной РСВ-вакцины с вакциной против сезонного гриппа было выполнено рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы III с включением лиц старше 65 лет. В исследовании необходимо было продемонстрировать не меньшую эффективность иммунных ответов при одновременном введении РСВ-вакцины и СИГВ. Безопасность и переносимость вакцин оценивали путем сбора данных о реактогенности и НЯ.

Всего 1399 участников (средний возраст 70 лет) были распределены в 2 группы и привиты одновременно РСВ-вакциной и СИГВ с последующей ревакцинацией плацебо через 1 мес. либо одновременно были привиты плацебо и СИГВ с последующей ревакцинацией РСВ-вакциной через 1 мес. [33]. Местные и системные НЯ носили преимущественно легкую или умеренную степень выраженности при одновременном применении РСВ-вакцины и СИГВ или по отдельности. Никаких серьезных НЯ, связанных с вакцинацией, зарегистрировано не было.

Среднее геометрическое соотношение составляло 0,86 для РСВ типа А и 0,85 для титров нейтрализации РСВ типа В через 1 мес. после введения РСВ-вакцины и от 0,77 до 0,90

для титров штамм-специфического ингибирования гемагглютинации через 1 мес. после введения СИГВ. Был достигнут заранее заданный предел не меньшей эффективности в обеих исследуемых группах [33]. Данное исследование подтвердило возможность одновременной иммунизации лиц старшего возраста бивалентной РСВ-вакциной и вакциной против сезонного гриппа.

Следует также отметить, что компанией Pfizer было выполнено исследование трех промышленных серий бивалентной РСВ-вакцины для подтверждения их стабильности и сопоставления показателей иммуногенности и безопасности. Для этих целей в исследование были включены 992 участника в возрасте от 18 до 49 лет, которые были распределены в 4 разные группы в равном соотношении, получившие вакцинацию одной из 3 промышленных серий РСВ-вакцины либо плацебо [35]. После вакцинации участников исследования тремя промышленными сериями вакцины было отмечено существенное увеличение среднегеометрических титров нейтрализующих антител к РСВ типов А и В, что соответствовало ≥ 14 -кратному увеличению титров антител по сравнению с исходными. Однократная вакцинация бивалентной РСВ-вакциной была признана безопасной и хорошо переносилась. Профиль безопасности трех серий был признан благоприятным, а частота развития НЯ была сопоставимой между тремя группами привитых [35].

Отдельно следует отметить необычный дизайн исследования фазы IIa с тестом экспериментального заражения привитых (табл. 1) [32]. Всего в данное исследование были включены 70 здоровых участников в возрасте от 18 до 50 лет, распределенных случайным образом в две равные группы и получивших бивалентную РСВ-вакцину или плацебо. Через 28 сут после вакцинации участникам исследования интраназально вводили штамм РСВ *Memphis 37b* и оставляли под наблюдением в течение 12 сут. Развитие РСВ-инфекции подтверждали по клиническим симптомам (появление в течение по крайней мере 2 сут подряд одного клинического симптома любой степени тяжести или хотя бы одного симптома средней степени тяжести) и при помощи ПЦР. Также проводили общую оценку симптомов за весь период наблюдения и величину вирусной нагрузки в смывах из носа со 2 сут после заражения.

Эффективность вакцинации составила 86,7% (95% ДИ 53,8–96,5) согласно принятым

¹⁰ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/abrysvo-epar-product-information_en.pdf

критериям оценки. Средняя вирусная нагрузка РСВ (4×lg копий на мл) по данным ПЦР в реальном времени составила 0,0 (межквартильный интервал 0,0–19,0) в группе привитых и 96,7 (межквартильный интервал 0,0–675,3) в группе плацебо [32]. Таким образом, в исследовании с тестом экспериментального заражения было продемонстрировано, что вакцинация бивалентной РСВ-вакциной эффективно предотвращала развитие РСВ-инфекции и выделение вируса.

Перспективные разработки вакцин против РСВ-инфекции

В Российской Федерации в настоящее время проводятся КИ вакцины-кандидата для профилактики РСВ-инфекции, разработанной сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России [36]. При этом уже была завершена фаза I исследования первичной оценки безопасности и иммуногенности в возрастных группах от 18 до 59 лет и старше 60 лет¹¹. С ноября 2023 г. проводится КИ фазы II по оценке безопасности и иммуногенности РСВ-вакцины у лиц старше 60 лет¹². Исследователями было разработано несколько векторных конструкций FLU/RSV на основе вируса гриппа, ослабленного за счет модификации белка NS1 путем замены иммуносупрессивного С-концевого домена белка последовательностями, кодирующими консервативные антигенные сайты II и IV F-белка РСВ [36]. Было показано, что векторы хорошо реплицируются и генетически стабильны при многократных пассажах в куриных эмбрионах. Все полученные штаммы безопасны при интраназальном введении лабораторным мышам. Также на мышинной модели продемонстрирована защита от РСВ-инфекции: у вакцинированных животных зафиксировано значительное снижение вирусной нагрузки, а также меньшая степень макроскопических и гистологических поражений в легких. Анализ полученных результатов показывает, что векторы FLU/RSV являются перспективными вакцинами кандидатами [36].

Также имеются сообщения о начале разработки РСВ-вакцины на основе технологии мРНК¹³. В июле 2023 г. компания Moderna раскрыла результаты КИ фазы III по оценке эффективности и безопасности вакцины-кандидата mRNA-1345,

продемонстрировавшей 83,7% эффективность (95,88% ДИ 66,0–92,2) в предотвращении развития РСВ-инфекции нижних дыхательных путей у лиц старшего возраста [37]. Всего в исследование был включен 35541 участник, из которых 17793 прошли однократную вакцинацию исследуемым препаратом и 17748 получили плацебо. Вакцина-кандидат была эффективна в отношении субтипов А и В РСВ.

Профиль безопасности вакцины был признан благоприятным, хотя среди вакцинированных была зарегистрирована более высокая частота ожидаемых местных НЯ (58,7% у привитых по сравнению с 16,2% в группе плацебо) и системных НЯ (47,7% у привитых по сравнению с 32,9% в группе плацебо); большинство НЯ были легкой или умеренной степени тяжести и самостоятельно разрешались. Серьезные НЯ были зарегистрированы у 2,8% участников в каждой из исследуемых групп [37].

Также имеется информация еще об одной перспективной разработке – вакцине для иммунизации детей, представляющей собой живой аттенуированный РСВ, полученный методом обратной генетики, с делецией NS2 гена (антагонист интерферона) и 1313 кодона в гене, кодирующем вирусную полимеразу, а также заменой изолейцина в 1314 кодоне для получения стабилизирующей миссенс-мутации. Данный препарат предназначен для интраназального введения. Были проведены КИ фазы I у детей для оценки безопасности и иммуногенности однократной вакцинации [38]. В исследование были включены РСВ-серопозитивные дети 12–59 мес. жизни и РСВ-серонегативные дети 6–24 и 4–6 мес. жизни. Исследование было выполнено по плацебо-контролируемому двойному слепому дизайну с распределением групп с вакцинацией и введением плацебо в соотношении 2:1. Были изучены 2 варианта вакцины: препарат, содержащий 10⁶ бляшкообразующих единиц (БОЕ) для иммунизации серопозитивных и серонегативных детей, и препарат, содержащий 10⁵ БОЕ, для иммунизации серонегативных детей. Было показано, что препарат с содержанием 10⁵ БОЕ у серонегативных детей проявлял себя как гиператтенуированная вакцина и не приводил к значимым эффектам после вакцинации. Однако доза 10⁶ БОЕ хорошо переносилась, репликация

¹¹ Государственный реестр лекарственных средств. PKI №376 (30.12.2022). <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=7d9a194c-95a1-401e-a456-4697c34ea592&CIPermGUID=613eec32-e703-4b5e-be73-22f898aa4ec3>

¹² Государственный реестр лекарственных средств. PKI №694 (30.11.2023). <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=c439c334-4dca-4675-852d-bfe67dc0b373&CIPermGUID=1cca2e6c-3a6a-43c1-b384-a3c59f8f764f>

¹³ Moderna Announces Global Regulatory Submissions For Its Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine, mRNA-1345. <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2023/Moderna-Announces-Global-Regulatory-Submissions-For-Its-Respiratory-Syncytial-Virus-RSV-Vaccine-MRNA-1345/default.aspx>

вакцинного штамма была выявлена у 90% привитых детей, а также была продемонстрирована иммуногенность вакцины (среднегеометрический титр сывороточных антител, нейтрализующих бляшки РСВ, составлял 1:64).

После завершения эпидемиологического сезона РСВ у 9 из 20 вакцинированных детей наблюдалось повышение титра антител к РСВ, которое было значительно выше, чем у 8 из 10 детей в группе плацебо (1:955 против 1:69 соответственно) [38]. Это указывает на то, что первичная вакцинация привела к формированию иммунологической памяти. В настоящее время исследования данной вакцины продолжаются с целью оценки совместного введения с другими педиатрическими вакцинами¹⁴: планируется изучить как одновременное применение интраназального препарата детям в возрасте 6 и 12 мес., так и введение препарата детям в возрасте 7 и 13 мес. отдельно от других педиатрических вакцин. Данная разработка отличается в первую очередь тем, что предназначена для иммунизации младенцев, в то время как рассмотренные в настоящем обзоре вакцины предназначены в первую очередь для вакцинации взрослых, в том числе старших возрастов.

Рекомендации по вакцинации против РСВ-инфекции

Основываясь на данных о безопасности и эффективности, а также текущих данных о бремени заболеваний, Консультативный комитет по практике иммунизации США (Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP) Центра по контролю и профилактике заболеваний США (Disease Control and Prevention, CDC) рекомендовал однократную вакцинацию взрослых в возрасте ≥ 60 лет против РСВ-инфекции одной из двух зарегистрированных вакцин на основании клинических данных, наличия факторов риска, состояния здоровья и выбора пациента [6].

Бивалентная вакцина, представленная Pfizer, рекомендована для вакцинации как лиц старшего возраста, так и беременных женщин на 24–36 нед. гестации для профилактики РСВ-инфекции у новорожденных. Моновалентная вакцина GSK предназначена только для вакцинации взрослых в возрасте ≥ 60 лет. Обе вакцины продемонстрировали сопоставимую эффективность у взрослых в возрасте ≥ 75 лет, а также у пациентов с сопутствующими заболеваниями.

Тем не менее существуют опасения по поводу развития некоторых НЯ, таких как синдром Гийена — Барре и фибрилляция предсердий, наблюдаемых после вакцинации в испытаниях обеих вакцин. Однако собранных в настоящее время сведений недостаточно для достоверного подтверждения причинно-следственной связи [6]. В Великобритании Объединенный комитет по вакцинации и иммунизации (The Joint Committee on Vaccination and Immunisation, JCVI) рекомендовал однократную вакцинацию против РСВ-инфекции всем взрослым в возрасте ≥ 75 лет¹⁵.

В настоящее время в некоторых странах мира (преимущественно США, страны Европейского союза, Япония) рекомендованы к применению два препарата на основе рекомбинантного стабилизированного pre-F-белка РСВ, однако в ближайшей перспективе, очевидно, будет также одобрена мРНК-вакцина. Обе вакцины продемонстрировали сопоставимые профили безопасности и профилактической эффективности, установленные в ходе ограниченных по масштабу контролируемых КИ. Но, несмотря на различную валентность вакцин (моновалентная бельгийская, бивалентная американская), значимых различий показателей профилактической эффективности по результатам проведенных исследований продемонстрировано не было, что может быть связано с наличием антигенных детерминант pre-F-белка РСВ, общего для разных субтипов.

Вопреки ощущению видимых различий в показателях эффективности в предотвращении поражений нижних дыхательных путей или ОРВИ, вызванных РСВ, с учетом представленных данных и в отсутствие надлежащей статистической обработки (например, по типу метаанализа) невозможно сделать вывод о превосходстве одного препарата над другим. Поэтому прямого сравнения показателей эффективности и безопасности обеих вакцин между собой следует избегать. Национальные рекомендации по вакцинации должны формироваться исходя из утвержденных показаний к применению, сформулированных по результатам завершенных программ КИ.

КИ новых РСВ-вакцин, которые будут разрабатываться, в том числе в нашей стране, обязательно должны включать в себя оценку профилактической (эпидемиологической) эффективности

¹⁴ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06397768>

¹⁵ Respiratory syncytial virus (RSV) immunisation programme for infants and older adults: JCVI full statement, 11 September 2023. Department of Health and Social Care (UK); 2023. <https://www.gov.uk/government/publications/rsv-immunisation-programme-jcvi-advice-7-june-2023/respiratory-syncytial-virus-rsv-immunisation-programme-for-infants-and-older-adults-jcvi-full-statement-11-september-2023>

вакцинации, рассчитанной исходя из разницы уровня заболеваемости в исследуемых группах и у целевых пациентов (как правило, речь идет о лицах старше 60 лет с наличием хронических заболеваний, повышающих риск тяжелого течения РСВ-инфекции и госпитализации по ее поводу).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что вакцины против респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (РСВ-инфекции) появились совсем недавно, перспективы их применения являются однозначными. С учетом распространенности поражений нижних дыхательных путей, вызываемых РСВ как у детей, так и у лиц старшего возраста, особенно при наличии факторов риска, препараты для специфической активной иммунопрофилактики РСВ-инфекции станут востребованными повсеместно.

При планировании и проведении КИ вакцин, одобренных в странах происхождения, для целей регистрации в Российской Федерации масштабных исследований эпидемиологической эффективности не потребуется и следует ограничиться проведением связующего исследования для подтверждения иммуногенности и безопасности вакцин в целевых группах пациентов.

При реализации программы КИ новых вакцин для профилактики РСВ-инфекции потребуется проведение оценки совместного введения

с другими вакцинами (в первую очередь вакцин против сезонного гриппа и, скорее всего, пневмококковой инфекции), предназначенными для лиц соответствующего возраста и при наличии соответствующих факторов риска для подтверждения формирования адекватного иммунного ответа на оба вводимых препарата и отсутствие повышения частоты развития ожидаемых типичных НЯ на введение инактивированных вакцин.

В программах клинической разработки обеих рассмотренных в настоящем обзоре вакцин присутствовал этап КИ, предусматривавший оценку сопоставимости иммуногенности и безопасности между тремя промышленными сериями препаратов для целей подтверждения стабильности производства иммунобиологических препаратов. Такая практика является общепринятой при разработке различных вакцин в странах, следующих рекомендациям Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH). Ее следует принимать во внимание и рекомендовать к внедрению такой подход при клинической оценке разрабатываемых и производимых в нашей стране инновационных иммунобиологических препаратов, предназначенных для профилактики инфекционных болезней у детей и взрослых.

Литература/References

1. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1749–59. <https://doi.org/10.1056/nejmoa043951>
2. The Impact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*. 1998;102(3):531–7. PMID: 9738173
3. Reicherz F, Abu-Raya B, Akinseye O, Rassekh SR, Wiens MO, Lavoie PM. Efficacy of palivizumab immunoprophylaxis for reducing severe RSV outcomes in children with immunodeficiencies: a systematic review. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2024;13(2):136–43. <https://doi.org/10.1093/jpids/piae004>
4. Papi A, Ison MG, Langley JM, Lee DG, Leroux-Roels I, Martinon-Torres F, et al. Respiratory syncytial virus prefusion F protein vaccine in older adults. *N Engl J Med*. 2023;388(7):595–608. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2209604>
5. Walsh EE, Pérez Marc G, Zareba AM, Falsey AR, Jiang Q, Patton M, et al. Efficacy and safety of a bivalent RSV prefusion F vaccine in older adults. *N Engl J Med*. 2023;388(16):1465–77. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2213836>
6. Melgar M, Britton A, Roper LE, Talbot HK, Long SS, Kotton CN, Havers FP. Use of respiratory syncytial virus vaccines in older adults: recommendations of the advisory committee on immunization practices – United States, 2023. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2023;72(29):793–801. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7229a4>
7. Acosta P, Caballero MT, Polack FP. Brief history and characterization of enhanced respiratory syncytial virus disease. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(3):189–95. <https://doi.org/10.1128/cvi.00609-15>
8. Altamirano-Lagos MJ, Díaz FE, Mansilla MA, Rivera-Pérez D, Soto D, McGill JL, et al. Current animal models for understanding the pathology caused by the respiratory syncytial virus. *Front Microbiol*. 2019;10:873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00873>
9. Walsh EE, Hall CB. Respiratory Syncytial Virus (RSV). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2015:1948–1960.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00160-0>
10. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001;7(6):719–24. <https://doi.org/10.1038/89098>
11. Collins PL, Fearn R, Graham BS. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;372:3–38. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38919-1_1
12. Tawar RG, Duquerroy S, Vonnrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagne N, et al. Crystal structure of a nucle-

- ocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science*. 2009;326(5957):1279–83.
<https://doi.org/10.1126/science.1177634>
13. Yu JM, Fu YH, Peng XL, Zheng YP, He JS. Genetic diversity and molecular evolution of human respiratory syncytial virus A and B. *Sci Rep*. 2021;11(1):12941.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92435-1>
 14. Tan L, Lemey P, Houspie L, Viveen MC, Jansen NJ, van Loon AM, et al. Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology. *PLoS One*. 2012;7(12):e51439.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051439>
 15. Vos LM, Oosterheert JJ, Kuil SD, Viveen M, Bont LJ, Hoepelman AIM, Coenjaerts FEJ. High epidemic burden of RSV disease coinciding with genetic alterations causing amino acid substitutions in the RSV G-protein during the 2016/2017 season in The Netherlands. *J Clin Virol*. 2019;112:20–26.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.01.007>
 16. König P, Giesow K, Schuldt K, Buchholz UJ, Keil GM. A novel protein expression strategy using recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV): modifications of the peptide sequence between the two furin cleavage sites of the BRSV fusion protein yield secreted proteins, but affect processing and function of the BRSV fusion protein. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 7):1815–24.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.80010-0>
 17. Yusuf S, Piedimonte G, Auais A, Demmler G, Krishnan S, Van Caesele P, et al. The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Epidemiol Infect*. 2007;135(7):1077–90.
<https://doi.org/10.1017/S095026880600776X>
 18. Hansen CL, Chaves SS, Demont C, Viboud C. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the US, 1999–2018. *JAMA Netw Open*. 2022;5(2):e220527.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.0527>
 19. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation. *Chest*. 2008;134(6):1141–8.
<https://doi.org/10.1378/chest.08-0888>
 20. Львов ДК, Бурцева ЕИ, Колобухина ЛВ, Федякина ИТ, Бовин НВ, Игнатьева АВ и др. Особенности циркуляции вирусов гриппа и ОРВИ в эпидемическом сезоне 2019–2020 гг. в отдельных регионах России. *Вопросы вирусологии*. 2020;65(6):335–49.
L'vov DK, Burtseva EI, Kolobukhina LV, Fedyakina IT, Bavin NV, et al. Peculiarities of the influenza and ARVI viruses during epidemic season 2019–2020 in some regions of Russia. *Problems of Virology*. 2020;65(6):335–49 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-4>
 21. Kim HW, Ganchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrotte RH. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969;89(4):422–34.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120955>
 22. Johnson PR, Collins PL. The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. *J Gen Virol*. 1988;69(Pt 10):2623–8.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-10-2623>
 23. Calder LJ, González-Reyes L, García-Barreno B, Wharton SA, Skehel JJ, Wiley DC, Melero JA. Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology*. 2000;271(1):122–31.
<https://doi.org/10.1006/viro.2000.0279>
 24. Smith BJ, Lawrence MC, Colman PM. Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. *Protein Eng*. 2002;15(5):365–71.
<https://doi.org/10.1093/protein/15.5.365>
 25. McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*. 2013;340(6136):1113–7.
<https://doi.org/10.1126/science.1234914>
 26. McLellan JS, Chen M, Joyce MG, Sastry M, Stewart-Jones GB, Yang Y, et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science*. 2013;342(6158):592–8.
<https://doi.org/10.1126/science.1243283>
 27. Crank MC, Ruckwardt TJ, Chen M, Morabito KM, Phung E, Costner PJ, et al. A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans. *Science*. 2019;365(6452):505–9.
<https://doi.org/10.1126/science.aav9033>
 28. Stephens LM, Varga SM. Considerations for a respiratory syncytial virus vaccine targeting an elderly population. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(6):624.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9060624>
 29. Walsh EE, Falsey AR, Scott DA, Gurtman A, Zareba AM, Jansen KU, et al. A randomized phase 1/2 study of a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine. *J Infect Dis*. 2022;225(8):1357–66.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiab612>
 30. Leroux-Roels I, Davis MG, Steenackers K, Essink B, Vandermeulen C, Fogarty C, et al. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus prefusion F (RSVpreF3) candidate vaccine in older adults: phase 1/2 randomized clinical trial. *J Infect Dis*. 2023;227(6):761–72.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiac327>
 31. Ferguson M, Murray A, Pliamm L, Rombo L, Sanmartin Berglund J, David MP, et al. Lot-to-lot immunogenicity consistency of the respiratory syncytial virus prefusion F protein vaccine in older adults. *Vaccine X*. 2024;18:100494.
<https://doi.org/10.1016/j.jvax.2024.100494>
 32. Schmoele-Thoma B, Zareba AM, Jiang Q, Maddur MS, Danaf R, Mann A, et al. Vaccine efficacy in adults in a respiratory syncytial virus challenge study. *N Engl J Med*. 2022;386(25):2377–86.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa2116154>
 33. Athan E, Baber J, Quan K, Scott RJ, Jaques A, Jiang Q, et al. Safety and immunogenicity of bivalent RSVpreF vaccine coadministered with seasonal inactivated influenza vaccine in older adults. *Clin Infect Dis*. 2024;78(5):1360–8.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciad707>
 34. Kampmann B, Madhi SA, Munjal I, Simões EAF, Pahud BA, Llapur C, et al. Bivalent prefusion F vaccine in pregnancy to prevent RSV illness in infants. *N Engl J Med*. 2023;388(16):1451–64.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa2216480>
 35. Baker J, Aliabadi N, Munjal I, Jiang Q, Feng Y, Brock LG, et al. Equivalent immunogenicity across three RSVpreF vaccine lots in healthy adults 18–49 years of age: Results of a randomized phase 3 study. *Vaccine*. 2024;42(13):3172–9.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.03.070>
 36. Васин АВ, Егоров АЮ, Сергеева МВ, Стукова МА. Рекомбинантные векторные конструкции на основе аттенуированного вируса гриппа для разработки вакцин против респираторных инфекций. В кн.: *III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. Т. 2.* Москва: Перо; 2021. С. 229–30.
Vasin AV, Egorov AY, Sergeeva MV, Stukova MA. Recombinant vector constructs based on attenuated influenza virus for the development of vaccines against respiratory infections. In: *III Joint Scientific Forum of Physiologists,*

- Biochemists and Molecular Biologists. VII Congress of Russian Biochemists. X Russian Symposium "Proteins and Peptides". VII Congress of CIS Physiologists. Vol. 2. Moscow: Pero; 2021. P. 229–30 (In Russ.).*
EDN: [SXYWDM](#)
37. Wilson E, Goswami J, Baqui AH, Doreski PA, Perez-Marc G, Zaman K, et al. Efficacy and safety of an mRNA-based RSV PreF vaccine in older adults. *N Engl J Med.* 2023;389(24):2233–44.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa2307079>
38. Karron RA, Luongo C, Mateo JS, Wanionek K, Collins PL, Buchholz UJ. Safety and immunogenicity of the respiratory syncytial virus vaccine RSV/ΔNS2/Δ1313/11314L in RSV-seronegative children. *J Infect Dis.* 2020;222(1):82–91.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz408>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Коровкин** — концепция работы, написание текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; **Д.В. Горенков** — обработка и анализ данных литературы, критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; **А.Р. Волгин** — критическое обсуждение текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.S. Korovkin** conceptualised the study, drafted the manuscript, and approved the final version for publication. **D.V. Gorenkov** reviewed and analysed literature data, participated in the critical discussion and editing of the manuscript. **A.R. Volgin** participated in the critical discussion of the manuscript.

Об авторах / Authors

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук / **Alexey S. Korovkin**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3241-1053>

Горенков Дмитрий Витальевич / **Dmitry V. Gorenkov**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Волгин Андрей Рудольфович, канд. мед. наук / **Andrey R. Volgin**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8097-2680>

Поступила 24.05.2024

После доработки 19.08.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Received 24 May 2024

Revised 19 August 2024

Accepted 12 September 2024



Идентификация и генотипирование вируса Чикунгунья с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Н.А. Нетесова¹, М.А. Абдурашитов², Т.Г. Самарцева³, О.В. Климович⁴,
А.С. Оксанич⁵, Е.В. Отрашевская³, Г.М. Игнатьев^{3,5}✉

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, АБК, к. 12а, Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью «СибЭнзайм», ул. Академика Тимакова, д. 2/12, г. Новосибирск, 630117, Российская Федерация

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

⁴ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ул. Филимонова, д. 2, г. Минск, 220114, Республика Беларусь

⁵ 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

✉ Игнатьев Георгий Михайлович; marburgman@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Генотипирование вируса Чикунгунья (ЧИКВ) проводится с помощью секвенирования участков генов белков E1, E2, nsP1 или всего генома вируса. Имеющиеся наборы реагентов или протокол проведения ПЦР не позволяют генотипировать ЧИКВ, а для секвенирования нуклеиновых кислот требуются дорогостоящее оборудование и материалы, что не всегда доступно. В связи с этим перспективным представляется применение более простого и экономичного метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), который не использовался ранее для определения генотипов ЧИКВ.

ЦЕЛЬ. Изучение возможности применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для идентификации и генотипирования вируса Чикунгунья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В экспериментальном исследовании использовали РНК штаммов ЧИКВ четырех генотипов: Азиатский (Asian), Западно-Африканский (WAg), Восточно-Центральный Южно-Африканский (ECSA) и Восточно-Центральный Южно-Африканский — линия Индийского океана (ECSA-IOL). Проводили полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с последующей рестрикцией и анализом длин рестрикционных фрагментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Установлено, что фрагмент гена nsP2 длиной 648 п.н. между позициями 3806 и 4453 содержит сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции PspEI, PvuII и DraI, наличие или отсутствие которых составляют различные комбинации и специфичны для каждого

из четырех генотипов ЧИКВ. Сконструированы праймеры, позволяющие амплифицировать выбранный участок гена, проведены ОТ-ПЦР и анализ ПДРФ.

ВЫВОДЫ. Для быстрого подтверждения подлинности вируса Чикунгунья и его генотипирования может быть успешно использован метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, который позволяет провести анализ в течение нескольких часов и в отсутствие высокотехнологичного оборудования.

Ключевые слова: вирус Чикунгунья; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; генотипирование

Для цитирования: Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Самарцева Т.Г., Климович О.В., Оксанич А.С., Отрашевская Е.В., Игнатьев Г.М. Идентификация и генотипирование вируса Чикунгунья с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):270–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-559>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 22-14-00184.

Потенциальный конфликт интересов. Г.М. Игнатьев — заместитель главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2024 г.). Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Identification and genotyping of Chikungunya virus using reverse transcription polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods

Nina A. Netesova¹, Murat A. Abdurashitov², Tatiana G. Samartseva³,
Olga V. Klimovich⁴, Alexey S. Oksanich³, Elena V. Otrashevskaya³,
George M. Ignatyev^{3,5} ✉

¹ State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", 12/A ABK, Koltsovo, Novosibirsk Region 630559, Russian Federation

² SibEnzyme Ltd, 2/12 Academician Timakov St., Novosibirsk 630117, Russian Federation

³ I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

⁴ Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, 23 Filimonov St., Minsk 220114, Republic of Belarus

⁵ 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

✉ George M. Ignatyev; marburgman@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Chikungunya virus (CHIKV) genotyping involves sequencing fractions of genes encoding E1, E2, and nsP1 proteins or the entire genome of the virus. Available reagent kits or polymerase chain reaction protocols cannot be used for CHIKV genotyping, and nucleic acid sequencing requires expensive equipment and materials, which are not always available. Therefore, it seems promising to use a simpler and more cost-effective restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, which has not previously been used for CHIKV genotyping.

AIM. This study aimed to investigate the possibility of using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and RFLP for CHIKV identification and genotyping.

MATERIALS AND METHODS. The experimental study used RNA from CHIKV strains of four genotypes, including the Asian, West African (WAF), and East/Central/South African (ECSA) genotypes, and the Indian Ocean Lineage of the ECSA genotype (ECSA-IOL). The study used RT-PCR followed by DNA restriction and restriction fragment length analysis.

RESULTS. The nsP2 gene fragment of 648 bp in length (positions 3806 to 4453) contains recognition sites for the restriction endonucleases PspEI, PvuII, and DraI. The presence or absence of these sites generates a different combination specific to each of the four CHIKV genotypes. The authors designed primers for amplification of the selected gene region and performed RT-PCR and RFLP.

CONCLUSIONS. The RFLP method can be used for rapid CHIKV identification and genotyping. The method provides results within a few hours and does not require high-tech equipment.

Keywords: Chikungunya virus; reverse transcription polymerase chain reaction; restriction fragment length polymorphism; genotyping

For citation: Netesova N.A., Abdurashitov M.A., Samartseva T.G., Klimovich O.V., Oksanich A.S., Otrasevskaya E.V., Ignatyev G.M. Identification and genotyping of Chikungunya virus using reverse transcription polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):270–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-559>

Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation under grant No. 22-14-00184.

Disclosure. G.M. Ignatyev has been a Deputy Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус Чикунгунья (ЧИКВ), переносчиком которого являются комары рода *Aedes*, распространенные в странах с тропическим и субтропическим климатом, вызывает одноименное заболевание — лихорадку Чикунгунья, характеризующуюся острой лихорадочной реакцией, сыпью, миалгией и артралгией с риском возможной хронизации [1, 2].

ЧИКВ относят к роду *Alphavirus*, семейству *Togaviridae*. Выделяют четыре генотипа вируса: Азиатский (Asian), Западно-Африканский (West African, WAF), Восточно-Центральный Южно-Африканский (East-Central-South African, ECSA) и Восточно-Центральный Южно-Африканский — линия Индийского океана (East-Central-South African — Indian Ocean Lineage, ECSA-IOL). Однако указанные генотипы не имеют четкой территориальной локализации, то есть на одной территории могут одновременно выявляться разные генотипы ЧИКВ [2–6]. Для детекции вируса в комарах или при лабораторном подтверждении клинического диагноза используют протокол, предложенный Центром по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), с использованием праймеров к различным участкам генов структурных белков E1, E2 и неструктурного белка nsP1 (non-structural protein 1) или коммерческих наборов реагентов для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени [2–10].

Генотипирование ЧИКВ проводится с помощью секвенирования участков генов, кодирующих белки E1, E2, реге nsP1, или секвенирования всего генома вируса [1–3, 6, 8, 9, 11, 12].

При эпидемиологическом исследовании важно определение генотипа штамма вируса для выявления места источника инфицирования. Имеющиеся наборы реагентов или протокол проведения ПЦР не позволяют генотипировать вирус, а для секвенирования нуклеиновых кислот требуются дорогостоящее оборудование и материалы, что не всегда доступно.

Ранее для парамиксовирусов (вирусы эпидемического паротита и кори) и вируса краснухи было показано применение метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) для генотипирования, вплоть до быстрого определения конкретного штамма вируса [13–15].

В связи с этим вероятно предположить, что метод ПДРФ может быть применен и для генотипирования вируса ЧИКВ, что проводится впервые.

Цель работы — изучение возможности применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для идентификации и генотипирования вируса Чикунгунья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования использовали РНК вирусов, относящихся к роду *Alphavirus* (ЧИКВ — по 3 штамма каждого из четырех

генотипов, которые были предварительно определены секвенированием: Asian, ECSA, ECSA-IOL, WAF; вирус венозного энцефаломиелита лошадей – 2 штамма; вирус Синдбис – 2 штамма) и семейству *Flaviviridae* (вирусы желтой лихорадки штамм 17D, денге 1–4 типов, японского энцефалита, Западного Нила, клещевого энцефалита – каждого по одному штамму).

Все работы проводили с соблюдением действующих санитарных норм. Штаммы, которые были использованы для получения РНК, находятся в коллекциях филиала ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России в Республике Никарагуа, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Выделение РНК из образцов проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиСенс® Магно-Сорб» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Экстракцию РНК выполняли в 50 мкл элюирующего раствора и хранили образцы при минус 70 °С до дальнейшего использования.

Получение кДНК из препаратов РНК. Реакционная смесь при проведении ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в объеме 60 мкл имела следующий состав: 10-кратный SE буфер M-MuLV – 6 мкл, смесь дНТФ (40 мМ) – 0,6 мкл, M-MuLV ревертаза (50 ед/мкл) – 1,4 мкл, специфический обратный праймер (24 пкмоль) – 8 мкл, РНК образца – 16 мкл, H₂O – 28 мкл (все использованные реактивы производства ООО «СибЭнзайм», Россия). Реакцию осуществляли в течение 30 мин при 42 °С.

ПЦР-амплификация фрагментов ДНК длиной 648 п.н. проводилась в объеме 125 мкл. Данный объем реакционной смеси состоял из 25 мкл кДНК, специфических праймеров – по 5 мкл каждого (3 пкмоль/мкл), 12,5 мкл SE-буфера Tag ДНК полимеразы, 25 мкл Tag ДНК полимеразы (активность 5000 е.а./мл), смесь дНТФ (40 мМ) – 1,5 мкл, H₂O – 51 мкл (все использованные реактивы производства ООО «СибЭнзайм», Россия). Термоциклирование проводили в амплификаторе ДТпрайм 5М1 («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: предварительный

прогрев при 95 °С – 90 с, далее 35 циклов амплификации (95 °С – 20 с, 55 °С – 40 с, 72 °С – 40 с), при 72 °С – 10 мин, хранение – 10 °С. При рестрикционном анализе гидролиз осуществляли эндонуклеазами рестрикции DraI, PvuII и PspEI (ООО «СибЭнзайм», Россия). К 25 мкл смеси ПЦР после амплификации добавляли 5 мкл буфера для рестрикции ROSE (ООО «СибЭнзайм», Россия) и 20 мкл H₂O, затем делили на две аликвоты по 25 мкл и к одной из них добавляли 1 мкл эндонуклеазы рестрикции. Вторую аликвоту использовали в качестве отрицательного контроля рестрикции. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С продукты гидролиза разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализировали на трансиллюминаторе в проходящем ультрафиолетовом свете.

При проведении ПЦР в качестве положительного контроля использовали рекомбинантную плазмидную ДНК, содержащую последовательность гена nsP2 ЧИКВ (кат. № D-1652 АО БТК «Биосервис», Россия).

Компьютерные программы. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей ЧИКВ осуществляли с использованием программы MAFFT version 7¹. Конструирование олигонуклеотидных праймеров проводили с помощью программы OLIGO 4.0².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор фрагмента вируса Чикунгунья, пригодного для определения генотипа методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Для ЧИКВ выбор фрагментов для дальнейшего использования метода ПДРФ осуществляли следующим образом:

- проводили множественное выравнивание 731 последовательности геномов ЧИКВ, для которых указан генотип в базе данных GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information)³;
- анализировали участки РНК, наиболее консервативные для каждого из четырех генотипов ЧИКВ;
- выбирали фрагмент, оптимальный для определения генотипа по наличию/отсутствию сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции;
- подбирали специфичные последовательности прямого и обратного праймеров для амплификации выбранного участка в геномах ЧИКВ.

¹ <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>

² <https://www.oligo.net/>

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Таблица 1. Структура олигонуклеотидов для выявления РНК вируса Чикунгунья с помощью ПЦР с обратной транскрипцией
Table 1. Structure of oligonucleotides for Chikungunya virus detection using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Наименование <i>Definition</i>	Обозначение <i>Designation</i>	Последовательность (5'-3') <i>Sequence (5'-3')</i>	Координаты в геноме (относительно референсного генома NC_004162, GenBank) <i>Genomic coordinates (relative to the reference genome NC_004162, GenBank)</i>	Размер ПЦР-продукта (п.н.) <i>PCR product size (bp)</i>
Прямой праймер <i>Forward primer</i>	CHIC2d	GG(G/A)GG(T/A)GACTC(A/C)(T/C) TGAGACTGCTCA (25 н.) (25 b)	3806–3831	648
Обратный праймер <i>Reverse primer</i>	CHIC2r-2	GTT(C/T)A(G/A)TGA(C/T)TG(G/A) GT(C/T)AGCCT(G/A)TCTTT (27 н.) (27 b)	4426–4453	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Анализ нуклеотидных последовательностей геномов штаммов вируса Чикунгунья, представленных в базе данных GenBank, для дифференциации генотипов

Из базы данных GenBank были выбраны нуклеотидные последовательности всех генотипов ЧИКВ длиной не менее 10000 н. Всего рассмотрена 731 нуклеотидная последовательность. В результате было установлено, что фрагмент гена неструктурного белка 2 (nsP2) длиной 648 н. между позициями 3806 и 4453 (относительно референсного генома ЧИКВ, GenBank NC_004162⁴) содержит сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, наличие или отсутствие которых составляют различные комбинации для каждого из 4-х генотипов ЧИКВ. Из-за вариабельности структур РНК данного фрагмента были подобраны праймеры с вырождением, позволяющие амплифицировать целевой участок генома всех рассмотренных штаммов ЧИКВ путем проведения ОТ-ПЦР (табл. 1).

Анализ нуклеотидных последовательностей с помощью метода множественного выравнивания позволил установить, что в выбранном фрагменте гена nsP2 в зависимости от генотипа вируса могут содержаться сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции PspEI, PvuII и DraI (рис. 1, табл. 2).

Сайты рестрикции PspEI, PvuII и DraI не одинаково представлены у разных генотипов ЧИКВ (табл. 2). В позиции 350 данного фрагмента в случае штаммов генотипов Asian, ECSA и ESCA-IOL находится последовательность GGTТАСС, которая расщепляется рестриктазой PspEI (сайт узнавания GGTNACC) и отсутствует у штаммов генотипа Waf. При этом у штаммов генотипа ESCA-IOL в позиции 252 обнаружена единичная нуклеотидная замена цитозина (С) на тимин (Т), что привело к образованию второго сайта узнавания рестриктазой PspEI. Таким образом,

расщепление ПЦР-продукта ферментом PspEI в случае штаммов генотипов Asian и ECSA должно привести к образованию двух фрагментов длиной 350 и 298 п.н., а для ESCA-IOL – к образованию трех фрагментов длиной 298, 252 и 98 п.н. В то же время расщепление ПЦР-продукта рестриктазой PspEI для штамма Waf не должно происходить. При анализе штаммов генотипов Waf, ECSA и ESCA-IOL обнаружена замена в положении 527 гуанина (G) на аденин (A), которая приводит к образованию последовательности CAGCTG и сайта узнавания для рестриктазы PvuII. При этом для генотипа Waf в результате замены А в позиции 226 на гуанин G в ДНК-фрагменте появляется еще один сайт узнавания PvuII. Генотип Asian не содержит сайтов узнавания PvuII. Таким образом, в случае штаммов Asian ПЦР-фрагмент гена nsP2 длиной 648 н. не может расщепляться PvuII, а для штаммов ECSA и ESCA-IOL гидролиз PvuII должен привести к образованию двух фрагментов длиной 527 и 121 п.н. В случае штаммов генотипа Waf ожидается образование трех фрагментов длиной 301, 226 и 121 п.н.

В геномах некоторых анализированных штаммов ЧИКВ генотипа ECSA (включая референсный NC_004162, GenBank) сайт PvuII в позиции 527 отсутствует. В этом случае различие генотипов ECSA и Asian может быть установлено с помощью расщепления ампликона ферментом DraI. Анализ методом множественного выравнивания позволил установить, что в позиции 403 данного фрагмента генотипа Asian находится сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции DraI, что должно привести к разделению ПЦР-продукта на два фрагмента – длиной 403 и 245 п.н. В случае трех других генотипов ЧИКВ в ДНК-фрагменте в позиции 408 вместо А находится G, в связи с чем ПЦР-продукт не может расщепляться эндонуклеазой рестрикции DraI.

⁴ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_004162.2

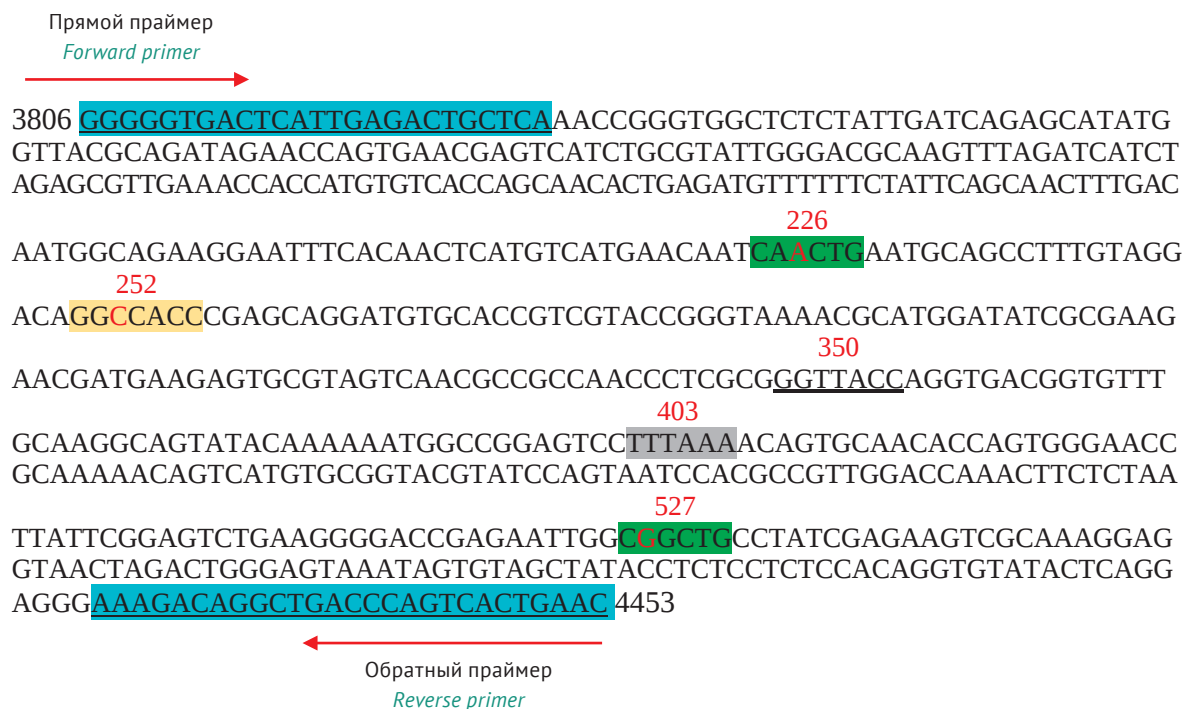


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Расположение сайтов рестрикции в выбранном фрагменте гена nsP2 вируса Чикунгунья (сконструированный участок генома всех штаммов).

Fig. 1. Restriction site location in the selected nsP2 gene fragment of Chikungunya virus (genome segment assembled for all the study strains).

Примечание. Сайты узнавания для рестриктаз: PspEI – GGtNACC; DraI – TTAAa; PvuII – CAgCTG. Красным цветом отмечена замена нуклеотида в сайте рестрикции.

Note. Recognition sites for the restriction enzymes: PspEI, GGtNACC; DraI, TTAAa; PvuII, CAgCTG. Nucleotide substitutions at the restriction sites are marked in red.

Таблица 2. Расчетная длина фрагментов рестрикции при типировании вируса Чикунгунья (ЧИКВ) методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Table 2. Estimated restriction fragment lengths in Chikungunya virus (CHIKV) typing by the restriction fragment length polymorphism method

Генотип ЧИКВ CHIKV genotype	Количество / ожидаемая длина фрагментов рестрикции (п.н.) Number / estimated length of restriction fragments (bp)		
	PspEI	PvuII	DraI
Waf	Один/648 <i>One/648</i>	Три/301; 226; 121 <i>Three/301; 226; 121</i>	Один/648 <i>One/648</i>
Asian	Два/350; 298 <i>Two/350; 298</i>	Один/648 <i>One/648</i>	Два/403; 245 <i>Two/403; 245</i>
ECSA	Два/350; 298 <i>Two/350; 298</i>	Два/527; 121* <i>Two/527; 121*</i>	Один/648 <i>One/648</i>
ECSA-IOL	Три/298; 252; 98 <i>Three/298; 252; 98</i>	Два/527; 121 <i>Two/527; 121</i>	Один/648 <i>One/648</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Генотипы ЧИКВ: Азиатский (Asian), Западно-Африканский (West African, Waf), Восточно-Центральный Южно-Африканский (East-Central-South African, ECSA) и Восточно-Центральный Южно-Африканский – линия Индийского океана (East-Central-South African – Indian Ocean Lineage, ECSA-IOL).

* сайт PvuII в позиции 527 в геномах некоторых штаммов генотипа ECSA (включая референсный NC_004162, GenBank) может отсутствовать.

Note. CHIKV genotypes: Asian; Waf, West African; ECSA, East/Central/South African; ECSA-IOL, ECSA Indian Ocean Lineage.

* There may be no PvuII site at position 527 in the genomes of some ECSA strains (including the reference genome NC_004162, GenBank).

Как следует из представленных в *таблице 2* обобщенных данных, эндонуклеазы рестрикции PvuII и PspEI могут быть использованы для генотипирования ЧИКВ методом ПДРФ, а фермент DraI — для дифференциации генотипов ECSA и Asian.

Оценка специфичности праймеров

Для определения специфичности выбранных праймеров проводили ОТ-ПЦР с контрольной рекомбинантной плазмидой, несущей последовательность гена nsP2 вируса Чикунгунья. В ходе реакции был амплифицирован фрагмент длиной, соответствующей расчетной, — 648 п.н. При проведении ОТ-ПЦР с использованием в качестве матрицы РНК гетерологичных вирусов (раздел «Материалы и методы») продукт амплификации выявлен не был. Напротив, при постановке ОТ-ПЦР с РНК ЧИКВ всех четырех генотипов амплифицирован фрагмент длиной, соответствующей расчетной, что свидетельствовало о специфичности выбранных праймеров в отношении всех существующих генотипов ЧИКВ.

Результаты ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией эндонуклеазами PspEI, PvuII и DraI

Для апробации разработанного способа типирования ЧИКВ на основе ОТ-ПЦР и метода ПДРФ была использована РНК штаммов, относящихся к разным генотипам. При проведении гидролиза

фрагмента гена nsP2 размером 648 п.н. с использованием эндонуклеаз рестрикции PspEI и PvuII в зависимости от генотипа ЧИКВ были получены фрагменты длиной, соответствующей расчетной (*рис. 2*).

