

УДК 578.7

**Влияние инактивирующих вирус агентов на иммуногенность вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом**© 2020 М. С. ЕГОРОВА<sup>1,\*</sup>, С. С. КУРАШОВА<sup>1</sup>, Т. К. ДЗАГУРОВА<sup>1</sup>, М. В. БАЛОВНЕВА<sup>1</sup>, А. А. ИШМУХАМЕТОВ<sup>1,2</sup>, Е. А. ТКАЧЕНКО<sup>1,2</sup><sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» Российской академии наук, Москва, 108819<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991

\*e-mail: masha\_0787@mail.ru

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

После доработки 28.12.2019 г.

Принята к публикации 31.03.2020 г.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острое зоонозное заболевание, вызываемое ортохантавирусами Puumala, Dobrava-Belgrad (4 генотипа), Hantaan (генотип Amur) и Seoul. В Российской Федерации ГЛПС занимает ведущее место среди всех природно-очаговых болезней человека. С целью выбора оптимального способа инактивации вируса при разработке цельновирионной вакцины против ГЛПС были испытаны: формалин, β-пропиолактон, ультрафиолетовое излучение. Специфическую активность вакцины определяли по числу копий вирусной РНК/мл, иммуногенность – по титру нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c в ответ на иммунизацию. Анализ иммуногенности вакцин, инактивированных формалином, β-пропиолактоном и УФ-излучением, не выявил достоверных отличий по уровню индуцируемых ими нейтрализующих антител. В то же время β-пропиолактон имеет очевидные технологические преимущества: в десятки раз сокращается время инактивации хантавируса, не требуется нейтрализация инактиватора и контроль его содержания в готовой вакцине, а также снижается количество общего белка в готовом препарате.

*Ключевые слова:* геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирусы, инактивированные вакцины, нейтрализующие антитела, формалин, β-пропиолактон, ультрафиолетовое излучение

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-64-73

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – вирусная нетрансмиссивная зоонозная инфекция, широко распространенная в Евразии, характеризующаяся лихорадкой, гемодинамическими нарушениями, почечным и геморрагическим синдромами. Занимает ведущее место в России среди всех природно-очаговых болезней человека [1].

Согласно Международной классификации вирусов, возбудители ГЛПС относятся к семейству *Hantaviridae*, отряд *Bunyavirales* [2]. По данным электронно-микроскопических исследований вирионы хантавирусов имеют сферическую форму и являются оболочечными вирусами, геном которых состоит из трех сегментов (L, M и S) минус-цепи РНК. S-сегмент (small) кодирует

*Список сокращений:* ВАК – вакцина; ВАК-ПУУ – инактивированная концентрированная очищенная вакцина на основе вируса Пуумала (ПУУ), ВАК-ХТН – инактивированная концентрированная очищенная вакцина на основе вируса Хантаан (ХТН), ВАК-Сочи – инактивированная концентрированная очищенная вакцина на основе вируса Сочи (геновариант Добрава/Белград), ГЛПС – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; МФА – метод иммунофлюоресценции; нАТ – нейтрализующие антитела; РН/ФОЕ – реакция нейтрализации фокусобразующих единиц; ФОЕ – фокусобразующая единица.

нуклеокапсидный белок N, М-сегмент (medium) кодирует поверхностные гликопротеины G<sub>n</sub> и G<sub>c</sub>, L-сегмент (large) – вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу [3].

Возбудителями ГЛПС в России являются следующие ортохантавирусы: Пуумала и 2 геноварианта вируса Добrava-Белград (Куркино и Сочи) на территории Европейской части России и вирусы Хантаан, Сеул и Амур в Азиатской части России, главным образом на Дальнем Востоке [4]. По данным эпидемиологического анализа заболеваемости ГЛПС в России 97,7% всех случаев ГЛПС этиологически обусловлено вирусом Пуумала, 1,5% – вирусами Хантаан, Амур, Сеул и 0,8% – вирусами Куркино и Сочи [5].

Этиотропных средств лечения хантавирусных инфекций, нацеленных на элиминацию возбудителя, пока нет. Наиболее действенным методом борьбы с ГЛПС считается вакцинопрофилактика, как это продемонстрировано в Китае и Республике Корея, где успешно применяются инактивированные вакцины, производимые на основе вирусов Хантаан и Сеул [6]. В России разработаны технологии производства инактивированных вакцин, культивируемых в клетках Vero: двухкомпонентная вакцина на основе вирусов Пуумала и Куркино [7] и поливалентная вакцина на основе вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи [4].

Для обеспечения безопасности и эффективности инактивированных вакцин большое значение имеет выбор соответствующего инактиватора и оптимальных условий его применения, позволяющие лишить вирус инфекционности при максимальном сохранении его иммуногенных свойств.

Для инактивации вирусов в настоящее время используют различные физические и химические методы. Из физических методов наиболее распространены следующие:  $\gamma$ -излучение [8, 9], УФ-излучение [10], воздействие температуры [11].

Среди химических инактиваторов наиболее широкое применение получили: формальдегид и  $\beta$ -пропиолактон, которые давно используются при производстве лицензированных вирусных вакцин [12]. Выбор способа инактивации основывается на механизме действия инактиватора и свойствах вируса.

Наиболее часто в производстве инактивированных вакцин используют формальдегид несмотря на его неблагоприятное воздействие на структуру антигенов. Формалин преимущественно взаимодействует с аминогруппами аминокислот с образованием метиленовых производных, однако эта реакция обратима, поэтому при удалении избытка реагента из смеси или ее разведении инфекционная активность вируса может восстанавливаться [13].

$\beta$ -пропиолактон – второй по частоте использования инактивирующий агент, нашедший широкое применение в вакцинопрофилактике, действует непосредственно на вирусную нуклеиновую кислоту [14, 15], вызывая точечные мутации и блокируя репликацию вируса [16]. В значительно меньшей степени  $\beta$ -пропиолактон повреждает структуру поверхностных белков [17], незначительно влияет на капсидный белок вируса [18]. Инактивация вирусов  $\beta$ -пропиолактоном зависит от концентрации препарата, температуры и содержания белка в вирусосодержащем субстрате вакцины. Повышение концентрации  $\beta$ -пропиолактона может привести к нежелательной реакции с вирусными белками и, вследствие этого, к снижению иммуногенности вакцины [14].

Реагенты, которые используют для инактивации вируса, являются мутагенами, поэтому инактиватор, чтобы удовлетворять требованиям безопасности, должен либо подвергаться самораспаду, либо переходить в неактивную форму (нейтрализоваться) с образованием нетоксичных и неканцерогенных продуктов. По данным Uittenbogaard и др. [19],  $\beta$ -пропиолактон гидролизует при комнатной температуре до нетоксичной 3-гидроксипропионовой кислоты в течение нескольких часов.

Известно, что УФ-излучение повреждает нуклеиновые кислоты (ДНК/РНК) вирусов, а также белки, ингибируя репликацию генома (транскрипцию) и, следовательно, предотвращая размножение вирусов [20]. Коротковолновые УФ-лучи могут поглощаться основаниями ДНК и РНК, что приводит к их фотохимической активации и образованию ковалентной связи между соседними пиримидиновыми основаниями (например, между тиминном и цитозинном) с образованием димеров [21]. Также известно, что УФ-излучение влияет на структуру белка. Отмечено, что в смеси аминокислот УФ-излучение разрушает тирозин, триптофан и цистеин [22].

Важным критерием оценки инактивированной вакцины является контроль ее специфической активности. В технологическом цикле производства вакцины после инактивирования вируса контроль специфической активности осуществляют, как правило, по количественному содержанию целевого белка – иммуногена или по числу копий РНК в единице объема.

Целью исследования было изучение влияния химических и физических инактивирующих агентов на иммуногенные свойства вакцин против ГЛПС и выбор оптимального способа инактивации хантавирусных вакцин.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Получение вакцинных препаратов хантавирусов

Вакцины против ГЛПС (ВАК-ПУУ; ВАК-ХТН; ВАК-Сочи), рассматриваемые в данном исследовании, представляют собой инактивированные очищенные вирусы ПУУ (штамм PUU-TKD/VERO), ХТН (штамм HTN-P88/VERO) и Сочи (штамм DOB-SOCHI/VERO), полученные путем репродукции в культуре клеток Vero. Полные геномные последовательности этих вакцинных штаммов зарегистрированы в GenBank. Для PUU-TKD/VERO это: MH251331 (для сегмента S), MH251332 (для сегмента M) и MH251333 (для сегмента L); для HTN-P88/VERO: MH251328 (S), MH251329 (M) и MH251330 (L); для DOB-SOCHI/VERO: MH251334 (S), MH251335 (M) и MH251336 (L).