Результаты рестрикции (*рис. 2*) четко визуализировались при электрофоретической детекции. При этом в случае штамма ЧИКВ генотипа Waf амплифицируемый фрагмент не расщеплялся рестриктазой PspEI, но при гидролизе рестриктазой PvuII образовывал три фрагмента, что соответствует двум сайтам рестрикции. Это позволило дифференцировать генотип Waf от других генотипов. В случае генотипа Asian исследуемый фрагмент не имел сайтов рестрикции PvuII, что в большинстве случаев позволяло отличить его от генотипа ECSA. Анализ ПЦР-продуктов генотипов ECSA и ECSA-IOL показал наличие одинаковых фрагментов при рестрикции ферментом PvuII, но при этом имелись четкие отличия при расщеплении рестриктазой PspEI.

Для дифференциации генотипов ECSA и Asian при проведении гидролиза фрагмента гена nsP2 размером 648 п.н. была использована эндонуклеаза DraI.

Анализ результатов (*рис. 3*) свидетельствует о том, что при проведении реакции были получены фрагменты длиной, соответствующей расчетной. В случае генотипов Asian и ECSA рестриктаза PspEI расщепляла ампликон на два

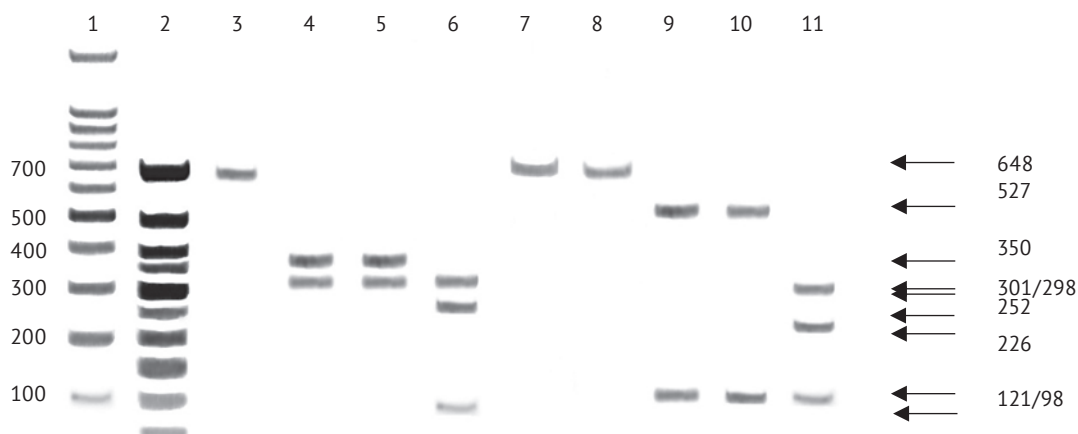


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Результаты электрофоретической детекции ПЦР-фрагментов гена nsP2 штаммов вируса Чикунгунья (ЧИКВ) разных генотипов, полученных после гидролиза при использовании рестриктаз PspEI и PvuII. Дорожки на электрофореграмме: 1, 2 — маркеры молекулярного веса; 3 — амплифицированный фрагмент гена nsP2 ЧИКВ (расчетная длина 648 п.н.); 4–7 — фрагменты после рестрикции эндонуклеазой PspEI последовательностей штаммов, относящихся к генотипам: Азиатский (Asian) — 4, Восточно-Центральный Южно-Африканский (ECSA) — 5, ECSA линия Индийского океана (ECSA-IOL) — 6, Западно-Африканский (Waf) — 7; 8–11 — фрагменты после рестрикции эндонуклеазой PvuII последовательностей штаммов генотипов: Asian — 8, ECSA — 9, ECSA-IOL — 10, Waf — 11.

Fig. 2. Electrophoretic detection results for PCR fragments of the nsP2 gene of Chikungunya virus (CHIKV) strains of different genotypes, obtained upon hydrolysis with the restriction endonucleases PspEI and PvuII. Electropherogram lanes: 1–2, molecular weight markers; 3, amplified CHIKV nsP2 gene fragment (estimated length: 648 bp); 4–7, fragments of CHIKV genotypes restricted by PspEI (4, Asian; 5, East/Central/South African (ECSA); 6, ESCA Indian Ocean Lineage (ECSA-IOL); 7, West African (Waf)); 8–11, DNA fragments of CHIKV genotypes restricted by PvuII (8, Asian; 9, ECSA; 10, ECSA-IOL; 11, Waf).

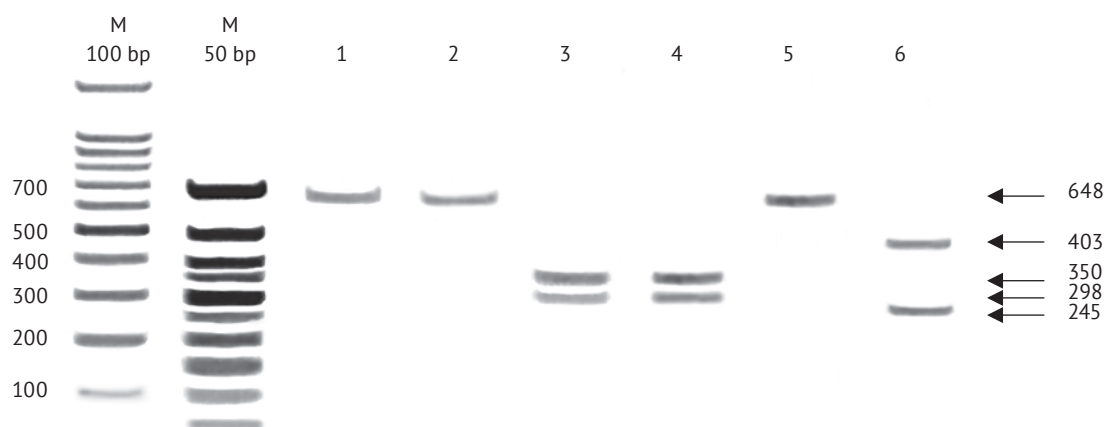


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Результаты электрофоретической детекции ДНК-фрагментов гена nsP2 штаммов вируса Чикунгунья (ЧИКВ) генотипов Азиатский (Asian) и Восточно-Центральный Южно-Африканский (ECSA), полученных после гидролиза при использовании рестриктаз PspEI и DraI. Дорожки на электрофореграмме: 1, 2 – амплифицированный фрагмент гена nsP2 ЧИКВ (расчетная длина 648 п.н.) генотипа Asian (1), генотипа ECSA (2); 3, 4 – ДНК-фрагменты после рестрикции эндонуклеазой PspEI последовательностей штаммов генотипов: Asian (3), ECSA (4); 5, 6 – ДНК-фрагменты после рестрикции эндонуклеазой DraI последовательностей штаммов генотипов: ECSA (5), Asian (6).

Fig. 3. Electrophoretic detection results for DNA fragments of the nsP2 gene of Chikungunya virus (CHIKV) strains of Asian and East/Central/South African (ECSA) genotypes, obtained upon hydrolysis with the restriction endonucleases PspEI and DraI. Electropherogram lanes: 1–2, amplified CHIKV nsP2 gene fragments (estimated length: 648 bp) (1, Asian; 2, ECSA); 3–4, DNA fragments of CHIKV strain genotypes restricted by PspEI (3, Asian; 4, ECSA); 5–6, DNA fragments of CHIKV strain genotypes restricted by DraI (5, ECSA; 6, Asian).

фрагмента – 350 и 298 п.н. В то же время в случае генотипа ECSA амплифицированный фрагмент не гидролизировался эндонуклеазой рестрикции DraI, а при анализе генотипа Asian показано расщепление ПЦР-продукта с образованием двух фрагментов, длины которых соответствовали расчетным – 403 и 245 п.н. Таким образом, метод ПДРФ позволил провести дифференциацию между всеми изученными генотипами ЧИКВ, и результаты рестрикционного анализа совпали с данными, полученными путем секвенирования, которое было осуществлено ранее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты продемонстрировали, что в гене неструктурного

белка nsP2 ЧИКВ находится фрагмент, имеющий сайты эндонуклеаз рестрикции, комбинация которых специфична для каждого генотипа вируса. Теоретически предсказано и экспериментально подтверждено, что метод ПЦР с обратной транскрипцией и последующий анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов позволяют провести определение генотипа вируса Чикунгунья. Исследование не требует продолжительного времени и использования высокотехнологического оборудования. Полученные результаты в перспективе могут быть использованы для идентификации и генотипирования при исследовании биологического материала, подозрительного на наличие возбудителя лихорадки Чикунгунья.

Литература/References

1. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(4):e107–17. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)30385-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(16)30385-1)
2. Simo FBN, Burt FJ, Makoah NA. Chikungunya virus diagnosis: a review of current antigen detection methods. *Trop Med Infect Dis.* 2023;8(7):365. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070365>
3. Cunha MS, Costa PAG, Correa IA, de Souza MRM, Calil PT, Duarte da Silva GP, et al. Chikungunya virus: an emergent arbovirus to the South American continent and a continuous threat to the world. *Front Microbiol.* 2020;11:1297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01297>
4. Tanabe ELL, Tanabe ISB, Santos ECD, Marques JPDS, Borges AA, Lima MC, et al. Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2018;60:e19. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860019>
5. Panning M, Grywna K, Van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(3):416–22. <https://doi.org/10.3201/eid1403.070906>
6. Lessa-Aquino C, Trinta KS, Pestana CP, Ribeiro MO, Supura MVF, Boia MN, et al. Detection of East/Central/South African genotype Chikungunya virus during an outbreak in a southeastern state of Brazil. *Epidemiol Infect.* 2018;146(16):2056–58. <https://doi.org/10.1017/s0950268818002467>
7. Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, Grandadam M, et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit Chikungunya and dengue viruses in

- the Southeast of France. *PLoS One*. 2013;8(3):e59716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>
8. Mattar S, Miranda J, Pinzon H, Tique V, Bolanos A, Aponte J, et al. Outbreak of Chikungunya virus in the north Caribbean area of Colombia: clinical presentation and phylogenetic analysis. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(10):1126–32. <https://doi.org/10.3855/jidc.6670>
 9. Johnson BW, Russell BJ, Goodman CH. Laboratory diagnosis of Chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays. *J Infect Dis*. 2016;214(suppl 5):S471–4. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw274>
 10. Waggoner JJ, Ballesteros G, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Tellez Y, Sahoo MK, et al. Clinical evaluation of a single-reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and Chikungunya virus detection. *J Clin Virol*. 2016;78:57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.01.007>
 11. Carletti F, Bordin L, Chiappini R, Ippolito G, Sciarone MR, Capobianchi MR, et al. Rapid detection and quantification of Chikungunya virus by a one-step reverse transcription polymerase chain reaction real-time assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(3):521–4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.521>
 12. Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, Patil J, Salunke A, Parashar D, Shah PS. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and Chikungunya viruses. *Arch Virol*. 2015;160(1):323–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2217-x>
 13. Кулак МВ, Белафин ПА, Нетесова НА, Юнасова ТН, Голикова ЛН, Бектемиров ТА, Игнатьев ГМ. Дифференциация вакцинного штамма Л-3 от других штаммов вируса паротита методом ОТ-ПЦР. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2008;(4):7–10. Kulak MV, Belavin PA, Netesova NA, Yunasova TN, Golikova LN, Bektemirov TA, Ignatyev GM. Differentiation of the vaccine strain L-3 from other strains of the mumps virus by RT-PCR. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2008;(4):7–10 (In Russ.). EDN: SATPME
 14. Игнатьев ГМ, Отрашевская ЕВ, Суханова ЛЛ, Сидоренко ЕС, Нетесова НА. Молекулярно-генетическое исследование штамма RA-27/3, используемого для производства вакцины против краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(4):38–46. Ignatyev GM, Atrashevskaya EV, Suchanova LL, Sidorenko ES, Netesova NA. Molecular-genetic study of the RA-27/3 strain used for the production of rubella vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;96(4):38–46 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-38-46>
 15. Игнатьев ГМ, Отрашевская ЕВ, Суханова ЛЛ, Сидоренко ЕС, Нетесова НА. Молекулярно-генетическое исследование штамма Ленинград-16, используемого для производства вакцины кори. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;(2):182–9. Ignatyev GM, Atrashevskaya AV, Sukhanova LL, Sidorenko ES, Netesova NA. Molecular genetic analysis of the strain Leningrad-16 used for the production of measles vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;(2):182–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-182-189>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.А. Нетесова** — обоснование концепции исследования, формулирование идеи, обобщение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи; **М.А. Абдурашитов** — создание модели исследования, анализ и обобщение данных литературы, расчет праймеров, критический пересмотр текста рукописи; **Т.Г. Самарцева** — подготовка образцов, проведение экспериментов, написание текста рукописи; **О.В. Климович** — подготовка образцов, проведение экспериментов; **А.С. Оксанич** — планирование исследования, редактирование текста рукописи; **Е.В. Отрашевская** — обобщение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** — обоснование концепции исследования, планирование исследования, проведение экспериментов, написание текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.A. Netesova** substantiated the study concept, formulated the study idea, summarised the study results, and critically revised the manuscript. **M.A. Abdurashitov** created the research model, analysed and summarised literature data, calculated the primers, and critically revised the manuscript. **T.G. Samartseva** prepared samples, conducted experiments, and drafted the manuscript. **O.V. Klimovich** prepared samples and conducted experiments. **A.S. Oksanich** planned the study and edited the manuscript. **E.V. Otrasheskaia** summarised the study results and edited the manuscript. **G.M. Ignatyev** substantiated the study concept, planned the study, conducted experiments, and drafted the manuscript.

Об авторах / Authors

Нетесова Нина Александровна, д-р биол. наук / **Nina A. Netesova**, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9896-5403>

Абдурашитов Мурат Абдурашитович, канд. биол. наук / **Murat A. Abdurashitov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9402-5254>

Самарцева Татьяна Геннадьевна / **Tatiana G. Samartseva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Климович Ольга Викторовна / **Olga V. Klimovich**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7842-2532>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук / **Alexey S. Oksanich**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Отрашевская Елена Викторовна / **Elena V. Otrasheskaia**

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

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф. / **George M. Ignatyev**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

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

Поступила 27.12.2023

После доработки 03.04.2024

Принята к публикации 16.05.2024

Online first 17.05.2024

Received 27 December 2023

Revised 3 April 2024

Accepted 16 May 2024

Online first 17 May 2024



Молекулярно-генетические методы контроля качества инактивированных вакцин на модели вируса Чикунгунья: подлинность штамма и полнота инактивации вируса

А.С. Оксанич¹, Т.Г. Самарцева¹, К.В. Каа², Е.В. Отрашевская¹, А.Г. Красько³,
А.Г. Лапутина¹, Н.А. Нетесова⁴, Г.М. Игнатьев^{1,5}, ✉

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5а, 105064, Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, ул. Погодинская д. 10, стр. 1, Москва, 119121, Российская Федерация

³ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ул. Филимонова, д. 23, г. Минск, 220114, Республика Беларусь

⁴ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, АБК, к. 12а, Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

⁵ 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

✉ Игнатьев Георгий Михайлович; marburgman@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. При разработке и производстве инактивированных вакцин важными критериями безопасности и качества препарата являются полнота инактивации вируса и подлинность вакцинного штамма. Для осуществления контроля качества инактивированных вакцин наиболее перспективным представляется использование молекулярно-биологических методов, отличающихся быстротой получения результата, а также высокими показателями чувствительности и специфичности.

ЦЕЛЬ. Разработка методов количественной полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (кПЦР-РВ) и интегрированной с культуральным методом кПЦР-РВ (ИКМ-кПЦР-РВ) для оценки полноты инактивации вируса Чикунгунья (ЧИКВ), а также метода обратной транскрипции – ПЦР с последующей оценкой полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ОТ-ПЦР-ПДРФ) для подтверждения подлинности штамма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследовании использовали РНК штаммов ЧИКВ (по 3 штамма каждого из четырех генотипов (Asian, ECSA, ECSA-IOL, WAF), которые были предварительно определены секвенированием), штамм ЧИКВ Nika21 (генотип ECSA), инактивированный β-пропиолактоном штамм Nika21, сорбированный на гидроокиси алюминия антиген Nika21. Применяли методы кПЦР-РВ, ИКМ-кПЦР-РВ, ОТ-ПЦР-ПДРФ, реакцию нейтрализации.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Определен фрагмент гена белка nsP1 длиной 218 п.о. между позициями 789 и 1006, который содержит сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, наличие

или отсутствие которых составляют различные комбинации и специфичны для каждого из 4 генотипов ЧИКВ. Подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать выбранный участок гена, отработаны условия проведения ОТ-ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР-ПДРФ. Продemonстрирована возможность использования метода ИКМ-кПЦР-РВ для подтверждения полноты инактивации вируса. Показана возможность применения метода ОТ-ПЦР-ПДРФ для установления подлинности вакцинного штамма.

ВЫВОДЫ. Продemonстрированы преимущества применения метода ИКМ-кПЦР-РВ для оценки полноты инактивации антигена вакцинного штамма и метода ОТ-ПЦР-ПДРФ для подтверждения подлинности вакцинного штамма вируса. Данные методы являются более чувствительными и быстрыми относительно традиционных культуральных методов и могут быть использованы на всех этапах технологического процесса производства инактивированных вакцин.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; интегрированная с культуральным методом количественная ПЦР; вирус Чикунгунья

Для цитирования: Оксанич А.С., Самарцева Т.Г., Каа К.В., Отрашевская Е.В., Красько А.Г., Лапутина А.Г., Нетесова Н.А., Игнатьев Г.М. Молекулярно-генетические методы контроля качества инактивированных вакцин на модели вируса Чикунгунья: подлинность штамма и полнота инактивации вируса. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):279–293. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-279-293>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 22-14-00184.

Потенциальный конфликт интересов. Г.М. Игнатьев — заместитель главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2024 г.). Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Molecular genetic methods for quality control of inactivated vaccines using a Chikungunya virus model: vaccine strain identification and completeness of virus inactivation

Alexey S. Oksanich¹, Tatiana G. Samartseva¹, Konstantin V. Kaa²,
Elena V. Otrachevskaya¹, Anatoli G. Krasko³, Armine G. Laputina¹,
Nina A. Netesova⁴, George M. Ignatyev^{1,5, ✉}

¹ I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

² Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, 10/1 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russian Federation

³ Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, 23 Filimonov St., Minsk 220114, Republic of Belarus

⁴ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", 12/A ABK, Koltsovo, Novosibirsk Region 630559, Russian Federation

⁵ 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

✉ George M. Ignatyev; marburgman@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The completeness of virus inactivation and the identity of the vaccine strain are essential parameters for the safety and quality of inactivated virus vaccines, which should

be controlled during vaccine development and production. Currently, the most promising quality control methods for inactivated virus vaccines are molecular genetic methods, which provide rapid results with high sensitivity and specificity.

AIM. The aim of this study was the development of a real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method and an integrated cell culture real-time quantitative polymerase chain reaction (ICC-qPCR) method to assess the completeness of virus inactivation, as well as a reverse-transcription polymerase chain reaction assay coupled with restriction fragment length polymorphism analysis (RT-PCR-RFLP) to confirm the identity of the vaccine virus strain.

MATERIALS AND METHODS. This study used RNA of CHIKV genotypes (three strains of each of the four CHIKV genotypes, including Asian, West African (Waf), and East/Central/South African (ECSA) genotypes, and the Indian Ocean Lineage of the ECSA genotype (ECSA-IOL), which were identified by sequencing prior to analysis). Additionally, the study used the Nika21 CHIKV strain (ECSA genotype), the Nika21 CHIKV strain inactivated with β -propiolactone, and the Nika21 CHIKV strain antigen adsorbed on aluminium hydroxide. The methods used included real-time qPCR, RT-PCR-RFLP, and virus neutralisation.

RESULTS. The study identified a 218 bp fragment of the nsP1 gene (positions 789 to 1006) with restriction endonuclease recognition sites. These sites were present or absent in combinations specific to each of the four CHIKV genotypes. The authors selected primers for amplification of the specified gene region and tested the conditions for real-time qPCR and RT-PCR-RFLP. The study demonstrated the possibility of using the ICC-qPCR method to confirm the completeness of virus inactivation and the RT-PCR-RFLP method to identify the vaccine strain.

CONCLUSIONS. The study showed the advantages of using the ICC-qPCR method to confirm the completeness of antigen inactivation and the RT-PCR-RFLP method to identify the vaccine strain. These methods are more sensitive and faster than traditional culture methods. ICC-qPCR and RT-PCR-RFLP can be used at any stage of the production process for inactivated vaccines.

Keywords: reverse transcription polymerase chain reaction; restriction fragment length polymorphism method; integrated cell culture quantitative PCR; Chikungunya virus

For citation: Oksanich A.S., Samartseva T.G., Kaa K.V., Otrashesvskaia E.V., Krasko A.G., Laputina A.G., Netesova N.A., Ignatyev G.M. Molecular genetic methods for quality control of inactivated vaccines using a Chikungunya virus model: vaccine strain identification and completeness of virus inactivation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):279–293. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-279-293>

Funding. The study reported in this publication was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation under grant No. 22-14-00184.
Disclosure. G.M. Ignatyev has been a Deputy Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

При разработке и производстве инактивированных вакцин важными критериями безопасности и качества препарата являются полнота инактивации вируса и подлинность вакцинного штамма. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)¹ (ОФС.1.7.1.0004.15) производителям инактивированных вакцин необходимо контролировать «специфическую безопасность», что подразумевает необходимость

оценить «методами *in vivo* и/или *in vitro* полноту инактивации». С этой целью для различных вакцин применяют разные подходы: так, например, для вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной (ФС.3.3.1.0014.15²) используют чувствительных лабораторных животных; для вакцины гриппозной инактивированной (ФС.3.3.1.0028.20³) и вакцины оспенной инактивированной (ФС.3.3.1.0034.15⁴) – куриные эмбрионы; для вакцины антирабической инактивированной (ФС.3.3.1.0025.15⁵) – чувствительные

¹ ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² ФС.3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ ФС.3.3.1.0028.20 Вакцина гриппозная инактивированная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. (введена приказом Министерства Здравоохранения Российской Федерации № 751 от 28.07.2200).

⁴ ФС.3.3.1.0034.15 Вакцина оспенная инактивированная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁵ ФС.3.3.1.0025.15 Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

культуры клеток. Методы *in vivo*, то есть с применением лабораторных животных, являются достаточно трудоемкими и затратными по времени. К недостаткам метода *in vitro* с использованием монослоя культуры чувствительных клеток можно отнести определенную степень субъективности из-за отсутствия практического стандарта для оценки данных, а также возможность получения сомнительных/неоднозначных результатов из-за неспецифических процессов деградации монослоя культуры клеток. В последнее десятилетие для контроля качества вакцин все чаще применяется метод количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) благодаря его специфичности, чувствительности и скорости. Однако данный метод не позволяет различать инфекционные и неинфекционные вирусы, что делает невозможным его прямое использование для исследования полноты инаktivации вируса. В работах B.L. Correia Moreira с соавт. [1, 2] была предложена комбинация кПЦР в реальном времени с методом культивирования на чувствительных линиях клеток для контроля качества вакцин для профилактики бешенства, в том числе ветеринарных. Описанный подход также применялся в случае вакцин для профилактики гепатита А [3] и инфекции, вызванной SARS-CoV-2 [4]. Данная комбинация как единый метод уже используется для оценки эффективности химических и физических способов инаktivации патогенных вирусов в окружающей среде, например для таких, как ротавирус, реовирус, энтеровирус, вирус Эбола и вирус полиомиелита [5–11]. Этот метод получил название «интегрированная с культуральным методом кПЦР в режиме реального времени» (ИКМ-кПЦР-РВ, integrated cell culture quantitative polymerase chain reaction, ICC-qPCR).

Для подтверждения подлинности производственного штамма вируса в препаратах инаktivированных вакцин чаще всего используются чувствительные лабораторные животные. Так, в соответствии с требованиями ГФ РФ метод *in vivo* рекомендован для вакцины клещевого энцефалита (ФС.3.3.1.0031.15)⁶. Для вакцины оспенной инаktivированной применяется метод *in vitro* — реакция нейтрализации с использованием вакцинного штамма и сыворотки иммунных животных (ФС.3.3.1.0034.15)⁷. Однако следует

отметить, что эти методы могут подтвердить исключительно принадлежность производственного штамма вируса к определенному семейству и роду, а не к какому-то конкретному штамму [12, 13]. Более того, эти методы являются достаточно трудоемкими. Молекулярно-биологические методы, в частности метод ПЦР с обратной транскрипцией с последующей оценкой полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ОТ-ПЦР-ПДРФ), могут стать существенным дополнением, а на определенном этапе полностью заменить биологический метод подтверждения подлинности производственного штамма вируса. Метод ОТ-ПЦР-ПДРФ разработан и рекомендуется для дифференциальной диагностики вакцинного штамма от «диких» для ряда препаратов, таких как вакцина для профилактики ветряной оспы [14], паротита [15], краснухи [12] и бешенства [16].

Указанные методы контроля полноты инаktivации вируса и подлинности вакцинного штамма могут быть применены при разработке новых инаktivированных вирусных вакцин, в частности для профилактики лихорадки, вызываемой вирусом Чикунгунья (ЧИКВ). В настоящее время инаktivированные вакцины для профилактики ЧИКВ разрабатываются с использованием формалина или β-пропиолактона [17–20], и одна из них находится на II/III фазе клинических исследований⁸. Актуальность разработки подтверждает тот факт, что Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) и Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) предоставили нескольким кандидатным вакцинам для профилактики заболевания, вызванного ЧИКВ, статус ускоренного и приоритетного рассмотрения (Fast Track, Priority Review)⁹.

Цель работы — разработка методов кПЦР-РВ и ИКМ-кПЦР-РВ для оценки полноты инаktivации ЧИКВ, а также ОТ-ПЦР-ПДРФ для подтверждения подлинности штамма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Вирусы. Для проведения исследования использовали РНК вирусов, относящихся к семействам *Alphaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*.

⁶ ФС.3.3.1.0031.15 Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инаktivированная жидкая сорбированная или сухая в комплекте с растворителем алюминия гидроксида. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁷ ФС.3.3.1.0034.15 Вакцина оспенная инаktivированная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁸ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04566484>

⁹ Code of Federal Regulations. Title 21. Section 601.91. Approval based on evidence of effectiveness from studies in animals. Washington DC: FDA; 2020.

Вирусы семейства *Alphaviridae*: ЧИКВ (по 3 штамма каждого из четырех генотипов, которые были предварительно определены секвенированием: Asian, ECSA, ECSA-IOL, WAF), вирус венозного энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ) (2 штамма), вирус Синдбис (2 штамма); вирусы семейства *Flaviviridae* – вирус желтой лихорадки (штамм 17D), вирусы денге (1 тип – штамм Hawaii, 2 тип – New Guinea C (NGC), 3 тип – H-87, 4 тип – H241), вирус японского энцефалита, вирус клещевого энцефалита (штамм Софьин) и вирус Западного Нила (каждого – по одному штамму); вирусы семейства *Bunyaviridae* – один штамм вируса Конго-Крымской геморрагической лихорадки. Вирусы были использованы для получения образцов РНК, которые применялись для подтверждения специфичности метода. Все указанные штаммы были получены из коллекций микроорганизмов следующих учреждений: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Республики Беларусь, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Россия) и филиала ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России (Никарагуа).

Для изучения полноты инактивации использовали штамм Nika21 (генотип ECSA). Нуклеотидная последовательность штамма Nika21 представлена в GenBank (OQ320495¹⁰).

Все работы проводили с соблюдением действующих санитарных норм и правил.

РНК из образцов выделяли с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Магно-Сорб» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Экстракцию РНК осуществляли в 50 мкл элюирующего раствора и хранили при минус 70 °С до дальнейшего использования.

Образцы сывороток. Использовали образцы сывороток крови людей, полученные в ходе клинических испытаний в Никарагуа, как описано ранее [21], а также образцы сывороток лиц, привитых вакциной ВЭЛ, как описано ранее [22]. Предварительно скрининг образцов сывороток на наличие/отсутствие антител проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием доступных коммерческих наборов в соответствии с инструкциями производителей: наборы реагентов для определения антител (АТ) класса IgG к вирусу Чикунгунья и вирусу Синдбис – «БиоСкрин-Чикунгунья

(IgG)» и «БиоСкрин-Синдбис (IgG)» (АО БТК «Биосервис», Россия); наборы реагентов для определения АТ класса IgG к вирусу денге и вирусу Зика – «Anti-Dengue Virus ELISA (IgG)» и «Anti-Zika Virus ELISA (IgG)» (Euroimmun AG, Германия); набор реагентов для определения АТ класса IgG к вирусу желтой лихорадки «Qualitative Human Yellow Fever Virus Antibody IgG (YFV-IgG) ELISA Kit» (MyBioSource Inc., США).

Для экспериментов были отобраны следующие образцы сывороток:

- 5 образцов сывороток от лиц, переболевших лихорадкой Чикунгунья, содержащих только антитела к ЧИКВ (группа «ЧИКВ»);
- 5 образцов сывороток от лиц, проживающих в странах Латинской Америки, содержащих только антитела к вирусу Синдбис (группа «Синдбис»);
- 5 образцов сывороток от лиц, привитых вакциной ВЭЛ, имеющих антитела только к вирусу ВЭЛ и не выезжавших в страны Латинской Америки или Юго-Восточной Азии (группа «ВЭЛ»);
- 5 образцов сывороток, не содержащих антитела к ЧИКВ, ВЭЛ и вирусу Синдбис, от лиц, не выезжавших в страны Латинской Америки или Юго-Восточной Азии. Данные образцы были использованы в качестве контрольных (группа «Контроль»).

Методы

Культивирование вируса. Вирус ЧИКВ (штамм Nika21, генотип ECSA) культивировали на клетках линии Vero с использованием дозы, соответствующей множественности заражения (multiplicity of infection, MOI), равной 0,00001, как описано ранее [23]. В качестве питательной среды применяли среду Игла МЕМ (ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», Россия) с 2% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (ООО «БиолоТ», Россия).

Титрование вируса проводили на клетках линии Vero, как описано ранее [23]. Результат титрования учитывали по выраженному цитопатическому действию и рассчитывали показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток (ТЦД₅₀), по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали его в lg ТЦД₅₀/мл [23].

Инактивация вируса. Штамм ЧИКВ Nika21 был инактивирован β-пропиолактоном (при объемном соотношении β-пропиолактон:

¹⁰ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OQ320495>

вирусодержащая культуральная жидкость, равном 1:1000). Инактивацию проводили в течение 48 ч при температуре 4 °С [24]. Через 48 ч обработанная β-пропиолактоном вирусодержащая культуральная жидкость в течение 2 ч выдерживалась при температуре 37 °С.

Сорбцию инактивированного ЧИКВ на гидроокись алюминия проводили, как описано ранее [24]. Десорбцию осуществляли как описано ранее [25].

Образцы для исследований. Для оценки метода ОТ-ПЦР-ПДРФ при подтверждении подлинности штамма вируса и метода ИКМ-кПЦР-РВ для анализа полноты инактивации штамма ЧИКВ Nika21 отбирали образцы вирусодержащей жидкости до и после инактивации, а также до и после сорбции на гидроокись алюминия (табл. 1).

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Обратная транскрипция (ОТ). Для получения кДНК проводили реакцию ОТ с использованием праймера pNS1CHVrev2-3 и набора реагентов для обратной транскрипции («Синтол», Россия) на матрице вирусной РНК. На первом этапе в отдельные пробирки, содержащие по 2 мкл обратного праймера pNS1CHVrev2-3 в концентрации 3 пмоль/мкл, добавляли по 3 мкл выделенной РНК, а затем прогревали смеси в течение 5 мин при 95 °С. Далее пробирки охлаждали до комнатной температуры и добавляли в каждую по 10 мкл смеси для ОТ, состоящей из 2,5-кратного буфера для ОТ («Синтол», Россия) и 25 ед. MMLV-ревертазы («Синтол», Россия). Смесь инкубировали при 42 °С в течение 30 мин.

Таблица 1. Описание образцов и методы их исследования
Table 1. Description of samples and testing methods

Номер образца <i>Sample number</i>	Наименование образца <i>Sample name</i>	Метод для подтверждения подлинности штамма ЧИКВ Nika21 <i>Nika21 CHIKV strain identification method</i>	Метод для оценки полноты инактивации вируса <i>Virus inactivation assessment method</i>
1	Вирусодержащая культуральная жидкость до инактивации β-пропиолактоном <i>Virus-containing culture fluid before β-propiolactone inactivation</i>	ОТ-ПЦР-ПДРФ <i>RT-PCR-RFLP</i>	ИКМ-кПЦР-РВ (в качестве положительного контроля) <i>ICC-qPCR (positive control)</i>
2	Вирусодержащая культуральная жидкость после инактивации β-пропиолактоном <i>Virus-containing culture fluid after β-propiolactone inactivation</i>	ОТ-ПЦР-ПДРФ <i>RT-PCR-RFLP</i>	ИКМ-кПЦР-РВ <i>ICC-qPCR</i>
3	Вирусодержащая культуральная жидкость после первого пассажа образца № 2 на клетках Vero <i>Virus-containing culture fluid after Passage 1 of Sample 2 in Vero cells</i>	ОТ-ПЦР-ПДРФ <i>RT-PCR-RFLP</i>	ИКМ-кПЦР-РВ <i>ICC-qPCR</i>
4	Вирусодержащая культуральная жидкость после второго пассажа образца № 2 на клетках Vero <i>Virus-containing culture fluid after Passage 2 of Sample 2 in Vero cells</i>	ОТ-ПЦР-ПДРФ <i>RT-PCR-RFLP</i>	ИКМ-кПЦР-РВ <i>ICC-qPCR</i>
5	Супернатант (надосадочная жидкость) после десорбции инактивированного ЧИКВ <i>Supernatant after inactivated CHIKV desorption</i>	ОТ-ПЦР-ПДРФ <i>RT-PCR-RFLP</i>	ИКМ-кПЦР-РВ <i>ICC-qPCR</i>
6	Десорбированный инактивированный ЧИКВ <i>Desorbed inactivated CHIKV</i>	ОТ-ПЦР-ПДРФ <i>RT-PCR-RFLP</i>	ИКМ-кПЦР-РВ <i>ICC-qPCR</i>
7	Суспензия клеток Vero <i>Vero cell suspension</i>	–	ИКМ-кПЦР-РВ (в качестве отрицательного контроля) <i>ICC-qPCR (negative control)</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ЧИКВ – вирус Чикунгунья; ОТ-ПЦР-ПДРФ – метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией с последующей оценкой полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; ИКМ-кПЦР-РВ – интегрированная с культуральным методом количественная ПЦР в режиме реального времени.
Note. CHIKV, Chikungunya virus; RT-PCR-RFLP, reverse-transcription polymerase chain reaction assay coupled with restriction fragment length polymorphism analysis; ICC-qPCR, integrated cell culture real-time quantitative polymerase chain reaction.

Для инактивации ревертазы после инкубации смесь прогревали в течение 5 мин при 95 °С.

Контрольная плазида. При проведении ПЦР в качестве калибратора и положительно-го контроля использовали плазмидную ДНК, содержащую последовательность гена белка nsP1 ЧИКВ (D-1621, АО БТК «Биосервис», Россия).

Полимеразная цепная реакция. ПЦР на кДНК, полученной после ОТ, проводили в объеме 25 мкл с использованием оригинальных праймеров и зондов для выявления гена белка nsP1 ЧИКВ. Для подбора праймеров осуществляли множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей 40 полноразмерных геномов ЧИКВ, представленных в GenBank¹¹ и включающих все четыре генотипа, с помощью программы AlignX (Vector NTI 11.0, Invitrogen, США). Неструктурные белки ЧИКВ, как и других альфа-вирусов, кодируются в 5'-области генома вирусной РНК с положительной цепью и транслируются непосредственно после попадания РНК в цитоплазму. Из всех генов nsP1 отвечает за экпирование геномной и субгеномной РНК ЧИКВ и удерживает репликативные комплексы на цитоплазматической поверхности мембраны клетки. Следовательно, можно предположить, что активность гена данного белка определяет скорость размножения и инфекционность ЧИКВ [26]. По результатам анализа к консервативным областям гена белка nsP1 вируса ЧИКВ были подобраны праймеры и зонд. Последовательности и характеристики подобранных олигонуклеотидов представлены в таблице 2 (опубликована на сайте журнала¹²).

ПЦР-смесь состояла из 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси («Синтол», Россия), по 3 пмоль каждого праймера, 2,5 пмоль флуоресцентно-меченного зонда и 5 мкл кДНК или ДНК калибратора. Реакцию проводили с использованием амплификатора ДТпрайм 5М1 («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 1 цикл – 95 °С – 90 с; 40 циклов – 95 °С – 15 с, 55 °С – 30 с; хранение – 10 °С. Расчетная длина фрагмента 218 п.о.

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Выбирая участок гена белка nsP1 ЧИКВ, руководствовались критерием наличия сайтов рестрикции внутри получаемого ПЦР-продукта. Также учитывали, что фрагменты, образующиеся при гидролизе ПЦР-продукта рестриктазой, должны иметь значительно отличающиеся друг от друга размеры. В выбранном

фрагменте гена белка nsP1 имелись несколько сайтов рестрикции, характерных для каждого отдельного генотипа ЧИКВ (табл. 3, опубликована на сайте журнала¹³).

У штаммов ЧИКВ генотипов ECSA и ECSA-IOL имеется сайт рестрикции DraI, расщепление, по которому дает 2 фрагмента с размерами 133 и 85 п.о. Генотипы Asian и WAF такого сайта не имеют, что позволяет дифференцировать штаммы ECSA и ECSA-IOL от других генотипов ЧИКВ. У штаммов ЧИКВ генотипа WAF по сайту рестрикции HindIII образуются два фрагмента 45 и 173 п.о., а по сайту SmaI – 169 и 49 п.о. Для штаммов ЧИКВ генотипа Asian по сайту рестрикции HindIII образуются два фрагмента с размерами 125 и 93 п.о. Таким образом, штаммы ЧИКВ генотипа WAF можно дифференцировать путем проведения ПДРФ с использованием эндонуклеазы рестрикции SmaI и HindIII, а штаммы ЧИКВ генотипа Asian – с помощью эндонуклеазы рестрикции HindIII.

Для рестрикционного анализа использовали эндонуклеазу рестрикции DraI (ООО «СибЭнзайм», Россия). К 25 мкл смеси ПЦР после амплификации добавляли 5 мкл буфера для рестрикции ROSE (кат. № B021, ООО «СибЭнзайм», Россия) и 20 мкл воды, затем делили на две аликвоты по 25 мкл и к одной из них добавляли 20 ед. эндонуклеазы рестрикции. После инкубации пробы в течение 1 ч при 37 °С продукты гидролиза разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализировали в трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Содержание РНК ЧИКВ оценивали с использованием метода ПЦР в режиме реального времени по показателю порогового цикла флуоресценции (Ct). Расчет пороговых циклов проводили с использованием программного обеспечения к амплификатору ДТпрайм 5М1 («ДНК-Технология», Россия). Для определения количества копий геном-эквивалентов (ГЭ) был использован калибратор, представляющий собой контрольную плазмиду с известной концентрацией, в полилинкере которой была клонирована последовательность nsP1 ЧИКВ. Расчетная концентрация ГЭ плазмиды составила $10,48 \times 10^{13}$ ГЭ/мл. Данную плазмиду использовали для получения калибровочных образцов путем 10-кратных разведений, начиная с концентрации 10^{10} ГЭ/мл до 10 ГЭ/мл.

¹¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

¹² <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-279-293-table2>

¹³ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-279-293-table3>

Интегрированная с культуральным методом количественная ПЦР в режиме реального времени (ИКМ-кПЦР-РВ). Метод состоял из двух частей. Сначала в культуре клеток Vero проводили два последовательных пассажа ЧИКВ с минимальной MOI, подобранной ранее. Использовали культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см² со сформировавшимся монослоем клеток Vero (в трех повторях). Для адсорбции вируса на клетках флаконы переносили в термостат с температурой 37 °C и 5% CO₂ на 1 ч, затем во флаконы добавляли питательную среду Игла МЕМ с 2% ЭТС в объеме 4 мл. Далее флаконы продолжали инкубировать в термостате при 37 °C и 5% CO₂. Наблюдение за клеточным монослоем проводили ежедневно с помощью микроскопа для оценки появления видимых морфологических изменений в структуре монослоя. На 5 сут все флаконы замораживали при минус 70 °C, после чего размораживали при комнатной температуре и собирали лизат для проведения второй части методики — кПЦР.

Реакцию нейтрализации (РН) проводили для определения вируснейтрализующих АТ по ранее описанной методике [24] с применением 96-луночных планшетов с использованием культуры клеток Vero и штаммов ЧИКВ, ВЭЛ и Синдбис. Для дальнейшей статистической обработки полученные результаты реакции выражали в виде значений логарифмов по основанию 2.

Статистический анализ данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016. Данные представляли в виде среднего значения (*M*) и стандартного отклонения среднего (*SD*). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента с «двумя хвостами» распределения (*t*-test). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости *p* < 0,05. Корреляцию между показателями оценивали по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полноты инактивации вируса Чикунгунья по показателю титра вируса в культуре клеток линии Vero и по значениям пороговых циклов в кПЦР

Специфичность кПЦР. Для определения специфичности метода проводили кПЦР с подобранными праймерами и зондом к гену белка nsP1 ЧИКВ и РНК штаммов вирусов семейств *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* и *Alphaviridae*, как описано в разделе «Материалы и методы». При использовании выбранных праймеров в кПЦР со штаммами вирусов семейств *Flaviviridae* и *Bunyaviridae*

амплификация не происходила, рост флуоресцентного сигнала не регистрировался, так же как и для образца клеток Vero. Для представителей семейства *Alphaviridae* — штаммов вирусов Синдбис и ВЭЛ — увеличения флуоресценции в ходе кПЦР также не регистрировалось. Напротив, при использовании РНК штаммов ЧИКВ, относящихся к разным генотипам, наблюдался рост флуоресцентного сигнала с регистрацией значений порогового цикла $Ct \leq 36$ в зависимости от титра вируса. При электрофоретическом анализе реакционной смеси после ОТ-ПЦР-РВ наблюдали наличие ампликонов, длина которых соответствовала расчетным для ЧИКВ — 218 п.о. Данные результаты подтверждают специфичность выбранных праймеров в отношении всех существующих генотипов ЧИКВ.

Чувствительность кПЦР. Раствор контрольной плазмиды с расчетной концентрацией $10,48 \times 10^{13}$ ГЭ/мл использовали как стандарт, который разводили с 10-кратным шагом начиная с концентрации 10^{10} ГЭ/мл до 10 ГЭ/мл. Известные концентрации данного стандарта соответствовали определенным значениям порогового цикла *Ct*. Введение этого типа контроля позволило построить калибровочный график, представленный на рисунке 1 (опубликован на сайте журнала¹⁴).

Полученный калибровочный график позволяет определить концентрацию ГЭ/мл по значениям полученных пороговых циклов (*Ct*). Однако детекция (*Ct* более 36) наблюдается и при более низких концентрациях ДНК (менее 10^4 ГЭ/мл), что свидетельствует о наличии ДНК в концентрации менее 50 молекул/25 мкл.

Оценка корреляционной зависимости между значением пороговых циклов РНК кПЦР и титром вируса Чикунгунья в культуре клеток Vero. Для анализа корреляции между значениями проводили исследование в динамике. На основании ранее опубликованных данных была выбрана доза ЧИКВ, которая вызывала полное разрушение монослоя клеток Vero в течение 72 ч — 0,00001 MOI на клетку [29]. В ходе исследования проводили заражение вирусом ЧИКВ монослоя клеток Vero и дальнейший отбор образцов культуральной вирусосодержащей жидкости через 2, 4, 8, 12, 24, 32, 36 и 48 ч, в которых определяли содержание ЧИКВ титрованием на линии клеток Vero и количества РНК ЧИКВ методом кПЦР.

Через 12 ч после заражения было отмечено появление признаков цитопатического действия ЧИКВ. Далее через 24 ч регистрировали

¹⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-279-293-fig1>

нарушение клеточного монослоя до 25%, через 36 ч — до 50%, а через 48 ч монослой был разрушен более чем на 75%, в связи с чем дальнейшие наблюдения не проводились. Результаты определения титра ЧИКВ на линии клеток Vero и количества РНК ЧИКВ методом кПЦР представлены в *таблице 4*.

Инфекционный титр ЧИКВ в культуральной жидкости (*табл. 4*) достоверно увеличивался после 12 ч и достиг максимума через 32 ч с сохранением на данном уровне до конца периода наблюдений. Отсутствие увеличения титра вируса после 32 ч может быть объяснено разрушением клеток Vero, то есть уменьшением субстрата для размножения ЧИКВ. Динамика показателя *St* имела сходную тенденцию — после 12 ч значения *St* уменьшились, что свидетельствовало об увеличении количества РНК ЧИКВ в исследуемых образцах.

Между значениями *St*, полученными методом кПЦР, и титром ЧИКВ в культуре клеток Vero установлена прямая сильная корреляция ($r=0,987$). Между значениями логарифма концентрации РНК, выраженной в ГЭ/мл, и титром ЧИКВ в культуре клеток Vero выявлена прямая сильная корреляционная зависимость ($r=0,991$). Таким образом, метод кПЦР позволяет получать достоверную информацию о количестве РНК

ЧИКВ, которое положительно и сильно коррелирует с титром ЧИКВ в культуре клеток.

Сравнение результатов анализа полноты инаktivации вируса Чикунгунья в культуре клеток Vero и кПЦР. Для оценки чувствительности обоих методов проводили заражение монослоя клеток Vero разными дозами вируса ЧИКВ. Множественность заражения составляла: MOI_1 — $1:10^6$ клеток; MOI_2 — $1:10^7$ клеток; MOI_3 — $1:10^8$ клеток. При заражении в дозах MOI_1 и MOI_2 через 48 ч отмечено нарушение монослоя >75% и наблюдение было остановлено (конец срока наблюдения). Собранные в конце этого срока образцы вирусосодержащей культуральной жидкости использовали для определения титра ЧИКВ в культуре клеток и количества РНК ЧИКВ методом кПЦР. В результате были получены данные, представленные в *таблице 5*. При отсутствии очевидной разницы при оценке цитопатического эффекта *ad oculus* титрование ЧИКВ в культуре клеток Vero выявило достоверную разницу между содержанием ЧИКВ при заражении клеточного монослоя в дозах MOI_1 и MOI_2 ($p<0,05$). При использовании дозы MOI_3 в двух последовательных пассажах в течение 5 сут цитопатического эффекта в монослое клеток Vero не отмечали, и наблюдение было остановлено (конец срока наблюдения).

Таблица 4. Динамика изменения количества РНК вируса Чикунгунья (ЧИКВ), определяемого методом ОТ-кПЦР, и титра вируса, регистрируемого после заражения монослоя клеток линии Vero

Table 4. Time course of changes in the amount of Chikungunya virus (CHIKV) RNA determined by RT-qPCR and the CHIKV titre determined in a monolayer of Vero cells after infection

Время, ч <i>Time, h</i>	Результат ОТ-кПЦР ЧИКВ <i>CHIKV RT-qPCR results</i>		Титр ЧИКВ, lg TCID ₅₀ /мл <i>CHIKV titre, log₁₀ TCID₅₀/mL</i>
	Пороговый цикл флуоресценции, <i>St</i> <i>Fluorescence threshold cycle, Ct</i>	Количество РНК, lg [ГЭ/мл] <i>Quantity of RNA, log₁₀ [GE/mL]</i>	
0*	28,5±0,306	3,774±0,100	3,300±0,069
2	35,3±0,862	1,743±0,252	0,750±0,012
4	35,4±0,208	1,717±0,058	0,772±0,017
8	34,0±0,115	2,125±0,058	1,930±0,348
12	29,0±0,808*	3,626±0,252	4,156±0,089*
24	16,9±0,321*	7,174±0,058*	7,428±0,023*
32	12,9±0,153*	8,390±0,000*	8,504±0,067*
36	12,6±0,208*	8,478±0,058*	8,600±0,127*
48	11,8±0,200*	8,708±0,252*	8,350±0,144*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. * — данные на 0 ч представляют собой инфекционный титр ЧИКВ ($3,300\pm0,069$ lg TCID₅₀/мл), который был использован для заражения монослоя клеток линии Vero; * — $p\leq0,05$ относительно данных на 0 ч. TCID₅₀ — тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток; ГЭ — геном-эквивалент. Данные в таблице представлены в виде $M\pm SD$.

Note. * The data at Hour 0 represent the infectious CHIKV titre ($3,300\pm0,069$ log₁₀ TCID₅₀/mL) used for infecting Vero cell monolayer cultures. * $p\leq0,05$ (in comparison with the data at Hour 0). TCID₅₀, tissue culture infective dose causing 50% cell death; GE, genome equivalent. Data are presented as $M\pm SD$.

Таблица 5. Количество РНК вируса Чикунгунья (ЧИКВ), определяемое методом ОТ-кПЦР, и титр ЧИКВ, регистрируемый в клетках линии Vero в вируссодержащих образцах после заражения монослоя клеток Vero разными дозами ЧИКВ
Table 5. Chikungunya virus (CHIKV) RNA measurements by RT-qPCR and the CHIKV titre in virus-containing samples determined after infection of Vero cell monolayer cultures with different doses of CHIKV

Номер образца <i>Sample number</i>	Характеристика образца (1 мл) <i>Sample description (1 mL)</i>			
	Доза заражения* <i>Infectious dose*</i>	Титр ЧИКВ, lg ТЦД ₅₀ /мл <i>CHIKV titre, log₁₀ TCID₅₀/mL</i>	Результат ОТ-кПЦР ЧИКВ <i>CHIKV RT-qPCR results</i>	
			Пороговый цикл флуоресценции, Ct <i>Fluorescence threshold cycle, Ct</i>	Количество РНК, lg [ГЭ/мл] <i>Quantity of RNA, log₁₀ [GE/mL]</i>
1	MOI ₁	8,725±0,125	11,46±0,200	8,8±0,100
2	MOI ₂	7,975±0,067*	13,20±0,153**	8,3±0*
3	MOI ₃	1 пассаж <i>Passage 1</i>	≤1	33,06±0,251
4		2 пассаж <i>Passage 2</i>	Отсутствует <i>Not present</i>	35,10±0,200***
				1,8±0,306****

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. MOI — множественность заражения; ТЦД₅₀ — тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток; ГЭ — геном-эквивалент. * — MOI₁ — 1:10⁶ клеток; MOI₂ — 1:10⁷ клеток; MOI₃ — 1:10⁸ клеток. * — $p < 0,05$ относительно образца MOI₁; ** — $p < 0,003$ относительно образца MOI₁; *** — $p < 0,005$ относительно образца MOI₃ в 1 пассаже; **** — $p < 0,02$ относительно образца MOI₃ в 1 пассаже. Данные в таблице представлены в виде $M \pm SD$.

Note. MOI, multiplicity of infection; TCID₅₀, tissue culture infective dose causing 50% cell death; GE, genome equivalent. * MOI₁ = 1:10⁶ cells, MOI₂ = 1:10⁷ cells, and MOI₃ = 1:10⁸ cells. * $p < 0.05$ (in comparison with MOI₁), ** $p < 0.003$ (in comparison with MOI₁), *** $p < 0.005$ (in comparison with MOI₃ at Passage 1), **** $p < 0.02$ (in comparison with MOI₃ at Passage 1). Data are presented as $M \pm SD$.

При титровании образца ЧИКВ, полученного после первого пассажа при использовании дозы MOI₃, в первом разведении в одной из лунок под микроскопом отметили изменение клеток без очевидного цитопатического эффекта. Данный результат оценили как сомнительный. При проведении второго пассажа нарушений монослоя не выявили, а при титровании образца на клетках Vero титр ЧИКВ не был определен и результат был расценен как отрицательный.

При сравнении соответствующих значений Ct в образцах, собранных после заражения клеточного монослоя дозами MOI₁ и MOI₂, разница также была достоверной, но более значимой ($p < 0,003$), чем между соответствующими титрами ЧИКВ. Данный факт позволил предположить, что метод кПЦР является более чувствительным. Падение содержания РНК ЧИКВ во 2 пассаже относительно 1 пассажа при заражении монослоя дозой MOI₃ можно объяснить разведением образца. При этом разница в показателях Ct была статистически достоверна. При сравнении количества геном-эквивалентов (ГЭ/мл) образцов, собранных после заражения дозами MOI₂ и MOI₁, разница была достоверна ($p < 0,05$). Для образца, полученного при дозе MOI₃, количество геном-эквивалентов в образцах 2 пассажа было достоверно ниже, чем в образце 1 пассажа ($p < 0,02$). Таким образом, проведение двух пассажей вируссодержащей культуральной жидкости с последующим исследованием образцов методом

кПЦР и их сравнением между собой позволило подтвердить отсутствие репликации ЧИКВ.

Далее в основном эксперименте исследовали полноту инактивации ЧИКВ в образцах, указанных в таблице 1. Наблюдение за монослоем продолжали в течение 5 сут. Результаты исследования данных образцов вируссодержащей культуральной жидкости представлены в таблице 6.

В образце вируссодержащей культуральной жидкости, полученном до инактивации β-пропиолактоном, выявлен цитопатический эффект, определен титр ЧИКВ, зарегистрированы показатель Ct и количество геном-эквивалентов (табл. 6). В образцах, полученных после применения β-пропиолактона, при заражении монослоя клеток Vero как при первом, так и при втором пассаже цитопатического эффекта не выявлено. При этом показатель Ct увеличился, а количество геном-эквивалентов уменьшилось. Объяснить данный факт можно следующим образом. Инактивированный препарат в любом случае имеет вирусную РНК, однако при последовательных пассажах происходит разведение образца, содержащего РНК ЧИКВ, и, соответственно, пороговые циклы регистрируются позже. Разница между показателем Ct до инактивации и после инактивации ЧИКВ статистически достоверна ($p < 0,0005$). Количество геном-эквивалентов до инактивации и после инактивации также статистически достоверно уменьшается ($p < 0,0005$).

Таблица 6. Количество РНК вируса Чикунгунья (ЧИКВ), определяемого методом ОТ-кПЦР, и титр ЧИКВ, регистрируемый в клетках линии Vero в образцах вирусосодержащей культуральной жидкости (1 мл), собранных на разных технологических этапах
Table 6. Chikungunya virus (CHIKV) RNA measurements by RT-qPCR and CHIKV titre determined in Vero cells using virus-containing culture fluid samples (1 mL) collected at different stages of vaccine production

Номер образца <i>Sample number</i>	Описание образца <i>Sample description</i>	Титр ЧИКВ, lg ТЦД ₅₀ /мл <i>CHIKV titre, log₁₀ TCID₅₀/mL</i>	Результат ОТ-кПЦР ЧИКВ <i>CHIKV RT-qPCR results</i>	
			Пороговый цикл флуоресценции, Ct <i>Fluorescence threshold cycle, Ct</i>	Количество РНК, lg [ГЭ/мл] <i>Quantity of RNA, log₁₀ [GE/mL]</i>
1	Вирусосодержащая культуральная жидкость до инактивации β-пропиолактоном <i>Virus-containing culture fluid before β-propiolactone inactivation</i>	7,628±0,067	14,80±0,200	7,829±0,021
2	Вирусосодержащая культуральная жидкость после инактивации β-пропиолактоном <i>Virus-containing culture fluid after β-propiolactone inactivation</i>	Без нарушения монослоя <i>No cell monolayer disruption</i>	21,10±0,320*	5,952±0,042*
3	Вирусосодержащая культуральная жидкость после 1 пассажа образца № 2 на клетках Vero <i>Virus-containing culture fluid after Passage 1 of Sample 2 in Vero cells</i>	Без нарушения монослоя <i>No cell monolayer disruption</i>	26,10±0,610**	4,488±0,146**
4	Вирусосодержащая культуральная жидкость после 2 пассажа образца № 2 на клетках Vero <i>Virus-containing culture fluid after Passage 2 of Sample 2 in Vero cells</i>	Без нарушения монослоя <i>No cell monolayer disruption</i>	30,50±0,208**	3,099±0,105**
5	Суспензия клеток Vero <i>Vero cell suspension</i>	Не приемлемо <i>Not applicable</i>	≥40	Отсутствует <i>Not present</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ТЦД₅₀ — тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток; ГЭ — геном-эквивалент. * — $p < 0,0005$ относительно образца № 1; ** — $p < 0,005$ относительно предыдущего образца. Данные в таблице представлены в виде $M \pm SD$.
Note. TCID₅₀, tissue culture infective dose causing 50% cell death; GE, genome equivalent. * $p < 0.0005$ (in comparison with Sample 1), ** $p < 0.005$ (in comparison with the previous sample). Data are presented as $M \pm SD$.

В случае неполной инактивации β-пропиолактоном ЧИКВ происходило бы накопление вирусной РНК в течение 5 сут наблюдения за монослоем и, соответственно, флуоресценция появлялась бы раньше, при этом показатель Ct уменьшался, а количество геном-эквивалентов увеличивалось. Данных изменений в эксперименте не отмечали.

Таким образом, при контроле полноты инактивации в случае отрицательного или сомнительного результата *in vitro* проведение кПЦР дает дополнительную информацию для подтверждения отсутствия инфекционного вируса. Данный метод также исключает получение ложноположительных результатов, так как накопление РНК происходит только за счет инфекционного вируса. Применение метода ИКМ-кПЦР-РВ с проведением как минимум двух пассажей вирусосодержащего образца в комбинации с кПЦР является убедительно информативным и специфичным, что особенно важно в случае неоднозначных результатов при использовании метода *in vitro*. Большинство исследователей отмечают, что длительность пассирования исследуемых образцов должна

быть оптимальной, чтобы вирусные частицы, при их наличии, имели возможность достаточно размножиться, чтобы тем самым повысить чувствительность метода [10, 27].

В качестве альтернативного традиционному культуральному методу данный метод предложен для детекции инфекционного аденовируса после дезинфекции ультрафиолетовым облучением [28]. Безусловно, метод требует тщательной валидации для получения данных по показателям Ct, которые бы однозначно подтверждали отсутствие размножения вируса (после инактивации) в образцах после пассажей на чувствительной линии клеток.

Подтверждение подлинности штамма вируса Чикунгунья Nika21 с использованием реакции нейтрализации и ОТ-ПЦР-ПДРФ

Реакция нейтрализации. РН рекомендована для подтверждения подлинности вакцинных штаммов. Специфичность РН оценивали на примере штамма ЧИКВ Nika21 с использованием охарактеризованных образцов сывороток, в том числе специфических. Результаты проведения РН представлены в *таблице 7*. Максимальные

Таблица 7. Результаты реакции нейтрализации (РН) с использованием образцов сывороток и вирусов Чикунгунья (ЧИКВ), ВЭЛ и Синдбис
Table 7. Results of virus neutralisation (VN) assays using serum samples and Chikungunya (CHIKV), Venezuelan Equine Encephalitis (VEE), and Sindbis viruses

Вирус, использованный в РН <i>Viruses used in VN assays</i>	Результаты РН, полученные при использовании образцов сывороток в группах* <i>VN assay results for the following groups of serum samples*</i>			
	Образцы сывороток группы «ЧИКВ» <i>CHIKV group</i> <i>n=5</i>	Образцы сывороток группы «ВЭЛ» <i>VEE group</i> <i>n=5</i>	Образцы сывороток группы «Синдбис» <i>Sindbis group</i> <i>n=5</i>	Образцы сывороток группы «Контроль»** <i>Control group**</i> <i>n=5</i>
ЧИКВ <i>CHIKV</i>	6,40±0,18*	4,60±0,18	4,00±0,38	1,80±0,18*
ВЭЛ <i>VEE</i>	3,80±0,38	5,20±0,38*	3,60±0,18	1,40±0,38*
Синдбис <i>Sindbis</i>	3,20±0,18	2,80±0,18	4,60±0,18*	1,80±0,18*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. *n* – количество образцов сывороток в группе; * – образцы сывороток, содержащих только антитела к ЧИКВ (группа «ЧИКВ»), антитела к вирусу ВЭЛ (группа «ВЭЛ»), антитела к вирусу Синдбис (группа «Синдбис»); ** – образцы сывороток здоровых добровольцев, не содержащих антитела к ЧИКВ, ВЭЛ и вирусу Синдбис; * – *p*<0,05 относительно остальных групп сывороток. Данные в таблице представлены в виде значений $\log_2$ (*M*±*m*).
Note. *n*, number of serum samples per group. The samples marked with * contained antibodies only to CHIKV (CHIKV group), VEE (VEE group), or Sindbis (Sindbis group), and the samples marked with ** were obtained from healthy volunteers and contained no IgG against CHIKV, VEE, or Sindbis viruses. * *p*<0.05 (in comparison with other groups of sera). Data are presented as $\log_2$ (*M*±*m*).

показатели, ожидаемо, наблюдали в РН с образцами специфических сывороток. Минимальные показатели отмечены в реакции с образцами сыворотки группы «Контроль».

Образцы специфических сывороток группы «ЧИКВ» оказывали вирус-нейтрализующее действие по отношению к каждому из использованных в эксперименте вирусов семейства *Alphaviridae*, хотя титр антител к ЧИКВ достоверно (*p*<0,001) превосходил этот показатель в отношении вирусов Синдбис и ВЭЛ. Аналогичная ситуация наблюдалась и для образцов сывороток других групп. Таким образом, выявлено наличие разной степени серологического перекреста между использованными в эксперименте вирусами *Alphaviridae*, то есть сыворотка, обладающая вируснейтрализующей активностью в отношении одного альфа-вируса, проявляла перекрестную реакцию нейтрализации с другим альфа-вирусом. Данный факт ограничивает возможность применения РН для подтверждения подлинности штамма ЧИКВ в нашем эксперименте. Результатом проведенного анализа может быть только факт подтверждения принадлежности исследуемого вируса к семейству альфа-вирусов.

Полученные результаты не противоречат ранее опубликованным данным о наличии серологического перекреста между представителями альфа-вирусов: Чикунгунья-Синдбис, ВЭЛ-Синдбис, Чикунгунья-ВЭЛ [21, 29, 30]. Данный феномен не позволяет при применении

РН подтвердить конкретный вирусный штамм, но подтверждает принадлежность конкретного штамма вируса к семейству. Ранее этот феномен был продемонстрирован для парамиксовирусов и матонавирусов [12, 13, 15].

Подтверждение подлинности штамма вируса Чикунгунья Nika21 методом ОТ-ПЦР-ПДРФ. Из всех отобранных образцов (табл. 1) выделяли РНК, проводили ОТ-ПЦР и полученный продукт «обрабатывали» рестриктазой DraI. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Все полученные в реакции ОТ-ПЦР продукты (расчетной длиной 218 п.о.) подверглись гидролизу рестриктазой DraI с образованием ожидаемых фрагментов – 133 и 85 п.о. (рис. 2, табл. 3). В образцах клеток Vero (отрицательный контроль) ни один фрагмент не был амплифицирован. Таким образом, подлинность штамма Nika21 (генотип ECSA) подтверждена на всех этапах получения готового адсорбированного антигена.

Генотипирование является единственным способом отличить вакцинные штаммы от вирусов дикого типа. Это становится особенно критичным во время вспышки вакциноуправляемых инфекций, а также в случае исследования поствакцинальных осложнений. Генотипирование можно проводить с применением метода ОТ-ПЦР-ПДРФ, который является быстрым, эффективным и информативным. Метод ОТ-ПЦР-ПДРФ, разработанный для подтверждения подлинности вакцинного штамма, может быть эффективно использован с целью

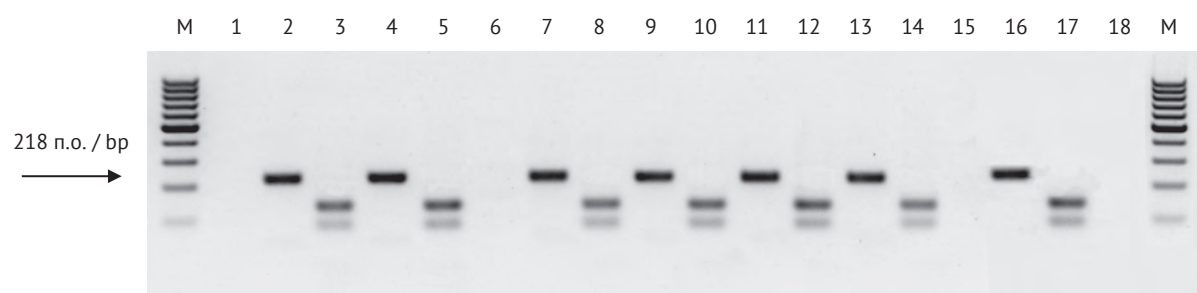


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Электрофоретический анализ гидролизованых рестриктазой Dral ПЦР-продуктов, полученных в результате амплификации нуклеиновых кислот, выделенных из образцов, содержащих и не содержащих РНК вируса Чикунгунья (ЧИКВ), штамм Nika21. Дорожки на электрофореграмме: М — ДНК-маркер 100 п.о.; 1, 6 — лизат клеток Vero; 2 — ампликон ЧИКВ до инактивации β-пропиолактоном; 3 — результат гидролиза Dral ампликона ЧИКВ до инактивации β-пропиолактоном; 4 — ампликон ЧИКВ после инактивации β-пропиолактоном; 5 — результат гидролиза Dral ампликона ЧИКВ после инактивации β-пропиолактоном; 7 — ампликон инактивированного ЧИКВ после 1 пассажа на клетках Vero; 8 — результат гидролиза Dral ампликона, инактивированного ЧИКВ после 1 пассажа на клетках Vero; 9 — ампликон инактивированного ЧИКВ после 2 пассажа на клетках Vero; 10 — результат гидролиза Dral ампликона, инактивированного ЧИКВ после 2 пассажа на клетках Vero; 11 — ампликон инактивированного ЧИКВ до сорбции; 12 — результат гидролиза Dral ампликона, инактивированного ЧИКВ до сорбции; 13 — ампликон, полученный при десорбции инактивированного ЧИКВ; 14 — результат гидролиза Dral ампликона, полученного при десорбции инактивированного ЧИКВ; 15 — отрицательный контроль выделения; 16 — К+ ПЦР (плазмиды); 17 — К+ ПЦР (Dral); 18 — отрицательный контрольный образец.

Fig. 2. Electrophoretic analysis of Dral-cleaved PCR products obtained by amplification of nucleic acids isolated from samples containing or not containing RNA of the Chikungunya virus (CHIKV) Nika21 strain. Electropherogram lanes: M, DNA marker of 100 bp; 1 and 6, Vero cell lysate; 2, CHIKV amplicon before β-propiolactone inactivation; 3, Dral-cleaved CHIKV amplicon before β-propiolactone inactivation; 4, CHIKV amplicon after β-propiolactone inactivation; 5, Dral-cleaved CHIKV amplicon after β-propiolactone inactivation; 7, amplicon of inactivated CHIKV after Passage 1 in Vero cells; 8, Dral-cleaved amplicon of inactivated CHIKV after Passage 1 in Vero cells; 9, amplicon of inactivated CHIKV after Passage 2 in Vero cells; 10, Dral-cleaved amplicon of inactivated CHIKV after Passage 2 in Vero cells; 11, amplicon of inactivated CHIKV before adsorption; 12, Dral-cleaved amplicon of inactivated CHIKV before adsorption; 13, amplicon obtained by desorption of inactivated CHIKV; 14, Dral-cleaved amplicon obtained by desorption of inactivated CHIKV; 15, negative control for isolation; 16, positive control PCR (plasmid); 17, positive control PCR (Dral); 18, negative control sample.

дискриминации вакцинного штамма от дикого, как, например, было предложено для вируса паротита [15]. Этот же метод был успешно применен для дискриминации вакцинного штамма ветеринарного препарата при расследовании эпидемии вируса птичьего ларинготрахеита [31].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что молекулярно-генетические методы, в частности ОТ-ПЦР в реальном времени и с электрофоретической детекцией, и метод ПДРФ могут быть применены для контроля подлинности штамма на любых этапах производства инактивированных вакцин. Комбинированный метод ОТ-ПЦР-ПДРФ позволяет отнести исследуемый вирус к конкретному штамму и таким образом подтвердить его принадлежность именно к вакцинному штамму. Указанный метод также позволяет дополнительно оценить полноту сорбции антигена в вакцине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При контроле качества технологических этапов производства вакцин критично не только время проведения анализов, но и достоверность полученных результатов. В данном исследовании продемонстрированы возможности и преимущества применения интегрированной с культуральным методом количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени для оценки полноты инактивации антигена вакцинного штамма, а также метода обратной транскрипции — ПЦР с последующей оценкой полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для подтверждения подлинности штамма вируса. Используемые методы показали себя как более чувствительные и быстрые относительно культуральных методов, также продемонстрирована возможность их применения на любых этапах технологического процесса производства инактивированных вакцин.

Литература/References

- Correia Moreira BL, Aparecida Pereira L, Lappas Gimenez AP, Fernandes Inagaki JM, Raboni SM. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for the quantification of rabies virus as quality control of inactivated rabies vaccines. *J Virol Methods*. 2019;270:46–51. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.025>
- Correia Moreira BL, Gimenez APL, Inagaki JMF, Raboni SM.

Inactivated rabies vaccines: Standardization of an *in vitro* assay for residual viable virus detection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(3):e0008142. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008142>

- Zhou J, Ji G, Wen JN, Li J, Sheng W, Guo ZQ, et al. Effective inactivation test of inactivated hepatitis A vaccine using integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-poly-

- merase chain reaction. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2008;22(6):488–91 (In Chinese). PMID: 19544655
4. Sundaram AK, Ewing D, Liang Z, Jani V, Cheng Y, Sun P, et al. Immunogenicity of adjuvanted psoralen-inactivated SARS-CoV-2 vaccines and SARS-CoV-2 spike protein DNA vaccines in BALB/c mice. *Pathogens*. 2021;10(5):626. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050626>
5. Li D, Gu AZ, Yang W, He M, Hu X-H, Shi H-C. An integrated cell culture and reverse transcription quantitative PCR assay for detection of infectious rotaviruses in environmental waters. *J Microbiol Methods*. 2010;82(1):59–63. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.003>
6. Gallagher EM, Margolin AB. Development of an integrated cell culture—real-time RT-PCR assay for detection of reovirus in biosolids. *J Virol Methods*. 2007;139(2):195–202. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.10.001>
7. Reynolds KA. Integrated cell culture/PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. *Methods Mol Biol*. 2004;268:69–78. <https://doi.org/10.1385/1-59259-766-1:069>
8. Huang Y, Xiao S, Song D, Yuan Z. Efficacy of disinfectants for inactivation of Ebola virus in suspension by integrated cell culture coupled with real-time RT-PCR. *J Hosp Infect*. 2022;125:67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.04.008>
9. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *Virol J*. 2009;6:149. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-149>
10. Guo X, Wang S, Zhao CL, Li JW, Zhong JY. An integrated cell absorption process and quantitative PCR assay for the detection of the infectious virus in water. *Sci Total Environ*. 2018;635:964–71. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.223>
11. Blackmer F, Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL. Use of integrated cell culture-PCR to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(5):2267–8. <https://doi.org/10.1128/aem.66.5.2267-2268.2000>
12. Игнатьев ГМ, Отрашевская ЕВ, Суханова ЛЛ, Сидоренко ЕС, Нетесова НА. Молекулярно-генетическое исследование штамма RA-27/3, используемого для производства вакцины против краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;(4):38–46. Ignatyev GM, Atrashevskaia EV, Suchanova LL, Sidorenko ES, Netesova NA. Molecular-genetic study of the RA-27/3 strain used for production of rubella vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(4):38–46 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-38-46>
13. Игнатьев ГМ, Отрашевская ЕВ, Суханова ЛЛ, Сидоренко ЕС, Нетесова НА. Молекулярно-генетическое исследование штамма Ленинград-16, используемого для производства вакцины кори. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;(2):182–9. Ignatyev GM, Atrashevskaia EV, Sukhanova LL, Sidorenko ES, Netesova NA. Molecular genetic analysis of the strain Leningrad-16 used for the production of measles vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;(2):182–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-182-189>
14. Loparev VN, Argaw T, Krause PR, Takayama M, Schmid DS. Improved identification and differentiation of varicella-zoster virus (VZV) wild-type strains and an attenuated varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3156–60. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.9.3156-3160.2000>
15. Кулак МВ, Белагин ПА, Нетесова НА, Юнаслова ТН, Голикова ЛН, Бектемиров ТА, Игнатьев ГМ. Дифференциация вакцинного штамма Л-3 от других штаммов вируса паротита методом ОТ-ПЦР. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2008;(4):7–10. Kulak MV, Belagin PA, Netesova NA, Yunasova TN, Golikova LN, Bektemirov TA, Ignatyev GM. Differentiation of the vaccine strain L-3 from other strains of the mumps virus by RT-PCR. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2008;(4):7–10 (In Russ.). EDN: SATPMF
16. Игнатьев ГМ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мосолова СВ, Мефед КМ и др. Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтвержде-
- ние подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):107–15. Ignatyev GM, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mosolova SV, Mefed KM, et al. Molecular genetic testing of stability and identification of Vnukovo-32 strain used for production of the cultural concentrated purified inactivated dry rabies vaccine. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):107–15 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-107-115>
17. Отрашевская ЕВ, Трухин ВП, Меркулов ВА, Игнатьев ГМ. Прогресс в разработке вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья и перспективы появления на рынке. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):42–64. Otrasheuskaja EV, Trukhin VP, Merkulov VA, Ignatyev GM. Chikungunya vaccines: advances in the development and prospects for marketing approval. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):42–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-42-64>
18. 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>
19. 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>
20. 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>
21. Отрашевская ЕВ, Казакова ЕВ, Жиренкина ЕН, Трухин ВП, Игнатьев ГМ. Ретроспективный серологический анализ распространения флавивирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа — авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):215–24. Atrasheuskaya EV, Kazakova EV, Zhirenkina EN, Trukhin VP, Ignatyev GM. The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua—virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(2):215–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>
22. Лукин ЕП, Черникова НК. Продолжительность гуморального поствакцинального и постинфекционного иммунитета к вирусу везнулезского лошадиного энцефаломиелита. *Вопросы вирусологии*. 1993;(2):71–4. Lukin EP, Chernikova NK. Duration of humoral postvaccinal and postinfectious immunity to Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Problems of Virology*. 1993;(2):71–4 (In Russ.).
23. Каа КВ, Игнатьев ГМ, Синюгина АА, Ишмухаметов АА. Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья и подбор метода наработки вирусного материала в промышленных объемах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):11–20. Каа КВ, Игнатьев ГМ, Синюгина АА, Ишмухаметов АА. 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):11–20 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>
24. Игнатьев ГМ, Каа КВ, Антонова ЛП, Отрашевская ЕВ, Ишмухаметов АА. Иммуногенные свойства препарата, содержащего инактивированный β-пропиолактоном антиген вируса Чикунгунья. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;(5):519–27. Ignatyev GM, Kaа KV, Antonova LP, Atrasheuskaya EV, Ishmukhametov AA. Immunogenic properties of the preparation containing the Chikungunya virus antigen inactivated by β-propiolactone. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;(5):519–27 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-159>

25. Оксанич АС, Красько АГ, Самарцева ТГ, Гасич ЕЛ, Игнатьев ГМ. Применение количественного иммуноферментного анализа для определения концентрации S-антигена в цельновирионных инактивированных адсорбированных коронавиральных вакцинах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):403–15.
26. Frollov I, Frollova EI. Molecular virology of Chikungunya virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2022;435:1–31.
27. Ryu H, Schrantz KA, Brinkman NE, Boczek LA. Applicability of integrated cell culture reverse transcriptase quantitative PCR (ICC-RTqPCR) for the simultaneous detection of the four human enteric enterovirus species in disinfection studies. *J Virol Methods*. 2018;258:35–40.
28. Ryu H, Cashdollar JL, Fout G, Schrantz KA, Hayes S. Applicability of integrated cell culture quantitative PCR (ICC-qPCR) for the detection of infectious adenovirus type 2 in UV disinfection studies. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2015;50(8):777–87.
29. Paessler S, Weaver SC. Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 4:D80–5.
30. Ryder S, Perez M, Avila J, Briceno A. Detección de anticuerpos al virus de la encefalitis equina venezolana en equinos de los Distritos Mara y Paez de la Guajira Venezolana. 1984. I. Evaluación prevacuna. *Investigación Clínica*. 2013;28(4).
31. Kim HR, Kang MS, Kim MJ, Lee HS, Kwon YK. Restriction fragment length polymorphism analysis of multiple genome regions of Korean isolates of infectious laryngotracheitis virus collected from chickens. *Poult Sci*. 2013;92(8):2053–8.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Оксанич** — дизайн, разработка и проведение молекулярно-биологических исследований, написание и критический анализ текста рукописи; **Т.Г. Самарцева** — проведение экспериментальных исследований, подготовка текста рукописи; **К.В. Каа** — участие в экспериментальных исследованиях; анализ результатов исследований; **Е.В. Отрашевская** — анализ и интерпретация результатов исследований; статистическая обработка данных; написание текста рукописи; **А.Г. Красько** — проведение экспериментальных исследований; анализ и обобщение результатов исследований; **А.Г. Лапутина** — участие в экспериментальных исследованиях; **Н.А. Нетесова** — обоснование концепции исследования, обобщение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** — обоснование концепции исследования, разработка дизайна исследования, проведение экспериментальных работ, написание и редактирование текста рукописи.

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены: таблица 2, 3, рисунок 1.

Об авторах / Authors

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук / Alexey S. Oksanich, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Самарцева Татьяна Геннадьевна / Tatiana G. Samartseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Каа Константин Владимирович / Konstantin V. Kaa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>

Отрашевская Елена Викторовна / Elena V. Otrashesvskaia

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

Красько Анатолий Геннадиевич, канд. мед. наук / Anatoli G. Krasko, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2765-3525>

Лапутина Армине Германовна / Armine G. Laputina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7527-6951>

Нетесова Нина Александровна, д-р биол. наук / Nina A. Netesova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9896-5403>

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф. / George M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof.

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

Поступила 18.04.2024

После доработки 02.09.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Received 18 April 2024

Revised 2 September 2024

Accepted 12 September 2024



Иммуногенность различных вариантов гена гликопротеина вирусов Эбола и Марбург в составе рекомбинантных аденовирусных векторов

Т.А. Ожаровская[✉], О.В. Зубкова, О. Попова, А.В. Ковыршина, П.П. Голдовская, И.В. Вавилова, И.В. Должикова, Е.И. Ермолова, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжова, О.Л. Воронина, Д.Н. Щербинин, Д.В. Щебляков, Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург

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

✉ Ожаровская Татьяна Андреевна; t.ozh@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Вирусы Марбург и Эбола вызывают тяжелую геморрагическую лихорадку у людей и приматов. В настоящее время не зарегистрированы вакцины для одновременной профилактики вызываемых этими филовир username заболеваний, способные предотвратить распространение заболевания или снизить его тяжесть. Исследования, направленные на выбор наиболее иммуногенной формы протективного антигена, являются необходимым этапом при разработке эффективных профилактических вакцин.

ЦЕЛЬ. Оценка индукции гуморального иммунного ответа на введение животным рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих различные формы гликопротеина вирусов Эбола и Марбург.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Рекомбинантные аденовирусы человека 5 серотипа получали методом гомологичной рекомбинации в клетках *Escherichia coli*. Культивирование аденовирусов проводили в культуре клеток HEK293 с последующей очисткой методом ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности цезия хлорида. Полученные препараты аденовирусов были охарактеризованы на подлинность методом ПЦР и полногеномным секвенированием; по количеству вирусных частиц (спектрофлуориметрия) и инфекционных вирусных частиц (метод ТЦД₅₀). Оценку титра гликопротеин-специфических IgG антител в сыворотке крови иммунизированных животных (мыши) проводили методом иммуноферментного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Получены рекомбинантные аденовирусы человека 5 серотипа, содержащие в своем геноме кассету с одной из форм гена гликопротеина, кодирующего полноразмерный гликопротеин (GP), GP с удаленным муциноподобным доменом, GP с удаленными гликановым кэпом и муциноподобным доменом. Каждую из форм изучали на примере GP четырех представителей филовир username: вируса Эбола видов Заир, Судан, Бундибугио и вируса Марбург. Показано, что форма GP не оказывает критического влияния на репликативную способность рекомбинантного аденовируса. Установлено, что через 3 нед. после иммунизации наибольший уровень продукции антиген-специфических антител вызывают аденовирусы, кодирующие полноразмерный GP и GP с удаленным муциноподобным доменом. Вне зависимости от вида филовир username антиген, представленный GP с удаленными гликановым кэпом и муциноподобным доменом, оказался наименее иммуногенным.

ВЫВОДЫ. Наиболее перспективными для разработки филовир username вакцин на основе рекомбинантных аденовирусных векторов являются конструкции, включающие ген полноразмерного GP и GP с удаленным муциноподобным доменом.

Ключевые слова: иммуногенность; варианты гена гликопротеина; вирус Эбола; вирус Марбург; аденовирус человека 5 серотипа; рекомбинантные аденовирусные векторы; болезнь, вызванная вирусом Эбола; болезнь, вызванная вирусом Марбург; гуморальный иммунный ответ

Для цитирования: Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Попова О., Ковыршина А.В., Голдовская П.П., Вавилова И.В., Должикова И.В., Ермолова Е.И., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Воронина О.Л., Щербинин Д.Н., Шебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Иммуногенность различных вариантов гена гликопротеина вирусов Эбола и Марбург в составе рекомбинантных аденовирусных векторов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):294–311. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Разработка пан-филовирусной вакцины (для профилактики болезни, вызванной вирусом Эбола, и геморрагической лихорадки Марбург)» (рег. номер АААА-А20-120022890039-0).

Потенциальный конфликт интересов. А.Л. Гинцбург и Д.Ю. Логунов являются членами редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 и 2024 г. соответственно. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Immunogenicity of various variants of Ebola and Marburg virus glycoprotein genes in recombinant adenoviral vectors

Tatiana A. Ozharovskaia ✉, Olga V. Zubkova, Olga Popova, Anna V. Kovyrshina, Polina P. Goldovskaya, Irina V. Vavilova, Inna V. Dolzhikova, Ekaterina I. Ermolova, Marina S. Kunda, Natalia N. Ryzhova, Olga L. Voronina, Dmitry N. Shcherbinin, Dmitry V. Shcheblyakov, Denis Y. Logunov, Alexander L. Gintsburg

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

✉ Tatiana A. Ozharovskaia; t.ozh@yandex.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Marburg and Ebola viruses cause severe haemorrhagic fever in humans and primates. Currently, there are no licensed prophylactic vaccines that can simultaneously prevent the spread or reduce the severity of both diseases caused by these filoviruses. The development of effective prophylactic vaccines requires studies aimed at selecting the most immunogenic forms of protective antigens.

AIM. This study aimed to evaluate humoral immune induction in animals after administration of recombinant adenoviral vectors expressing various forms of Ebola and Marburg virus glycoproteins (GPs).

MATERIALS AND METHODS. Samples of recombinant human adenovirus type 5 (rAd5) were obtained using homologous recombination in *Escherichia coli*, growth in HEK293 cells, and purification by CsCl gradient ultracentrifugation. The resulting rAd5 samples were characterised in terms of their identity (PCR and whole-genome sequencing), the concentration of viral particles (fluorescence spectroscopy), and the concentration of infectious viral particles (TCID₅₀ assay). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to evaluate the GP-specific IgG titres in the sera of immunised mice.

RESULTS. The authors constructed rAd5 samples, and each construct contained an expression cassette with a GP gene form encoding a full-length GP, a GP without the mucin-like domain, or a GP without both the glycan cap and the mucin-like domain. Each of these forms was studied using the GPs of four filoviruses, including Zaire Ebola virus, Sudan Ebola virus, Bundibugyo Ebola virus, and Marburg virus. Neither of the forms had a critical effect on the rAd5 replicative capacity. Three weeks after immunisation, the highest GP-specific IgG production was induced by the rAd5 samples encoding either the full-length GP or the GP without the mucin-like domain. The GP without both the glycan cap and the mucin-like domain was the least immunogenic antigen regardless of the filovirus species.

CONCLUSIONS. The most promising constructs for the development of filovirus vaccines based on recombinant adenoviral vectors are the constructs that include the genes encoding the full-length GP or the GP without the mucin-like domain.

Keywords: immunogenicity; glycoprotein gene variants; Ebola virus; Marburg virus; human adenovirus type 5; recombinant adenoviral vectors; Ebola virus disease; Marburg virus disease; humoral immune response

For citation: Ozharovskaia T.A., Zubkova O.V., Popova O., Kovyrshina A.V., Goldovskaya P.P., Vavilova I.V., Dolzhikova I.V., Ermolova E.I., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Voronina O.L., Shcherbinin D.N., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Immunogenicity of various variants of Ebola and Marburg virus glycoprotein genes in recombinant adenoviral vectors. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):294–311. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311>

Funding. This study was funded by the Ministry of Health of the Russian Federation under the State Assignment “Development of a pan-filovirus vaccine (for the prevention of Ebola virus disease and Marburg haemorrhagic fever)” (R&D Registry No. AAAA-A20-120022890039-0).

Disclosure. A.L. Gintsburg and D.Y. Logunov have been members of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021 and 2024, respectively. The other authors declare no conflict of interest.

Словарь терминов и сокращений

EBOV — вирус Эбола вида Заир (вид *Orthoebolavirus zairense*);
BUDV — вирус Эбола вида Бундибугио (вид *Orthoebolavirus bundibugyoense*);
SUDV — вирус Эбола вида Судан (*Orthoebolavirus sudanense*);
MARV — вирус Марбург (вид *Orthomarmburgvirus marburgense*);

GP — гликопротеин;
rAd5 — рекомбинантный аденовирус человека 5 серотипа;
а.о. — аминокислотный остаток;
в.ч. — вирусная частица;
ВНА — вирус-нейтрализующие антитела;
ДИ — доверительный интервал.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы Эбола и Марбург являются членами семейства *Filoviridae* порядка *Mononegavirales* и известны тем, что, будучи высоколетальными, вызывают тяжелую геморрагическую лихорадку у людей и приматов. Вирус Эбола относится к роду *Orthoebolavirus*, который включает 6 видов. Из них высоколетальными и патогенными для человека являются три: *Orthoebolavirus zairense* (EBOV), *Orthoebolavirus bundibugyoense* (BUDV) и *Orthoebolavirus sudanense*¹ (SUDV). Этиологическим агентом двух наиболее крупных вспышек был вирус Эбола вида Заир. Вспышка в Западной Африке проходила в 2014–2016 гг., во время которой было инфицировано 28715 человек и зарегистрировано 11372 случая летального исхода, а вспышка в восточной части Демократической Республики Конго в 2018 г. унесла жизни еще 2320 человек².

Поскольку летальность при инфицировании вирусом Эбола достигает 70–90%, основные усилия ученых были направлены на разработку

вакцин для профилактики болезни, вызванной этим представителем семейства *Filoviridae*. В Российской Федерации первая подобная вакцина, названная «ГамЭвак-Комби», была разработана в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и зарегистрирована в 2015 г. (рег. удостоверение № ЛП-003390 от 28.12.2015) [1]. В 2019 г. была одобрена для медицинского применения в Европейском союзе и США вакцина ERVEBO®, разработанная учеными из Агентства общественного здравоохранения Национальной микробиологической лаборатории Канады³. В Китае была одобрена вакцина Ad5-EBOV для предотвращения заболеваний, вызванных EBOV, производства CanSino, которая продемонстрировала высокую иммуногенность и приемлемый уровень безопасности в клинических исследованиях [2].

Помимо представителей рода *Orthoebolavirus*, вирус Марбург, относящийся к роду *Orthomarmburgvirus* виду *marburgense* (MARV), к настоящему времени явился причиной двух крупных

¹ ICTV <https://ictv.global/report/chapter/filoviridae/filoviridae/orthoebolavirus>

² <https://www.cdc.gov/ebola/outbreaks/index.html>

³ <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-ebola-virus-disease-marking-critical-milestone-public-health>

вспышек: в Демократической Республике Конго с 1998 по 2000 гг. и в Анголе в 2004–2005 гг. (252 случая, летальность 90%) [3].

Описанные вирусы являются глобальной угрозой общественному здравоохранению из-за высокой летальности вызываемых ими заболеваний, быстрого распространения, постоянных вспышек в Западной Африке, которые могут распространиться и за пределы африканского континента, а также появления нового состояния, известного как «синдром, обусловленный перенесенной болезнью, вызванной вирусом Эбола». Заболевание проявляется в виде воспалительных и аутоиммунных реакций, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и спондилоартрит с увеитом [4].

Несмотря на то что вирус Марбург и вирус Эбола были открыты в 1967 и 1976 гг. соответственно и широко исследовались в последующие годы, в настоящее время не существует зарегистрированных вакцин для одновременной профилактики вызываемых этими филовирусами заболеваний. Показано, что протективный иммунный ответ достигается только тогда, когда антиген в составе вакцины имеет то же происхождение, что и филовирус, используемый для заражения (то есть вакцина, основанная на гликопротеине вируса Эбола вида Заир, будет обеспечивать защиту только от данного патогена). Кроме того, известно отсутствие перекрестной защиты от вирусов, антигены которых не содержатся в вакцине [5]. В связи с этим можно сделать вывод о том, что существующие вакцины могут не обеспечивать защиту от всех разновидностей филовирусов. Таким образом, филовирусы занимают одно из приоритетных мест в списке биологических угроз здравоохранению Российской Федерации.

Традиционные вакцины, такие как живые аттенуированные и инактивированные, не являются оптимальной вакцинной платформой из-за высоких рисков, связанных с недостаточной аттенуацией или неполной инактивацией летального вируса. Значительный прогресс был достигнут в использовании альтернативных платформ, таких как рекомбинантные вирусные векторы. Например, при иммунизации приматов вектором на основе аттенуированного рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (VSV), экспрессирующего или гликопротеин (GP) EBOV, или GP MARV, животные были полностью защищены от заражения гомологичным вирусом [5].

Наиболее широко изученные векторы на основе аденовирусов (Ad) показали многообещающие результаты при создании панфиловиральной вакцины. Разработана кандидатная

вакцина, состоящая из четырех рекомбинантных аденовирусов человека 5 серотипа (Ad5), каждый из которых экспрессирует по два антигена (GP пяти различных филовирусов, охватывающих три значимых вида EBOV, SUDV, MARV (три изолята) и нуклеопротеин (NP) EBOV и MARV). Иммунизация приматов продемонстрировала 100% защиту от заражения двумя видами вируса Эбола и тремя изолятами вируса Марбург, каждый из которых вводился в дозе, в 1000 раз превышающую смертельную [6].

Первую фазу клинических исследований прошла гетерологичная кандидатная вакцина, состоящая из двух компонентов. Первый компонент — Ad26.ZEBOV — представлен аденовирусом 26 серотипа, кодирующим GP EBOV, а второй — вектором на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара, кодирующим GP EBOV, SUDV и MARV, а также NP вируса Тай Форест (названный MVA-BN-Filo) [7]. Нуклеопротеин включают в состав вакцин в качестве адъюванта, потому что известно, что NP способен вызывать эффективный клеточный иммунный ответ и может повысить эффективность вакцины на основе GP [6].

Тем не менее ключевой мишенью для разработки вакцинных препаратов является вирусный GP, который занимает центральное место в патогенности филовирусов, поскольку является ключевым структурным белком и отвечает как за проникновение вируса в клетки, так и за уклонение от иммунного ответа. Полноразмерный GP представляет собой тримерный белок слияния I типа и транслируется в белок-предшественник размером около 670 а.о., после чего расщепляется фурином клетки-хозяина на две субъединицы GP1 и GP2, связанные дисульфидной связью [8]. Субъединица GP1 отвечает за связывание с рецептором Ниманна — Пика C1 и состоит из 4 доменов: основания, головки, гликанового кэпа и муциноподобного домена [9, 10]. Субъединица GP2 содержит пептид слияния и имеет наиболее высокую консервативность между различными представителями филовирусов [8]. Гликопротеин служит также основной мишенью для нейтрализующих антител. GP EBOV и MARV претерпевают сложные структурные перестройки во время проникновения вируса в клетку, что приводит к образованию различных конформационных состояний, которые могут влиять на эффективность вакцины.

Поскольку в настоящее время не созданы зарегистрированные вакцины для одновременной защиты от обоих филовирусов, способные предотвратить распространение заболевания или снизить его тяжесть, в данном исследовании

мы стремились изучить иммуногенность различных форм гликопротеинов EBOV и MARV, чтобы предоставить информацию для разработки вакцин следующего поколения.

Цель работы — оценка индукции гуморального иммунного ответа на введение животным рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих различные формы гликопротеина вирусов Эбола и Марбург.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Бактериальные штаммы и клеточные линии

Для получения рекомбинантных плазмидных конструкций использовали лабораторные штаммы *Escherichia coli* DH5a (New England Biolabs, США) и BJ5183 (Stratagene, США). Для культивирования бактерий использовали ростовую среду 2xYT (Диазм, Россия), агар бактериологический (Диазм, Россия), селективные антибиотики ампициллин и канамицин (Thermo Fisher Scientific, США).

Для создания плазмидных конструкций, кодирующих геном rAd5 с различными формами GP вирусов рода Эбола и Марбург, использовали полученный ранее [11] экспрессионный вектор, содержащий геном rAd5 с делетированными E1- и E3-областями со встроенной экспрессионной кассетой.