Для оценки специфической активности вакцинных препаратов определяли число копий РНК/мл.

### Контроль специфической активности

Специфическую активность определяли методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя разработанные праймеры и зонды (табл. 1) на вакцинные штаммы: PUU-TKD/VERO, HTN-P88/VERO и DOB-SOCHI/VERO. РНК выделяли из хроматографически очищенного концентрата вируса, инактивированного β-пропиолактоном, формалином или УФ-излучением, методом хлороформ-фенольной экстракции [23]. Получали кДНК методом обратной транскрипции в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5×RT Buffer (Thermo Fisher Scientific, США), 2,5 мМ dNTPs («СибЭнзим», Россия), 20 пМ праймер N6 Random («СибЭнзим»), 1 U обратной транскриптазы Maxima Reverse Transcriptase 200 е.а./ мкл (Thermo Fisher Scientific), 10 мкл раствора РНК. Реакцию проводили при следую-

щих условиях: 10 мин при 25 °С, 30 мин при 42 °С и 6 мин при 96 °С. Объем реакционной смеси при ПЦР в реальном времени составлял 25 мкл и включал: 10×Hot Start Buffer (Thermo Fisher Scientific), 2,5 мМ dNTPs, 5 пМ каждого праймера и зонда («Евроген», Россия) (табл.1), 2 U ДНК-полимераза Taq HS (Thermo Fisher Scientific), 2 мкл кДНК и стерильную воду. Реакцию проводили в следующем режиме: 2 мин при 95 °С и затем 40 циклов по 15 с при 95 °С, 40 с при 55 °С и 30 с при 72 °С. Амплификацию и детекцию в реальном времени проводили на амплификаторе AriaMx 96 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США).

Иммуногенность вакцин оценивали по титру нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c.

### Иммунизация животных

Эксперименты по оценке влияния инактиваторов на иммуногенность вакцин выполнены на клинически здоровых половозрелых самках мышей линии BALB/c массой тела 20,0±2,0 г на начало исследования, находившихся в одинаковых условиях содержания и кормления. Содержание животных осуществлялось в соответствии с международными и российскими нормативными актами, регламентирующими работу с лабораторными животными: Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), Страсбург, 1986, дополненная в 2006 году ([https://www.coe.int/t/e/legal\\_affairs/legal\\_cooperation/biological\\_safety\\_and\\_use\\_of\\_animals/laboratory\\_animals/GT123\(2002\)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf](https://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/laboratory_animals/GT123(2002)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf)); правила лабораторной практики (GLP) (<http://docs.cntd.ru/document/1200101144>, <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>).

Животные получены из филиала «Андреевка» Федерального Государственного бюджетного

Таблица 1

### Разработанные праймеры и зонды

#### Primers and probes developed

Штамм	Название праймера и зонда	Последовательность 5'→3'
PUU-TKD/VERO	Ufa_Z 3780	BHQ1-TGCTCC TGG GAT GGT AAA TAA CCC AAC T-FAM
	Ufa_F 3760	GTA TTA TGT ACG AGT AAA GTT GAG AGA
	Ufa_R 3800	CCT AAA GGT ATA GGG ATT AAA CTC CT
DOB-SOCHI/VERO	Sochi_Z 4500	BHQ1-ATC CCA GCT GTG ATT GGG TAC AAG T-FAM
	Sochi_F 4480	TCA CTG TGA GAG AGA AGG ATC GA
	Sochi_R 4530	TAG AAC ATC TGA CAT TTC ATC AAC TGT
HTN-P88/VERO	Hantaan_Z3770	BHQ1-TAC AGC ACC AGG TAT GGT GAA CCA-FAM
	Hantaan_F3750	GTG TAC TAG TAA AGT TGA ACG GTT GT
	Hantaan_R3790	GTG TAT CAG CAT GCT TGA CTT GCA

учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства. Исследуемые препараты в количестве 0,5 мл готовой формы каждой вакцины вводили трехкратно внутримышечно с двухнедельным интервалом (каждый эксперимент проводили трижды с использованием идентичных доз). Животным контрольной группы вводили стерильный физиологический раствор натрия хлорида в объеме 0,5 мл. Через 14 дней после третьей иммунизации животных выводили из эксперимента помещением в CO<sub>2</sub>-камеру с последующим обескровливанием методом декапитации. Количество животных в каждой из опытных и контрольных групп равнялось 7.