Для получения и накопления рекомбинантных аденовирусов использовали клеточную линию HEK293 — клетки почки эмбриона человека, содержащие в геноме E1-область Ad5 (получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных, РККК П). Для постановки реакции нейтрализации псевдовироионов использовали клеточную линию Vero E6 — клетки почки зеленой марышки (получена из РККК П). Клетки культивировали в среде DMEM 1x (HyClone, США) с добавлением 6% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), 25 мл 7,5% бикарбоната натрия (ПанЭко, Россия), 146 мг L-глутамина (ПанЭко, Россия) и смеси антибиотиков пенициллина (50 МЕ/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия) при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Лабораторные животные

Все эксперименты с использованием лабораторных животных проводили в соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации⁴. Мыши (самки возраст 6 нед.) линии C57BL/6, экспрессирующие

гаплотип b главного комплекса гистосовместимости, были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Россия). Животных содержали в системе ISOcage (Tecniplast, Италия) со свободным доступом к корму и воде. Проведение исследования было одобрено локальным независимым этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (выписка из протокола № 35 от 24.01.2023).

Методы

Выбор последовательностей антигена

На первом этапе работы отдельно для каждого вида филовирюсов (*Orthoebolavirus zairense*, *Orthoebolavirus bundibugyoense*, *Orthoebolavirus sudanense* и *Orthomarburbgavirus marburgense*) выбирали последовательность гена GP. Для этого из официального общедоступного источника NCBI Virus Variation Resource⁵ нами были отобраны аминокислотные последовательности полноразмерного GP штаммов филовирюсов, изолированных от человека. В программе «Geneious Prime» (Biomatters, Новая Зеландия) выравнивали последовательности и получали консенсусную последовательность, в каждом положении которой находился аминокислотный остаток, наиболее часто встречающийся у полноразмерного белка. Консенсусную последовательность затем сравнивали с полными последовательностями GP изолятов данного филовирюса и выбирали наиболее близкую к ней последовательность, представленную в базе данных.

Конструирование плазмидных векторов

Нуклеотидные последовательности выбранных антигенов (Zaire-GP, Zaire-GPΔM, Zaire-GPΔC, Sudan-GP, Sudan-GPΔM, Sudan-GPΔC, Bund-GP, Bund-GPΔM, Bund-GPΔC, Marburg-GP, Marburg-GPΔM, Marburg-GPΔC) были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия). Полученные последовательности встраивали рестрикционно-лигазным методом клонирования в состав экспрессионной кассеты между промотором и терминатором транскрипции плазмидного вектора pSh5. Плазмидная конструкция pSh5 — это челночный вектор для гомологичной рекомбинации, несущий фрагменты генома Ad5, так называемые «плечи гомологии», а именно: левый и правый концы генома с делецией E1-области, место которой встроена экспрессионная кассета (CMV-промотор, полилинкер и терминатор

⁴ ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики.

⁵ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/variation/>

транскрипции (сигнал полиаденилирования вируса SV40)). Далее проводили гомологичную рекомбинацию в *E. coli* штамма BJ5183 между плазмидной конструкцией, несущей полный генотип rAd5 с делецией E3-области, и полученными на предыдущем этапе челночными векторами, линейаризованными по уникальному сайту рестрикции *PmeI*, заложенному между «плечами гомологии». Таким образом были получены 12 плазмидных конструкций, кодирующих генотип rAd5 с различными формами GP вирусов рода Эбола и Марбург. Подлинность подтверждали методом ПЦР, рестрикционным картированием и полногеномным секвенированием.

Получение, накопление и очистка рекомбинантных аденовирусных векторов

Для получения рекомбинантных аденовирусов сконструированные на предыдущем этапе плазмидные конструкции обрабатывали специфической эндонуклеазой рестрикции *PacI* для экспонирования вирусных инвертированных концевых повторов. Полученными препаратами линейной ДНК трансфецировали клетки HEK293 с использованием реагента Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Трансфецированные клетки пересеивали с увеличением посевной площади до наступления 100% цитопатического действия. Получение рекомбинантных вирусных векторов подтверждали ПЦР и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Титры аденовирусов выражали в ТЦД₅₀/мл (50% тканевая цитопатическая доза); значения ТЦД₅₀/мл определяли методом Риды и Менча [12].

Рекомбинантные аденовирусы нарабатывали в препаративных количествах в клетках HEK293. Для этого 2×10^7 клеток, высеванных на культуральные чашки диаметром 15 см, заражали рекомбинантными аденовирусами в дозе 0,5 ТЦД₅₀ на клетку. Через 48–72 ч после трансдукции при наступлении полного цитопатического действия клетки осаждали низкоскоростным центрифугированием, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и лизировали путем замораживания-оттаивания (3 цикла) для высвобождения вирусных частиц. Лизаты центрифугировали в течение 10 мин при скорости 3500 об/мин для оседания клеточного дебриса. Супернатант концентрировали и очищали от клеточных белков и нуклеиновых кислот двукратным ультрацентрифугированием в градиенте цезия хлорида на приборе Optima™ XPN-90 в роторе SW41

(Beckman Coulter Inc., США): первое ультрацентрифугирование проводили в течение 1 ч 15 мин при 35000 об/мин и 14 °С, второе – в течение 20 ч при 41000 об/мин и 15 °С).

Концентрацию вирусных частиц в препарате определяли с помощью набора Pico488 dsDNA quantification Kit (Lumiprobe, США) согласно рекомендациям производителя. Для построения калибровочной кривой использовали стандартный образец Ad5.

Иммунизация животных и получение образцов сывороток

Для определения уровня антигенспецифического гуморального иммунного ответа мышам линии C57/BL6 (по 7 особей в группе) однократно внутримышечно вводили по 10^{10} в.ч. исследуемых аденовирусных векторов (в объеме 100 мкл). Мышам в контрольной группе вводили аналогичный объем фосфатно-солевого буфера. Через 21 сут после иммунизации у мышей отбирали кровь из хвостовой вены (методом отсечения кончика хвоста) для последующего выделения сыворотки. Образцы инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С, а затем центрифугировали в течение 10 мин при 300 *g*. Образцы сывороток хранили при минус 70 °С.

Проверка подлинности полученных рекомбинантных аденовирусов

Подлинность препаратов полученных рекомбинантных аденовирусов подтверждали методами ПЦР и ПЦР-РВ. Для этого вирусную ДНК выделяли с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) согласно протоколу производителя. ПЦР-РВ проводили с использованием смеси qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия) на приборе CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США), детекцию проводили на канале HEX (гексахлорфлуоресцеин). Программа ПЦР-РВ представлена в *таблице 1* (опубликована на сайте журнала⁶). Праймеры и зонд были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия), их нуклеотидные последовательности представлены в *таблице 2* (опубликована на сайте журнала⁷).

ПЦР для подтверждения наличия целевых генов проводили с использованием смеси 5X ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия) на приборе T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Программа амплификации представлена в *таблице 3* (опубликована на сайте журнала⁸), нуклеотидные последовательности праймеров

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table1>

⁷ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table2>

⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table3>

приведены в таблице 2 (опубликована на сайте журнала).

Секвенирование полученных аденовирусов

Библиотеки готовили по протоколу Nextera™ DNA Flex Library Prep (Illumina, США). Проверку качества и размера библиотек проводили с помощью электрофореза на чипах High Sensitivity DNA Chips 2100 Bioanalyzer System (Agilent, США). Секвенирование выполняли на платформе Illumina MiSeq с картриджем MiSeq Reagent Kit v2 Nano (500 Cycles). Для сборки прочтений *de novo* и по предоставленным референсным последовательностям использовали пакет программ CLC Genomic Workbench v.21 (Qiagen, США).

Определение титра антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа

Титр GP-специфических антител в сыворотке крови иммунизированных животных определяли методом иммуноферментного анализа по стандартному протоколу. Использовали следующие рекомбинантные белки: GP вируса Марбург с делецией трансмембранного домена (MARV-Angola rGPΔTM) (IBT Bioservices, США); полный GP вируса Эбола вида Sudan штамма Gulu (SinoBiological, КНР); GP1-домен гликопротеина вируса Эбола вида Bundibugyo штамма Uganda 2007 GP1/Glycoprotein Protein (His Tag), (SinoBiological, КНР); полный GP вируса Эбола вида Zaire штамма H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15 (SinoBiological, КНР). Для детекции использовали вторичные антитела, специфичные к IgG мыши и конъюгированные с пероксидазой хрена (IgG-NXA931, GE Healthcare, США). Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan™ FC (Thermo Fisher Scientific, США). За титр антител принимали обратную величину последнего разведения сыворотки крови при условии, что значение оптической плотности целевого образца превосходит таковое контрольного образца >2 раза.

Реакция нейтрализации псевдовироионов

Для постановки анализа четыре рекомбинантных VSV (rVSV-Zaire-GP, rVSV-Sudan-GP, rVSV-Bund-GP и rVSV-Marburg-GP (псевдотипированные GP вируса Эбола или Марбург)) получали, как описано ранее [13]. Для проведения эксперимента клетки линии Vero E6 (10⁶ клеток на лунку) высевали на 6-луночные планшеты за день до эксперимента. Перед проведением эксперимента сыворотки крови мышей инактивировали при температуре 56 °C в течение 30 мин. Двукратные разведения образцов

инактивированных сывороток мышей (начиная с 1:10) смешивали с rVSV-GP в количестве 100 бляшкообразующих единиц, а затем полученную смесь инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Далее смесь добавляли к монослою клеток Vero E6 в трех повторах. Через 6 ч отбирали среду, наносили полутвердое агаризованное покрытие на клетки и инкубировали в течение 48 ч при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. После этого проводили учет результатов. За титр нейтрализующих антител в сыворотке крови иммунизированного животного принимали обратную величину максимального разведения, при котором наблюдали 50% снижение количества бляшек rVSV-GP по сравнению с сыворотками не вакцинированных животных.

Определение титра вирус-нейтрализующих антител к Ad5 в сыворотках крови иммунизированных животных

Титры вирус-нейтрализующих антител (ВНА) к вектору Ad5 измеряли с помощью реакции вирус-нейтрализации на культуре клеток HEK293. Для анализа использовали Ad5, экспрессирующий ген зеленого флуоресцентного белка (Ad5-EGFP) [14]. Двукратные разведения образцов сывороток (начиная с 1:25) вносили в лунки 96-луночного планшета. К ним добавляли по 50 мкл Ad5-EGFP (в дозе 100 ТЦД₅₀) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Каждую сыворотку анализировали в трех повторах. Далее в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл клеточной суспензии (5×10⁶ клеток). Планшеты инкубировали в течение 48 ч при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Флуоресценцию EGFP определяли при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX73 (Olympus; Япония) с модулем U-RFL-T (Olympus; Япония) при длинах волн 490 и 510 нм возбуждения и эмиссии соответственно. Титры ВНА определяли количественно как обратную величину разведения сыворотки крови мышей в лунке, где достигалось снижение количества фокусов флуоресценции на 50% по сравнению с лункой положительно-го контрольного образца (содержащего только Ad5-EGFP без добавления сыворотки).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили при помощи программы GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США), а также Excel (Microsoft, США). Для анализа несвязанных выборок применяли критерий Манна-Уитни. Результаты сравнения экспериментальных и контрольных групп считали статистически достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор последовательностей и различных форм гликопротеинов вирусов Эбола и Марбург

На первом этапе работы осуществляли выбор последовательностей антигенов четырех филовирусов. Поскольку известно, что вирус EBOV обладает достаточно высокой скоростью мутирования (скорость замен составляет $7,06 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен / позицию нуклеотида / год) [15], для выбора последовательности GP вируса EBOV использовали последовательности изолятов вируса Эбола (наиболее крупной вспышки (2014–2016 гг.), унесшей жизни 11372 человек). Консенсусная последовательность совпала с последовательностью GP GenBank: AIG95977.

Несмотря на то что вирусы EBOV и SUDV впервые были обнаружены в один и тот же

год (1976 г.), установлено, что вирус SUDV характеризуется в 15 раз меньшей скоростью мутирования ($0,46 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен / позицию нуклеотида / год). Поэтому для выбора последовательности GP вируса SUDV использовали консенсусные последовательности изолятов, построенные по всем доступным в базе данных NCBI Virus Variation Resource⁹ последовательностям (в том числе по последовательностям изолятов, полученных в ходе пяти крупных вспышек заболевания); результирующая последовательность совпала с GP GenBank: AGB56678. Вирусы BUDV и MARV характеризуются более низкой мутационной изменчивостью, поэтому в качестве целевых были выбраны консенсусные последовательности, которые наиболее гомологичны

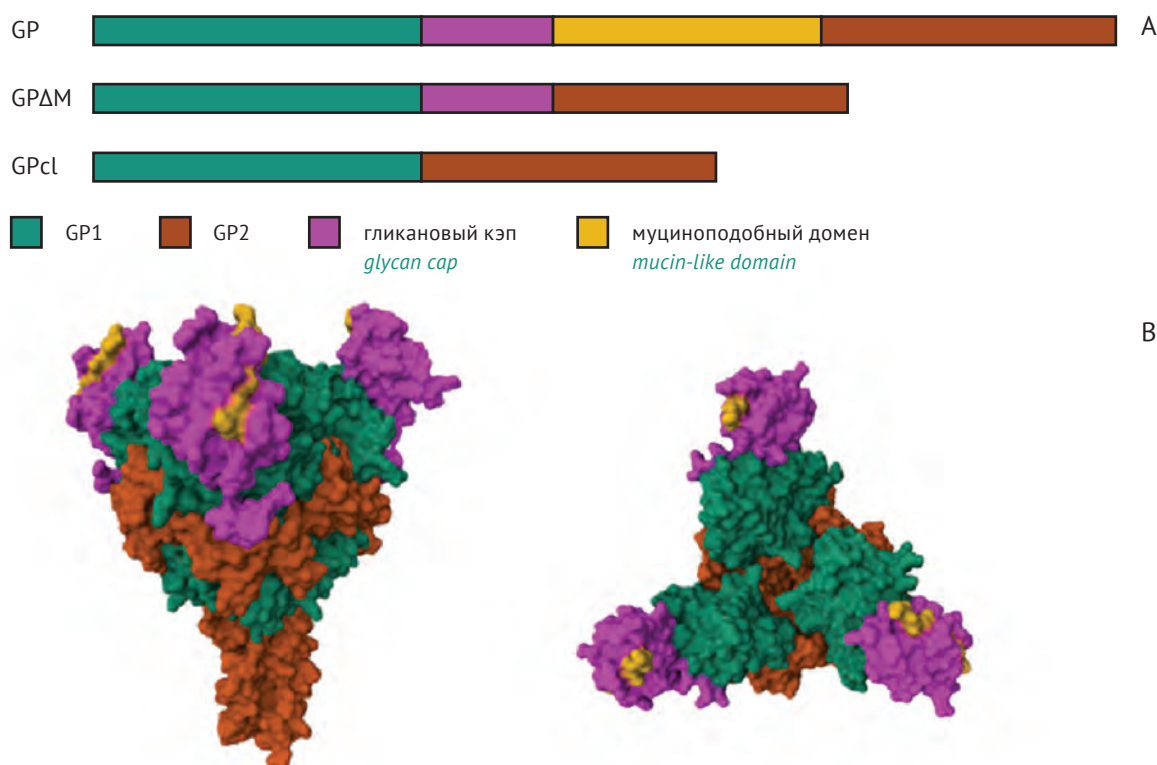


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным (часть А). Псевдомодель GP построена на основе данных PDB ID 5JQ3 (часть В) / The figure is prepared by the authors using their own data (part A). The GP pseudomodel was generated using PDB ID 5JQ3 (part B)

Рис. 1. Схематичное изображение последовательности и структуры гликопротеина (GP) филовируса: А — схема доменной структуры полноразмерного гена GP филовируса и исследуемых модифицированных форм (GPΔM и GPΔL); В — псевдомодель GP филовируса с обозначением тех же доменов. Модель построена с помощью RCSB PDB на основе PDB ID 5JQ3 [17]. Желтым цветом обозначено приблизительное расположение муциноподобного домена, соединяющего соответствующие концы гликанового кэпа (фиолетовый цвет) и субъединицы GP2 (оранжевый цвет). Часть муциноподобного домена GP, которая считается неструктурированной, не представлена на модели.

Fig. 1. Schematic representation of the filovirus glycoprotein (GP) sequence and structure. A, schematic domain structure of the full-length form (GP) and the studied modified forms (GPΔM and GPΔL) of the filovirus GP gene. B, filovirus GP pseudomodel with the same domains highlighted in the same colours. The yellow colour indicates the approximate location of the mucin-like domain connecting the corresponding ends of the glycan cap (magenta) and the GP2 subunit (orange). The model does not show the GP mucin-like domain part that is considered unstructured. The model was generated using the PDB ID 5JQ3 entry from the Protein Data Bank of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB PDB) [17].

⁹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/variation/>

последовательностям GP циркулирующих изолятов (GenBank: AGL73460 и GenBank: AFV31307 соответственно).

Затем были разработаны модификации гена GP для каждого вируса (рис. 1). В белке GPΔM отсутствует полный Ser/Thr муциноподобный домен, который включает большую С-концевую часть субъединицы GP1, обогащенную сайтами N- и O-гликозилирования [16]. Поскольку гликаны вирусного белка играют решающую роль в уклонении от иммунного ответа хозяина, образуя так называемый «гликановый кэп» на поверхности GP, то для сравнения нами была выбрана последовательность (названная «GPcl»), в которой удалены как муциноподобный домен,

так и гликановый кэп — наиболее гликозилированные области данного антигена.

Получение рекомбинантных аденовирусов, кодирующих различные формы гликопротеинов филовирусов

Для определения и сравнения иммуногенности различных форм GP панфиловирозов нами было получено двенадцать rAd5, содержащих на месте удаленной E1-области своего генома экспрессионную кассету с геном одной из форм GP, в соответствии со стандартными протоколами для создания аденовирусных векторов. Схемы всех полученных рекомбинантных аденовирусов показаны на рисунке 2.

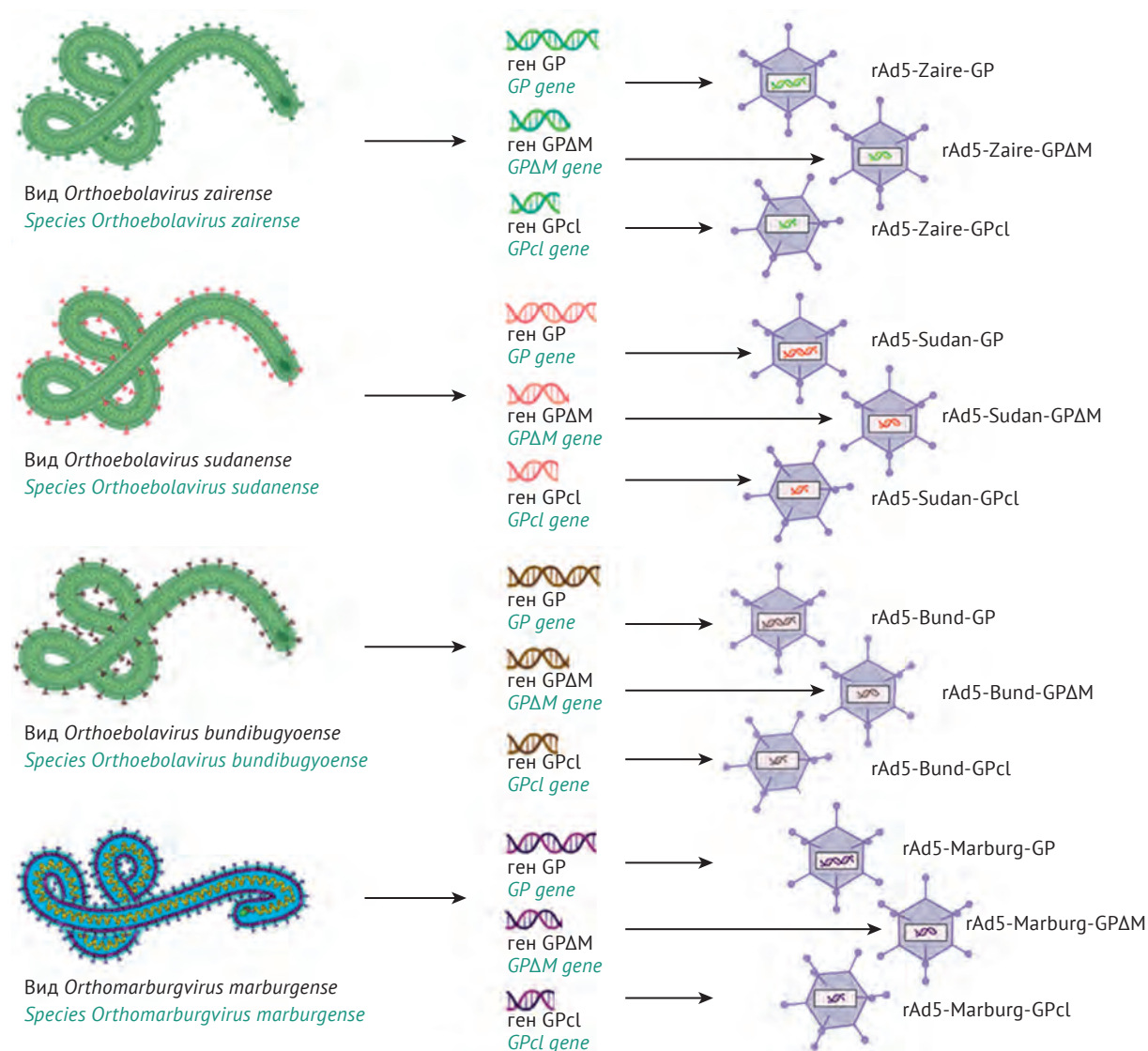


Рисунок подготовлен авторами с использованием программы BioRender / The figure is prepared by the authors using BioRender software

Рис. 2. Схематичное изображение рекомбинантных аденовирусов (rAd5), содержащих в геноме кассету с одной из форм гликопротеина (GP) соответствующего филовируса.

Fig. 2. Schematic representation of recombinant adenoviruses (rAd5), each containing a cassette with one of the glycoprotein (GP) forms of the corresponding filovirus.

В настоящее время технология получения rAd5 хорошо изучена и отработана. Однако наряду с относительной простотой создания rAd5 существует сложность лежащих в основе данного процесса биологических характеристик самого вируса: можно упустить из виду возможность того, что культуральные свойства рекомбинантного аденовируса будут снижены за счет гиперэкспрессии целевого трансгена. Каждая новая комбинация вектора и целевого гена может рассматриваться как новая система, подвергающаяся искусственному отбору в лабораторной культуре клеток. В связи с этим нами были изучены культуральные свойства всех полученных rAd5. Для этого вирусы наращивали на десяти культуральных чашках, проводили очистку методом ультрацентрифугирования и измеряли количество в.ч., определяли инфекционный титр и число геномов rAd5 (табл. 4) (опубликована на сайте журнала¹⁰). По результатам исследований во всех пробах был обнаружен ген гексона rAd5. Соотношение в.ч./ТЦД₅₀ находилось в диапазоне значений от 500 до 1000 (стандартный диапазон при культивировании rAd5).

Установлено, что удаление муциноподобного домена и гликанового кэпа GP не оказывает влияния на рост rAd5, несущего ген GP вируса Марбург. При одинаковых условиях культивирования среди вирусов, кодирующих GP EBOV, наибольшее количество в.ч. после очистки наблюдалось у rAd5-Zaire-GPcl. При этом среди rAd5, кодирующих различные формы GP SUDV и BUDV, аденовирусы, несущие ген полноразмерного белка GP, были накоплены в большем количестве. Представленные в таблице 4 (опубликована на сайте журнала¹¹) данные показывают, что форма GP не оказывает критического влияния на выход рекомбинантного аденовируса. В тех случаях, когда экспрессия трансгена препятствует размножению аденовирусного вектора, существует возможность получения векторов с мутациями в целевом гене, что обеспечивает улучшение репликативных свойств по сравнению с исходным вирусом [18].

Согласно полученным данным ПЦР и полногеномного секвенирования подлинность всех полученных аденовирусов была подтверждена (данные не представлены).

Сравнение иммуногенности различных форм гликопротеинов вирусов Эбола и Марбург в составе аденовирусных векторов

Для анализа иммуногенных свойств различных форм GP мышам внутримышечно

однократно вводили по 100 мкл каждого из препаратов полученных 12 рекомбинантных аденовирусов в дозе 10¹⁰ в.ч. Через 3 нед. после иммунизации получали образцы сывороток крови животных и анализировали в них титры антигенспецифических антител. Индивидуальные данные, а также среднее геометрическое значение титра (СГТ), представлены на рисунке 3. В сыворотке крови мышей контрольной группы (животные, которым вводили фосфатно-солевой буфер) GP-специфические IgG не обнаружили.

Наибольший титр антител, специфичных к GP EBOV, наблюдали в группе животных, иммунизированных rAd5-Zaire-GPΔM (СГТ 8614, 95% доверительный интервал (ДИ) 4608–16103), чуть ниже – в группе rAd5-Zaire-GP (СГТ 7802, 95% ДИ 4240–14355), однако данная разница не была статистически достоверна ($p=0,8491$, критерий Манна–Уитни). В группе животных, иммунизированных rAd5-Zaire-GPcl, GP-специфические IgG наблюдали только у 2 из 7 мышей.

По результатам проведенного исследования показано, что все три полученных рекомбинантных аденовируса, несущих ген GP SUDV, индуцируют формирование специфического гуморального иммунного ответа. При этом наибольший титр антител наблюдали в группе животных, иммунизированных rAd5-Sudan-GP (СГТ 34455, 95% ДИ 14068–84385). У животных, иммунизированных rAd5-Sudan-GPΔM, обнаружено достоверное снижение титров антител (СГТ 4307, 95% ДИ 2304–8051) по сравнению с rAd5-Sudan-GP, а самые низкие титры отмечены у мышей, которым вводили rAd5-Sudan-GPcl (СГТ 975, 95% ДИ 437–2178).

Наибольший титр GP-специфических IgG наблюдали в группе животных, иммунизированных rAd5-Bund-GP (СГТ 2898, 95% ДИ 1224–6865). У мышей, иммунизированных rAd5-Bund-GPΔM, титры антител (СГТ 1077, 95% ДИ 337–3442) статистически значимо не отличались от группы rAd5-Bund-GP. У животных, иммунизированных rAd5-Bund-GPcl, специфические антитела обнаружили только у одной мыши.

Наибольший титр антител, специфичных к GP MARV, наблюдали в группе животных, иммунизированных rAd5-Marburg-GPΔM (СГТ 3200, 95% ДИ 1399–7321), при этом титры антител в группе rAd5-Marburg-GP (СГТ 594, 95% ДИ 287–1230) были достоверно ниже ($p=0,0064$, критерий Манна–Уитни). В группе животных, иммунизированных rAd5-Marburg-GPcl, GP-специфические IgG наблюдали только у 1 из 7 мышей.

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table4>

¹¹ Там же

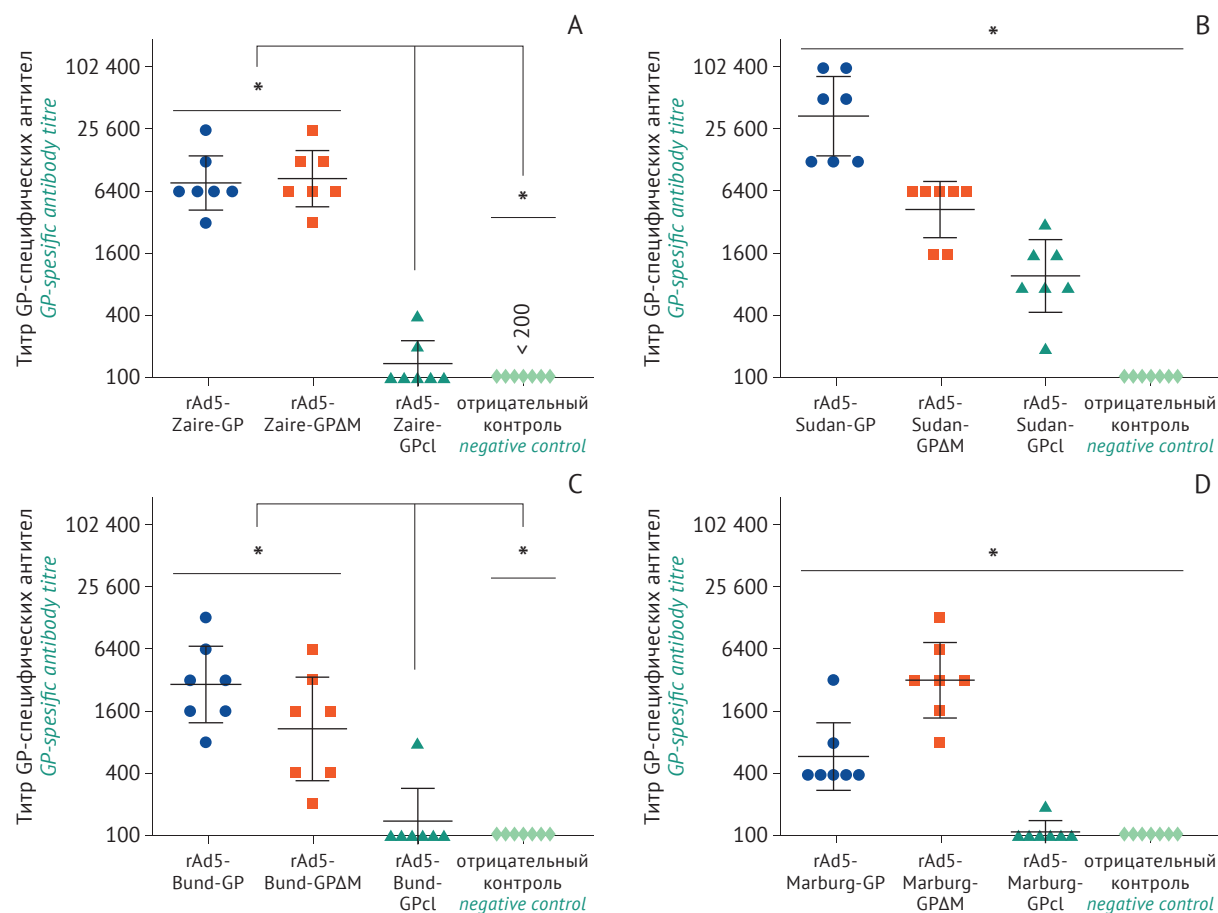


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Иммуногенность рекомбинантных аденовирусов (rAd5), кодирующих различные формы гликопротеина (GP) филовирсов. Данные представлены в виде индивидуальных значений титров GP-специфических антител в сыворотках крови иммунизированных животных. По оси X обозначены группы мышей, иммунизированных векторами, экспрессирующими различные формы GP EBOV (A), SUDV (B), BUDV (C), MARV (D); отрицательный контроль – животные, которым вводили фосфатно-солевой буфер. По оси Y – индивидуальные значения титров GP-специфических антител. Отмечен средний геометрический титр (СГТ) и 95% доверительный интервал СГТ для каждой группы (n=7). А – титры антител, специфичных к GP EBOV (* – p<0,05, отличия статистически значимы при сравнении rAd5-Zaire-GPcl с остальными группами). В – титры антител, специфичных к GP SUDV (* – p<0,05, отличия статистически значимы между всеми группами). С – титры антител, специфичных к GP BUDV (* – p<0,05, отличия статистически значимы при сравнении rAd5-Bund-GPcl с остальными группами). D – титры антител, специфичных к GP MARV (* – p<0,05, отличия статистически значимы между всеми группами).

Fig. 3. Immunogenicity of recombinant adenoviruses (rAd5) encoding various filovirus glycoprotein (GP) forms. Data are presented as individual values of GP-specific antibody titres in the sera of immunised animals. The X-axis shows groups of mice immunised with vectors expressing different GP forms of Zaire Ebola virus (EBOV; A), Sudan Ebola virus (SUDV; B), Bundibugyo Ebola virus (BUDV; C), and Marburg virus (MARV; D), as well as negative control animals injected with phosphate-buffered saline. The Y-axis shows individual values of GP-specific antibody titres. The geometric mean titre (GMT) and the 95% confidence interval are indicated for each group (n=7). A, EBOV GP-specific antibody titres (* p<0.05; the differences between rAd5-Zaire-GPcl and the other groups are statistically significant). B, SUDV GP-specific antibody titres (* p<0.05; the differences between all groups are statistically significant). C, BUDV GP-specific antibody titres (* p<0.05; the differences between rAd5-Bund-GPcl and the other groups are statistically significant). D, MARV GP-specific antibody titres (* p<0.05; the differences between all groups are statistically significant).

Отметим, что форма GP с удаленными муцино-подобным доменом и гликановым кэпом (GPcl) оказалась наименее иммуногенной вне зависимости от вида филовирсуса. Возможно, такой белок не приобрел благоприятную конформацию, необходимую для обеспечения адекватного представления иммунной системе животных и выработки сильного гуморального ответа

у мышей. Однако известно, что в области гликанового кэпа находятся два иммунодоминантных CD4⁺ Т-клеточных эпитопа (а.о. в положениях 244–263 и 252–271) [19], потеря которых снижает как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Поскольку CD4⁺ Т-клетки необходимы для индукции устойчивости к заражению вирусом Эбола [19], а гликановый кэп, по-видимому,

имеет решающее значение для обеспечения защитного иммунного ответа у мышей против летальной дозы EBOV [20], представленные авторами в данной статье результаты подтверждают значимость муциноподобного домена и гликанового кэпа для эффективного иммунного ответа.

Ранее было показано, что использование в качестве антигена полноразмерного GP EBOV вызывает появление антител, нацеленных преимущественно на гликановый кэп и муциноподобный домен [21, 22]. Данные антитела, как правило, не обладают нейтрализующей активностью, поскольку оба домена отщепляются во время проникновения EBOV в клетки до того, как произойдет связывание с рецептором и слияние [23]. Однако позднее было описано несколько вариантов антител, связывающихся с эпитопами на гликановом кэпе, которые эффективно нейтрализовали EBOV и являлись полифункциональными (то есть способными выполнять несколько функций одновременно, в отличие от монофункциональных антител, которые могут связываться только с одним специфическим антигеном или выполнять одну задачу) [24, 25].

Полученные нами результаты демонстрируют важность использования полноразмерного GP или GP с удаленным муциноподобным доменом для индукции GP-специфических IgG. Дополнительная делеция гликанового кэпа практически лишает GP иммуногенных свойств.

Исследование перекрестной реактивности антител к гликопротеинам вирусов Эбола и Марбург

Аминокислотные последовательности гликопротеинов BUDV, EBOV и SUDV различаются >30%, а отличия с GP вируса MARV составляют >70% [26]. Поэтому нами было проведено исследование перекрестной реактивности антител к GP вирусов Эбола и Марбург. Образцы сывороток крови животных, полученные в предыдущем эксперименте, были пулированы и проанализированы на наличие перекрестно реагирующих GP-специфических антител (рис. 4). Из исследования были исключены группы животных, которым вводили аденовирусы, экспрессирующие ген GP с удаленными муциноподобным доменом и гликановым кэпом (GPcI), из-за их низкой иммуногенности.

Анализ результатов проведенного исследования указал на то, что иммунизация мышей рекомбинантными аденовирусами, экспрессирующими две формы гена GP SUDV (rAd5-Sudan-GP и rAd5-Sudan-GPΔM), приводит к формированию перекрестного гуморального иммунитета

к GP EBOV и BUDV. Кроме того, GP-специфические антитела к EBOV, SUDV и BUDV не обладают перекрестной активностью к GP MARV. В свою очередь, антитела в сыворотке крови мышей, иммунизированных rAd5-Marburg-GPΔM, обладают перекрестной активностью к GP EBOV и SUDV и определяются в минимальных титрах (СГТ составили 100 и 71 соответственно).

Кроме того, была детектирована перекрестная реактивность антител, специфичных к EBOV и SUDV, а также к GP BUDV. Это согласуется с проведенным ранее исследованием, где была показана как перекрестная реактивность, так и защита от заражения летальной дозой BUDV после иммунизации кандидатными векторными вакцинами, экспрессирующими GP EBOV и SUDV [27].

Определение вирус-нейтрализующих антител к гликопротеину филовирюсов в сыворотках крови иммунизированных животных

Наличие нейтрализующих антител у обезьян не коррелирует с защитой от инфекции, вызванной вирусом Эбола. Кроме того, нейтрализующие антитела у вакцинированных животных могут не обнаруживаться [27]. Тем не менее для более полного сравнения иммуногенности различных форм GP нами было проведено исследование индукции вирус-нейтрализующих антител (ВНА) после иммунизации животных.

При традиционной постановке эксперимента по определению ВНА к вирусам Эбола и Марбург требуется использование инфекционного вируса, обращение с которым должно осуществляться в лабораториях соответствующего уровня биобезопасности, поскольку все филовirusы относятся к микроорганизмам I группы патогенности (уровень биобезопасности 4 (BSL-4)). В связи со сложными условиями постановки такого эксперимента, трудоемкости и времязатратности (до 4 сут) было принято решение использовать аналогичный анализ – анализ нейтрализации псевдовироионов (PVNA). В качестве псевдовируса был выбран VSV, поскольку с данным вирусом можно работать в лабораториях уровня BSL-2, а сам тест является безопасным, быстрым (48 ч) и масштабируемым.

Для анализа использовали предварительно инактивированные пулированные сыворотки крови мышей (из анализа исключили группы животных, которым вводили rAd5, экспрессирующие ген GPcI из-за их низкой иммуногенности). Наибольший титр ВНА наблюдали в группах животных, иммунизированных rAd5-Marburg-GP и rAd5-Marburg-GPΔM (СГТ составило 40) (рис. 5). Титр ВНА к SUDV отличался между группами:

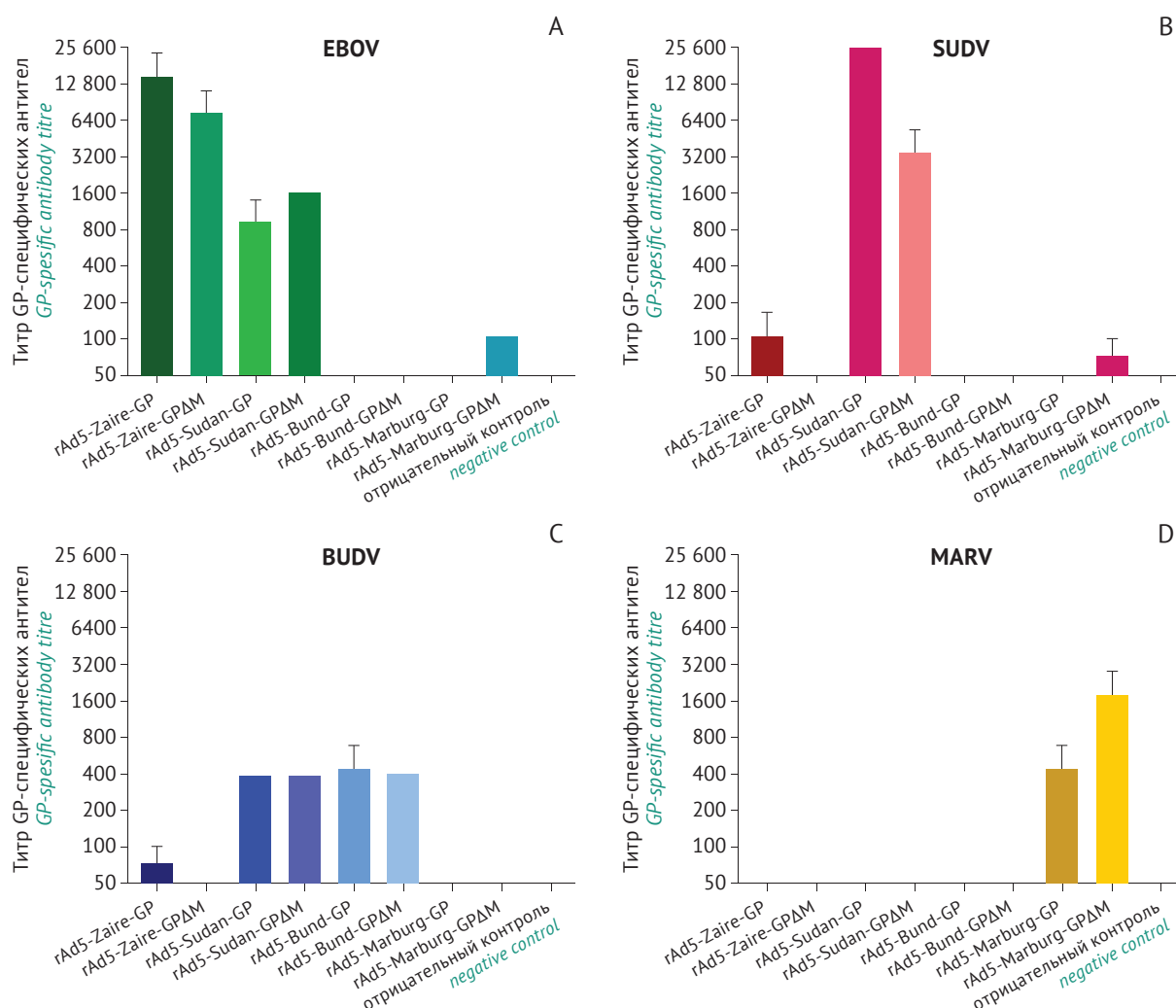


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Титры антител класса IgG, специфичных к гликопротеину (GP) вируса Эбола вида Заир (EBOV) – А, Судан (SUDV) – В, Бундибугио (BUDV) – С и вируса Марбург (MARV) – D, в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусными векторами (rAd5). По оси X обозначены группы мышей, иммунизированных векторами, экспрессирующими различные формы GP EBOV (А), SUDV (В), BUDV (С), MARV (D); отрицательный контроль – животные, которым вводили фосфатно-солевой буфер. По оси Y – среднегеометрический титр (СГТ) GP-специфических антител. Данные представлены в виде СГТ пулированных сывороток, исследованных в четырех повторах; отмечено стандартное отклонение.

Fig. 4. Titres of IgG antibodies specific to glycoprotein (GP) forms of Zaire Ebola virus (EBOV; A), Sudan Ebola virus (SUDV; B), Bundibugyo Ebola virus (BUDV; C), and Marburg virus (MARV; D) in the sera of mice immunised with recombinant adenoviral vectors (rAd5). The X-axis shows groups of mice immunised with vectors expressing different GP forms of EBOV (A), SUDV (B), BUDV (C), and MARV (D), as well as negative control animals injected with phosphate-buffered saline. The Y-axis shows geometric mean titre values (GMT) for GP-specific antibodies. Data are presented as GMT values for pooled sera tested in quadruplicate; the standard deviation is indicated.

у мышей, иммунизированных rAd5-Sudan-GP, СГТ составил 40, и rAd5-Sudan-GPΔM – СГТ составил 10. Титр ВНА к EBOV оказался минимальным (СГТ – 10), а ВНА к BUDV у животных, иммунизированных аденовирусами rAd5-Bund-GP и rAd5-Bund-GPΔM, обнаружены не были.

Полученные результаты согласуются с предыдущими исследованиями, в которых показано, что ВНА не всегда детектируются после вакцинации, однако животные выживают после заражения летальной дозой филовируса [5]. Так,

титры ВНА к EBOV у макак-крабоедов (*Macaca fascicularis*), иммунизированных рекомбинантным VSV, экспрессирующим GP SUDV, не были обнаружены, несмотря на высокие титры IgG (конечные разведения от 500 до 10000). Однако ВНА стали детектироваться (конечные разведения от 80 до 320) только через 14 и 28 сут после заражения летальной дозой вируса [5]. В том же исследовании у макак-крабоедов, иммунизированных рекомбинантным VSV, экспрессирующим GP MARV, ВНА были обнаружены только

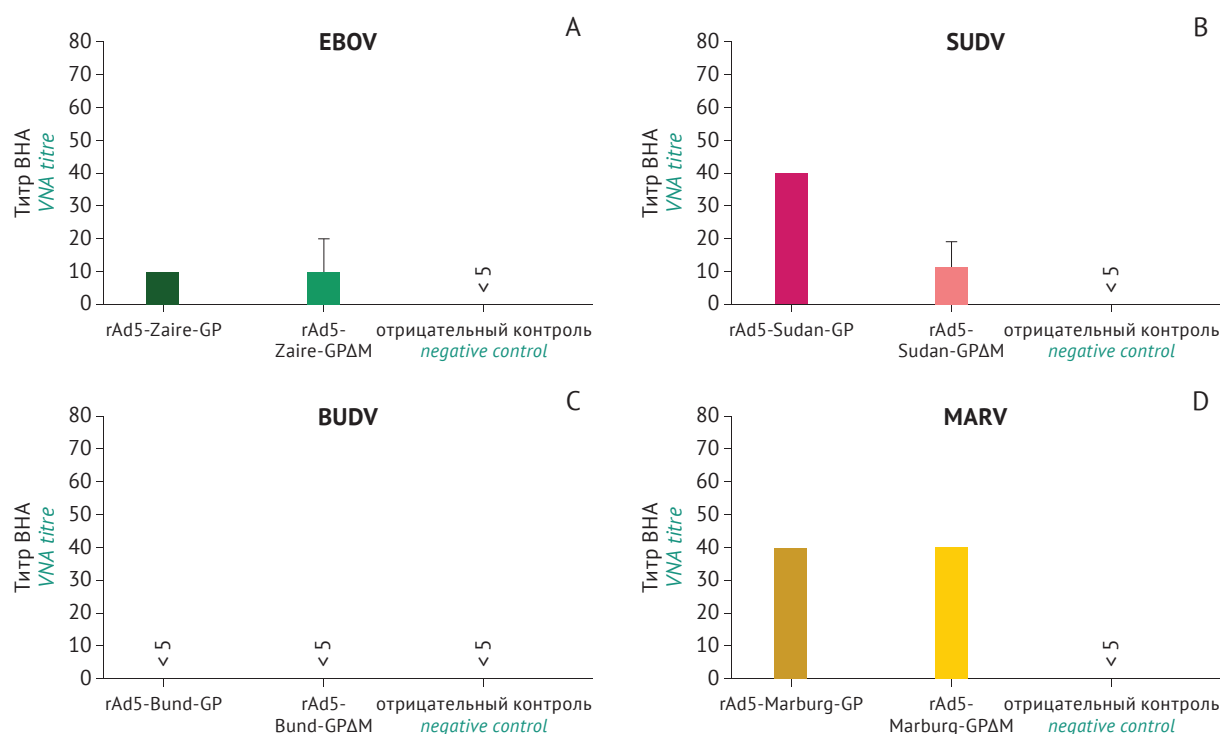


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Титры вирус-нейтрализующих антител (ВНА), специфичных к EBOV GP (A), SUDV (B), BUDV — (C) и MARV — (D), в сыворотках крови мышей, иммунизированных rAd5. По оси X обозначены группы мышей, иммунизированных векторами, экспрессирующими различные формы GP EBOV (A), SUDV (B), BUDV (C), MARV (D); отрицательный контроль — животные, которым вводили фосфатно-солевой буфер. По оси Y — среднегеометрический титр (СГТ) ВНА. Данные представлены в виде СГТ пулированных сывороток, исследованных в трех повторах; отмечено стандартное отклонение.