### Реакция нейтрализации фокусобразующих единиц

Каждая проба сыворотки крови трехкратно исследована в реакции нейтрализации фокусобразующих единиц (РН/ФОЕ) в культуре Vero E6, описанной ранее [24]. За титр нейтрализующих антител (НАТ) принимали разведение сыворотки, подавляющее 50% ФОЕ, выявленных в контроле вируса. Каждая проба сыворотки крови трехкратно исследована в РН/ФОЕ<sub>50</sub>. Критерием достаточной иммуногенности считали наличие в сыворотке крови экспериментальных животных вируснейтрализующих антител в титре  $\geq 4,32 \log_2$ .

### Непрямой метод иммунофлюоресценции (нМФА)

Для выявления специфического антигена в инактивированном вакцинном полуфабрикате использовали нМФА с применением диагностического набора «Диагностикум ГЛПС» (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Россия), согласно инструкции производителя.

### Инактивирование вирусов в составе вакцин

Инактивацию вакцинных штаммов проводили тремя разными способами:  $\beta$ -пропиолактоном, формалином и УФ-излучением. Титр вируса в полуфабрикате вакцинного препарата до инактивации оценивали по числу ФОЕ/мл по ранее описанной методике [24].

В ходе эксперимента в определенных временных точках отбирали аликвоты вакцинных образцов и оставляли при  $-70$  °С. Для определения выжившего вируса инактивированные образцы вакцин трижды пассировали в культуре клеток Vero E6. После каждого пассажа в клетках и культуральной жидкости определяли титр вируса ФОЕ/мл и проводили контроль антигена методом нМФА.

### Инактивация $\beta$ -пропиолактоном

Раствор 98%-ного  $\beta$ -пропиолактона (Acros Organics, Geel, Бельгия) в конечных разведениях: 1/2000, 1/4000, 1/6000, 1/8000, 1/10000 – вносили в вакцинный полуфабрикат, перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре. Пробы отбирали через 5, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 мин.

### Инактивация УФ - излучением

Чтобы оценить потенциал УФ-излучения для инактивации хантавирусов, устанавливали небольшую емкость, содержащую вакцинный полуфабрикат толщиной 3 мм на расстоянии 24 см от источника коротковолновых ультрафиолетовых лучей с максимальной длиной волны 253,7 нм (UV-C). Пробы на контроль инактивации отбирали через 1, 2 и 3 мин после включения лампы.

### Инактивация формалином

Формальдегид (36,5%, Riedel-de Haen, Германия) разводили в 20 раз в дистиллированной воде, вносили в вакцинный полуфабрикат до конечного содержания формальдегида 0,025% и интенсивно перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре. Препарат подвергали стерилизующей фильтрации через мембрану Millipore (Merck, Германия) с диаметром пор 0,22 мкм и выдерживали при температуре 4 °С в течение 30 сут. Пробы отбирали ежедневно.

### Термоинактивация

Аликвоты вакцинных полуфабрикатов после стерилизующей фильтрации хранились при температуре 4 °С и 22 °С в течение 30 сут. Пробы отбирались ежедневно.

### Статистический анализ

Все данные анализировали в программе Graph-Pad Prism версии 8.2.0. Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка, Даннетта и Уилкинсона. Статистическая значимость указана как ns = несущественная, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$  и \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнения влияния различных способов инактивации были приготовлены полуфабрикаты вакцинных препаратов ВАК-ПУУ, ВАК-ХТН и ВАК-Сочи с титрами 5,4, 6,0 и 5,6 lg ФОЕ/мл и содержанием общего белка 65,37, 86,63 и



41,5 мкг/мл соответственно. Специфическую активность в образцах до и после инактивации определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Степень подавления инфекционности вируса определяли после трех последовательных пассажей инактивированных вакцинных полуфабрикатов в культуре клеток Vero E6 с последующей индикацией вируса методом ФОЕ.

### Инактивация $\beta$ -пропиолактоном

Задачи исследования включали подбор оптимальных условий инактивирования для каждого вируса, а именно: времени экспозиции и концентрации  $\beta$ -пропиолактона при температуре  $23 \pm 2$  °С. Полная инактивация вируса Пуумала с исходным титром 5,4 lg ФОЕ/мл в конечном разведении  $\beta$ -пропиолактона 1/4000 и 1/6000 наступала через 30 мин, 1/8000 – через 90 мин, 1/10000 – через 140 мин. Контрольный образец (нативный образец без инактивации с добавлением физиологического раствора) хранился при температуре  $-70$  °С (рис. 1).