Fig. 5. Titres of virus-neutralising antibodies (VNAs) specific to glycoprotein (GP) forms of Zaire Ebola virus (EBOV; A), Sudan Ebola virus (SUDV; B), Bundibugyo Ebola virus (BUDV; C), and Marburg virus (MARV; D) in the sera of mice immunised with recombinant adenoviral vectors (rAd5). The X-axis shows groups of mice immunised with vectors expressing different GP forms of EBOV (A), SUDV (B), BUDV (C), and MARV (D), as well as negative control animals injected with phosphate-buffered saline. The Y-axis shows geometric mean titre values (GMT) for VNAs. Data are presented as GMT values for pooled sera tested in quadruplicate; the standard deviation is indicated.

у 1 из 4 обезьян, несмотря на наличие антител класса IgG и протективных свойств данного вектора против летальной дозы вируса Марбург [5]. В другом исследовании показано, что у яванских макак, иммунизированных репликационными альфа-вируса, кодирующими GP MARV, не были детектированы ВНА к вирусу Марбург, однако эти животные выживали после заражения летальной дозой вируса [28]. Это позволяет предположить, что появление протективного иммунитета может являться результатом довольно высоких уровней ненейтрализующих антител (от англ. non-neutralising antibodies) у животных.

Определение вирус-нейтрализующих антител к вектору в сыворотках крови иммунизированных животных

Помимо ВНА к целевому белку, при иммунизации происходит индукция ВНА к вектору, если он обладает вирусной природой. Для определения уровня ВНА была поставлена реакция

нейтрализации вирусов с образцами пулированных сывороток (рис. 6). В результате титры ВНА к Ad5 были низкими (СГТ<100) во всех образцах.

В настоящее время среди исследователей нет единого мнения по поводу пороговых значений титров ВНА к Ad5 в реакции нейтрализации вирусов. В работе F.-C. Zhu с соавт. [29] предложено считать титр 1:200 в сыворотках крови человека в качестве точки отсечения между низкими и высокими титрами ВНА к Ad5. В других исследованиях мышей иммунизировали однократно и двукратно Ad5 в дозе 10^{10} в.ч. для создания предсуществующего иммунитета к вектору. В результате титры ВНА к Ad5 через 4 нед. составили около 1:20 при однократной и более 1:200 при двукратной иммунизации [30, 31]. В качестве порогового значения высокого титра ВНА также принят титр 1:200. В результате нами было установлено, что при однократной иммунизации мышей индуцируется образование ВНА к вакцинному вектору только в низких титрах (СГТ <100).

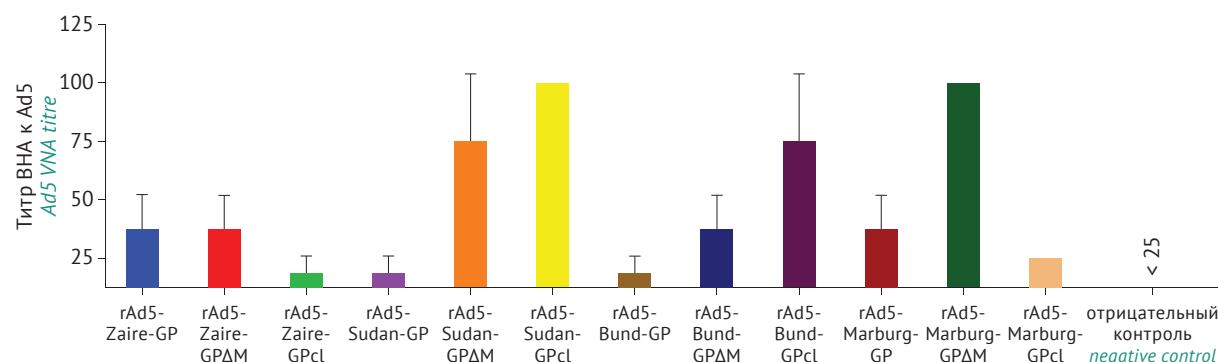


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Титры вирус-нейтрализующих антител (ВНА) к Ad5 в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусными векторами (rAd5), кодирующими различные формы GP. По оси X обозначены группы мышей, иммунизированных векторами, экспрессирующими различные формы GP EBOV, SUDV, BUDV, MARV; отрицательный контроль — животные, которым вводили фосфатно-солевой буфер. По оси Y — среднегеометрический титр (СГТ) ВНА. Данные представлены в виде СГТ пулированных сывороток, исследованных в четырех повторях; отмечено стандартное отклонение.

Fig. 6. Titres of virus-neutralising antibodies (VNAs) against adenovirus type 5 (Ad5) in the sera of mice immunised with recombinant adenoviral vectors (rAd5) encoding various glycoprotein (GP) forms. The X-axis shows groups of mice immunised with vectors expressing different GP forms of Zaire Ebola virus (EBOV), Sudan Ebola virus (SUDV), Bundibugyo Ebola virus (BUDV), and Marburg virus (MARV), as well as negative control animals injected with phosphate-buffered saline. The Y-axis shows geometric mean titre values (GMT) for VNAs. Data are presented as GMT values for pooled sera tested in quadruplicate; the standard deviation is indicated.

Одним из направлений дальнейших исследований является изучение полученных векторов на других видах животных, поскольку существуют как высокоиммунодоминантные эпитопы GP, которые распознаются антителами в поликлональных сыворотках крови (смесь антител, выработанных различными клонами В-лимфоцитов в ответ на антигенное воздействие, с широким спектром специфичности к различным эпитопам целевого антигена) нескольких разных видов животных одновременно (мышей, морских свинок и макаков-резус), так и эпитопы, которые могут чаще распознаваться сывороточными антителами, полученными от конкретных видов животных [32].

Таким образом, при разработке векторных вакцин для профилактики филовиральных инфекций в качестве антигена можно использовать как полноразмерный GP, так и GP с удаленным муциноподобным доменом всех четырех филовирусов: вируса Эбола вида Заир, Судан, Бундибуго и вируса Марбург.

ВЫВОДЫ

1. Получены рекомбинантные аденовирусы человека 5 серотипа, содержащие в своем геноме кассету с одной из форм гена GP (полноразмерный гликопротеин (GP), GP с удаленным муциноподобным доменом, с удаленными гликановым экзомом и муциноподобным доменом), которые были изучены на примере четырех представителей филовирусов: EBOV, SUDV, BUDV, MARV.

2. Сравнительный анализ иммуногенности различных форм GP филовирусов показал, что наиболее высокие уровни гуморального иммунного ответа у животных индуцируются в ответ на введение вектора, кодирующего полноразмерный GP или GP с удаленным муциноподобным доменом. ВНА были также обнаружены у мышей, иммунизированных векторами, экспрессирующими две упомянутые выше формы GP EBOV, SUDV и MARV. Анализ перекрестной реактивности антител показал, что иммунизация мышей вектором, кодирующим обе иммуногенные формы гена GP SUDV, приводит к формированию перекрестного гуморального иммунитета к GP EBOV и BUDV. Кроме того, антитела в сыворотке крови мышей, иммунизированных rAd5, кодирующим GP с удаленным муциновым доменом, обладают низкой перекрестной активностью к GP EBOV и SUDV.

3. Разработка вакцинных препаратов на основе полноразмерного GP или GP с удаленным муциновым доменом является перспективным подходом для профилактики геморрагических лихорадок, вызванных вирусом Эбола или Марбург, в связи с чем важными представляются дальнейшая оптимизация подходов, направленных на выбор вакцинной платформы, и изучение иммуногенной и протективной активности векторов при совместном применении всех четырех антигенов.

Литература/References

- Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, Dzharullayeva AS, Tukhvatulina NM, Shcheblyakov DV, et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(3):613–20.
<https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1238535>
- Zhang Z, Zhao Z, Wang Y, Wu S, Wang B, Zhang J, et al. Comparative immunogenicity analysis of intradermal versus intramuscular immunization with a recombinant human adenovirus type 5 vaccine against Ebola virus. *Front Immunol*. 2022;13:963049.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.963049>
- Ahmed I, Salsabil L, Hossain MJ, Shahriar M, Bhuiyan MA, Islam MR. The recent outbreaks of Marburg virus disease in African countries are indicating potential threat to the global public health: Future prediction from historical data. *Health Sci Reports*. 2023;6(7):e1395.
<https://doi.org/10.1002/hsr2.1395>
- Rojas M, Monsalve DM, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramirez-Santana C, Ansari AA, et al. Ebola virus disease: An emerging and re-emerging viral threat. *J Autoimmun*. 2020;106:102375.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102375>
- Jones SM, Feldmann H, Ströher U, Geisbert JB, Fernando L, Grolla A, et al. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med*. 2005;11(7):786–90.
<https://doi.org/10.1038/nm1258>
- Swenson DL, Wang D, Luo M, Warfield KL, Woraratanadham J, Holman DH, et al. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(3):460–7.
<https://doi.org/10.1128/CI.00431-07>
- Afolabi MO, Ishola D, Manno D, Keshinro B, Bockstal V, Rogers B, et al. Safety and immunogenicity of the two-dose heterologous Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccine regimen in children in Sierra Leone: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(1):110–22.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00128-6)
- Peng W, Rayaprolu V, Parvate AD, Pronker MF, Hui S, Parekh D, et al. Glycan shield of the ebolavirus envelope glycoprotein GP. *Commun Biol*. 2022;5(1):785.
<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03767-1>
- Ahmad I, Fatemi SN, Ghaheeri M, Rezvani A, Khezri DA, Natami M, et al. An overview of the role of Niemann-Pick C1 (NPC1) in viral infections and inhibition of viral infections through NPC1 inhibitor. *Cell Commun Signal*. 2023;21(1):352.
<https://doi.org/10.1186/s12964-023-01376-x>
- Murin CD, Gilchuk P, Crowe JE, Ward AB. Structural biology illuminates molecular determinants of broad ebolavirus neutralization by human antibodies for pan-ebolavirus therapeutic development. *Front Immunol*. 2022;12:808047.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808047>
- Зубкова ОВ, Ожаровская ТА, Должикина ИВ, Попова О, Щебляков ДВ, Гроусова ДМ и др. Экспрессионный вектор для создания иммунобиологического средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 (варианты). Патент Российской Федерации № 2731356 C9; 2021.
Zubkova OV, Ozharovskaia TA, Dolzhikova IV, Popova O, Shcheblyakov DV, Grousova DM, et al. Expression vector for creating immunobiological agent for inducing specific immunity to virus of severe acute respiratory syndrome SARS-CoV-2 (embodiments). Patent of the Russian Federation No. 2731356 C9; 2021 (In Russ.).
EDN: [KSWWVX](https://pubs.rsc.org/doi/10.1039/D1PY00000A)
- Lock M, Korn M, Wilson J, Sena-Esteves M, Gao G. Measuring the infectious titer of recombinant adenovirus using tissue culture infection dose 50% (TCID₅₀) end-point dilution and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(8):pdb.prot095562.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095562>
- Whitt MA. Generation of VSV pseudotypes using recombinant ΔG-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J Virol Methods*. 2010;169(2):365–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.08.006>
- Ожаровская ТА, Попова О, Зубкова ОВ, Вавилова ИВ, Почтовый АА, Щебляков ДЕ и др. Разработка и характеристика векторной системы на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2023;(1):4–11.
Ozharovskaia TA, Popova O, Zubkova OV, Vavilova IV, Pochtovyy AA, Shcheblyakov DE, et al. Development and characterization of a vector system based on the simian adenovirus type 25. *Bull Russ State Med Univ*. 2023;(1):4–11 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24075/vrgmu.2023.006>
- Carroll SA, Townner JS, Sealy TK, McMullan LK, Khristova ML, Burt FJ, et al. Molecular evolution of viruses of the family *Filoviridae* based on 97 whole-genome sequences. *J Virol*. 2013;87(5):2608–16.
<https://doi.org/10.1128/JVI.03118-12>
- Yang ZY, Duckers HJ, Sullivan NJ, Sanchez A, Nabel EG, Nabel GJ. Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat Med*. 2000;6(8):886–9.
<https://doi.org/10.1038/78645>
- Zhao Y, Ren J, Harlos K, Jones DM, Zeltina A, Bowden TA, et al. Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein. *Nature*. 2016;535(7610):169–72.
<https://doi.org/10.1038/nature18615>
- Cottingham MG, Carroll F, Morris SJ, Turner AV, Vaughan AM, Kapulu MC, et al. Preventing spontaneous genetic rearrangements in the transgene cassettes of adenovirus vectors. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(3):719–28.
<https://doi.org/10.1002/bit.24342>
- Gallais Y, Sierocki R, Lhomme G, Sivelles C, Kiseljak D, Wurm F, et al. Large-scale mapping of the Ebola NP and GP proteins reveals multiple immunoprevalent and conserved CD4 T-cell epitopes. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(5):1323–5.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0455-2>
- Bhatia B, Furuyama W, Hoenen T, Feldmann H, Marzi A. Ebola virus glycoprotein domains associated with protective efficacy. *Vaccines*. 2021;9(6):630.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9060630>
- Meyer M, Yoshida A, Ramanathan P, Saphire EO, Collins PL, Crowe JE, et al. Antibody repertoires to the same Ebola vaccine antigen are differentially affected by vaccine vectors. *Cell Rep*. 2018;24(7):1816–29.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.044>
- Kimble JB, Malherbe DC, Meyer M, Gunn BM, Karim MM, Ilinykh PA, et al. Antibody-mediated protective mechanisms induced by a trivalent parainfluenza virus-vectored ebolavirus vaccine. *J Virol*. 2019;93(4):e01845–18.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01845-18>
- Murin CD, Fusco ML, Bornholdt ZA, Qiu X, Olinger GG, Zeitlin L, et al. Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(48):17182–7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1414164111>

24. Saphire EO, Schendel SL, Fusco ML, Gangavarapu K, Gunn BM, Wec AZ, et al. Systematic analysis of monoclonal antibodies against Ebola virus GP defines features that contribute to protection. *Cell*. 2018;174(4):938–952.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.033>
25. Bornholdt ZA, Turner HL, Murin CD, Li W, Sok D, Souders CA, et al. Isolation of potent neutralizing antibodies from a survivor of the 2014 Ebola virus outbreak. *Science*. 2016;351(6277):1078–83. <https://doi.org/10.1126/science.aad5788>
26. Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albariño CG, Conlan S, Reeder SA, et al. Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog*. 2008;4(11):e1000212. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000212>
27. Hensley LE, Mulangu S, Asiedu C, Johnson J, Honko AN, Stanley D, et al. Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus species. *PLoS Pathog*. 2010;6(5):e1000904. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000904>
28. Hevey M, Negley D, Pushko P, Smith J, Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology*. 1998;251(1):28–37. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9367>
29. Zhu F-C, Guan X-H, Li Y-H, Huang J-Y, Jiang T, Hou L-H, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2020;396(10249):479–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)
30. Flickinger JC, Singh J, Carlson R, Leong E, Baybutt TR, Barton J, et al. Chimeric Ad5.F35 vector evades anti-adenovirus serotype 5 neutralization opposing GUCY2C-targeted antitumor immunity. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e001046. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001046>
31. Flickinger JC, Staudt RE, Singh J, Carlson RD, Barton JR, Baybutt TR, et al. Chimeric adenoviral (Ad5.F35) and listeria vector prime-boost immunization is safe and effective for cancer immunotherapy. *NPI Vaccines*. 2022;7(1):61. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00483-z>
32. Mitchell DAJ, Dupuy LC, Sanchez-Lockhart M, Palacios G, Back JW, Shimanovskaya K, et al. Epitope mapping of Ebola virus dominant and subdominant glycoprotein epitopes facilitates construction of an epitope-based DNA vaccine able to focus the antibody response in mice. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(12):2883–93. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1347740>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Т.А. Ожаровская** — участие в формулировании концепции и плана экспериментов, получение генно-инженерных конструкций, получение и наработка рекомбинантных аденовирусов, оценка гуморального иммунного ответа, исследование вирус-нейтрализующих антител к аденовирусу, написание текста рукописи; **О.В. Зубкова** — формулирование концепции и плана экспериментов, получение рекомбинантных аденовирусов, исследование вирус-нейтрализующих антител к аденовирусу, формулировка выводов, редактирование рукописи; **О. Попова** — получение генно-инженерных конструкций, оценка гуморального иммунного ответа, постановка реакции нейтрализации псевдовирусов; **А.В. Ковыршина, И.В. Вавилова** — анализ препаратов рекомбинантных аденовирусов; **П.П. Голдовская** — комплекс работ по экспериментам с животными; **И.В. Должикова** — участие в формулировании концепции и плана экспериментов, выбор последовательностей антигенов; **Е.И. Ермолова, М.С. Кунда, Н.Н. Рыжова, О.Л. Воронина** — секвенирование рекомбинантных аденовирусов; **Д.Н. Щербинин** — биоинформатический анализ и выбор последовательностей антигенов; **Д.В. Щебляков** — редактирование текста рукописи; **Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург** — утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании этического комитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, протокол заседания № 35 от 24.01.2023.

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены таблицы 1–4. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table2>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table3>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table4>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **T.A. Ozharovskaya** participated in the formulation of the concept and plan of experiments, obtained genetically engineered constructs, obtained and grew recombinant adenoviruses, assessed the humoral immune response and adenovirus-neutralising antibodies, and drafted the manuscript. **O.V. Zubkova** formulated the concept and plan of experiments, produced recombinant adenoviruses, studied adenovirus-neutralising antibodies, formulated the conclusions, and edited the manuscript. **O. Popova** obtained genetically engineered constructs, assessed the humoral immune response, and conducted pseudovirus neutralisation tests. **A.V. Kovyreshina** and **I.V. Vavilova** analysed the recombinant adenovirus samples. **P.P. Goldovskaya** conducted the experiments with animals. **I.V. Dolzhikova** participated in the formulation of the concept and the plan of experiments and selected antigen sequences. **E.I. Ermolova, M.S. Kunda, N.N. Ryzhova** and **O.L. Voronina** performed sequencing of recombinant adenoviruses. **D.N. Shcherbinin** conducted bioinformatics analysis selected antigen sequences. **D.V. Shcheblyakov** edited the manuscript. **D.Y. Logunov** and **A.L. Gintsburg** approved the final version of the manuscript.

Ethics approval. The study was approved by the Bioethics Committee at the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol No. 35 dated 24 January 2023).

Additional information. Tables 1–4 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table2>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table3>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-294-311-table4>

Об авторах / Authors

Ожаровская Татьяна Андреевна, канд. биол. наук / **Tatiana A. Ozharovskaia**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7147-1553>

Зубкова Ольга Вадимовна, канд. биол. наук / **Olga V. Zubkova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7893-8419>

Попова Ольга / Olga Popova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3248-1227>

Ковыршина Анна Витальевна / Anna V. Kovyrshina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8757-7026>

Голдовская Полина Павловна / Polina P. Goldovskaya

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1965-0482>

Вавилова Ирина Викторовна / Irina V. Vavilova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-6272-0368>

Должикова Инна Вадимовна, канд. биол. наук / **Inna V. Dolzhikova**, Cand. Sci. (Biol.)

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

Ермолова Екатерина Ивановна, канд. биол. наук / **Ekaterina I. Ermolova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

Кунда Марина Сергеевна, канд. биол. наук / **Marina S. Kunda**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Рыжова Наталья Николаевна, канд. биол. наук / **Natalia N. Ryzhova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Воронина Ольга Львовна, канд. биол. наук, доц. / **Olga L. Voronina**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Щербинин Дмитрий Николаевич, канд. биол. наук / **Dmitry N. Shcherbinin**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Щебляков Дмитрий Викторович, канд. биол. наук / **Dmitry V. Shcheblyakov**, Cand. Sci. (Biol.).

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

Логунов Денис Юрьевич, д-р биол. наук, академик РАН / **Denis Y. Logunov**, Dr. Sci. (Biol.), Academician of the Russian Academy of Sciences

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, академик РАН, профессор / **Alexander L. Gintsburg**, Dr. Sci. (Biol.), Academician of the Russian Academy of Sciences, Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Поступила 09.04.2024

После доработки 04.09.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Received 09 April 2024

Revised 04 September 2024

Accepted 12 September 2024



Исследование защитной эффективности препарата КомбиМаб-2 против вируса иммунодефицита человека типа 1 на мышах, гуманизированных CD4⁺ Т-лимфоцитами

Д.С. Леонтьев^{1,✉}, Ф.А. Урусов^{1,2}, Д.В. Глазкова¹, Б.В. Белугин¹, О.В. Орлова¹,
Р.Р. Минтаев¹, Г.М. Цыганова¹, Е.В. Богословская¹, Г.А. Шипулин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства, Погодинская ул., д. 10, стр. 1, Москва,
119121, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова», проспект Буденного, д. 31,
Москва, 105275, Российская Федерация

✉ Леонтьев Данила Сергеевич; danila.leontyev@gmail.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Несмотря на существующие подходы к терапии инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), полное излечение остается труднодостижимым из-за высокой изменчивости ВИЧ типа 1 (ВИЧ-1), что требует пожизненного приема антиретровирусных препаратов, обладающих серьезными побочными эффектами. Разработка генотерапевтических препаратов с использованием векторов на основе аденоассоциированных вирусов (adeno-associated virus, AAV), кодирующих нейтрализующие антитела широкого спектра действия (широко нейтрализующие антитела), является перспективным направлением для создания долгосрочной терапии в отношении большого количества вариантов вируса.

ЦЕЛЬ. Оценка защитной эффективности препарата КомбиМаб-2, представляющего собой комбинацию трех AAV-векторов (AAV9-VRC07-523, AAV9-10-1074 и AAV9-PGDM1400), кодирующих широко нейтрализующие антитела против ВИЧ-1, на модели гуманизированных мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследовании использована животная модель ВИЧ-инфекции на основе иммунодефицитных мышей линии B-NDG, гуманизированных человеческими CD4⁺ Т-лимфоцитами в количестве 1,5×10⁷ клеток на мыш, полученными из лейкоконцентрата здорового донора. В эксперименте использовали две группы мышей. Контрольной группе животных (3 особи) вводили физиологический раствор, опытной группе (5 особей) – Комбимаб-2. Препарат в виде трех отдельных компонентов вводили в разные мышцы за 6 нед. до инфицирования животных вирусом. CCR5-тропный ВИЧ-1 получали путем трансфекции клеток HEK293FT плазмидой pNL4-3(Δ8), кодирующей полноразмерный вирус. В течение 4 нед. после заражения проводили мониторинг вирусной нагрузки в плазме крови методом ПЦР с обратной транскрипцией и числа CD4⁺ Т-лимфоцитов методом точной цитометрии в периферической крови животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Установлено, что через 6 нед. после введения исследуемого препарата гуманизированным мышам уровень широко нейтрализующих антител в сыворотке крови животных варьировал от 0,17 до 4,0 мкг/мл. После заражения ВИЧ-1 в контрольной группе мышей уровень вирусной нагрузки составил 10⁵ копий/мл через 1 нед., далее наблюдалось увеличение показателя в течение последующих 3 нед. В группе животных, получавших

препарат, инфекция развилась только у одной мыши, имевшей самый низкий титр антител. У остальных мышей вирусная нагрузка не детектировалась, что указывает на эффективность препарата при условии достижения концентрации широко нейтрализующих антител в сыворотке крови от 0,5 мкг/мл и выше.

ВЫВОДЫ. Препарат на основе трех AAV-векторов (AAV9-VRC07-523, AAV9-10-1074 и AAV9-PGDM1400) обладает защитной эффективностью в отношении ВИЧ-1 в исследовании на гуманизированных мышах. Представленные данные позволяют рассматривать препарат как перспективное противовирусное средство, что может послужить основой для дальнейшей фармацевтической разработки.

Ключевые слова: гуманизированные мыши; вирус иммунодефицита человека типа 1; ВИЧ-1; CD4⁺ Т-лимфоциты; аденоассоциированный вирус; AAV-вектор; генная терапия; широко нейтрализующие антитела; защитная эффективность; противовирусная активность

Для цитирования: Леонтьев Д.С., Урусов Ф.А., Глазкова Д.В., Белугин Б.В., Орлова О.В., Минтаев Р.Р., Цыганова Г.М., Богословская Е.В., Шипулин Г.А. Исследование защитной эффективности препарата КомбиМаб-2 против вируса иммунодефицита человека типа 1 на мышах, гуманизированных CD4⁺ Т-лимфоцитами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):312–321. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-312-321>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России «Пассивная иммунизация».
Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Study of the protective efficacy of CombiMab-2 against human immunodeficiency virus type 1 in mice humanised with CD4⁺ T-lymphocytes

Danila S. Leontyev^{1,✉}, Felix A. Urusov^{1,2}, Dina V. Glazkova¹,
Boris V. Belugin¹, Olga V. Orlova¹, Ramil R. Mintaev¹, Galina M. Tsyganova¹,
Elena V. Bogoslovskaya¹, German A. Shipulin¹

¹ Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, 10/1, Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russian Federation

² Izmerov Research Institute of Occupational Health, 31 Budenny Ave, Moscow 105275, Russian Federation

✉ Danila S. Leontyev; danila.leontyev@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. Despite existing treatment methods, complete eradication of human immunodeficiency virus (HIV) infection remains an unattainable goal due to the high variability of HIV type 1 (HIV-1). HIV infection necessitates life-long administration of antiretroviral medicinal products, which cause serious adverse drug reactions. The development of gene therapy products based on adeno-associated virus (AAV) vectors encoding broadly neutralising antibodies represents a promising direction for creating long-term therapies capable of countering a wide range of viral variants.

AIM. This study aimed to evaluate the protective efficacy of CombiMab-2, a medicinal product consisting of a combination of three AAV vectors (AAV9-VRC07-523, AAV9-10-1074, and AAV9-PGDM1400) encoding broadly neutralising antibodies against HIV-1, in a humanised mouse model.

MATERIALS AND METHODS. The study used an HIV infection model based on immunodeficient B-NDG mice humanised with human CD4⁺ lymphocytes (1.5×10^7 cells per animal) from a leukoconcentrate of a healthy donor. The experiment used two groups of mice, including a control group (3 animals) receiving saline solution and an experimental group (5 animals) receiving CombiMab-2. The medicinal product was administered into different muscles as three separate

components six weeks prior to infection. The CCR5-tropic HIV-1 strain was obtained by transfecting HEK293FT cells with the pNL4-3(AD8) plasmid encoding the full-length virus. The authors monitored viral loads in the plasma of animals by reverse transcription polymerase chain reaction and CD4⁺ lymphocyte counts in the peripheral blood of animals by flow cytometry for four weeks after infection.

RESULTS. Six weeks after CombiMab-2 administration, the levels of broadly neutralising antibodies in the serum of humanised mice ranged from 0.17 µg/mL to 4.0 µg/mL. In the control group, the viral load reached 10⁵ copies/mL one week after HIV-1 infection and continued to rise over the next three weeks. In the treatment group, infection developed only in one mouse, which had the lowest antibody titre before infection. No viral load was detected in the remaining mice of the treatment group, which indicated that the medicinal product was effective if serum concentrations of broadly neutralising antibodies reached 0.5 µg/mL or higher.

CONCLUSIONS. The tested medicinal product based on three AAV vectors (AAV9-VR07-523, AAV9-10-1074, and AAV9-PGDM1400) exhibits protective activity against HIV-1 in humanised mice. The presented data allow the authors to consider CombiMab-2 as a promising antiviral agent that can serve as a basis for further pharmaceutical development.

Keywords: humanised mice; human immunodeficiency virus type 1; HIV-1; CD4⁺ T-lymphocytes; adeno-associated virus; AAV vector; gene therapy; broadly neutralising antibodies; protective efficacy; antiviral activity

For citation: Leontyev D.S., Urusov F.A., Glazkova D.V., Belugin B.V., Orlova O.V., Mintaev R.R., Tsyganova G.M., Bogoslovskaya E.V., Shipulin G.A. Study of the protective efficacy of CombiMab-2 against human immunodeficiency virus type 1 in mice humanised with CD4⁺ T-lymphocytes. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):312–321. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-312-321>

Funding. The study reported in this publication was carried out by the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical and Biological Agency of Russia as part of the publicly funded research project Passive Immunisation.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), остается глобальной проблемой здравоохранения: по всему миру ВИЧ инфицировано более 38 млн человек¹. В Российской Федерации на 31.12.2022 более 1 млн человек имели подтвержденный диагноз ВИЧ-инфекции, что составляло около 0,8% от населения России². Хотя антиретровирусная терапия способствует значительному повышению продолжительности жизни инфицированных людей, она не приводит к полному излечению и требует пожизненного приема препаратов [1]. Кроме того, быстрая изменчивость ВИЧ позволяет ему развивать лекарственную устойчивость. Для решения указанных проблем необходимо разрабатывать новые и эффективные методы лечения ВИЧ-инфекции [2, 3].

Перспективными для разработки новых подходов терапии ВИЧ-инфекции являются нейтрализующие антитела широкого спектра действия (широко нейтрализующие антитела, broadly

neutralising antibodies, bNAbs) [4]. Эти антитела обладают способностью распознавать и нейтрализовать широкий спектр штаммов ВИЧ-1 [5].

Результаты ряда клинических исследований показали, что применение широко нейтрализующих антител в виде белковых препаратов имеет терапевтический потенциал при лечении ВИЧ-инфекции, значительно снижая уровень вирусной нагрузки у пациентов [6, 7]. Однако эффект носил временный характер, что обусловлено наличием двух ограничивающих факторов: развитием резистентности вируса и относительно коротким периодом полужизни антител в организме [6]. Проблема резистентности вируса может быть решена путем применения комбинаций из нескольких широко нейтрализующих антител. Комбинация из двух и более антител позволяет значительно снижать вирусную нагрузку и предотвращает появление резистентных штаммов [8, 9].

Короткий период полужизни антител *in vivo* требует частых повторных введений

¹ Путь к победе над СПИДом: Доклад ЮНЭЙДС о глобальной эпидемии СПИДа 2023. Женева: Объединенная программа Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДУ (ЮНЭЙДС); 2023.

² ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2022 г. Справки по ВИЧ-инфекции в России. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. <https://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2023/09/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2022.pdf>

для поддержания их терапевтической концентрации в плазме крови, что затрудняет проведение лечения и приводит к его удорожанию [10, 11]. Для решения этой проблемы разрабатываются новые подходы, одним из которых является использование векторов на основе аденоассоциированных вирусов (adeno-associated virus, AAV) для доставки в клетки организма трансгенов, кодирующих широко нейтрализующие антитела [12, 13]. Эта стратегия может обеспечить долгосрочную (не менее одного года) экспрессию антител в организме человека и в перспективе стать более эффективным подходом к лечению ВИЧ-инфекции [14].

Ранее авторами данной статьи был разработан экспериментальный генотерапевтический препарат КомбиМаб-2 на основе трех AAV-векторов 9 серотипа (AAV9): AAV9-VRC07-523, AAV9-10-1074, AAV9-PGDM1400, кодирующих три широко нейтрализующих антитела [15]. Введение такой комбинации рекомбинантных векторов мышам приводило к выработке и длительной циркуляции антител в крови животных. Образцы сыворотки крови, полученные от животных, обладали нейтрализующей активностью в отношении глобальной панели штаммов ВИЧ-1 [15].

Для исследования защитных свойств разработанного препарата в данной работе в качестве модели *in vivo* применялись мыши с врожденным иммунодефицитом линии B-NDG (NOD.CB17-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1}/Bcgen). Выбор модели обусловлен возможностью обеспечить длительную циркуляцию человеческих лимфоцитов в организме мышей, что создает условия для заражения животных ВИЧ-1 и оценки эффективности тестируемого препарата. В отличие от общепринятого метода гуманизации мышей фракцией мононуклеарных клеток (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) [16], в данной работе животным вводили выделенные человеческие CD4⁺ Т-лимфоциты. Такая модификация стандартного протокола гуманизации иммунодефицитных мышей основана на данных исследования [17], подтверждающих, что использование фракции CD4⁺ Т-лимфоцитов замедляет наступление реакции «трансплантат против хозяина», характерной для мышей, гуманизированных PBMC.

Цель работы — оценка защитной эффективности препарата КомбиМаб-2, представляющего собой комбинацию трех AAV-векторов (AAV9-VRC07-523, AAV9-10-1074 и AAV9-PGDM1400), кодирующих широко нейтрализующие антитела против ВИЧ-1, на модели гуманизированных мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Исследования на животных проводились в соответствии с Протоколом биоэтической комиссии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России (Протокол № 2 от 15.02.2024). В работе были использованы самки и самцы иммунодефицитных мышей линии B-NDG (Biocytogen, Китай) весом 20–23 г. Животные содержались в индивидуально вентилируемых клетках ISOcage (Tecniplast, Италия) для обеспечения микробиологического барьера и поддержания SPF-статуса иммунодефицитных животных. Все манипуляции с ВИЧ-1 и инфицированными животными проводили с соблюдением правил работы с микроорганизмами II группы патогенности.

Наработка КомбиМаб-2

Наработку AAV-векторов проводили в культуре клеток HEK293FT (Invitrogen, США) путем трансфекции тремя плазмидами (в эквимольном соотношении) — pAAV-Helper (Cell Biolabs, США), pAAV-RC-9 (Cell Biolabs, США) и векторной плазмидой, кодирующей одно из антител [15]. Клетки трансфицировали с помощью полиэтиленимин гидрохлорида PEI MAX 40000 (Polysciences, США) в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США). На следующий день после трансфекции заменяли ростовую среду на бесывороточную OptiMEM (Gibco, США) и культивировали при 37 °C и 5% CO₂. Через 72 ч после трансфекции клетки собирали, лизировали путем трехкратного замораживания-оттаивания и обрабатывали бензоназой (Merck Life Science, США). Лизат клеток центрифугировали при 2300 g в течение 5 мин, полученный супернатант фильтровали через PES-мембрану с размером пор 0,45 мкм (TPP, Швейцария). Очистку AAV-векторов проводили ультрацентрифугированием при 175000 g в течение 2 ч в градиенте плотности йодиксанола (Unique Pharmaceuticals Laboratories, Индия) с дальнейшим диализом и концентрированием с использованием фильтров Amicon Ultra 50 kDa (Merck Life Science, США). Полученные препараты AAV-векторов разделяли на аликвоты и хранили при минус 70 °C. Число копий векторных геномов (vg) в образцах AAV-векторов определяли, используя метод капельной цифровой ПЦР (droplet digital PCR) с праймерами GGAACCCCTAGTGATGGAGTT, CGGCCTCAGTGAGCGA и зондом FAM-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG-BHQ1 (синтезированы АО «ГенТерра», Россия), которые были

комплементарны последовательностям коротких инвертированных повторов (inverted terminal repeat, ITR) AAV.

Проведение пассивной иммунизации с использованием КомбиМаб-2

Экспериментальных животных вне зависимости от пола разделяли на две группы: контрольная группа ($n=3$) и опытная группа ($n=5$). За 6 нед. до введения Т-лимфоцитов и заражения животным опытной группы вводили исследуемый препарат КомбиМаб-2. Каждый из трех AAV-векторов, входящих в состав препарата, вводили по отдельности в разные мышцы: 100 мкл AAV9-VRC07-523 — в левую бедренную мышцу; 100 мкл AAV9-10-1074 — в правую бедренную мышцу; по 50 мкл AAV9-PGDM1400 — в правую и левую трехглавые мышцы передних лап. Доза каждого AAV-вектора составила 4×10^{11} вг/мышь. Животным контрольной группы вводили 0,9% раствор NaCl в эквивалентном объеме.

Для подтверждения экспрессии широко нейтрализующих антител спустя 28 сут после введения препарата оценивали концентрацию антител в сыворотке животных с помощью коммерческого набора для определения общего количества IgG человека — Human IgG ELISA Antibody Pair Kit (StemCell, Канада) в соответствии с инструкцией производителя.

Гуманизация животных

Мононуклеарные клетки человека выделяли из лейкоконцентрата здорового донора, полученного из цельной крови в тот же день, когда производился забор крови. Выделение фракции мононуклеаров проводили с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла (P050E, ПанЭко, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Из полученных мононуклеаров крови выделяли фракцию CD4⁺ Т-лимфоцитов методом негативной магнитной сепарации с помощью набора CD4⁺ T Cell Isolation Kit, human (кат. № 130-096-533, Miltenyi Biotec, Германия), клетки после выделения замораживали и хранили в жидком азоте.

За 8 сут до введения животным клетки размораживали и культивировали в бессывороточной среде X-VIVO 15 (Lonza, Швейцария). На 2 сут после разморозки клетки активировали магнитными частицами CD3/CD28 Dynabeads Human T-Activator (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и добавляли IL-2 до конечной концентрации 100 МЕ/мл (ООО «Биотех», Россия). На 4 сут магнитные частицы удаляли и далее каждые два дня клетки рассеивали в среде X-VIVO 15, содержащей 100 МЕ/мл IL-2, до плотности 1 млн кл/мл.

На 9 сут культивирования клетки осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (DPBS, Gibco, США) до плотности $7,5 \times 10^7$ кл/мл. Жизнеспособность клеток перед введением животным оценивали в камере Горяева, окрашивая клетки 0,1% раствором трипанового синего. В работе использовали одну партию клеток, полученных от одного донора, жизнеспособность которых составляла не менее 93%, содержание CD4⁺ Т-лимфоцитов — не менее 95%.

Трансплатацию CD4⁺ Т-лимфоцитов человека мышам (гуманизацию) проводили путем введения клеток в хвостовую вену в количестве $1,5 \times 10^7$ кл/мышь в объеме 200 мкл. Через 3 нед. для временного купирования реакции «трансплантат против хозяина» всем животным внутривенно вводили нормальный человеческий иммуноглобулин (АО «НПО «Микроген», Россия) в дозе 2 г/кг.

Наработка ВИЧ-1

Штамм ВИЧ-1 NL4-3(AD8), тропный к рецептору CCR5, получали в клетках HEK293FT путем трансфекции клеток плазмидой pNL4-3(AD8), кодирующей полноразмерный вирус, предоставленной по программе Национальных институтов здравоохранения США (National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program). Для получения вируса клетки культивировали в флаконах площадью 75 см² в ростовой среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки в условиях, обеспечивающих формирование на следующий день 50% клеточного монослоя. На следующий день клетки трансфицировали с помощью реагента FuGENE (Promega, США) плазмидной ДНК pNL4-3(AD8) в дозе 13 мкг на один культуральный флакон. Через 16 ч после трансфекции проводили замену среды на бессывороточную среду OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, США). На 3 сут после трансфекции собирали клеточный супернатант, который фильтровали с использованием 0,45 мкм фильтра (TPP, Швейцария), обрабатывали бензоном при 37 °C в течение 1 ч и концентрировали в 10 раз с помощью центрифужных концентраторов (Amicon® Ultra-15, Merck Life Science, США) с размером пор 100 кДа. Вирусную суспензию разделяли на аликваты по 200 мкл и хранили при температуре минус 70 °C. Концентрацию антигена p24 ВИЧ в вирусной суспензии определяли с помощью набора реагентов p24-антиген-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Заражение животных ВИЧ-1 и отбор образцов крови

Заражение животных проводили на следующий день после введения CD4⁺ Т-лимфоцитов человека. Животных из опытной и контрольной групп заражали штаммом ВИЧ-1 NL4-3(AD8) в дозе 500 нг р24/мышь путем внутрибрюшинной инъекции. Кровь для мониторинга вирусной нагрузки и количества Т-клеток отбирали из бедренной вены животных, предварительно anestезированных изофлураном. Отбирали не менее 70 мкл крови с помощью капиллярных пробирок (Microvette 200, Sarstedt, Германия).

Оценка вирусной нагрузки в образцах плазмы крови мышей

Образцы крови центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин и отделяли плазму. Клеточный осадок использовали для цитометрического анализа. Определение концентрации РНК ВИЧ-1 в плазме крови экспериментальных животных проводили методом ОТ-ПЦР с помощью набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-FRT» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

Цитометрический анализ

Полученные после центрифугирования клетки крови ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере в объеме удаленной плазмы и окрашивали с помощью флуоресцентно-меченных антител, специфичных к человеческим рецепторам: hCD45-FITC, hCD3-APC, hCD4-PE (BD Biosciences, США). Цитометрический анализ образцов клеток и определение абсолютного числа CD3⁺/CD4⁺ Т-лимфоцитов проводили с использованием проточного цитометра Bio-Rad ZE5 (Bio-Rad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн эксперимента

Схема дизайна эксперимента по оценке защитных свойств препарата КомбиМаб-2 на гуманизированных мышах представлена на *рис. 1*.

Пассивная иммунизация

В соответствии с дизайном эксперимента (*рис. 1*) на 1 этапе животным вводили препарат КомбиМаб-2. Введение осуществлялось за 6 нед. до трансплатации CD4⁺ Т-лимфоцитов и заражения животных вирусом, так, чтобы к моменту инфицирования в крови мышей была достаточная для нейтрализации вируса концентрация антител. Схема эксперимента обусловлена временным ограничением периода его проведения (не более 4–5 нед.) из-за возможности развития у мышей реакции «трансплантат против хозяина». Через 4 нед. после введения препарата был достигнут детектируемый уровень широко нейтрализующих антител в сыворотке крови мышей – диапазон от 0,17 до 4,0 мкг/мл (*табл. 1*).

Результаты цитометрического анализа лимфоцитов периферической крови

Через 6 нед. после введения исследуемого препарата мышам опытной и контрольной групп проводили трансплатацию CD4⁺ Т-лимфоцитов человека, на следующий день всех животных инфицировали ВИЧ-1. Спустя 1 нед. после заражения и далее еженедельно проводили цитометрическое исследование образцов периферической крови. На *рисунке 2* показана стратегия гейтирования (выбора исследуемой популяции клеток) при проведении цитометрического анализа. Показано наличие у всех гуманизированных мышей CD4⁺ Т-лимфоцитов человека на протяжении всего срока наблюдения (*табл. 2*), что обеспечивает физиологические условия для заражения и протекания инфекции [16].

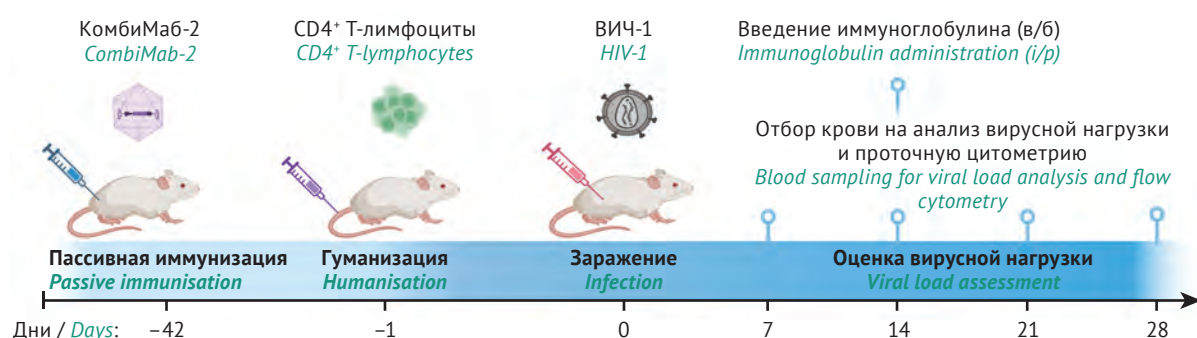


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Схема эксперимента.

Fig. 1. Experimental timeline.

Таблица 1. Концентрация широко нейтрализующих антител и вирусной РНК в плазме крови мышей
Table 1. Plasma levels of broadly neutralising antibodies and viral RNA in mice

Группа Group	Номер мыши в группе Mouse No.	Концентрация IgG, мкг/мл IgG concentration, µg/mL	Вирусная нагрузка, копии/мл Viral load, copies/mL			
			1 нед. Week 2	2 нед. Week 2	3 нед. Week 3	4 нед. Week 4
Опытная группа – КомбиМаб-2 CombiMab-2 group	1	4,00	3,2×10 ³	0	0	0
	2	0,55	0	0	*	*
	6	0,50	0	0	0	2,9×10 ⁴
	7	0,17	0	4,8×10 ³	2,6×10 ⁶	*
	8	1,80	0	0	0	*
Контрольная группа Control group	3	–	1,4×10 ⁶	1,5×10 ⁶	1,8×10 ⁷	8,0×10 ⁶
	4	–	2,5×10 ⁵	1,8×10 ⁶	1,8×10 ⁷	8,2×10 ⁵
	5	–	1,8×10 ⁵	1,9×10 ⁶	*	*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. * – отсутствие данных вследствие гибели животного.
Note. * missing data due to the death of the animal.

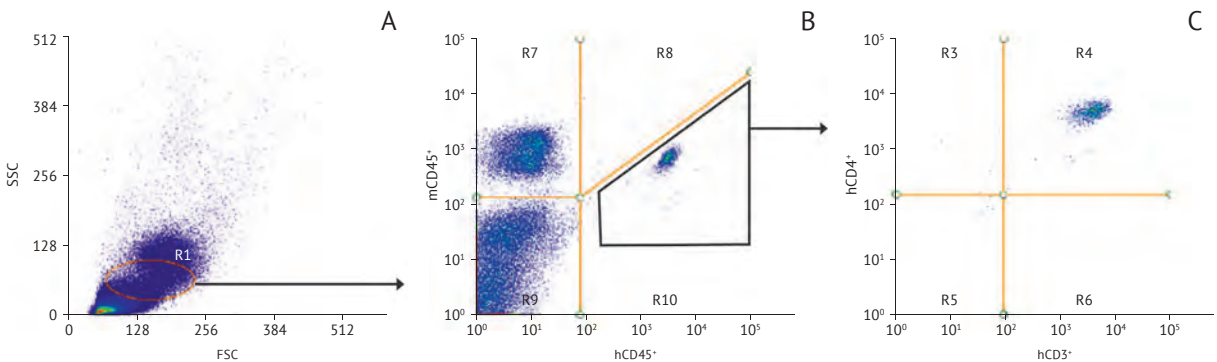


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Цитометрический анализ клеток периферической крови гуманизированной мыши через 1 нед. после трансплантации CD4⁺ Т-лимфоцитов человека. Стратегия гейтирования (выбора исследуемой популяции клеток) включала: А – выделение популяции (гейта) лимфоцитов по боковому и прямому светорассеиванию (side scattering/forward scattering, SSC/FSC); В – отделение популяции CD45⁺ клеток человека (hCD45⁺, квадрант R10) от популяции CD45⁺ мыши (mCD45⁺); С – выделение популяции CD3⁺/CD4⁺ Т-лимфоцитов человека (hCD3⁺/hCD4⁺, квадрант R4).

Fig. 2. Flow cytometry of peripheral blood cells obtained from a humanised mouse one week after transplantation of human CD4⁺ T-lymphocytes. The gating strategy included the following: A, selection of the lymphocyte population (gate) based on side and forward light scattering (SSC/FSC); separation of the human CD45⁺ cell population (hCD45⁺, quadrant R10) from the mouse CD45⁺ population (mCD45⁺); C, identification of the human CD3⁺/CD4⁺ T-lymphocyte population (hCD3⁺/hCD4⁺, quadrant R4).

К концу срока наблюдения в обеих группах наблюдалось снижение числа CD4⁺ Т-лимфоцитов человека, что, видимо, связано с ограниченным периодом полужизни данных клеток после их активации и пролиферации в культуре.

Мониторинг вирусной нагрузки

У всех мышей контрольной группы после заражения ВИЧ-1, несмотря на неоднородное содержание человеческих CD4⁺ Т-лимфоцитов, развивалась инфекция. Вирусная нагрузка составила >10⁵ копий/мл уже через 1 нед. после заражения

и увеличивалась на протяжении 3 нед. (табл. 1). Уменьшение вирусной нагрузки в контрольной группе наблюдалось на 4 нед. у двух выживших мышей (№ 3 и 4), что совпало со снижением числа лимфоцитов. Применение мышей линии B-NDG, гуманизированных CD4⁺ Т-лимфоцитами человека, в качестве модельных животных позволяет адекватно воспроизводить ВИЧ-инфекцию.

В опытной группе только у одной мыши (№ 7) было отмечено развитие инфекции, которое началось с задержкой на 1 нед. по сравнению с контрольной группой. Следует отметить,

Таблица 2. Количество CD4⁺ Т-лимфоцитов человека в образцах крови гуманизированных мышей (объем пробы — 40 мкл)
Table 2. Number of human CD4⁺ lymphocytes in blood samples (40 µL) from humanised mice

Группа <i>Group</i>	Номер мыши в группе <i>Mouse No.</i>	Количество CD4 ⁺ Т-лимфоцитов человека <i>Number of human CD4⁺ cells</i>			
		1 нед. <i>Week 2</i>	2 нед. <i>Week 2</i>	3 нед. <i>Week 3</i>	4 нед. <i>Week 4</i>
Опытная группа — КомбиМаб-2 <i>CombiMab-2 group</i>	1	2240	#	397	43
	2	491	242	*	*
	6	64	299	34	9
	7	1738	1747	950	*
	8	1402	2104	2486	*
Контрольная группа <i>Control group</i>	3	3261	1516	215	112
	4	1690	474	189	49
	5	401	2887	*	*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. * — отсутствие данных вследствие гибели животного, # — отсутствие данных по технической причине.
Note. * missing data due to the death of the animal; # unavailable data due to technical reasons.

что в сыворотке крови этого животного наблюдалась самая низкая концентрация человеческих антител до инфицирования — 0,17 мкг/мл (табл. 1). У остальных четырех мышей из опытной группы устойчивого развития инфекции не наблюдалось: у двух мышей (№ 2 и 8) вирусная нагрузка не детектировалась ни в одной временной точке; у одной мыши (№ 1) низкое число вирусных копий выявлено спустя 1 нед. после инфицирования, однако все дальнейшие пробы были отрицательные; у одной мыши (№ 6) невысокая вирусная нагрузка ($2,9 \times 10^4$ копий/мл) обнаружилась только в последнюю неделю эксперимента. Таким образом, можно сделать вывод, что действие препарата КомбиМаб-2 приводит к блокированию развития ВИЧ-инфекции у гуманизированных мышей при достижении в крови концентрации антител 0,5 мкг/мл.

В настоящее время минимальный уровень антител, необходимый для эффективной нейтрализации ВИЧ-1, пока не определен. Согласно данным экспериментальных исследований *in vitro* разные комбинации антител могут быть эффективны в различных концентрациях, в том числе при <1 мкг/мл [18]. Диапазон эффективных концентраций антител в исследованиях *in vivo* также отличается от данных, полученных *in vitro*, что показано, например, в работе Y.U. van der Velden с соавт. [19]. В других исследованиях *in vivo* было продемонстрировано, что некоторые широко нейтрализующие антитела могут подавлять ВИЧ-1 при концентрации от 8,3 мкг/мл и выше [20, 21]. В нашей работе при использовании комбинированного препарата КомбиМаб-2 эффективное

подавление вирусной нагрузки в организме животных было достигнуто при более низких значениях антител — 0,5–4,0 мкг/мл. Однако следует отметить, что показатель снижения концентрации вирусной РНК зависит от многих факторов: специфической активности исследуемых антител, штамма вируса, применяемого для заражения, метода измерения IgG в крови и др. В связи с этим прямое сравнение результатов, полученных в разных экспериментальных условиях, не всегда оправдано.

При использовании AAV-векторов, кодирующих нейтрализующие антитела, обеспечение эффективной экспрессии антител в организме зависит от серотипа применяемого AAV-вектора. AAV-векторы 1 и 8 серотипов, которые ранее использовались для экспрессии широко нейтрализующих антител против ВИЧ-1 в клинических исследованиях, обладали ограниченной эффективностью. Так, в клиническом исследовании вектора на основе AAV8 для экспрессии антитела VRC07 показано, что иммунный ответ на вектор и его продукты существенно снижал эффективность препарата [22]. При использовании AAV1 были выявлены проблемы с низкой или недетектируемой экспрессией антител [23]. В нашей работе при разработке препарата КомбиМаб-2 применялся вектор на основе AAV9, поскольку согласно ранее полученным данным такой вектор обеспечивает более высокую концентрацию антител в крови у мышей, чем AAV8 [15].

Таким образом, согласно представленным данным разработанный генотерапевтический препарат КомбиМаб-2, состоящий

из комбинации AAV-векторов 9 серотипа, обеспечивает экспрессию трех широко нейтрализующих антител (VRC07-523, 10-1074 и PGDM1400) *in vivo*, что позволяет эффективно подавлять репликацию ВИЧ-1 у гуманизированных мышей.

ВЫВОДЫ

1. Гуманизация иммунодефицитных мышей линии B-NDG зрелыми CD4⁺ Т-лимфоцитами человека обеспечивает физиологические условия для успешного заражения животных, и такой подход может быть использован для моделирования ВИЧ-инфекции.
2. Пассивная иммунизация мышей препаратом КомбиМаб-2, состоящим из комбинации
3. AAV9-векторов, кодирующих три широко нейтрализующих антитела против ВИЧ-1 (VRC07-523, 10-1074, PGDM1400), в дозе 4×10^{11} вг/мышь (для каждого AAV-вектора) приводит к эффективной экспрессии антител с достижением уровня концентрации в сыворотке крови мышей в диапазоне от 0,17 до 4 мкг/мл.
4. При использовании препарата КомбиМаб-2 у 4 из 5 животных опытной группы вирусная нагрузка в течение трех недель после заражения ВИЧ не детектировалась либо была существенно ниже, чем у животных контрольной группы, что свидетельствует о защитной эффективности разработанного препарата в отношении ВИЧ-1.

Литература/References

1. Kamal S, Bugnon O, Cavassini M, Schneider MP. HIV-infected patients' beliefs about their chronic co-treatments in comparison with their combined antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2018;19(1):49–58. <https://doi.org/10.1111/hiv.12542>
2. Wu HF, Morris-Natschke SL, Xu XD, Yang MH, Cheng YY, Yu SS, Lee KH, et al. Recent advances in natural anti-HIV triterpenoids and analogs. *Med Res Rev.* 2020;40(6):2339–85. <https://doi.org/10.1002/med.21708>
3. Chirenje ZM, Marrazzo J, Parikh UM. Antiretroviral-based HIV prevention strategies for women. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(10):1177–86. <https://doi.org/10.1586/eri.10.79>
4. Gruell H, Klein F. Antibody-mediated prevention and treatment of HIV-1 infection. *Retrovirology.* 2018;15(1):73. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0455-9>
5. Walker L, Huber M, Doores K, Falkowska E, Pejchal R, Julien J, et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature.* 2011;477(7365):466–70. <https://doi.org/10.1038/nature10373>
6. Lynch RM, Boritz E, Coates EE, DeZure A, Madden P, Costner P, et al. Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci Transl Med.* 2015;7(319):319ra206. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad5752>
7. Caskey M, Klein F, Lorenzi JC, Seaman MS, West AP Jr, Buckley N, et al. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature.* 2015;522(7557):487–91. <https://doi.org/10.1038/nature14411>
8. Bar-On Y, Gruell H, Schoofs T, Pai JA, Nogueira L, Butler AL, et al. Safety and anti-viral activity of combination HIV-1 broadly neutralizing antibodies in viremic individuals. *Nat Med.* 2018;24(11):1701–7. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0186-4>
9. LaMont C, Otwinowski J, Vanshylla K, Gruell H, Klein F, Nourmohammad A. Design of an optimal combination therapy with broadly neutralizing antibodies to suppress HIV-1. *Elife.* 2022;11:e76004. <https://doi.org/10.7554/eLife.76004>
10. Waters L, Miguel-Buckley R, Poulin S, Arribas J. Broadly neutralizing antibodies for HIV treatment: broad in theory, narrow in reality. *Clin Infect Dis.* 2023;76(6):1136–41. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac835>
11. Choudhry V, Zhang M, Dimitrova D, Prabakaran P, Dimitrov A, Fouts T, et al. Antibody-based inhibitors of HIV infection. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(5):523–31. <https://doi.org/10.1517/14712598.6.5.523>
12. Wang D, Tai P, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(5):358–78. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
13. Bennett MS, Akkina R. Gene therapy strategies for HIV/AIDS: preclinical modeling in humanized mice. *Viruses.* 2013;5(12):3119–41. <https://doi.org/10.3390/v5123119>
14. Van den Berg FT, Makoah NA, Ali SA, Scott TA, Mapengo RE, Mutsunguma LZ, et al. AAV-mediated expression of broadly neutralizing and vaccine-like antibodies targeting the HIV-1 envelope V2 region. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;14:100–12. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.06.002>
15. Shipulin GA, Glazkova DV, Urusov FA, Belugin BV, Dontsova V, Panova AV, et al. Triple combinations of AAV9-vectors encoding Anti-HIV bNAbs provide long-term *in vivo* expression of human IgG effectively neutralizing pseudoviruses from HIV-1 global panel. *Viruses.* 2024;16(8):1296. <https://doi.org/10.3390/v16081296>
16. Kim KC, Choi BS, Kim KC, Park KH, Lee HJ, Cho YK, et al. A simple mouse model for the study of human immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2016;32(2):194–202. <https://doi.org/10.1089/AID.2015.0211>
17. Søndergaard H, Kvist PH, Haase C. Human T cells depend on functional calcineurin, tumour necrosis factor- α and CD80/CD86 for expansion and activation in mice. *Clin Exp Immunol.* 2013;172(2):300–10. <https://doi.org/10.1111/cei.12051>
18. Kochina E, Urusov F, Kruglov A, Glazkova D, Shipulin G, Bogoslovskaya E. Double and triple combinations of broadly neutralizing antibodies provide efficient neutralization of all HIV-1 strains from the global panel. *Viruses.* 2022;14(9):1910. <https://doi.org/10.3390/v14091910>
19. van der Velden YU, Villaudy J, Siteur-van Rijnstra E, van der Linden CA, Frankin E, Weijer K, et al. Short communication: protective efficacy of broadly neutralizing antibody PGDM1400 against HIV-1 challenge in humanized mice. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2018;34(9):790–3. <https://doi.org/10.1089/AID.2018.0114>
20. Horwitz JA, Halper-Stromberg A, Mouquet H, Gitlin AD, Tretiakova A, Eisenreich TR, et al. HIV-1 suppression and durable control by combining single broadly neutralizing antibodies and antiretroviral drugs in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(41):16538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315295110>

21. Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang L, Baltimore D. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature*. 2011;481(7379):81–4. <https://doi.org/10.1038/nature10660>
22. Casazza JP, Cale EM, Narpala S, Yamshchikov GV, Coates EE, Hendel CS, et al. Safety and tolerability of AAV8 delivery of a broadly neutralizing antibody in adults living with HIV: a phase 1, dose-escalation trial. *Nat Med*. 2022;28(5):1022–30. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01762-x>
23. Lin A, Balazs AB. Adeno-associated virus gene delivery of broadly neutralizing antibodies as prevention and therapy against HIV-1. *Retrovirology*. 2018;15(1):66. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0449-7>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Д.С. Леонтьев** – выполнение экспериментальных работ, написание текста рукописи; **Ф.А. Урусов** – работа с источниками литературы, статистическая обработка результатов; **Д.В. Глазкова** – редактирование текста рукописи, формулировка выводов; **Б.В. Белугин** – наработка препарата, редактирование текста рукописи (раздел «Материалы и методы»); **О.В. Орлова** – наработка и титрование вируса; **Р.Р. Минтаев** – проведение работ на экспериментальных животных; **Г.М. Цыганова** – проведение ПЦР-анализа образцов для определения вирусной нагрузки; **Е.В. Богословская** – концепция работы, редактирование текста рукописи; **Г.А. Шипулин** – дизайн исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации. **Соответствие принципам этики.** Исследования на животных проводились в соответствии с Протоколом биоэтической комиссии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России (Протокол № 2 от 15.02.2024).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **D.S. Leontyev** conducted experiments and drafted the manuscript. **F.A. Urusov** worked with literature sources and performed statistical processing of the results. **D.V. Glazkova** edited the manuscript and formulated the conclusions. **B.V. Belugin** produced the medicinal product and edited the manuscript (*Materials and Methods* section). **O.V. Orlova** produced and titrated virus samples. **R.R. Mintaev** handled experimental animals. **G.M. Tsyganova** conducted PCR analysis to determine the viral load. **E.V. Bogoslovskaya** conceptualised the study and edited the manuscript. **G.A. Shipulin** designed the study and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The animal experiments were approved by the Bioethics Committee at the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical and Biological Agency of Russia (Meeting Minutes No. 2 dated 15 February 2024).

Об авторах / Authors

Леонтьев Данила Сергеевич, канд. биол. наук / **Danila S. Leontyev**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7761-9870>

Урусов Феликс Анатольевич, канд. биол. наук / **Felix A. Urusov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2304-7787>

Глазкова Дина Викторовна, канд. биол. наук / **Dina V. Glazkova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6083-4478>

Белугин Борис Владимирович, канд. биол. наук / **Boris V. Belugin**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2646-9774>

Орлова Ольга Владимировна, канд. биол. наук / **Olga V. Orlova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7882-8033>

Минтаев Рамиль Рафаилович / **Ramil R. Mintaev**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5398-3627>

Цыганова Галина Михайловна / **Galina M. Tsyganova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1527-949X>

Богословская Елена Владимировна, д-р мед. наук / **Elena V. Bogoslovskaya**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3250-6498>

Шипулин Герман Александрович, канд. мед. наук / **German A. Shipulin**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3668-6601>

Поступила 07.06.2024

После доработки 05.09.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Received 7 June 2024

Revised 5 September 2024

Accepted 12 September 2024



Особенности регулирования обращения лекарственных препаратов бактериофагов: международный опыт и перспективы развития

Д.С. Давыдов[✉], Р.Л. Парфенюк, З.В. Дурманова, Р.Е. Казаков, А.А. Мовсесянц

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

✉ Давыдов Дмитрий Сергеевич; davydov@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Увеличение распространенности штаммов возбудителей заболеваний с множественной лекарственной устойчивостью определяет необходимость применения принципиально новых средств борьбы с бактериями, в том числе лекарственных препаратов бактериофагов. Стабильному внедрению фаготерапии мешает отсутствие общепринятых стандартизированных нормативных правовых и методических документов, регламентирующих проведение доклинических и клинических исследований, а также производство препаратов бактериофагов.

ЦЕЛЬ. Анализ международного опыта в области организации производства и обращения лекарственных препаратов бактериофагов, а также основных нормативных требований к контролю их качества, эффективности и безопасности.

ОБСУЖДЕНИЕ. Разработка препаратов вирулентных бактериофагов в соответствии с существующими требованиями к лекарственным средствам труднореализуема в связи с биологическими характеристиками бактериофагов, большим разнообразием их штаммов, возможными быстрыми изменениями, происходящими как в популяции бактериофагов, так и в популяции возбудителей. В связи с этим целесообразна разработка облегченных подходов к регистрации препаратов фаготерапии и упрощенных методов оценки их эффективности и безопасности. При этом необходима оценка специфических для этой группы препаратов нежелательных явлений, таких как риск развития лизогении и резистентности к бактериофагам, а также возможности переноса генов устойчивости к антибиотикам между штаммами бактерий. Во многих странах мира, в том числе в США, при фармацевтической разработке препаратов бактериофагов используется несколько подходов: концепция «качество через разработку» (Quality by Design); подход, основанный на формировании «мастер-файла на биологическую активную фармацевтическую субстанцию» (Biological Master File), согласно которому подается на одобрение регулирующих органов отдельный пакет документов, охватывающий только часть досье; программа «расширенного доступа» (Expanded Access), открывающая отдельному пациенту возможность применять инновационные препараты без утвержденных протоколов лечения. В России промышленное производство лекарственных препаратов бактериофагов осуществляется в соответствии со стандартами качества, указанными в Государственной фармакопее Российской Федерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Подходы к фаготерапии и ее регулированию, принятые в мире и на территории Российской Федерации, в значительной степени отличаются. Представляется целесообразным дополнить существующие национальные рекомендации в сфере анализа эффективности и безопасности лекарственных препаратов бактериофагов, в частности регламентировать обязательность проведения доклинических исследований.

Ключевые слова: бактериофаги; лекарственные препараты бактериофагов; фаготерапия; персонализированные препараты бактериофагов; производство препаратов бактериофагов; обращение лекарственных средств; государственная регистрация лекарственных средств; множественная лекарственная устойчивость; Quality by Design

Для цитирования: Давыдов Д.С., Парфенюк Р.Л., Дурманова З.В., Казаков Р.Е., Мовсесянц А.А. Особенности регулирования обращения лекарственных препаратов бактериофагов: международный опыт и перспективы развития. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):322–334. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-322-334>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. А.А. Мовсесянц является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2001 г.). Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Specific aspects of bacteriophage regulation: international practices and future developments

Dmitry S. Davydov✉, Rimma L. Parfenyuk, Zoya V. Durmanova, Ruslan E. Kazakov, Artashes A. Movsesyants

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

✉ Dmitry S. Davydov davydov@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The increasing prevalence of multidrug-resistant strains of pathogens determines the need for fundamentally new antibacterial agents, including bacteriophage preparations. The consistent implementation of phage therapy is hindered by the lack of generally accepted standardised regulatory documents governing the legal and methodological aspects of the production and preclinical and clinical studies of bacteriophage preparations.

AIM. This study aimed to analyse the international experience with the production and lifecycle management of bacteriophage preparations, as well as the main regulatory requirements for the control of their quality, safety, and efficacy.

DISCUSSION. It is difficult to develop virulent bacteriophage preparations in accordance with the existing requirements for other medicinal products because of the biological characteristics of bacteriophages, the wide variety of bacteriophage strains, and the potential for rapid changes both in the bacteriophage population and in the pathogen population. Therefore, it is reasonable to develop streamlined marketing authorisation routes for phage therapies and methods for the assessment of their safety and efficacy. As part of these efforts, it is necessary to assess the adverse events specific to this group of medicinal products, such as the risks of lysogeny, resistance to bacteriophages, and antibiotic resistance gene transfer between bacterial strains. The pharmaceutical development of bacteriophage preparations can be based on several approaches. Many countries worldwide, including the United States, are implementing the concept of Quality by Design, considering approaches based on the Biological Master File, and conducting Expanded Access programmes. The Active Substance Master File procedure allows the submission of a separate document package covering only part of the registration dossier for regulatory approval. Expanded Access programmes provide individual patients with access to innovative medicinal products without approved treatment protocols. In the Russian Federation, the commercial production of bacteriophage medicinal products is conducted in accordance with the quality standards specified in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

CONCLUSIONS. There are fundamental differences in the approaches to phage therapy and its regulation around the world and in the Russian Federation. It is reasonable to supplement the

current national guidelines for the safety and efficacy evaluation of bacteriophage preparations, in particular, to specify the requirements for conducting preclinical studies.

Keywords: bacteriophages; bacteriophage preparations; phage therapy; personalised bacteriophage preparations; production of bacteriophage preparations; medicinal product lifecycle; marketing authorisation of medicines; multidrug resistance; Quality by Design

For citation: Davydov D.S., Parfenyuk R.L., Durmanova Z.V., Kazakov R.E., Movsesyants A.A. Specific aspects of bacteriophage regulation: international practices and future developments. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):322–334. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-322-334>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. Movsesyants A.A. has been a member of the Editorial Board of the journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2001. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних десятилетий актуальность поиска средств и методов сдерживания распространения лекарственно-устойчивых патогенных микроорганизмов неуклонно возрастает как на макрорегиональном, так и на глобальном уровне. Как одно из перспективных средств лечения и профилактики инфекционных заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью, все большее внимание специалистов в области здравоохранения, эпидемиологии, фармакологии, биотехнологии привлекают к себе бактериофаги – убиквитарные вирусы различных таксономических групп, которые являются симбионтами или специфическими патогенами для бактерий, включая возбудителей инфекционных заболеваний [1, 2]. Мировой опыт использования живых культур бактериофагов в качестве активного компонента лекарственных препаратов антимикробного действия насчитывает уже 100 лет. Культуры бактериофагов представляют собой сложные, гетерогенные, поликомпонентные, динамически вариативные системы, вследствие чего готовые лекарственные формы, содержащие бактериофаги, являются препаратами с вариативным составом. В связи с этим в каждой стране, на территории которой осуществляется использование бактериофагов в медицинских целях, аспекты стандартизации данной категории препаратов, а также разработки единых нормативных правовых и методических подходов к производству, проведению доклинических и клинических исследований и обеспечению качества чрезвычайно сложны для всех субъектов государствен-

ного регулирования обращения лекарственных средств и в полной мере не решены.

В настоящее время в мировой практике рассматривается два основных подхода к созданию препаратов бактериофагов [2–4]. В первом случае создается комбинация литических бактериофагов широкого спектра действия, которые активны в отношении отдельного вида патогенного микроорганизма. Такой подход был внедрен изначально, еще в 30-е гг. XX века, так как он позволял проводить стандартизацию процессов промышленного производства препаратов. Вторым вариантом фаготерапии предусматривается индивидуальный подбор культуры бактериофага, литически активного в отношении штамма возбудителя, выделенного у конкретного пациента (персонализированные препараты).

Однако уже к середине XX века бурное развитие промышленного производства химических антимикробных препаратов фактически остановило внедрение обоих вариантов фаготерапии в схемы лечения и профилактики инфекционных заболеваний во всех странах мира, кроме СССР и некоторых стран Организации Варшавского договора. Таким образом, только в СССР, а в настоящее время в Российской Федерации, в здравоохранении накоплен релевантный опыт промышленного производства и практического применения лекарственных препаратов бактериофагов. За пределами России увеличение интенсивности исследований в области фаготерапии началось только в 1990-е гг. – после объявления Всемирной организацией здравоохранения об угрозе глобального распространения устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к лекарственным препаратам¹.

¹ Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2a). WHO; 2001.

Стандарты производства и контроля качества готовых лекарственных форм бактериофагов промышленного производства включены в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ)². В проектах монографий Европейской фармакопеи и Фармакопеи США приведено только перечисление показателей качества и методов контроля. В других странах мира в данный момент национальные фармакопейные стандарты производства и контроля качества бактериофагов отсутствуют, применение бактериофагов на популяционном уровне не является системным явлением и носит единичный характер.

К странам, в которых имеется опыт изучения возможности применения бактериофагов для медицинских целей, относятся США, ряд стран Европейского союза (Бельгия, Польша, ФРГ, Великобритания), Япония, Китай, Индия, Бразилия, Канада. В настоящее время в этих странах выработаны общие принципы обращения препаратов бактериофагов [5, 6]:

- препараты изготавливаются только для персонализированного применения, промышленное производство не предусмотрено;
- изготовление препаратов бактериофагов может проводиться только с использованием зарегистрированных в установленном порядке компонентов, внесенных в национальные реестры продукции, подлежащей к использованию в рамках осуществления фармацевтической деятельности;
- регистрации и применению подлежат только препараты с фиксированным составом, тогда как регистрация препаратов с переменным составом не предусмотрена;
- применение бактериофагов в терапевтических целях возможно в соответствии со статьей 37 Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, которая предусматривает возможность отхода лечащим врачом от стандартов оказания медицинской помощи с согласия пациента и применение средств и методов с недоказанной (непроверенной) эффективностью и безопасностью при отсутствии иных средств и неэффективности имеющихся в угрожающих жизни состояниях, для облегчения страданий. В этом случае предусмотрена возможность упрощенной регистрации препаратов бактериофагов при условии успешного применения на протяжении определенного времени на территории других стран. Кроме того, предусмотрено сокращение объема клинических исследований или отказ от их проведения.

Таким образом, в связи с бурным развитием сегмента биологических лекарственных препаратов, в том числе бактериофагов, в Российской Федерации и во всем мире и недостаточной проработанностью механизмов регулирования обращения препаратов данной группы актуальным представляется освещение аспектов регистрации препаратов и подходов к проведению их доклинических и клинических исследований, принятых в разных странах и имеющих свои особенности.

Цель работы — анализ международного опыта в области организации производства и обращения лекарственных препаратов бактериофагов, а также основных нормативных требований к контролю качества, эффективности и безопасности.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Специфические особенности лекарственных средств на основе вирулентных бактериофагов

С 2018 г. Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) и Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) разрабатывают новые отдельные регуляторные механизмы, которые способствовали бы совершенствованию процедуры регистрации и контроля обращения препаратов бактериофагов. В Европейском союзе (ЕС) эта группа препаратов отнесена к биомедицинским продуктам для фаготерапии (phage therapy medicinal products, PTMP), а в США — к лекарственным средствам (drugs). В связи с этим к бактериофагам предъявляются те же требования к производству, клиническим исследованиям, составу регистрационного досье, как и к любой другой продукции, относящейся к категории антимикробных лекарственных препаратов. Из этого следует, что любая выделенная культура бактериофага, обладающая литической активностью в отношении патогенных микроорганизмов, должна пройти полный комплекс исследований *in vitro* — для определения подлинности, специфичности, механизмов действия, а также *in vivo* — для оценки токсичности, иммуногенности и режима дозирования.

Фармакодинамика и фармакокинетика бактериофагов изучены недостаточно. В организме бактериофаги, с одной стороны, эффективно элиминируются иммунной системой пациента,

² ОФС.1.7.1.0002.15 Бактериофаги. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

особенно ретикулоэндотелиальной системой, но одновременно могут экспоненциально размножаться в присутствии бактерий-хозяев [1, 2].

Препараты бактериофагов могут быть как моно-, так и поликомпонентными (в состав входят несколько штаммов бактериофагов), что усложняет дизайн предрегистрационных исследований. Поликомпонентные препараты имеют ряд преимуществ, но сложность их состава затрудняет получение релевантных результатов при оценке эффективности. При использовании таких комплексных препаратов (коктейль бактериофагов) основной целью является предотвращение возникновения резистентности бактерий, поскольку как *in vitro*, так и *in vivo* было показано появление резистентности в популяции патогенов к бактериофагам постоянного состава [3, 4, 7]. Комплексные препараты обладают более широким спектром действия, что снижает необходимость постоянной интенсивной ротации действующего вещества и в большей степени соответствует общим принципам надлежащей клинической практики [8]. Поликомпонентные

препараты могут применяться в начале эмпирической терапии, особенно при выявлении генерализованных инфекций, вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью [9].

На рисунке 1 показаны возможные алгоритмы действия при проведении фаготерапии. В одном случае предлагается готовый продукт, находящийся в свободной продаже. При этом лечение может быть комбинированным с другой антибактериальной терапией, а при положительном результате лечения конечных анализов можно не проводить. Согласно другой схеме предполагается индивидуальный подбор состава препарата. Это дорогостоящий путь лечения мультирезистентных инфекций, при котором конечный контроль, как правило, обязателен.

Применимость существующих общих требований к лекарственным средствам по отношению к препаратам бактериофагов

В настоящее время в США и ЕС отсутствуют требования к порядку проведения клинических испытаний фаз I–IV для оценки безопасности

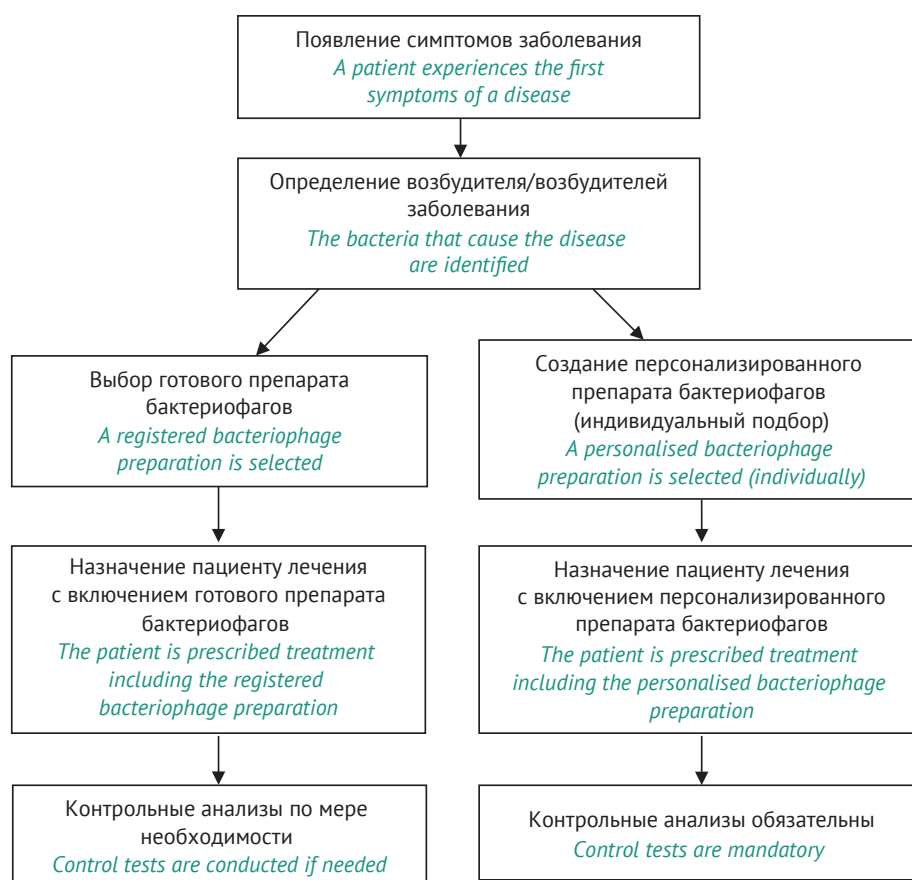


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Алгоритмы действия при назначении препаратов бактериофагов.

Fig. 1. Prescription algorithms for bacteriophage preparations.

и эффективности препаратов бактериофагов. При этом, согласно позиции регуляторных органов, специальных нормативных требований для предрегистрационных исследований бактериофагов и составления регистрационного досье не требуется [5]. Однако это в большей степени применимо к препаратам постоянного состава.

В соответствии с требованиями регуляторных органов в США и ЕС при регистрации препаратов бактериофагов необходимо предоставлять информацию о профиле и уровне литической активности не только комплекса бактериофагов, входящих в состав препарата, но и каждого его штамма в отдельности, а также результаты изучения динамики изменения количественного содержания каждого штамма бактериофага при совместном культивировании.

Многие специалисты справедливо полагают, что в дальнейшем при применении этого подхода в регулировании обращения препаратов бактериофагов возникнут трудности, связанные с происходящими в течение времени изменениями структуры и свойств популяций микроорганизмов в зависимости от области их распространения, а также с появлением в популяции патогенных бактерий, резистентных к препаратам постоянного состава. О скорости и механизмах формирования фагорезистентности в настоящее время мало известно, в том числе о случаях устойчивости в клинических условиях (например, у человека во время курса терапии бактериофагами). Имеются клинические наблюдения об отдельных случаях резистентности к культурам бактериофагов, когда она возникала с такой же или даже более высокой частотой, чем устойчивость к антибиотикам [4, 7, 10, 11]. Это определяет необходимость постоянной адаптации комбинаций бактериофагов и включение новых культур в состав готовой лекарственной формы. Согласно позиции регуляторных органов необходима регистрация каждой комбинации в отдельности [1].

Следует отметить, что существующий общепринятый порядок разработки и регистрации лекарственных препаратов (или биомедицинских продуктов) не в полной мере применим для препаратов бактериофагов. С учетом большого количества фагов, являющихся активными компонентами готовой лекарственной формы, стоимость проведения предрегистрационных исследований каждого бактериофага в отдельности и в полном объеме становится очень дорогостоящей и недоступной ни одному фармацевтическому предприятию как в случае препаратов промышленного производства, так

и в случае препаратов для персонализированной терапии [12].

Фармацевтическая промышленность на глобальном уровне в настоящее время не готова инвестировать в массовые исследования и разработку препаратов бактериофагов. Несмотря на относительно невысокую стоимость выделения и культивирования бактериофагов при соблюдении правил GMP и требований регуляторной практики, а также при постоянном обновлении состава комплексных препаратов бактериофагов, мониторинге фагорезистентности и ее профилактике общий размер материального обеспечения таких работ будет сопоставим с затратами на разработку антимикробных препаратов химической природы [13]. Так, согласно экономическому анализу медианная и средняя стоимость фармацевтической разработки для вывода препарата бактериофагов на рынок (во второй декаде XXI века) составили 985 и 1336 млн долларов США соответственно, а стоимость разработки пяти новых антибиотиков составила 1260 и 1297 млн долларов США соответственно [14]. Среди причин неготовности фарминдустрии к таким проектам: недостаточная защита прав интеллектуальной собственности в отношении биообъектов, таких как бактериофаги; проблема сохранения специфичности и устойчивости свойств бактериофагов; малое количество рандомизированных клинических исследований эффективности фаготерапии [6].

Следует отметить, что ряд фармацевтических компаний, тем не менее, проводят регистрацию препаратов бактериофагов по сложному и дорогостоящему пути согласно стандартной процедуре регистрации лекарственных препаратов. Одним из примеров является проект «PhagoBurn», финансируемый Европейской комиссией, — первое крупное исследование бактериофаговой терапии в соответствии с современными стандартами регулирования лекарственных средств в ЕС [15]. В этом рандомизированном контролируемом двойном слепом исследовании фазы I/II оценивалась эффективность и переносимость смеси бактериофагов для лечения ожоговых ран, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*. Производство исследуемой смеси заняло 20 мес., на что была затрачена большая часть бюджета [16]. Кроме того, ретроспективно было показано, что сложный коктейль, состоящий из не менее чем 12 бактериофагов *P. aeruginosa*, неактивен (*in vitro*) в отношении штаммов *P. aeruginosa*, обнаруженных у трех из десяти пациентов [15]. Поскольку действие исследуемого биомедицинского продукта для фаготерапии было направлено только

на один из многих видов бактерий, вызывающих инфекции ожоговых ран, формирование групп пациентов было крайне затруднено [16]. Вне зависимости от результатов относительно неудачного клинического исследования [15], предварительная фаза проекта «PhagoBurn» позволила выявить ряд ограничений методических подходов, нуждающихся в адаптации требований к производству (изготовлению) и обращению таких препаратов в целом. Исследование подтвердило необходимость создания специальных нормативных требований для персонализированных подходов к фаготерапии, для обеспечения безопасности и эффективности, а также для реагирования на актуальные угрозы общественному здравоохранению, такие как резкое распространение мульти- и панрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* или вспышка особо опасной инфекции, вызванной *Escherichia coli* STEC O104:H4 в Германии в 2011 г. [17].

Подходы к регулированию обращения препаратов бактериофагов в США

Начиная с 2015 г. национальные регуляторные органы в ряде стран, в том числе в США, подняли вопрос о необходимости углубленного системного взаимодействия с производителями лекарственных препаратов бактериофагов в части адаптации процедур государственной регистрации применительно к таким препаратам. Это подходит для коммерческих препаратов промышленного производства с фиксированным штаммовым составом, однако не может использоваться для препаратов экстенпорального изготовления, если при их получении используются бактериофаги, в отношении которых ранее не были проведены исследования эффективности и безопасности. В связи с этим возникла необходимость разработки порядка создания централизованных банков штаммов бактериофагов, аттестованных в соответствии с требованиями регуляторных органов и надлежащих практик, что позволило бы своевременно регистрировать поликомпонентные препараты бактериофагов (коктейли) [1]. Для этого необходима характеристика отдельных бактериофагов *in vitro* с использованием структурного и геномного анализа, а также оценка эффективности. Безопасность и эффективность также могут быть установлены в ходе испытаний *in vivo* на животных моделях [1].

Нормативно-правовые требования, регулирующие процесс производства препаратов бактериофагов и контроль его стадий, также может

облегчить и удешевить обновление коктейлей бактериофагов [18]. Подход, основанный на концепции «качество через разработку» (Quality by Design, QbD), все чаще применяется в США при разработке и производстве биофармацевтических молекул [19]. Подход QbD базируется на качестве процесса и продукта, реализуемого на основе научных знаний и рисков. Понимание потребностей пациентов и определение конкретных качественных характеристик продукта, связанных с безопасностью и эффективностью, являются важнейшими компонентами QbD.

Для регулирования обращения препаратов бактериофагов было предложено использовать подход, основанный на формировании «мастер-файла на биологическую активную фармацевтическую субстанцию» (Biological Master File, BMF). Такой подход применяется в настоящее время к некоторым препаратам химического происхождения [20], при котором составляется и подается на одобрение регуляторных органов отдельный пакет документов, охватывающий только часть регистрационного досье. Например, BMF может включать только активный компонент (бактериофаг) препарата бактериофага; и для каждого отдельного бактериофага будет представлен свой BMF. Концепция BMF в основном фокусируется на качестве производственного процесса (GMP) и вопросах безопасности. Однако следует отметить, что европейское законодательство не позволяет применять это понятие к биологически активным веществам.

В США регулирование обращения бактериофагов как лекарственных препаратов осуществляется Центром экспертизы и исследования биологических препаратов (Center for Biologics Evaluation and Research, CBER) при FDA. Правила, применимые к таким препаратам, требуют, чтобы клинические исследования проводились по процедуре рассмотрения заявки на регистрацию нового экспериментального лекарственного средства (Investigational New Drug Application, IND).

Препараты бактериофагов, предназначенные для лечения или профилактики заболеваний, считаются биологическими препаратами и лекарствами и регулируются подразделением CBER. Правила, применимые к биологическим препаратам, которые соответствуют определению «лекарства», данному в Законе о пищевых продуктах, лекарственных препаратах и косметических средствах (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, FD&C), можно найти в Своде федеральных нормативных актов (Code of Federal Regulations, CFR) 21, часть 312 (22, 23, 24, 25, 26)³.

³ Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/COMPS-973/pdf/COMPS-973.pdf>

За редким исключением, эти правила требуют, чтобы клинические исследования проводились в соответствии с досье на IND.

Подача заявки на регистрацию обеспечивает регулирующий надзор за использованием исследуемого препарата на людях. Хотя целью подачи заявки может быть регистрация препарата в США, заявки также необходимы для заявителей, которые намереваются проводить исследования с участием людей с использованием незарегистрированных биологических препаратов исключительно в исследовательских целях⁴. Перед подачей заявки на регистрацию можно запросить предварительную встречу с представителями CBER. В этом формальном процессе заявитель может инициировать взаимодействие с FDA для обсуждения данных, необходимых для организации первого исследования на людях, планирования первоначального клинического исследования, нормативных требований к демонстрации безопасности и эффективности, а также вопросов по составу, производству и контролю качества (Chemistry, Manufacturing, and Controls, CMC), связанных с безопасностью исследуемого нового препарата, предложенного для использования в первоначальных клинических исследованиях⁵ [21].

Клинические исследования проводятся на последовательно увеличивающемся количестве участников. Исследования фазы I сосредоточены исключительно на безопасности участников исследования, получающих препарат; фаза II направлена на определение оптимальной дозы и/или продолжительности лечения, а также на получение некоторых доказательств эффективности; целью фазы III является сбор дополнительной информации об эффективности и безопасности, необходимой для оценки общего соотношения «польза–риск». На всех этапах рассмотрения заявки на регистрацию дорабатываются показатели и методы контроля готовой лекарственной формы, уточняется перечень критических точек производственного процесса, при этом перечень показателей качества и методы их исследования должны

быть определены, а все методики полностью валидированы до начала проведения исследований фазы III.

При подаче заявки на регистрацию биологического препарата (Biologics License Application, BLA) заявитель представляет на рассмотрение FDA полный пакет данных⁶, при этом заявитель должен продемонстрировать, что препарат соответствует стандартам, разработанным для обеспечения «постоянной безопасности, чистоты и специфической активности»⁷. Для взаимодействия заявители могут обращаться в CBER, в том числе перед подачей заявки на регистрацию (BLA)⁸.

В некоторых исследованиях описано использование фаготерапии для лечения отдельных пациентов в США в условиях программы «расширенного доступа» (Expanded Access) [22–25]. Этот подход делает исследуемые препараты доступнее для пациентов с тяжелыми заболеваниями (состояниями), когда нет сопоставимой альтернативы⁹. Программа расширенного доступа представляет собой практику законного использования препарата вне клинических исследований для лечения человека — в случаях, когда имеется серьезное или непосредственно угрожающее жизни заболевание или отсутствуют утвержденные протоколы лечения. Расширенный доступ регулируется FDA в каждом конкретном случае для отдельного пациента или групп пациентов, которые не соответствуют критериям для участия в клиническом исследовании.

Существуют три категории расширенного доступа: для отдельных пациентов (в том числе для экстренного использования); для небольших популяций пациентов; для широкого применения. Для всех видов использования расширенного доступа требуется информированное согласие пациентов.

Следует отметить, что разработка препаратов бактериофагов и их последующая регистрация имеет ряд уникальных особенностей, в том числе касающихся представления информации о составе, производстве и контроле качества в соответствующих модулях регистрационного досье.

⁴ Title 21. Code of Federal Regulations, Part 312 (2018). Investigational new drug application.

⁵ U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry: IND meetings for human drugs and biologics. Chemistry, manufacturing and controls Information. FDA; 2001.

⁶ U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Biologics guidances. FDA; 2008.

⁷ Title 21. Code of Federal Regulations, Sec. 600.3 (2018). Definitions.

⁸ U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry: IND meetings for human drugs and biologics. Chemistry, manufacturing and controls Information. FDA; 2001.

⁹ Title 21. Code of Federal Regulations, Part 312, Subpart I (2018). Expanded access to investigational drugs for treatment use.

Свойства бактериофагов, влияющие на качество лекарственных препаратов бактериофагов

Бактериофаги, выделяемые из природных источников (сточные воды, почва), проявляют литическую активность в отношении большинства видов бактерий. Спектр встречающихся в природе специфически активных бактериофагов для каждого патогена потенциально может быть весьма большим. Кроме того, варианты и формы взаимодействия в паре «бактериофаг–клетка» уникальны, в связи с чем сформулировать общие принципы взаимодействия между бактериофагом и целевым микроорганизмом, основываясь на ограниченном количестве известных исследований, затруднительно. По этой причине досье заявки на регистрацию (IND) должно включать достаточную информацию, чтобы гарантировать правильную идентификацию, качество, чистоту, специфичность и эффективность бактериофага, предназначенного для клинических исследований с участием людей.

Хотя некоторые бактериофаги способны инфицировать несколько видов бактерий, в большинстве своем бактериофаги узкоспецифичны [26–35]. Это является преимуществом препаратов бактериофагов, поскольку незначительно нарушает баланс в нативной микробиоте по сравнению с антибиотиками широкого спектра действия. Специфичность бактериофагов одновременно усложняет лечение, поскольку обеспечение эффективности требует предварительной идентификации инфекционного агента и оценки активности препарата бактериофага против изолята (изолятов) возбудителя. Специфичность бактериофагов чаще всего определяется взаимодействием «бактериофаг–рецептор», однако на это также оказывают влияние и другие факторы, в том числе уровень экспрессии определенных генов [36–39].

Бактериофаги могут обладать иммуногенностью, и при их использовании существует вероятность возникновения адаптивного иммунного ответа [40]. Формирование комплексов «антитело–бактериофаг» и другие последствия иммунного ответа на бактериофаги потенциально могут представлять угрозу для безопасности терапии. Степень иммунного ответа может зависеть от пути введения. Иммуногенность может быть изучена *in vivo* или при проведении клинических исследований.

Некоторые бактериофаги способствуют переносу генов между бактериями [39]. Одним из механизмов этого процесса является лизогенная конверсия, то есть приобретение и/или изме-

нение фенотипических признаков бактерионосителя, образование токсинов и некоторых ферментов и др., при котором интеграция бактериофага в геном бактерии-хозяина обеспечивает ее потенциальное селективное преимущество. В результате бактерия-хозяин может становиться более вирулентной, чем раньше. Кроме того, бактерии, лизогенные для данного бактериофага, обычно также становятся невосприимчивыми к уничтожению им, что снижает эффективность препарата. В связи с этим бактериофаги, опосредующие лизогенную конверсию, не являются подходящими кандидатами для терапевтического использования.

Бактериофаги могут опосредовать генетический перенос с использованием трансдукции, то есть передачи генетической информации от одной бактериальной клетки (донора) к другой (реципиенту) [41–43]. Различают неспецифическую (генерализованную), ограниченную (специфическую) и abortивную трансдукцию, а также котрансдукцию. При неспецифической трансдукции сегменты бактериальной ДНК хозяина случайным образом упаковываются в частицы бактериофага, и когда они встречаются с новыми бактериальными хозяевами, частицы могут передавать свою ДНК, которая, путем гомологичной рекомбинации может быть включена в геном клетки-хозяина. В результате происходит перенос бактериальной ДНК от одной бактерии к другой [41–43]. При молекулярно-биологическом анализе наличие трансдуцирующих частиц в лизате можно обнаружить с помощью праймеров для ПЦР, специфичных для последовательностей бактериальных хозяев, таких как гены 16S рРНК.

Следует отметить, что при использовании в фаготерапии бактериофагов, не способных к лизогении, устраняется возможность как лизогенной конверсии, так и специализированной трансдукции. Способность бактериофагов к лизогении можно оценить с помощью нескольких методов [27, 28]. При микробиологическом тесте наличие непрозрачной фаговой бляшки свидетельствует о вероятной лизогении. Молекулярно-биологические методы также можно использовать для определения способности бактериофага к лизогении. ДНК бактериофага можно секвенировать и анализировать на наличие генов-репрессоров, генов интегразы, других гомологий с известными лизогенными бактериофагами или других индикаторов лизогении. Кроме того, последовательность генома предполагаемого лизогена можно проанализировать на наличие профага, отсутствующего в родительском штамме.

С учетом описанных выше биологических характеристик сформирован перечень необходимых свойств бактериофагов, предназначенных для использования в терапии. Так, геном бактериофага не должен включать гены факторов вирулентности или устойчивости к антибиотикам. Бактериофаги должны быть нелизогенными, чтобы избежать проблем лизогенной конверсии и специфической трансдукции. В идеале бактериофаги также должны быть неспособны к генерализованной трансдукции. Если обнаружено, что бактериофаг, предназначенный для терапии, обладает способностью к трансдукции, его следует размножать на непатогенном штамме, в котором отсутствуют детерминанты устойчивости к антибиотикам, которые можно легко трансдуцировать, и отсутствуют профаги, которые могут снизить чистоту препарата бактериофага. Однако в некоторых случаях такого подхода к ограничению переноса нежелательных генов может оказаться недостаточно.

Для обеспечения надлежащей идентификации, качества, чистоты и эффективности исследуемых препаратов бактериофагов, при формировании досье заявки на регистрацию (IND) необходимо предоставить следующую информацию:

- источники получения и история штаммов бактериофагов;
- полногеномные последовательности и аннотации геномов бактериофагов, включая анализы на наличие известных факторов вирулентности и элементов устойчивости к антибиотикам, с подробным описанием методик;
- данные о способности бактериофагов к лизогении;
- данные о том, способны ли бактериофаги к генерализованной трансдукции;
- информацию о бактериальных штаммах-хозяевах, используемых для размножения бактериофагов, включая источники и историю штаммов бактерий-хозяев, а также полногеномные последовательности и аннотации штаммов бактерий-хозяев, включая анализы на наличие известных факторов вирулентности, элементов устойчивости к антибиотикам и профагов, с пояснениями того, как проводились эти исследования.

Существуют некоторые дополнительные исследования, которые можно считать желательными для бактериофагов, предназначенных для терапевтического использования. Например, после серийного пассажа на мышах были выделены мутанты бактериофагов, которые дольше сохраняются в кровотоке [40], что потенциально

увеличивает продолжительность времени, в течение которого бактериофаги могут встретиться со своими бактериальными мишенями. Кроме того, было обнаружено, что некоторые бактериофаги используют факторы вирулентности [44] или белки устойчивости к антибиотикам [45] в качестве рецепторов. В этих случаях бактерии, у которых развивается устойчивость к бактериофагу в результате мутации рецептора, становятся менее вирулентными или более чувствительными к антибиотикам, что является положительным шагом на пути к разрешению инфекции.

Поликомпонентные препараты бактериофагов (коктейли бактериофагов) предназначены для расширения спектра лечения, то есть для использования против нескольких видов бактерий или нескольких штаммов одного вида бактерий [4, 46, 47]. Коктейли бактериофагов помогут снизить вероятность возникновения бактериальной резистентности к лечению. Этот подход аналогичен использованию нескольких противомикробных препаратов для лечения туберкулеза или ВИЧ. Обоснование такого подхода заключается в том, что приобретение устойчивости к множеству бактериофагов менее вероятно, чем к одному, поскольку зависит от различных генетических факторов устойчивости для разных бактериофагов, и мутация, вызывающая устойчивость к одному бактериофагу, не приводит к устойчивости ко всем. При разработке эффективных коктейлей бактериофагов можно определять рецепторы к бактериофагам-кандидатам или использовать эмпирические методы для изучения способности различных комбинаций фагов подавлять рост целевых штаммов *in vitro* [4, 46, 47].

Следует отметить, что подходы к фаготерапии и ее регулированию, принятые в мире и на территории Российской Федерации, в значительной степени отличаются. В России установлен приоритет государственного регулирования безопасности, качества и эффективности лекарственных средств при их обращении. Лекарственные препараты бактериофагов, внесенные в Государственный реестр лекарственных средств, представляют собой комбинации литических бактериофагов, активных в отношении широкого спектра эпидемиологически актуальных групп возбудителей. ГФ РФ устанавливает перечень показателей качества и методов контроля качества лекарственных препаратов, основанный на результатах доклинических исследований. Несмотря на актуальность применения персонализированного подхода к лечению и профилактике инфекционных

заболеваний человека, правовые основания для такого применения бактериофагов практически отсутствуют как в России, так и в других странах мира [48].

Недостаточность критериев оценки качества препаратов бактериофагов, произведенных в рамках персонализированного подхода, затрудняет деятельность медицинских организаций по формированию внутренней системы управления качеством при их изготовлении. Представляется целесообразным дополнить существующие национальные рекомендации в сфере анализа эффективности и безопасности лекарственных препаратов бактериофагов, в частности, регламентировать обязательность проведения доклинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение препаратов бактериофагов в практической медицине предполагает разработку нормативных правовых и методических документов, регламентирующих их производство, а также проведение доклинических и клинических исследований. Фармацевтическая разработка препаратов вирулентных бактериофагов в соответствии с существующими требованиями к лекарственным средствам труднореализуема в связи с биологическими характеристиками бактериофагов, большим разнообразием их штаммов, возможным быстрым изменениям, происходящим как в популяции бактериофагов, так и в популяции возбудителей. В связи с этим целесообразна разработка облегченных подходов к регистрации препаратов фаговой терапии и упрощенные методы оценки их эффективности и безопасности. При этом необходимо

оценивать специфические для этой группы препаратов нежелательные явления, такие как риск развития лизогении и резистентности к бактериофагам, а также возможность переноса генов устойчивости к антибиотикам между штаммами бактерий.

Во многих странах мира, в том числе в США, при фармацевтической разработке препаратов бактериофагов используются следующие подходы: концепция «качество через разработку» (Quality by Design); подход, основанный на формировании «мастер-файла на биологическую активную фармацевтическую субстанцию» (Biological Master File), который подается на одобрение регулирующих органов как отдельный пакет, охватывающий только часть досье; программа «расширенного доступа» (Expanded Access), открывающая отдельному пациенту возможность применять инновационные препараты без утвержденных протоколов лечения.

В России промышленное производство лекарственных препаратов бактериофагов осуществляется в соответствии со стандартами качества, указанными в Государственной фармакопее Российской Федерации.

В результате проведенного аналитического исследования установлено наличие принципиальных различий в подходах к фаготерапии и ее регулированию, принятых в мире и на территории Российской Федерации. На основании проведенного анализа рекомендовано дополнить существующие национальные рекомендации в сфере анализа эффективности и безопасности лекарственных препаратов бактериофагов, в частности регламентировать обязательность проведения доклинических исследований.

Литература/References

1. Cooper CJ, Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Adapting drug approval pathways for bacteriophage-based therapeutics. *Front Microbiol.* 2016;7:1209. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01209>
2. Pirnay JP, Ferry T, Resch G. Recent progress toward the implementation of phage therapy in Western medicine. *FEMS Microbiol Rev.* 2022;46(1):fuab040 <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab040>
3. Hall AR, Vos DD, Friman V-P, Pirnay J-P, Buckling A. Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in wax moth larvae. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(16):5646–52. <https://doi.org/10.1128/aem.00757-12>
4. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(10):e00954–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>
5. Verbeken G, Pirnay JP, Lavigne R, Jennes S, De Vos D, Casteels M, Huys I. Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy. *Arch Immunol Ther Exp.* 2014;62(2):117–29. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0269-y>
6. Pirnay JP, Verbeken G, Rose T, Jennes S, Zizi M, Huys I, et al. Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future Virol.* 2012;7(4):379–90. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.24>
7. Van Nieuwenhuysse B, Van der Linden D, Chatzis O, Lood C, Wagemans J, Lavigne R, et al. Bacteriophage-antibiotic combination therapy against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection to allow liver transplantation in a toddler. *Nat Commun.* 2022;13(1):5725. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33294-w>
8. Gill JJ, Hyman P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(1):2–14. <https://doi.org/10.2174/138920110790725311>
9. Glonti T, Pirnay JP. In vitro techniques and measurements of phage characteristics that are important for phage therapy success. *Viruses.* 2022;14(7):1490. <https://doi.org/10.3390/v14071490>

10. Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp*. 1999;47(5):267–74. PMID: 10604231
11. Egidio JE, Costa AR, Aparicio-Maldonado C, Haas PJ, Brouns SJJ. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2022;46(1):fuab048. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048>
12. Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, Merabishvili M, Chani-shvili N, Vaniichoutte M, et al. The phage therapy paradigm: pre-t-a-porter or sur-mesure? *Pharm Res*. 2011;28(4):934–7. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0313-5>
13. Matthey M, Spencer J. Bacteriophage therapy – cooked goose or phoenix rising? *Curr Opin Biotechnol*. 2008;19(6):608–12. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.09.001>
14. Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009–2018. *JAMA*. 2020;323(9):844–53. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>
15. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(1):35–45. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1)
16. Servick K. Drug development. Beleaguerd phage therapy trial presses on. *Science*. 2016;352(6293):1506. <https://doi.org/10.1126/science.352.6293.1506>
17. Merabishvili M, De Vos D, Verbeken G, Kropinski AM, Van-denheuvel D, Lavigne R, et al. Selection and characterization of a candidate therapeutic that lyses the *Escherichia coli* O104:H4 strain from the 2011 outbreak in Germany. *PLoS One*. 2012;7(12):e52709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052709>
18. Henein A. What are the limitations on the wider therapeutic use of phage? *Bacteriophage*. 2013;3(2):e24872. <https://doi.org/10.4161/bact.24872>
19. Verbeken G, Pirnay JP, De Vos D, Jennes S, Zizi M, Lavigne R, et al. Optimizing the European regulatory frame-work for sustainable bacteriophage therapy in human medicine. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60(3):161–72. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0175-0>
20. Fauconner A. Regulating phage therapy: the biological master file concept could help to overcome regulatory challenge of personalized medicines. *EMBO Rep*. 2017;18(2):198–200. <https://doi.org/10.15252/embr.201643250>
21. Shapiro SZ. The HIV/AIDS vaccine researchers' orientation to the process of preparing a US FDA application for an investigational new drug (IND): what it is all about and how you start by preparing for your pre-IND meeting. *Vaccine*. 2002;20(9–10):1261–80. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00453-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00453-4)
22. Aslam S, Yung G, Dan J, Reed S, LeFebvre M, Logan C, et al. Bacteriophage treatment in a lung transplant recipient. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37(4):S155–6. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.01.376>
23. Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Eleftheriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol Med Public Health*. 2018;1(1):60–6. <https://doi.org/10.1093/emph/eoy005>
24. Furr CLL, Lehman SM, Morales SP, Rosas FX, Gaidamaka A, Bilinsky IP, et al. P084 bacteriophage treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a cystic fibrosis patient. *J Cyst Fibros*. 2018;17:S83. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(18\)30381-3](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(18)30381-3)
25. LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, Kumaraswamy M, Schooley RT, Wooten D. Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site infection. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(4):ofy064. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy064>
26. Greene J, Goldberg RB. Isolation and preliminary characterization of lytic and lysogenic phages with wide host range within the streptomycetes. *J Gen Microbiol*. 1985;131(9):2459–65. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-9-2459>
27. Harshey RK. Phage Mu. In: Calendar R, ed. *The bacteriophages*. Boston: Springer;1988.
28. Yarmolinsky MB, Sternberg N. Bacteriophage P. In: Calendar R, ed. *The bacteriophages*. Boston: Springer;1988.
29. Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, Thompson TL, Lee KW, Nickerson KW, Kokjohn TA. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(2):575–80. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.575-580.1998>
30. Pantucek R, Rosypalova A, Doskar J, Kailerovala J, Ruzickova V, Borecka P, et al. The polyvalent staphylococcal phage phi 812: its host-range mutants and related phages. *Virology*. 1998;246(2):241–52. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9203>
31. Khan MA, Satoh H, Katayama H, Kurisu F, Mino T. Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water Res*. 2002;36(13):3364–70. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00029-5)
32. Sullivan MB, Waterbury JB, Chisholm SW. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature*. 2003;424(6952):1047–51. <https://doi.org/10.1038/nature01929>
33. O'Flaherty S, Ross RP, Meaney W, Fitzgerald GF, Elbreki MF, Coffey A. Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(4):1836–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1836-1842.2005>
34. El-Arabi TF, Griffiths MW, She YM, Villegas A, Lingohr EJ, Kropinski AM. Genome sequence and analysis of a broad-host range lytic bacteriophage that infects the *Bacillus cereus* group. *Virol J*. 2013;10:48. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-48>
35. Mirzaei KM, Nilsson AS. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>
36. DeWyngaert MA, Hinkle DC. Bacterial mutants affecting phage T7 DNA replication produce RNA polymerase resistant to inhibition by the T7 gene 2 protein. *J Biol Chem*. 1979;254(22):11247–53. PMID: 387768
37. Qimron U, Marintcheva B, Tabor S, Richardson CC. Genomewide screens for *Escherichia coli* genes affecting growth of T7 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(50):19039–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609428103>
38. James TD, Cashel M, Hinton DM. A mutation within the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase impairs transcription from bacteriophage T4 middle promoters. *J Bacteriol*. 2010;192(21):5580–7. <https://doi.org/10.1128/JB.00338-10>
39. Azam AH, Hoshiga F, Takeuchi I, Miyayama K, Tanji Y. Analysis of phage resistance in *Staphylococcus aureus* SA003 reveals different binding mechanisms for the closely related Twort-like phages SA012 and SA039. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(20):8963–77. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9269-x>
40. Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(8):3188–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3188>

41. Sander M, Schmiegier H. Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(4):1490–3. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1490-1493.2001>
42. Beumer A, Robinson JB. A broad-host-range, generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8301–4. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8301-8304.2005>
43. DelCasale A, Flanagan PV, Larkin MJ, Allen CC, Kulakov LA. Analysis of transduction in wastewater bacterial populations by targeting the phage-derived 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Ecol.* 2011;76(1):100–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01034.x>
44. Yen M, Camilli A. Mechanisms of the evolutionary arms race between *Vibrio cholerae* and Vibriophage clinical isolates. *Int Microbiol.* 2017;20(3):116–20. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.292>
45. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2016;6:26717. <https://doi.org/10.1038/srep26717>
46. Henry M, Biswas B, Vincent L, Mokashi V, Schuch R, Bishop-Lilly KA, Sozhamannan S. Development of a high throughput assay for indirectly measuring phage growth using the OmniLog(TM) system. *Bacteriophage.* 2012;2(3):159–67. <https://doi.org/10.4161/bact.21440>
47. Estrella LA, Quinones J, Henry M, Hannah RM, Pope RK, Hamilton T, et al. Characterization of novel *Staphylococcus aureus* lytic phage and defining their combinatorial virulence using the OmniLog(R) system. *Bacteriophage.* 2016;6(3):e1219440. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1219440>
48. Давыдов ДС, Парфенюк РЛ, Дурманова ЗВ, Меркулов ВА, Мовсесянц АА. Особенности государственной регистрации и обеспечения качества лекарственных препаратов бактериофагов в Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(2):181–93. Davydov DS, Parfenyuk RL, Durmanova ZV, Merkulov VA, Movsesyants AA. Characteristic aspects of marketing authorisation and quality assurance of bacteriophage medicinal products in the Russian Federation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2023;23(2):181–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-431>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Д.С. Давыдов** — дизайн исследования, обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; **Р.Л. Парфенюк, З.В. Дурманова, Р.Е. Казаков** — анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; **А.А. Мовсесянц** — критическое обсуждение текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **D.S. Davydov** designed the study, processed and analysed literature data, and drafted the manuscript. **R.L. Parfenyuk, Z.V. Durmanova,** and **R.E. Kazakov** analysed literature data and edited the manuscript. **A.A. Movsesyants** critically discussed the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук / **Dmitry S. Davydov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>

Парфенюк Римма Леонтьевна, канд. биол. наук / **Rimma L. Parfenyuk**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8190-9299>

Дурманова Зоя Владимировна / **Zoya V. Durmanova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2845-1359>

Казаков Руслан Евгеньевич, канд. биол. наук / **Ruslan E. Kazakov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0802-4229>

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. / **Artashes A. Movsesyants**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Поступила 20.06.2024

После доработки 04.09.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Received 20 June 2024

Revised 4 September 2024

Accepted 12 September 2024

УДК 615.07:604

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-335-347>

Обзор | Review



Обзор современных регуляторных требований к изучению стабильности биологических лекарственных препаратов

А.А. Солдатов✉, А.К. Яковлев, Ж.И. Авдеева, Д.В. Горенков, А.С. Коровкин, В.В. Косенко

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

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для оценки стабильности биологических лекарственных препаратов (БЛП) требуются особые подходы и нормативные требования. В связи с этим необходима разработка актуальных национальных рекомендаций для препаратов данной группы, что является важным условием их безопасного и эффективного использования.

ЦЕЛЬ. Анализ национальных и международных требований к оценке стабильности биологических лекарственных препаратов для последующего обоснования единого регуляторного подхода к определению и подтверждению срока годности препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ. Большинство биотехнологических лекарственных препаратов (БТЛП), учитывая их белковую природу, характеризуются высокой чувствительностью к действию факторов внешней среды, в связи с чем срок годности БТЛП устанавливается на основе результатов исследования стабильности, полученных в условиях реального времени. Оценка стабильности в ускоренных и стрессовых условиях используется для обоснования срока годности, а также для характеристики механизма деградации структуры белка, что позволяет выбрать наиболее чувствительные показатели и методы анализа при проведении исследований стабильности. Национальными и международными регуляторными органами разработаны специализированные руководства по исследованию стабильности БЛП различного происхождения. В регуляторной системе Евразийского экономического союза (ЕАЭС) разработаны подходы к оценке стабильности, гармонизированные с международными стандартами. Особенности изучения стабильности вакцин подразумевают, помимо установления срока годности, также определение стабильности восстановленных для применения препаратов и термостабильности при кратковременных нарушениях температурного режима «холодовой цепи».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Испытания стабильности различных групп БЛП (включая биотехнологические и иммунобиологические) имеют свои особенности, что диктует необходимость разработки и совершенствования системы требований к оценке стабильности. Это позволит оптимизировать процессы обращения БЛП в Российской Федерации и на территории государств – членов ЕАЭС.

Ключевые слова: биологические лекарственные препараты; биотехнологические лекарственные препараты; исследование стабильности препаратов; стабильность вакцин; условия «ускоренного старения»; стрессовые условия; долгосрочные испытания стабильности; срок годности; термостабильность; фотостабильность

Для цитирования: Солдатов А.А., Яковлев А.К., Авдеева Ж.И., Горенков Д.В., Коровкин А.С., Косенко В.В. Обзор современных регуляторных требований к изучению стабильности биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2024;24(3):335–347. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-335-347>

© А.А. Солдатов, А.К. Яковлев, Ж.И. Авдеева, Д.В. Горенков, А.С. Коровкин, В.В. Косенко, 2024

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Ж.И. Авдеева и А.С. Коровкин являются членами редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2016 и 2024 г. соответственно. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Current regulatory requirements for stability studies of biological medicinal products: a review

Aleksandr A. Soldatov✉, Aleksey K. Yakovlev, Zhanna I. Avdeeva,
Dmitry V. Gorenkov, Alexey S. Korovkin, Valentina V. Kosenko

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

✉ Aleksandr A. Soldatov; soldatov@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The stability assessment of biological medicinal products (BMPs) requires special approaches and regulatory requirements. Therefore, BMPs require relevant national guidelines, which are an important prerequisite for the assurance of the safe and effective use of BMPs.

AIM. This study aimed to analyse national and international requirements for the stability assessment of BMPs in order to use the results to inform future development of a unified regulatory approach to estimating and confirming shelf-life periods for BMPs.

DISCUSSION. Most biotechnological medicinal products (BTMPs) are proteins and are highly sensitive to environmental factors by nature. Therefore, the shelf life of a BTMP is established on the basis of real-time stability studies. Stability testing under accelerated and stress conditions is conducted to support shelf-life claims and to characterise the mechanism of protein structure degradation. The results of accelerated and stress studies can be used to select the most sensitive stability-indicating parameters and testing methods. National and international regulatory authorities have developed specialised guidelines for stability studies of BMPs of various origins, and the stability assessment approaches in the regulatory system of the Eurasian Economic Union (EAEU) are harmonised with international standards. Special considerations associated with the stability of vaccines imply that stability studies of vaccines should not only establish shelf life but also investigate stability after reconstitution and after short-term temperature excursions from the recommended cold-chain conditions.

CONCLUSIONS. Special stability testing considerations for various groups of BMPs (including BTMPs and immunobiologicals) indicate the need to develop and improve the system of requirements for BMP stability assessment. This will facilitate the optimisation of the life cycle of BMPs in the Russian Federation and the other EAEU member states.

Keywords:

biological medicinal products; biotechnological medicinal products; stability studies; vaccine stability; accelerated stability studies; stability studies under stress conditions; long-term stability studies; shelf life; thermal stability; photostability

For citation:

Soldatov A.A., Yakovlev A.K., Avdeeva Zh.I., Gorenkov D.V., Korovkin A.S., Kosenko V.V. Current regulatory requirements for stability studies of biological medicinal products: a review. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):335–347. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-335-347>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. Zh.I. Avdeeva and A.S. Korovkin have been members of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2016 and 2024, respectively. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

К биологическим лекарственным средствам относятся препараты, получаемые на основе биологической технологии или из биологических объектов, контроль которых осуществляется с использованием физико-химических и биологических методов¹. Биологические лекарственные препараты (БЛП) представлены четырьмя группами: препараты из плазмы крови, биотехнологические препараты (получаемые с использованием генной инженерии, контролируемой экспрессии генов, гибридных технологий и других биотехнологических процессов), иммунобиологические препараты (препараты из плазмы крови, сыворотки, вакцины, аллергены и др.) и генотерапевтические препараты (действующие на генетический материал клетки). Среди биологических лекарственных средств наибольшая группа представлена биотехнологическими препаратами.

Биотехнологические лекарственные препараты (БТЛП), учитывая их белковую природу, имеют существенные отличия от других групп лекарственных препаратов (ЛП), в связи с чем для оценки их качества, эффективности и безопасности требуются особые подходы и нормативные требования. Нестабильность молекулы белка в процессе хранения БТЛП предопределяет чувствительность препарата к изменению условий внешней среды. Неблагоприятное воздействие внешних факторов в конечном итоге может привести к деградации белковой молекулы [1, 2]. Изменение характеристик белковой молекулы, в свою очередь, может стать причиной потери ее функциональной активности или снижения эффективности при клиническом применении. Продукты деградации могут привести к появлению примесей и загрязнений, что скажется на безопасности (токсичности) препарата, развитии иммунных реакций (нежелательная иммуногенность) и изменении биодоступности препарата [3].

В соответствии с концепцией «качество через разработку» (Quality by Design, QbD) оценка стабильности является частью профиля качества (Quality Target Product Profile) БТЛП². Исследование стабильности используется для выявления изменений подлинности, чистоты и специфической/биологической активности

лекарственного препарата с течением времени. Оценка стабильности проводится на протяжении всего жизненного цикла каждого препарата, начиная с доклинической разработки и ранних клинических фаз исследования до дальнейшего применения в клинической практике.

Цель работы — анализ национальных и международных требований к оценке стабильности биологических лекарственных препаратов для последующего обоснования единого регуляторного подхода к определению и подтверждению срока годности препаратов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Действующие нормативные требования к оценке стабильности лекарственных препаратов

Наиболее полные рекомендации, касающиеся вопросов оценки стабильности лекарственных препаратов, были подготовлены Международным советом по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH). В серии руководств ICH Q1A – Q1F представлены подходы к научно обоснованной оценке рисков лекарственных препаратов, связанных со стабильностью.

В руководстве ICH Q1A (R2)³ представлены основные рекомендации для обеспечения качества фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, касающиеся выбора серий, дизайна исследования, оценки параметров и интерпретации результатов при проведении исследований стабильности. В данном документе указаны критерии выбора серий для конкретных исследований, а также выбора и оценки условий хранения с учетом особенностей упаковки препарата. Кроме того, в документе содержатся рекомендации по исследованиям стабильности: порядок проведения исследований в стрессовых условиях, указание условий хранения (например, температуры и влажности), включая долгосрочные, промежуточные и ускоренные испытания, а также частота контрольных точек испытаний⁴.

Руководство ICH Q1B регламентирует изучение фотостабильности препаратов⁵.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

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

² ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. EMA/CHMP/ICH/167068/2004. EMA; 2017.

³ ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and products. CPMP/ICH/2736/99. EMA; 2003.

⁴ Там же.

⁵ ICH Q1B Photostability testing of new active substances and medicinal products. CPMP/ICH/279/95. EMA; 1998.

В документе ICH Q1C описано применение ICH Q1A (R2) для новых лекарственных форм⁶. В руководстве ICH Q1D содержатся рекомендации по использованию бреккетинга (оценка выборок по экстремальным значениям определенных расчетных факторов во всех контрольных точках) и матричного анализа в исследованиях стабильности⁷. Руководство ICH Q1E регламентирует оценку результатов исследований стабильности, а также их экстраполяцию⁸. Документ ICH Q1F, содержащий рекомендации по оценке стабильности в разных климатических зонах, был отозван в июне 2006 г.⁹ Рекомендации относительно оценки стабильности с учетом особенностей климатических зон указаны в документе, подготовленном Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ)¹⁰.

В целом документы ICH Q1A – Q1F касаются химических препаратов, но в контексте общих требований могут быть применимы для исследований стабильности БТЛП. Поскольку данные руководства не могут гарантировать получение достоверных сведений о стабильности БТЛП, была инициирована подготовка специального руководства ICH Q5C, регламентирующего оценку стабильности БТЛП¹¹. Этот документ содержит рекомендации по проведению исследований стабильности БТЛП, применимые в отношении препаратов на основе хорошо изученных белков и полипептидов, выделенных из тканей, жидкостей организма, культур клеток или полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК.

При подготовке общей фармакопейной статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации¹², касающейся стабильности БЛП, за основу было взято руководство ICH Q5C. С целью гармонизации нормативных требований государств – членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС) с международными стандартами руководство ICH Q5C было принято за основу при подготовке требований для оценки стабильности БТЛП – глава 8, «Исследование стабильности биотехнологических (биологических) препаратов», в составе Решения Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК)

от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (далее – Решение Совета ЕЭК № 89)¹³.

Проблемы стабилизации биотехнологических лекарственных препаратов

БТЛП существенно отличаются от обычных препаратов, получаемых с помощью химического синтеза, и представляют собой, как правило, белковые макромолекулы, которые имеют сложную структуру и конформация которых в большинстве случаев определяется нековалентными связями, что делает данные молекулы чувствительными к изменению факторов внешней среды. Поэтому особое внимание должно быть уделено разработке оптимального состава БТЛП (буферный раствор, стабилизаторы и др.), а также выбору материалов первичной упаковки, позволяющих поддерживать неизменность структуры белковой молекулы в процессе хранения¹⁴. Неблагоприятные воздействия внешних факторов могут привести к изменениям характеристик белковой молекулы [1, 2], что может стать причиной потери ее функциональной активности или снижения эффективности при клиническом применении. Продукты деградации могут сказаться на безопасности (токсичности) препарата, в том числе на развитии нежелательной иммуногенности, а также изменении биодоступности [3]. Так, образовавшиеся агрегаты могут инициировать нежелательную иммунную реакцию в отношении других веществ, входящих в состав лекарственного препарата, например, к полиэтиленгликолю (ПЭГ) в случае конъюгированных препаратов при ковалентном химическом соединении ПЭГ с белковой молекулой.

Деградация белков БТЛП чаще всего развивается в виде следующих реакций:

- денатурация – нарушение естественной вторичной или третичной структуры белка. Часто это необратимый процесс, который может развиваться под влиянием многих факторов,

⁶ ICH Q1C Stability testing for new dosage forms. ICH; 1996.

⁷ ICH Q1D Bracketing and matrixing designs for stability testing of new drug substances and products. CPMP/ICH/4104/00. EMA; 2002.

⁸ ICH Q1E Evaluation of stability data. CPMP/ICH/420/02. EMA; 2003.

⁹ ICH Q1F Stability data package for registration applications in climatic zones III and IV. ICH; 2006.

¹⁰ Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. World Health Organization Technical Report Series, No. 953. WHO; 2009.

¹¹ ICH Q5C Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products. ICH; 1996.

¹² ОФС.1.1.0020.18 Стабильность биологических лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

¹⁴ Там же.

наиболее распространенным является тепловое воздействие [4];

- агрегация — образование комплексов между макромолекулами (димеры, тримеры, мультимеры). Комплексы могут быть связаны ковалентно или за счет сил гидрофобного взаимодействия. Агрегация может быть вызвана многими факторами, но особенно часто причиной являются изменение температурного режима и pH. В конечном счете, агрегация может привести к полному осаждению белковых структур. Образование агрегатов, в первую очередь, влияет на эффективность препарата, а также приводит к проявлению нежелательной иммуногенности [5–7];
- окислению обычно подвергаются аминокислоты боковых цепей при воздействии кислорода воздуха, вспомогательных веществ или воздействия видимого или ультрафиолетового диапазона света. В частности, к окислению склонны метионин, цистеин, триптофан и тирозин. Ионы металлов, таких как железо, цинк, медь или вольфрам могут выщелачиваться из материалов, используемых в производстве и контактирующих с лекарственным препаратом, или присутствовать в следовых количествах во вспомогательных веществах и катализировать окисление, а также другие процессы, обуславливающие деградацию белковых молекул [8, 9];
- реакции дезамидирования аспарагиновой и глутаминовой аминокислот могут быть причиной образования новых ковалентных связей и изменения конформационной структуры белка, которая в свою очередь может влиять на скорость реакции дезамидирования аминокислот [4, 10].

Кроме того, при исследовании стабильности необходимо учитывать еще и такие процессы, как фрагментация, дегликозилирование, разрушение дисульфидных связей, которые поддерживают третичную структуру белковой молекулы, а также возможность адсорбции белка на компонентах первичной упаковки [11–13].

Состав вспомогательных веществ оказывает влияние на стабильность БТЛП. Так, пероксиды, источником появления которых может быть вспомогательное вещество (в частности, полисорбат 80 и полисорбат 20), оказывают отрицательный эффект на стабильность чувствительных к окислению протеинов, вызывая окисление боковых цепей аминокислот; сахарады и полиолы, применяемые для поддержания

стабильности, могут приводить к гликозилированию и другим реакциям, влияющим на качество конечного белкового продукта [14–18].

Таким образом, процессы деградации могут вызвать критичные изменения вторичной и третичной структур белковых молекул. Для оценки возможных изменений БТЛП при исследовании стабильности используется широкий спектр аналитических методов.

Общие подходы к изучению стабильности биологических лекарственных препаратов

Оценка стабильности готовой лекарственной формы БЛП (в утвержденной первичной упаковке) включает исследование в режиме реального времени. Также необходимо охарактеризовать влияние условий транспортирования БЛП и изучить стабильность при применении препарата в многодозовой упаковке и при восстановлении лиофилизированного препарата.

Как правило, БЛП вводятся парентерально. Для обеспечения стабильности БЛП применяется лиофилизация, в связи с чем перед введением препарата необходим этап приготовления (разведения). В случае БЛП, выпускаемых в виде концентрата для приготовления раствора для инфузий, также важен этап приготовления растворов и оценка максимально допустимого времени хранения подготовленных систем перед применением. При разведении необходимо контролировать, чтобы не произошла деградация белковых молекул [19]¹⁵.

В рамках исследования стабильности проводится оценка совместимости. При этом учитывается совместимость растворителей, разбавителей, совместимость всех материалов, контактирующих с препаратом (иглы шприцов, фильтров в системах для введения и трубочек, материалов инфузионного оборудования). Поршни и цилиндры шприцов, иглы и другие компоненты могут быть покрыты силиконовым маслом, что может привести к нежелательным взаимодействиям с препаратом и вызвать, например, агрегацию молекул белка [20].

БЛП обычно хранятся в определенных температурных условиях (2–8 °C). Стандартные исследования стабильности проводятся при хранении в указанном температурном диапазоне. При транспортировке может происходить временный выход температурных условий за пределы данного диапазона, что необходимо учитывать для препаратов, транспортируемых в условиях «холодовой цепи» [21]¹⁶.

¹⁵ Там же.

¹⁶ The Gold Sheet (September 2006). Global effort to control drug temperature in transit heats up. 40(9):1–19.

Для оценки влияния на стабильность условий транспортировки результаты стандартных исследований при замораживании-оттаивании не всегда могут быть корректными. Белковые молекулы могут выдерживать фазовые изменения, которые быстро происходят в классическом цикле замораживания-оттаивания (например, при понижении температуры до значений от минус 20 °С до минус 25 °С с последующим возвратом к регламентированной температуре хранения и транспортирования при 2–8 °С). Однако скорость замерзания (или оттаивания) в реальных условиях транспортировки, как правило, может быть медленнее. Было показано, что скорость замораживания влияет на денатурацию белка в циклах лиофилизации [22]. Возможность пребывания жидкого состава в течение длительного времени в частично замороженном состоянии может вызвать денатурацию и/или последующую агрегацию в сравнении с замораживанием в короткие сроки [19]. Кроме того, в частично замороженном состоянии на белок могут негативно влиять такие факторы, как pH, ионная сила и концентрация самого белка в лекарственном препарате. Это может привести как к частичной, так и к полной деградации белковой молекулы. Для препаратов, хранение которых осуществляется при отрицательных температурах, необходимо проведение исследований в условиях нескольких циклов замораживания-оттаивания.

Для препаратов, применение которых связано с восстановлением, разведением или смешиванием, а транспортирование осуществляется в условиях «холодовой цепи», оценку стабильности необходимо проводить с учетом указанных особенностей. Например, известно, что лиофилизованные вакцины становятся гораздо более термочувствительными после того, как их подвергли восстановлению разбавителем¹⁷, в связи с чем рекомендуется использовать их как можно скорее. Восстановленные вакцины следует хранить при температуре 2–8 °С до момента использования. Срок хранения восстановленного препарата определяется в исследовании стабильности¹⁸. При этом срок не должен превышать 24 ч, «если восстановление или разведение и т.д.

не осуществлялось в проверенных и валидированных асептических условиях»¹⁹.

Частные вопросы оценки стабильности биологических лекарственных препаратов

Исследование стабильности

биотехнологических лекарственных препаратов

При регистрации БТЛП необходимо предоставить результаты изучения стабильности активной фармацевтической субстанции и готового лекарственного препарата²⁰. Для оценки стабильности БТЛП на территории государств – членов ЕАЭС приняты общие рекомендации относительно объема данных о стабильности²¹. Требования не распространяются на следующие лекарственные средства: классические вакцины (получаемые методом культивирования вакцинных штаммов; исключение – вакцины на основе рекомбинантных белков и пептидов), антибиотики, гепарины, витамины, аллергенные экстракты и другие продукты, полученные с использованием традиционных биологических или ферментативных процессов. В руководстве представлены конкретные рекомендации для БТЛП, касающиеся выбора серий для исследования, условий хранения, временных периодов, показателей качества, а также методов оценки показателей качества с целью характеристики стабильности препаратов²². При этом результаты оценки стабильности БЛП должны быть получены при исследовании как минимум трех серий в первичной упаковке: репрезентативные серии препарата промышленного производства и репрезентативные серии препарата, который планируется использовать в клинических исследованиях.

Как правило, обоснование срока годности БТЛП основано на результатах изучения стабильности в режиме реального времени и заявленных условиях хранения. Экстраполяция результатов исследований стабильности, полученных при неполных (минимальных) исследованиях для обоснования срока хранения препарата, не применима к БТЛП²³. Это обусловлено тем, что кинетика деградации белковых молекул в препарате имеет нелинейный характер. Кроме того, деградация БТЛП в разные

¹⁷ WHO/IVB/06.10 Temperature sensitivity of vaccines. WHO; 2006.

¹⁸ WHO policy statement: the use of opened multi-dose vials of vaccine in subsequent immunization sessions. WHO; 2000.

¹⁹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10.05.2018 № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

²⁰ ICH Q1F Stability data package for registration applications in climatic zones III and IV. ICH; 2006.

²¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

²² Там же.

²³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 (ред. от 29.05.2024) «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

периоды хранения может проходить по разным механизмам²⁴.

Ускоренные и стрессовые испытания стабильности

Срок годности БТЛП обосновывается результатами исследований стабильности в реальном времени. В регистрационное досье также рекомендуется включать данные исследования стабильности активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата при хранении в ускоренных и стрессовых условиях (на этапе регистрации препарата и при внесении изменений в производственный процесс)²⁵. Результаты этих исследований могут быть использованы в качестве дополнительной информации для обоснования срока годности. Эти данные необходимы для обоснования использования аналитических методик при изучении стабильности и характеристики профиля деградации активной субстанции или препарата. Результаты, полученные в стрессовых условиях, могут быть использованы для характеристики влияния случайных условий (например, во время транспортировки) на стабильность препарата. Эти исследования позволяют обосновать выбор конкретных параметров для характеристики стабильности препарата²⁶ и определить те показатели, которые наиболее чувствительны для оценки качества препарата при неблагоприятном внешнем воздействии. При проведении анализа необходимо использовать валидированные методики²⁷.

Хотя в руководстве по стабильности ICH Q1A (R2)²⁸ подробно описаны условия ускоренного и стрессового исследования, заявителю следует учитывать, что указанные в документе условия могут не подходить для БТЛП. В частности, необходимо отметить, как правило, повышенную чувствительность препаратов к воздействию светового облучения, что предопределяет необходимость исследования фотостабильности и оценки способности вторичной упаковки обеспечить надежную защиту БТЛП от светового воздействия.

Следует отметить, что результаты исследования в экстремальных условиях могут охарактеризовать процессы деградации препарата, что дает возможность более объективно отслеживать изменения в процессе хранения в стандартных условиях.

Оценка стабильности биоподобных препаратов при их разработке

Биоаналогичный (биоподобный) лекарственный препарат — БТЛП, схожий по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным БТЛП в такой же лекарственной форме и имеющий идентичный способ введения. Регистрация такого препарата основывается на демонстрации высокой степени сходства/подобия с оригинальным (референтным) препаратом в ходе проведения сравнительных исследований таких показателей качества, как структурные и физико-химические свойства, чистота, биологическая активность и др. Исследования по доказательству сходства/подобия должны быть проведены с использованием серий препарата промышленного масштаба по разработанной технологии.

Одним из существенных аспектов доказательства сходства/подобия является исследование по оценке стабильности препаратов. Следует подчеркнуть, что, как и для всех вновь разработанных БТЛП, срок годности устанавливается на основе собственных результатов исследования стабильности, не допускается экстраполяция данных, касающихся оригинального препарата. Исследования стабильности должны включать сравнительную оценку стабильности разработанного и оригинального препаратов в условиях «ускоренного старения» и стрессовых условиях с целью оценки сопоставимости профиля деградации. При выборе исследуемых образцов необходимо учитывать сроки годности разработанного и оригинального (референтного) препаратов до окончания срока их хранения. Следует использовать широкий спектр аналитических методик для объективной оценки и характеристики сравниваемых препаратов (структурная целостность молекулы белка, содержание родственных соединений и посторонних примесей — образование агрегатов и низкомолекулярных форм, соотношение содержания заряженных форм и др.) и для оценки специфической биологической активности. Качественные и количественные изменения оцениваемых показателей качества, наблюдаемые в ускоренных и стрессовых условиях, позволяют установить и сопоставить основные пути деградации исследуемых белковых препаратов.

²⁴ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

²⁵ Там же.

²⁶ Там же.

²⁷ Там же.

²⁸ ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and products. CPMP/ICH/2736/99. EMA; 2003.

Результаты сравнительных исследований показателей качества определяют объем дальнейших сравнительных доклинических и клинических исследований, подтверждающих отсутствие отрицательного влияния выявленных различий на безопасность, эффективность и иммуногенность препаратов.

Оценка стабильности биотехнологических лекарственных препаратов при внесении изменений в технологию производства

Проведение исследований стабильности требуется в случаях внесения значительных изменений в процесс производства БТЛП, которые могут повлиять на структуру белковой молекулы препарата и, в конечном итоге, на эффективность и безопасность его применения. Задачи и особенности таких исследований описаны в Решении Совета ЕЭК № 89²⁹ в главе 9.1 «Сопоставимость показателей качества биотехнологических (биологических) препаратов при внесении изменений в производственный процесс»; программа мониторинга стабильности, выбор серий и оцениваемых показателей и обоснование условий исследования — в главе 8, «Исследование стабильности биотехнологических (биологических) препаратов».

Необходимо учитывать, что даже небольшое изменение производственного процесса может повлиять на стабильность препарата. Оценка сравнительных результатов изучения стабильности может выявить незначительные различия (между препаратами, полученными до и после внесения изменения), которые невозможно обнаружить при сравнении показателей качества препаратов, указанных в спецификации (полученных до и после внесения изменения).

Например, наличие следовых количеств протеазы может быть определено только по продуктам деградации, которые образуются через продолжительный период хранения препарата. В некоторых случаях двухвалентные ионы, вымываемые из вновь введенной укупорочной системы (первичной упаковки препарата), могут изменить профиль стабильности вследствие активации следовых протеаз, которые не были выявлены ранее при оценке стабильности препарата до внесения изменений в производственный процесс. Это обусловлено чувствительностью белков к изменению состава буферного раствора, условий обработки, сроков

и условий хранения промежуточных продуктов между стадиями производства (holding), использованию органических растворителей и др. При внесении подобных изменений в процесс производства необходимо проведение исследования стабильности в реальном времени и при заявленной температуре³⁰.

При внесении изменений в производственный процесс БТЛП необходимо проведение сравнительного изучения стабильности препаратов, полученных до и после внесения изменения, в ускоренных и стрессовых условиях. Такие исследования позволяют оценить динамику возможных изменений молекулы белка и охарактеризовать особенности деградации препаратов. В рамках данных исследований могут быть получены дополнительные материалы, позволяющие обосновать срок годности, и необходимые сведения для характеристики вносимых производственных изменений (рецептура, масштаб производства и др.). Результаты анализа могут привести к выводу о различиях между препаратами, полученными до и после внесения изменения, что может потребовать проведения дополнительных исследований и контрольных мероприятий в процессе производства и хранения. Кроме того, результаты испытаний также могут позволить обосновать выбор аналитических методик для контроля показателей качества в процессе изучения стабильности³¹.

Оценка стабильности вакцин для профилактики инфекционных заболеваний

В последние годы при создании вакцин активно разрабатываются технологические платформы с использованием современных биотехнологических методов для получения антигенов (технология рекомбинантной ДНК, вирусных векторов, мРНК вакцин и др.). При оценке стабильности данных вакцин могут быть применены подходы, базирующиеся на рекомендациях для оценки стабильности БТЛП. Следует отметить, что в случае вакцин, разрабатываемых на основе традиционных технологий получения антигенов (живые вакцины, инактивированные и др.), для оценки стабильности описанные выше рекомендации не предназначены.

Основные принципы исследования стабильности вакцин представлены в рекомендациях ВОЗ³². Особенностью вакцинных препаратов является то, что они состоят из сложных смесей

²⁹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

³⁰ Там же.

³¹ Там же.

³² Guidelines on stability evaluation of vaccines. Annex 3, TRS No. 962. WHO; 2006.

белков, углеводов, липидов, инактивированных микроорганизмов или, в некоторых случаях, живых ослабленных микроорганизмов в качестве активных компонентов, а также стабилизаторов, адъювантов, консервантов и других веществ, которые в совокупности определяют общую эффективность и безопасность вакцины³³.

В рекомендациях ВОЗ указано, что вакцинные препараты чувствительны к изменениям условий окружающей среды, среди которых следует выделить температурный фактор³⁴, свет и др. Хотя фотостабильность не считается обязательным параметром при изучении стабильности вакцин, существуют исключения, например лиофилизированные вакцины БЦЖ, которые, независимо от штамма, чувствительны к ультрафиолетовому и флуоресцентному излучению³⁵. Для таких вакцин использование янтарного стекла является обязательным условием при упаковке и транспортировке. Для вакцин, которые являются чувствительными к свету, допускается использование особой упаковки без проведения рутинных исследований стабильности по данному параметру³⁶.

Исследования в стресс-условиях (экстремальные условия окружающей среды) при воздействии таких факторов, как свет или экстремальные температуры, как правило, могут не проводиться при исследовании стабильности вакцин. Однако, если вакцина предназначена для применения в регионах, где существует реальная вероятность воздействия экстремальных температур или других неблагоприятных внешних факторов, исследования стабильности в стрессовых условиях являются необходимыми³⁷.

Такие исследования позволяют охарактеризовать стабильность вакцины на основании результатов оценки деградации. Потенциальные продукты деградации, которые могут выявиться в случае воздействия стрессовых факторов, позволят обосновать выбор подходящих чувствительных аналитических методик для их выявления при изучении стабильности вакцины. Анализ может проводиться при воздействии на вакцину различных температурных режимов, превышающих рекомендованные температурные

условия хранения, а также света, окислителей, замораживания-размораживания, различных значений pH.

Основная проблема при оценке стабильности вакцин заключается в том, что вакцины обладают специфической биологической активностью, которую невозможно полностью охарактеризовать только физико-химическими методами, поэтому важную роль в контроле качества вакцин играют биологические методы. Оценка стабильности вакцин основана на определении показателя иммуногенности, который косвенно характеризует эффективность вакцины. С этой целью могут применяться в том числе методы *in vivo*, например тест Кендрика для оценки цельноклеточной вакцины для профилактики коклюша или реакция биологической нейтрализации для вакцин для профилактики и лечения бешенства³⁸.

Так как в случае некоторых вакцин возможна потенциальная реверсия токсичности и изменения свойств антигенов в составе комплексной вакцины, то эти особенности необходимо оценить в процессе исследования токсичности в рамках оценки стабильности. Кроме того, при изучении стабильности некоторых вакцин (например, вакцины для профилактики коклюша) рекомендуется проведение следующих тестов: на сенсибилизацию гистамином, определение уровня свободного полисахарида, оценка десорбции из адъюванта и агрегации адъюванта.

Оценка показателей при исследовании стабильности вакцин, включая определение биологической активности (например, эффективность, содержание антигена и специфическая токсичность), проводится до и после воздействия рекомендуемой температуры хранения (условия хранения в режиме реального времени) или температуры выше рекомендуемой для хранения (ускоренные исследования стабильности)³⁹. Учитывая присущую биологическим методам исследования вариабельность, для получения адекватных результатов рекомендуется использование эталонных препаратов. При этом производственные стандартные образцы должны быть откалиброваны по Международному биологическому стандартному образцу, если таковой имеется.

³³ Там же.

³⁴ Temperature sensitivity of vaccines. WHO/IVB/06.10. WHO; 2006.

³⁵ Immunization in practice: a practical resource guide for health staffs. WHO/IVB/04.06. WHO; 2004.

³⁶ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. Annex 3, WHO Technical Report Series No. 979. World Health Organization; 2013.

³⁷ Guidelines on stability evaluation of vaccines. Annex 3, TRS No 962. WHO; 2006.

³⁸ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of acellular pertussis vaccines, Annex 4, WHO Technical Report Series, No. 979. WHO; 2014.

Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. Annex 2, WHO Technical Report Series No 941. WHO; 2007.

³⁹ Guidelines on stability evaluation of vaccines. Annex 3, TRS No 962. WHO; 2006.

Выбор показателей для оценки стабильности обосновывается индивидуально для каждой вакцины с учетом природы антигена, состава вакцины, а также особенностей производственного процесса. При выборе параметров для характеристики стабильности необходимо учитывать их связь с результатами клинических исследований — с эффективностью или безопасностью. Специфическая активность большинства вакцин и, следовательно, их ожидаемая иммуногенность и профилактическая эффективность напрямую связана с их стабильностью. Например, показатели активности живых вирусных вакцин, согласно материалам Комитета экспертов ВОЗ по биологической стандартизации, отражают связь минимальных значений специфической активности вакцины с подтверждением протективной эффективности в клинических испытаниях и с максимально безопасной переносимой дозой⁴⁰.

При оценке стабильности вакцин следует включать исследования по определению активности *in vivo* и *in vitro*, общей и специфической токсичности, а также по оценке содержания антигена, антимикробного агента и адъюванта (адсорбента), а также pH, полноты адсорбции, стерильности и изменения физико-химических свойств⁴¹. Для живых аттенуированных вакцин титр специфических антител является параметром, свидетельствующим о стабильности, который можно оценивать на этапе промежуточного продукта и готовой лекарственной формы препарата. Для неживых вакцин определение специфической активности на стадии промежуточного продукта нецелесообразно (или невозможно), данные параметры необходимо оценивать на готовой лекарственной форме препарата (например, адсорбированные вакцины).

Согласно рекомендациям ВОЗ окончательное утверждение периода хранения промежуточного продукта или срока годности готовой лекарственной формы препарата должно основываться на данных о стабильности в реальном времени и реальных условиях хранения. Такие исследования проводятся во время разработки вакцины при оценке специфической активности или других ее параметров. Эти исследования должны быть проведены на репрезентативных сериях (для конечных или промежуточных продуктов технологического процесса) в упаковке коммерческого производства. Выбор показателей

стабильности, а также периоды определения показателей должны быть обоснованы. При этом следует принимать во внимание кумулятивный (совокупный) возраст всех антигенов к концу срока годности конечного продукта⁴².

Если установленный срок хранения вакцины более 6 мес. и показано, что изменение параметров стабильности является линейным, то данные о реальных условиях хранения должны быть представлены как минимум за 6 мес. Следует отметить, что прогнозирование стабильности на основе моделирования по минимальному набору показателей спецификации крайне ненадежно. Однако для некоторых вакцин разработка производственного процесса осуществляется в сжатые сроки (например, вакцины против сезонного гриппа), и в таких случаях экстраполяция данных, полученных в предыдущие годы, может считаться приемлемой⁴³.

В рекомендациях ВОЗ для отдельных видов вакцин термостабильность оценивается при установлении срока годности. В то же время для некоторых вакцин термическую стабильность следует рассматривать как характеристику вакцины, которая служит показателем неизменности производственного процесса. Термостабильность является одним из показателей спецификации живых аттенуированных вакцин при выпуске производственных партий, таких как оральная вакцина против полиомиелита, вакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи, а также желтой лихорадки⁴⁴.

При изучении стабильности вакцин предпочтительно использовать методы с количественной оценкой исследуемых показателей, например специфическая активность (в международных единицах) или содержание антигена (в микрограммах). При этом результаты исследования стабильности не следует указывать в критериях «соответствует» или «не соответствует», если данные оценки имеют определенное количественное значение. Использование этих критериев является исключением, например, в случае теста на стерильность, проводимого в начале и в конце исследования стабильности, где результат обычно обозначается как «соответствует»⁴⁵.

При испытании стабильности вакцин необходимо учитывать рекомендации ВОЗ, представленные в руководствах для оценки качества доклинических и клинических исследований

⁴⁰ Guidelines on stability evaluation of vaccines. Annex 3, TRS No 962. WHO; 2006.

⁴¹ Там же.

⁴² Там же.

⁴³ Там же.

⁴⁴ Там же.

⁴⁵ Там же.

конкретных моновакцин, а также действующие нормативно-правовые акты Российской Федерации и ЕАЭС. В частности, в главе 30 «Указания по разработке вакцин против оспы (осповакцин)» (Решение Совета ЕЭК № 89) в разделе, касающемся исследования стабильности, указано, что срок годности должен быть обоснованным⁴⁶. При этом необходимо подтвердить активность на протяжении всего периода валидации процесса производства. Снижение активности при хранении должно быть надлежащим образом оценено; значительное снижение активности, даже не выходящее за допустимые пределы, может свидетельствовать о нестабильности вакцины. Для лиофилизированных вакцин необходимо обосновать критерии приемлемости при исследовании термостабильности (например, 4 нед. при 37 °C).

Исследование стабильности отдельных видов вакцин

В последнее время в мире интенсивно разрабатываются комбинированные вакцины. Это обусловлено тем, что такие вакцины обеспечивают защиту от нескольких инфекционных заболеваний, упрощают программы вакцинации, улучшают их принятие родителями и обществом, а также увеличивают охват прививками населения.

Согласно рекомендациям ВОЗ целью исследований стабильности комбинированных вакцин является обеспечение гарантии того, что в конце срока годности, периода хранения или периода применения (например, установленный срок применения лиофилизированной вакцины после восстановления) каждый компонент вакцины сохраняет показатели качества, безопасности и эффективности⁴⁷. Параметры, характеризующие стабильность комбинированных вакцин, подбираются индивидуально, в зависимости от особенностей компонентов вакцины. Определение срока годности комбинированной вакцины должно основываться на стабильности компонента с самым коротким сроком годности. Данные, полученные при исследовании моновакцин, должны обосновывать заключение о стабильности комбинированной вакцины. Стабильность комбинированной вакцины не должна основываться на экстраполяции данных о стабильности отдельных компонентов.

Если в производственный процесс вносятся изменения, которые могут повлиять

на стабильность препарата, должна быть подтверждена стабильность вакцины, полученной после внесения изменения.

Стабильность вакцины подтверждают в исследованиях, проведенных в режиме реального времени, в условиях рекомендуемой температуры хранения в коммерческой упаковке. Исследования стабильности в условиях «ускоренного старения» могут предоставить дополнительные доказательства стабильности продукта, но не могут заменить исследования на протяжении всего срока годности. Если предполагается, что срок хранения превышает 6 мес., а зависимость между определенным количественным показателем качества и временем носит линейный характер, то в регистрационном досье необходимо представить, как минимум, шестимесячные данные о хранении препарата в режиме реального времени. При этом ускоренные исследования следует рассматривать как дополнение к исследованиям в реальном времени, а не замену им. Однако в отдельных случаях (например, вакцина против сезонного гриппа) экстраполяция данных, полученных в предыдущие годы, может считаться приемлемой. Так, согласно рекомендациям Решения Совета ЕЭК № 89 (Приложение № 28 «Требования к разработке и оценке качества вакцин для профилактики гриппа») при регистрации новой вакцины для профилактики гриппа необходимо представить результаты исследований стабильности моновалентных нерасфасованных продуктов, если предполагается их использование более 1 года⁴⁸.

Учитывая высокую изменчивость вируса гриппа, производители вакцин вынуждены ежегодно обновлять штаммовый состав вакцин. Однако в очень короткие сроки до начала массовой вакцинации невозможно провести полноценные исследования стабильности вакцины с новым штаммом. Поэтому согласно рекомендациям Решения Совета ЕЭК № 89 (Приложение № 28) в заявлении о внесении изменений, связанных с заменой штамма, необходимо включить результаты исследования за предыдущий сезон и представить гарантийное обязательство продолжить оценку стабильности в пострегистрационном периоде. При изучении стабильности вакцин для профилактики гриппа также проводятся исследования в условиях «ускоренного старения».

⁴⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁴⁷ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of DT-based combined vaccines. WHO Technical Report Series, No. 980, Annex 6. WHO; 2014.

⁴⁸ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

Результаты испытаний стабильности моновалентных нерасфасованных продуктов при хранении в условиях реального времени и «ускоренного старения» представляют с целью подтверждения максимального срока хранения. Эти данные также могут послужить дополнительным доказательством качества вакцины с различным штаммовым составом. Поэтому при изменении (обновлении) штаммового состава проводятся исследования стабильности для каждого нового штамма, чтобы накопить базу данных о качестве вакцины⁴⁹. Результаты испытаний стабильности методом «ускоренного старения» используются для того, чтобы показать, что препараты с новым штаммовым составом, вероятно, будут иметь те же характеристики стабильности, что и препараты со штаммовым составом, изученные в исследованиях, на которых основан срок годности (срок хранения).

При регистрации вакцин для профилактики гриппа в период пандемии (так называемые пандемические вакцины) в качестве данных, подтверждающих стабильность, используются результаты испытаний опытно-промышленных серий, если такие материалы являются репрезентативными для полномасштабного процесса производства. Заявленный срок годности (срок хранения) подтверждается путем сравнения доступных данных о стабильности, полученных в испытаниях естественного, ускоренного хранения и (или) стресс-исследования, которые проводятся для вакцин до и после обновления пандемического штамма⁵⁰.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биотехнологические лекарственные препараты, учитывая белковую природу, характеризуются высокой чувствительностью к действию факторов внешней среды. Поэтому даже небольшое изменение внешних факторов, включая условия процесса производства или хранения, может привести к деградации молекулы белка. В связи с этим данные исследования стабильности в течение жизненного цикла препарата

являются неотъемлемой частью системного подхода в подтверждении его качества.

В регуляторной системе ЕАЭС разработаны подходы к оценке стабильности, гармонизированные с международными стандартами, в соответствии с которыми срок годности при регистрации биотехнологических лекарственных препаратов или при внесении изменений в производственный процесс устанавливается по результатам долгосрочных испытаний стабильности. Исследования в условиях стрессовых и ускоренных испытаний стабильности служат необходимой дополнительной характеристикой, подтверждающей неизменность профиля деградации препарата и его сопоставимость до и после внесения изменений в производственный процесс. Эти исследования также могут предоставить данные для обоснования критических показателей, которые необходимо контролировать при изучении стабильности, и обосновать аналитические методы для контроля качества БЛП.

Нормативные требования для оценки стабильности традиционных вакцин (живые, инактивированные и др.) при внесении изменений в регистрационное досье отсутствуют. Программу проведения исследований стабильности вакцин необходимо разрабатывать с учетом их конкретных особенностей. Кроме оценки стабильности в режиме реального времени также необходима характеристика стабильности при транспортировке препарата и изучение стабильности после восстановления лиофилизированных препаратов и использования многодозовых форм упаковки.

Разработка единых требований для испытаний стабильности БЛП (включая биотехнологические и иммунобиологические), гармонизированных с ведущими международными стандартами, но учитывающих в то же время их ключевые особенности, позволит оптимизировать регуляторные подходы и обращение современных препаратов на территории Российской Федерации и единого экономического пространства ЕАЭС.

Литература/References

1. Berkowitz S, Rathore AS, Krull IS. Challenges in the determination of protein aggregates. Part II. *LCGC North Am.* 2015;33(7):478–89.
2. Rathore AS, Krull IS. Challenges in the determination of protein aggregates. Part I. *LCGC North Am.* 2015;33(1):42–9.
3. Noel JC, Lagassé D, Golding B, Sauna ZE. Emerging approaches to induce immune tolerance to therapeutic proteins. *Trends Pharmacol Sci.* 2023;44(12):1028–42. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.10.002>
4. Wearne SJ, Creighton TE. Effect of protein conformation on rate of deamidation: ribonuclease A. *Proteins.* 1989;5(1):8–12. <https://doi.org/10.1002/prot.340050103>
5. Grigolato F, Arosio P. Synergistic effects of flow and interfaces on antibody aggregation. *Biotechnol Bioeng.* 2020;117(2):417–28. <https://doi.org/10.1002/bit.27212>
6. Shah M. Commentary: New perspectives on protein aggregation during biopharmaceutical development. *Int J Pharm.* 2018;552(1–2):1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.049>
7. Chi EY, Krishnam S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical

⁴⁹ Там же.

⁵⁰ Там же.

- stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res.* 2003;20(9):1325–36.
<https://doi.org/10.1023/a:1025771421906>
8. Jacob S, Shirwaikar AA, Srinivasan KK, Alex J, Prabu SL, Mahalaxmi R, Kumar R. Stability of proteins in aqueous solution and solid state. *Indian J Pharm Sci.* 2006;68(2):154–63.
<https://doi.org/10.4103/0250-474X.25708>
 9. Larson NR, Wei Y, Prajapati I, Chakraborty A, Peters B, Kalonia C, et al. Comparison of polysorbate 80 hydrolysis and oxidation on the aggregation of a monoclonal antibody. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):633–9.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.069>
 10. Xie M, Schowen R. Secondary structure and protein deamidation. *J Pharm Sci.* 1999;88(1):8–13.
<https://doi.org/10.1021/js9802493>
 11. Cohen S, Price C, Vlasak J. β -Elimination and peptide bond hydrolysis: two distinct mechanisms of human IgG1 hinge fragmentation upon storage. *J Am Chem Soc.* 2007;129(22):6976–7.
<https://doi.org/10.1021/ja0705994>
 12. Cordoba AJ, Shyong B, Breen D, Harris RJ. Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;818(2):115–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.033>
 13. Werner R, Kopp K, Schlueter M. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatr.* 2007;96(455):17–22.
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00199.x>
 14. Luo D, Smith SW, Anderson BD. Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J Pharm Sci.* 2005;94(2):304–16.
<https://doi.org/10.1002/jps.20253>
 15. Cleland JL, Lam X, Kendrick B, Yang J, Yang T, Overcashier D, et al. A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *J Pharm Sci.* 2001;90(3):310–21.
[https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200103\)90:3%3C310::aid-jps6%3E3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200103)90:3%3C310::aid-jps6%3E3.0.co;2-r)
 16. Constantino HR, Carrasquillo KG, Cordero RA, Mumenthaler M, Hsu CC, Gribenow K. Effect of excipients on the stability and structure of lyophilized recombinant human growth hormone. *J Pharm Sci.* 1998;87(11):1412–20.
<https://doi.org/10.1021/js980069t>
 17. Lai MC, Topp EM. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. *J Pharm Sci.* 1999;88(5):489–500.
<https://doi.org/10.1021/js980374e>
 18. Li S, Patapoff TW, Overcashier D, Hsu C, Nguyen TH, Borchardt RT. Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state. *J Pharm Sci.* 1996;85(8):873–7.
<https://doi.org/10.1021/js950456s>
 19. Narhi LO, Chou DK, Christian TR, Gibson S, Jagannathan B, Jiskoot W, et al. Stress factors in primary packaging, transportation and handling of protein drug products and their impact on product quality. *J Pharm Sci.* 2022;111(4):887–902.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.01.011>
 20. Besheer A, Burton L, Galas RJ Jr, Gokhale K, Goldbach P, Hu Q, et al. An industry perspective on compatibility assessment of closed system drug-transfer devices for biologics. *J Pharm Sci.* 2021;110(2):610–4.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.10.047>
 21. Campa C, Pronce T, Paludi M, Weusten J, Conway L, Savery J, et al. Use of stability modeling to support accelerated vaccine development and supply. *Vaccines (Basel).* 2021;9(10):1114.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9101114>
 22. Bunc M, Hadži S, Graf C, Bončina M, Lah J. Aggregation time machine: a platform for the prediction and optimization of long-term antibody stability using short-term kinetic analysis. *J Med Chem.* 2022;65(3):2623–32.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02010>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева** — концепция работы, написание и редактирование текста рукописи, формулировка выводов; **А.К. Яковлев, Д.В. Горенков** — анализ источников литературы, оформление рукописи; **А.С. Коровкин** — критический пересмотр содержания рукописи; **В.В. Косенко** — утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Soldatov** and **Zh.I. Avdeeva** conceptualised the study, drafted and edited the manuscript, and formulated the conclusions. **A.K. Yakovlev** and **D.V. Gorenkov** analysed literature and formatted the manuscript. **A.S. Korovkin** critically revised the manuscript. **V.V. Kosenko** approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук / **Aleksandr A. Soldatov**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Яковлев Алексей Константинович, канд. биол. наук / **Aleksey K. Yakovlev**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2809-1819>

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф. / **Zhanna I. Avdeeva**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

Горенков Дмитрий Витальевич / **Dmitry V. Gorenkov**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук / **Alexey S. Korovkin**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3241-1053>

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук / **Valentina V. Kosenko**, Cand. Sci. (Pharm.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>

Поступила 17.07.2024

После доработки 17.09.2024

Принята к публикации 12.09.2024

Received 17 July 2024

Revised 17 September 2024

Accepted 12 September 2024



Сравнительный анализ результатов испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами

С.А. Алексеева✉, И.В. Касина, Т.И. Немировская

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

✉ Алексеева Светлана Александровна; AlekseevaS@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для проведения экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» актуальным представляется внедрение альтернативных методов анализа, позволяющих специфически идентифицировать споровый сибиреязвенный антиген с помощью соответствующих диагностических препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации, предназначенных для выявления спор *Bacillus anthracis*.

ЦЕЛЬ. Оценка возможности применения иммунофлуоресцентного метода и сравнительный анализ результатов его применения с иммунохроматографическим методом при испытании вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали коммерческие серии вакцины сибиреязвенной живой. Применяли коммерческие диагностические препараты российского производства: иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие, набор реагентов: иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест-система *B. anthracis*). Для приготовления мазков и проведения реакции в ИХ тест-системе готовили рабочие разведения микробных взвесей исходя из общей концентрации спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 с помощью фармакопейного стандартного образца мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Регистрировали качественные реакции образования иммунокомплексов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При испытании вакцины сибиреязвенной живой иммунофлуоресцентным методом при окраске мазков диагностическими иммуноглобулинами в разведениях 1:32 и 1:64 наблюдалась яркая зеленовато-желтая флуоресценция оболочки микробной клетки — оценка интенсивности флуоресценции на 4+ и 3+. При исследовании вакцины сибиреязвенной живой иммунохроматографическим методом выявлен споровый антиген в концентрациях вакцины 10^8 и 10^9 спор/мл — зарегистрированы две отчетливые полосы темно-розового цвета, что свидетельствует о формировании иммунопреципитата. Результаты, полученные указанными методами, подтверждают принадлежность исследуемой микробной культуры к виду *B. anthracis*.

ВЫВОДЫ. Применение иммунохроматографического и иммунофлуоресцентного методов анализа с помощью соответствующих диагностических препаратов, является удобным и надежным подходом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* СТИ-1 в вакцине сибиреязвенной живой. Полученные результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю качества «Подлинность» могут быть основанием для рекомендации вышеуказанных методов как альтернативных в качестве дополнения к методу бактериоскопии спор по Цию — Нильсену, который в настоящее время применяется в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Ключевые слова: вакцина сибиреязвенная живая; иммунобиологический лекарственный препарат; показатель «Подлинность»; иммунофлуоресцентный метод; иммунохроматографический метод; диагностические препараты; иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие; ИХ тест-система; споры вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1; фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей 10 МЕ; нормативная документация

Для цитирования: Алексеева С.А., Касина И.В., Немировская Т.И. Сравнительный анализ результатов испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):348–356. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-348-356>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Comparative analysis of the results of live anthrax vaccine identification by immunofluorescence and immunochromatography

Svetlana A. Alekseeva ✉, Irina V. Kasina, Tatiana I. Nemirovskaya

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

✉ Svetlana A. Alekseeva; AlekseevaS@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The quality evaluation of live anthrax vaccines will benefit from the implementation of alternative testing methods that are capable of specific identification of the *Bacillus anthracis* spore antigen using the appropriate diagnostic products that are authorised in the Russian Federation for the detection of *B. anthracis* spores.

AIM. This study aimed to investigate the applicability of immunofluorescence analysis to the identification of live anthrax vaccines and compare this method with immunochromatography.

MATERIALS AND METHODS. The study used commercial batches of a live anthrax vaccine and Russian diagnostic products, including diagnostic dry adsorbed fluorescent anti-anthrax spore immunoglobulins and an immunochromatographic assay (ICA) reagent kit for rapid detection and identification of *B. anthracis* spores (ICA system for *B. anthracis*). For smears and ICA system reactions, the authors prepared working solutions of bacterial suspensions at spore concentrations typical of the *B. anthracis* STI-1 vaccine strain. The spore concentrations were achieved using the pharmacopoeial reference standard (RS) for the opacity of bacterial suspensions of 10 international units (IU). Identification reactions involved the registration of immune complex formation.

RESULTS. Immunofluorescence tests of the live anthrax vaccine demonstrated bright greenish-yellow envelope fluorescence with an intensity score of 3+ to 4+ for smears stained with diagnostic immunoglobulins at 1:32 and 1:64 dilutions. Immunochromatographic tests of the live anthrax vaccine detected the spore antigen at vaccine concentrations of 10^9 and 10^8 spores/mL, with the test strips showing two distinct dark-pink lines indicative of immunoprecipitation. According to the results obtained using the selected methods, the tested microbial culture was confirmed as *B. anthracis*.

CONCLUSIONS. Immunochromatography and immunofluorescence tests with appropriate diagnostic preparations are convenient and reliable tools for the species-specific detection of *B. anthracis* STI-1 spores in the live anthrax vaccine. The results obtained in the anthrax vaccine identification tests provide a basis for recommending the above methods as supplementary alternatives to Ziehl–Neelsen bacteriological staining, which is currently prescribed by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Keywords:

live anthrax vaccine; immunobiological medicinal product; identification; immunofluorescence analysis; immunochromatography; diagnostic products; diagnostic fluorescent immunoglobulins; immunochromatographic assay; ICA system; *B. anthracis* STI-1 vaccine strain spores; pharmacopoeial reference standard for the bacterial suspension opacity of 10 IU; regulatory standards

For citation:

Alekseeva S.A., Kasina I.V., Nemirovskaya T.I. Comparative analysis of the results of live anthrax vaccine identification by immunofluorescence and immunochromatography. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):348–356. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-348-356>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Основным способом предупреждения заболевания сибирской язвой является плановая иммунизация сельскохозяйственных животных в неблагополучных районах и вакцинация лиц, подверженных повышенному риску заражения сибирской язвой. В Российской Федерации для иммунизации населения используется отечественная вакцина сибиреязвенная живая, которая представляет собой споры вакцинного сибиреязвенного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1, лиофилизированные в 10% водном растворе сахарозы. Вакцина после двукратного применения с интервалом 20–30 сут вызывает формирование специфического иммунитета продолжительностью до 1 года [1]. В Китае используют живую сибиреязвенную вакцину на основе штамма *B. anthracis* A16R. В США и Великобритании применяют химические вакцины – AVA и AVP соответственно [2].

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации¹ (ГФ РФ) обязательным показателем качества вакцины живой сибиреязвенной является показатель «Подлинность», который подтверждается при микроскопии мазков, окрашенных по Цилю – Нильсену. Однако, по мнению авторов статьи, данный метод объективно не характеризует подлинность вакцины, так как не всегда позволяет специфически идентифицировать споры сибиреязвенного антигена [3].

При проведении экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой по показателю

«Подлинность» важным аспектом является внедрение альтернативных перспективных методов анализа с помощью соответствующих диагностических препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации, предназначенных для выявления спор возбудителя сибирской язвы. В лабораторной диагностике для обнаружения возбудителя сибирской язвы или его компонентов (ДНК, антигенов) используются разные диагностические наборы, бактериофаги и питательные среды² [4–7]. Ранее в опубликованной авторами работе при оценке качества вакцины по показателю «Подлинность» было продемонстрировано, что иммунохроматографический метод может быть эффективным экспресс-методом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* СТИ-1 в сибиреязвенной вакцине [3]. Кроме того, в других работах авторов рассмотрены альтернативные методы испытания вакцины сибиреязвенной и других вакцин против особо опасных инфекций (туляремийная, бруцеллезная, чумная вакцины) по показателю «Подлинность» [8–10]. Так, например, был применен иммунофлуоресцентный метод, основанный на окраске спор *B. anthracis* специфическими иммуноглобулинами, меченными флуоресцентным красителем (реакция иммунофлуоресценции), и показана его диагностическая эффективность [8, 9]. Таким образом, внедрение альтернативных иммунологических методов для ускоренной оценки показателя «Подлинность» сибиреязвенной вакцины с помощью российских диагностических препаратов обеспечивает эффективный

¹ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

ФС.3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

² Шепелин ИА, Миронов АЮ, Шепелин КА. Возбудители особо опасных бактериальных инфекций: Справочник бактериолога. М.; 2016.

Мищенко ГГ, Кутырев ВВ, ред. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАЩ «Шико»; 2013.

контроль качества данного иммунобиологического лекарственного препарата.

Цель работы — оценка возможности применения иммунофлуоресцентного метода и сравнительный анализ результатов его применения с иммунохроматографическим методом при испытании вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность».

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- выявление спорового антигена в вакцине сибиреязвенной живой иммунофлуоресцентным методом с помощью коммерческих иммуноглобулинов диагностических сибиреязвенных при определении показателя качества «Подлинность»;
- проведение сравнительного анализа испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В исследовании использовали следующие основные материалы:

- вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения, серия 2850921, производства ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России;
- фармакопейный стандартный образец (ФСО) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ФСО мутности 10 МЕ) — ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) производства ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
- иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие по ТУ 9389-005-01897080-2010 (ФСР 2011/11339), серия 1-22, производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия;
- набор реагентов «Иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест-система *B. anthracis*)» по ТУ 9398-093-78095326-2008 (ФСР 2009/05485), серия О84-К-19, производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Россия.

Оборудование

Учет результатов иммунофлуоресцентного анализа проводили на микроскопе люминесцентном (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Германия).

Методы

При выполнении работ руководствовались требованиями СанПиН 3.3686-21 и методическими указаниями МУК 4.2.2413-08³.

Подтверждение подлинности вакцины сибиреязвенной живой иммунофлуоресцентным методом проводили с помощью иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных споровых адсорбированных сухих, представляющих собой меченную флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ) иммуноглобулиновую фракцию к водорастворимому антигену споровой формы *B. anthracis*, выделенную из гипериммунной кроличьей сыворотки и адсорбированную на основе магноиммосорбентов с водорастворимыми антигенами штаммов *B. cereus* 8, *B. cereus* 104, *B. cereus* 111, *B. megaterium* 6.

Препарат обеспечивает видоспецифическое выявление и идентификацию спор *B. anthracis* в суспензиях, полученных из колоний микроорганизмов, выращенных на питательном агаре в течение 7 сут при температуре 35 ± 1 °C, и в суспензиях, полученных из сырья животного происхождения и объектов окружающей среды путем специальной пробоподготовки, при которой из выращенных культур готовят микробные взвеси в 0,9% растворе натрия хлорида по ФСО мутности 10 МЕ, эквивалентной концентрации 10^8 спор/мл. Рабочее разведение иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных споровых адсорбированных сухих — 1:64. Согласно инструкции по применению рабочее разведение иммуноглобулинов должно быть не менее 1:16. В данной работе при окраске мазков с вакциной сибиреязвенной использовали разведения иммуноглобулинов 1:32 и 1:64. Поскольку вакцина сибиреязвенная живая представляет собой взвесь живых спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1, лиофилизированную в 10% водном растворе сахарозы, в связи с чем пробоподготовка исследуемого образца для получения спор не требовалась. Взвесь спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 разводили исходя из общей концентрации, указанной в паспорте на вакцину, 0,9% раствором натрия хлорида (рН $7,2 \pm 0,2$) до концентрации 10^8 спор/мл по ФСО мутности 10 МЕ и готовили мазки. Далее

³ СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4). МУК 4.2.2413-08. 4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 29.07.2008).

проводили обеззараживание и окраску мазков, а также учет результатов в соответствии с инструкцией по применению на иммуноглобулины. Для учета результатов испытания вакцины использовалась система оценки по интенсивности свечения и количеству специфически светящихся клеток⁴: 4+ — очень яркая, сверкающая флуоресценция зеленовато-желтого цвета оболочки микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; 3+ — яркая флуоресценция зеленовато-желтого цвета оболочки микробной клетки, при этом клетки расположены отдельными группами и единично; 2+ — слабое свечение всей микробной клетки; 1+ — едва заметные контуры клетки. Препарат вакцины сибиреязвенной живой в рабочем разведении должен обеспечивать специфическое зеленовато-желтое свечение интенсивностью на 3+ или 4+. Свечение на 1+ или 2+ свидетельствует об отсутствии в исследуемых мазках *B. anthracis* в споровой форме. При этом препарат вакцины в рабочем разведении не должен вызывать специфическую флуоресценцию гетерологичных штаммов рода *Bacillus*.

Испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» иммунохроматографическим методом проводили, как описано ранее [3]. Для исследования готовили суспензию из взвеси спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 до концентрации 10^9 спор/мл, исходя из общей концентрации спор, указанной в паспорте на вакцину (4,9 млрд спор/мл). Затем разводили в 0,9% растворе натрия хлорида (рН 7,2±0,2) до концентрации 10^8 спор/мл по ФСО мутности 10 МЕ. Микробные взвеси в полученных разведениях в объеме 0,1 мл вносили в лунку тест-системы. Через 15 мин фиксировали результат.

Статистическая обработка данных. Испытания проводили три оператора, каждый использовал по одному образцу (ампула) вакцины сибиреязвенной живой. Так как при применении

иммунофлуоресцентного и иммунохроматографического методов регистрировали качественные реакции образования иммунных комплексов, результаты оценивали визуально, в связи с чем статистической обработки полученных результатов не проводилось.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При контроле качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Подлинность» предприятиями-изготовителями, контрольными лабораториями, экспертными организациями применяется широкий спектр методов — биологических, химических, физико-химических, молекулярных и др.⁵ В отношении препаратов вакцин против особо опасных инфекций (сибиреязвенная, туляремия, бруцеллезная, чумная вакцины)⁶ существующие методы оценки по показателю «Подлинность» чаще всего являются достаточно трудоемкими, сложными и длительными, а также не всегда обеспечивают высокую достоверность анализа. В связи с этим для подтверждения подлинности вакцины сибиреязвенной более предпочтительным является использование иммунофлуоресцентного и иммунохроматографического методов, которые отвечают основным современным критериям, таким как экспрессность, относительная простота проведения анализа, высокая достоверность результатов анализа. Данные методы успешно применяются для экспресс-диагностики сибирской язвы как в отечественной, так и в зарубежной лабораторной практике⁷.

Результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой иммунофлуоресцентным методом

Как видно на рисунке 1, при окраске мазков препарата вакцины сибиреязвенной живой диагностическими иммуноглобулинами в обоих разведениях наблюдалась яркая зеленовато-желтая, сверкающая флуоресценция оболочки, четко контрастирующая с темным телом споры,

⁴ МУК 4.2.2413-08. 4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 29.07.2008).

Инструкция по применению иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных спорных адсорбированных сухих. ФГУЗ СтамНИПЧИ Роспотребнадзора; 2011.

⁵ ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

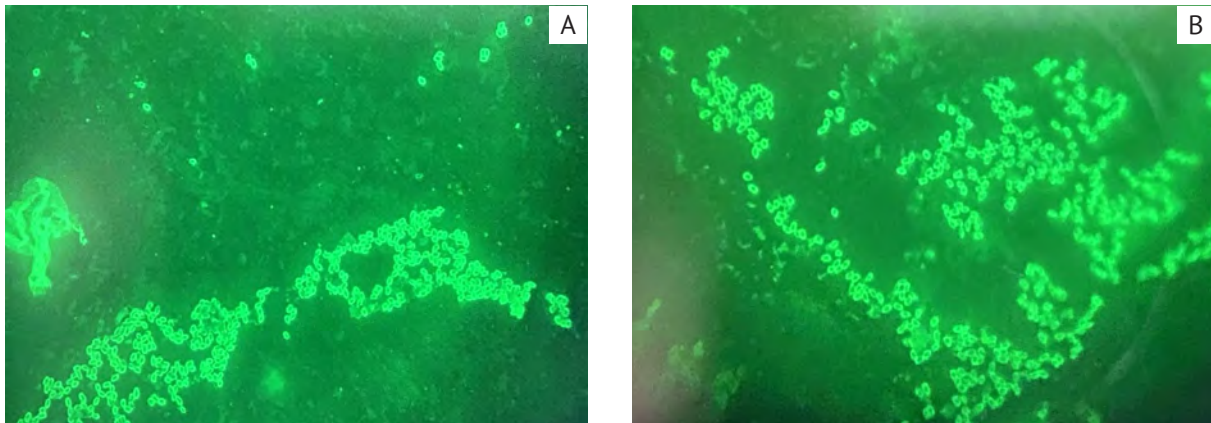
⁶ ФС.3.3.1.0011.15 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

ФС.3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

ФС.3.3.1.0019.15 Вакцина туляремия живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

ФС.3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁷ Задорина ИИ. Антигенная и молекулярно-генетическая оценка стабильности вакцинного сибиреязвенного штамма Ланге после длительного хранения: дис. ... канд. вет. наук. Казань; 2020.



Фотографии выполнены авторами/The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Результаты испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» при окрашивании иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными споровыми адсорбированными. Споры *B. anthracis* СТИ-1 из препарата вакцины сибиреязвенной живой в разведении 1:32 (А) и 1:64 (В). Микроскопия, увеличение $\times 1000$.

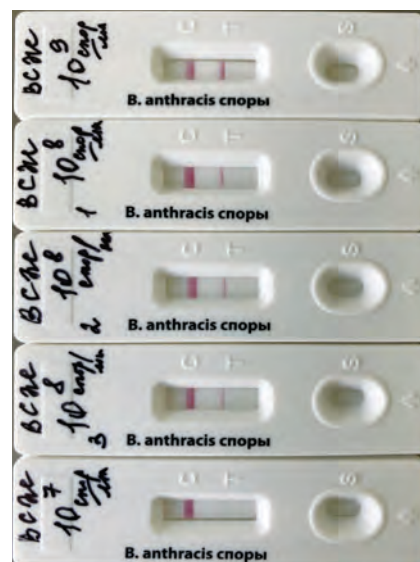
Fig. 1. Results of live anthrax vaccine identification involving staining with diagnostic adsorbed fluorescent anti-anthrax spore immunoglobulins. *B. anthracis* STI-1 spores from the vaccine at dilutions of 1:32 (A) and 1:64 (B). Microscopy, $\times 1000$ magnification.

оцениваемая на 3+ или 4+⁸. При этом были отчетливо видны окрашенные споры как в скоплениях, так и при одиночном расположении размером $(0,8-1,0) \times 1,5$ мкм⁹. Было отмечено, что испытуемый препарат вакцины сибиреязвенной живой в рабочем разведении не вызывал специфическую флуоресценцию гетерологичных штаммов рода *Bacillus*.

На основании полученных результатов при испытании вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность» рекомендовано окрашивать мазки диагностическими сибиреязвенными иммуноглобулинами в рабочем разведении.

Сравнительный анализ данных, полученных при исследовании вакцины сибиреязвенной живой иммунохроматографическим и иммунофлуоресцентным методами

При выявлении спорового антигена в вакцине сибиреязвенной живой иммунохроматографическим и иммунофлуоресцентным методами с помощью, соответственно, ИХ тест-системы *B. anthracis* и диагностических сибиреязвенных иммуноглобулинов были зафиксированы положительные результаты. В концентрациях суспензии вакцины сибиреязвенной живой, равных 10^9 и 10^8 спор/мл, в зоне «С» и «Т» тест-полосок отчетливо видны красные линии (рис. 2), которые свидетельствуют о связывании спорового антигена *B. anthracis* со специфическими антителами, иммобилизованными на тестовой линии [7].



Фотография выполнена авторами/The photograph is taken by the authors

Рис. 2. Результаты испытаний вакцины сибиреязвенной живой по показателю «Подлинность», полученные с применением иммунохроматографической тест-системы для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест-система *B. anthracis*).

Fig. 2. Results of live anthrax vaccine identification using immunochromatographic assay (ICA) reagent kit for rapid detection and identification of *B. anthracis* spores (ICA system for *B. anthracis*).

Примечание. Обозначения на фотографии: ВСЖ — вакцина сибиреязвенная живая; 10^9 , 10^8 , 10^7 спор/мл — концентрация микробной взвеси вакцины.

Note. The markings on the test strips for *B. anthracis* spores indicate the tested concentrations of the live anthrax vaccine (BCJ) bacterial suspension (10^7 , 10^8 , and 10^9 spores/mL).

⁸ МУК 4.2.2413-08. 4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 29.07.2008).

⁹ Поздеев ОК. Медицинская микробиология. М.; 2004.

Следует отметить, что полученные авторами в данной работе положительные результаты испытаний на наличие спорового антигена *B. anthracis* иммунохроматографическим методом с помощью ИХ тест-системы коррелируют с положительными результатами других исследователей [11].

Таким образом, результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой продемонстрировали, что как иммунофлуоресцентный, так и иммунохроматографический методы равноценны и подтверждают подлинность сибиреязвенного микроба, входящего в состав вакцины. При этом важно отметить, что каждый метод имеет как преимущества, так и недостатки (табл. 1).

Использование иммунохроматографического теста при подтверждении подлинности вакцины сибиреязвенной живой, учитывая быстроту анализа, высокую специфичность и экономичность, является удобным и надежным методом. Достоверность тестов достигает 92–99,8%, и при этом каждый тест имеет встроенный

внутренний контроль [11]. К недостаткам используемых тест-систем можно отнести субъективность оценки результатов в спорных моментах, однако это можно нивелировать путем проведения контрольных тестов¹⁰.

В свою очередь, иммунофлуоресцентный метод может быть эффективным в силу наглядного учета результатов, невысокой стоимости иммуноглобулинов диагностических сибиреязвенных споровых адсорбированных и относительно большого срока их годности (3 года). Следует отметить значительный разброс данных литературы по характеристике специфичности этого метода. Согласно данным Ю.О. Селянинова и И.Ю. Егорова [12], специфичность метода составляет 70% из-за большого числа перекрестно реагирующих антигенов с близкородственными микроорганизмами. Результаты другого исследования показывают, что иммуноглобулины диагностические сибиреязвенные в разведении 1:64 выявляют 93,8±6,0% исследуемых штаммов *B. anthracis* (оценка

Таблица 1. Сравнительная характеристика иммунохроматографического и иммунофлуоресцентного методов при оценке качества вакцины сибиреязвенной живой
Table 1. Comparative characteristics of immunochromatography and immunofluorescence analysis for the quality assessment of the live anthrax vaccine

Показатель <i>Parameter</i>	Метод <i>Method</i>	
	Иммунохроматографический <i>Immunochromatography</i>	Иммунофлуоресцентный <i>Immunofluorescence</i>
Время проведения анализа <i>Testing time</i>	15–20 мин <i>15–20 min</i>	2,5 ч <i>2.5 h</i>
Специфичность <i>Specificity</i>	92–99,8% (со встроенным внутренним контролем) <i>92–99.8% (integrated internal control)</i>	70–99%
Наглядность учета результатов <i>Visual clarity of results</i>	Визуальная оценка невооруженным глазом <i>Unaided visual inspection</i>	Визуальная оценка с помощью микроскопа <i>Microscopy</i>
Срок годности диагностических препаратов ¹¹ <i>Shelf life of diagnostic products¹¹</i>	1 год <i>1 year</i>	3 года <i>3 years</i>
Использование дополнительного оборудования <i>Additional equipment</i>	Не используется <i>not used</i>	Используется <i>used</i>
Стоимость диагностических препаратов ¹² <i>Cost of diagnostic products¹²</i>	1100 рублей за упаковку (3 теста) <i>1100 rubles per pack (3 test strips)</i>	340 рублей за ампулу <i>340 rubles per ampoule</i>

Таблица составлена авторами с использованием источников согласно сноскам^{11, 12} /The table is prepared by the authors using data from the sources specified in the footnotes^{11, 12}

¹⁰ Задорина ИИ. Антигенная и молекулярно-генетическая оценка стабильности вакцинного сибиреязвенного штамма Ланге после длительного хранения: дис. ... канд. вет. наук. Казань; 2020.
¹¹ Инструкция по применению иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных споровых адсорбированных сухих. ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора; 2011.
Инструкция по применению иммунохроматографической тест-системы для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы *B. anthracis* «ИХ тест-система споры *B. anthracis*». ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; 2009.
¹² <https://www.snipchi.ru/page.php?83>
<https://www.obolensk.org/services/nutrient-media/diagnostics>

по интенсивной флуоресценции на 3+ или 4+), при этом в 96,9±3,1% случаев не реагируют со штаммами близкородственных микроорганизмов¹³. Однако недостатком данного метода является использование дорогостоящего оборудования — люминесцентного микроскопа с системой светофильтров.

ВЫВОДЫ

1. Иммунофлуоресцентный метод с использованием иммуноглобулинов диагностических сибиреязвенных споровых адсорбированных является эффективным методом для видоспецифического выявления спор *B. anthracis* СТИ-1 в вакцине сибиреязвенной живой. Основные преимущества метода: наглядность учета результатов, невысокая стоимость иммуноглобулинов и относительно большой срок их годности (3 года).
2. Иммунохроматографический метод с использованием диагностического набора реагентов — иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест-система *B. anthracis*) эффективен для подтверждения подлинности спорового антигена вакцины сибиреязвенной живой. Основные преимущества метода: быстрота и простота проведения анализа, специфичность и экономичность.
3. Представленные результаты испытания вакцины сибиреязвенной живой по показателю качества «Подлинность» иммунофлуоресцентным и иммунохроматографическим методами с помощью коммерческих диагностических препаратов российского производства являются основанием для рекомендации внесения данных методов в нормативную документацию на вакцину сибиреязвенную живую в качестве альтернативных подходов, дополнительных к методу бактериоскопии спор по Цию — Нильсену.

Литература/References

1. Медуницын НВ, Катлинский АВ, Ворслов ЛО. *Вакцинология: монография*. М.: Практическая медицина. 2022. 480 с.
Medunitsyn NV, Katlinsky AV, Vorslov LO. *Vaccinology: monograph*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2022 (In Russ.).
EDN: [FOLWPT](#)
2. Микшис НИ, Попова ПЮ, Семакова АП, Кутырев ВВ. Лицензированные сибиреязвенные вакцины и экспериментальные препараты на стадии клинических исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2017;(4):112–26.
Mikshis NI, Popova PYu, Semakova AP, Kutyrev VV. Licensed anthrax vaccines and experimental preparations at the stage of clinical trials. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*. 2017;(4):112–26 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-4-112-126>
3. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(4):277–84.
Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Theoretical and experimental substantiation of alternative methods for quality control of live anthrax vaccine. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):277–84 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-277-284>
4. Дятлов ИА, ред. *Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы*. Оболенск: Династия; 2021.
Dyatlov IA, ed. *Methods for studying the biological and molecular genetic properties of the anthrax pathogen*. Obolensk: Dinastiya; 2021 (In Russ.).
EDN: [LBR5WQ](#)
5. Саяпина ЛВ, Лобач РН, Бондарев В., Никитюк НФ. Современное состояние лабораторной диагностики сибирской язвы: обнаружение и идентификация *Bacillus anthracis*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(1):27–34.
Sayapina LV, Lobach RN, Bondarev VP, Nikityuk NF. Current status of the laboratory diagnosis of anthrax: detection and identification of *Bacillus anthracis*. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(1):27–34 (In Russ.).
EDN: [VSCUQR](#)
6. Жарникова ИВ, Курчева СА, Русанова ДВ, Жарникова ТВ. Аналитические характеристики диагностических препаратов для иммуноанализа особо опасных инфекций. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2020;16(3):36–42.
Zharnikova IV, Kurcheva SA, Rusanova DV, Zharnikova TV. Analytical characteristics of diagnostic preparations for immunoassay of particularly dangerous infections. *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology* 2020;16(3):36–42 (In Russ.).
EDN: [NMWSEM](#)
7. Егорова ИЮ, Селянинов ЮО, Ковалева ЕН. Оценка эффективности и практической пригодности современных методов экспресс-индикации возбудителя сибирской язвы. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016;(2):3–13.
Egorova IYu, Selyaninov YuO, Kovaleva EN. Evaluation of effectiveness and feasibility of up-to-date methods for anthrax rapid indication. *RJOAS*. 2016;(2):3–13 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-02.01>
8. Саяпина ЛВ, Абдрашитова АС, Лобач РН, Комратов АВ, Малахаева АН, Лешова ОЮ и др. Диагностическая эффективность иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных адсорбированных по данным медицинских испытаний. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012;(4):92–6.
Sayapina LV, Abdrashitova AS, Lobach RN, Komratov AV, Malakhaeva AN, Leshova OYu, et al. Diagnostic efficiency

¹³ Лобач РН. Диагностическая ценность сибиреязвенных иммуноглобулинов и бактериофага гамма а-26 при выявлении и идентификации возбудителя сибирской язвы: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2014.

- of adsorbed anthrax vegetative fluorescent immunoglobulins demonstrated in the medical trials. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2012;(4):92–6 (In Russ.). EDN: [PMDKYE](#)
9. Лобач РН, Саяпина ЛВ, Абдрашитова АС, Ляшова ОЮ, Валова ТВ, Храмов МВ и др. К вопросу об индикации возбудителя сибирской язвы иммуноглобулинами флуоресцирующими сибиреязвенными спорными адсорбированными. *Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие*. 2013;8(2):46–51. Lobach RN, Sayapina LV, Abdrashitova AS, Lyashova OY, Valova TV, Khramov MV, et al. To the question of anthrax indication by fluorescing anthracisabsorbing sporous immunoglobulines. *Life without Dangers. Health. Prevention. Longevity*. 2013;8(2):46–51 (In Russ.). EDN: [QJBWON](#)
 10. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремииного (Тулярина) по показателю «Подлинность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):231–40. Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Evaluation of the applicability of immunochromatography to the identification of live plague vaccines and the tularaemia allergen (Tularin). *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):231–40 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-231-240>
 11. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА, Герасимов ВН. *Сибиреязвенные скотомогильники: проблемы и решения*. М.: Династия; 2017. Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA, Gerasimov VN. *Anthrax cattle burials: problems and solutions*. Moscow: Dinastiya; 2017 (In Russ.). EDN: [VYVZNL](#)
 12. Селянинов ЮО, Егорова ИЮ. Об ошибках при индикации и идентификации *B. anthracis*. *Ветеринария*. 2008;(10):30–3. Selyaninov YuO, Egorova IYu. On some diagnostic mistakes as occurred at *B. anthracis* indication and identification. *Veterinary*. 2008;(10):30–3 (In Russ.). EDN: [JWCYLB](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.А. Алексеева** — выполнение экспериментальных исследований по определению показателя качества «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, написание и критический пересмотр текста рукописи; **И.В. Касина** — формирование цели и задач исследования, выполнение экспериментальных исследований по определению показателя качества «Подлинность» вакцины сибиреязвенной живой; обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи; **Т.И. Немировская** — общее руководство, критический пересмотр текста рукописи и утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.A. Alekseeva** conducted identification experiments with the live plague vaccine, summarised the experimental data, analysed and interpreted the study results, and drafted and critically revised the manuscript. **I.V. Kasina** formulated the study aim and objectives, conducted identification experiments with the live plague vaccine, summarised the experimental data, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **T.I. Nemirovskaya** provided general supervision of the research project, critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук / **Svetlana A. Alekseeva**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук / **Irina V. Kasina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3287-2631>

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук / **Tatiana I. Nemirovskaya**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>

Поступила 10.06.2024

После доработки 12.08.2024

Принята к публикации 12.09.2024

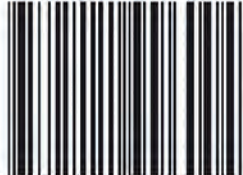
Received 10 June 2024

Revised 12 August 2024

Accepted 12 September 2024



ISSN 2221-996X



917722211996004