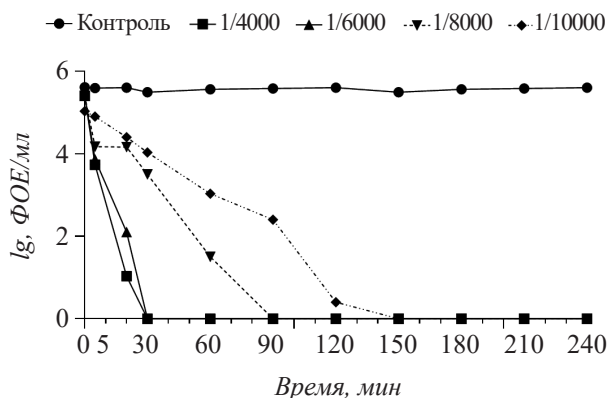
Полная инактивация вируса Хантаан с исходным титром 6,0 lg в конечном разведении  $\beta$ -пропиолактона 1/4000 и 1/6000 наступала через 30 мин, 1/8000 – через 140 мин, 1/10000 – через 240 мин; вируса Сочи с исходным титром 5,6 lg и разведении 1/4000 – через 30 мин, 1/6000 – через 60 мин, 1/8000 – через 140 мин, 1/10000 – 210 мин. Данные по вирусам Хантаан и Сочи графически не представлены.

Учитывая полученные результаты, мы посчитали, что оптимальным будет применение  $\beta$ -пропиолактона в конечном разведении 1/6000 в течение 180 мин, что совпадает с временем естественного гидролиза  $\beta$ -пропиолактона [25]. Именно этот режим инактивации был использован при анализе влияния  $\beta$ -пропиолактона на иммуногенность вакцинных препаратов.

### Инактивация УФ-излучением

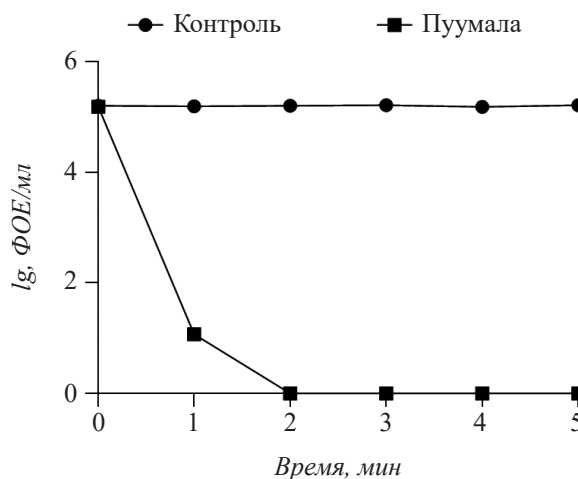
Использование УФ-излучения для инактивации вирусов также практикуется в производстве вакцин. Это недорогой и достаточно простой технологический процесс. Известно, что на полноту инактивации вирусов под действием УФ-излучения влияют следующие параметры: концентрация белка, прозрачность раствора, время экспозиции, толщина обрабатываемого слоя и расстояние от источника излучения [26].

В нашем эксперименте полное инактивирование хантавирусов наступало через 3 мин при толщине слоя вирусной суспензии 3 мм на расстоянии 24 см от источника коротковолновых ультрафиолетовых лучей (рис. 2).



**Рис. 1.** Кинетика инактивации хантавирусов на примере вируса Пуумала  $\beta$ -пропиолактоном в разных разведениях. Представленные усредненные данные являются результатом трех независимых экспериментов, статистически обработанных с использованием одностороннего ANOVA с тестом Уилкинсона.

**Fig. 1.** The kinetics of Puumala virus inactivation with  $\beta$ -propiolactone in different concentrations. The data presented are the average of three independent experiments statistically processed using a one-way ANOVA with Wilkinson test.



**Рис.2.** Кинетика инактивации хантавирусов на примере вируса Пуумала УФ-излучением при толщине слоя вирусной суспензии 3 мм на расстоянии 24 см от источника коротковолновых ультрафиолетовых лучей 253,7 нм. Представленные усредненные данные являются результатом трех независимых экспериментов, статистически обработанных с использованием одностороннего ANOVA с тестом Уилкинсона.

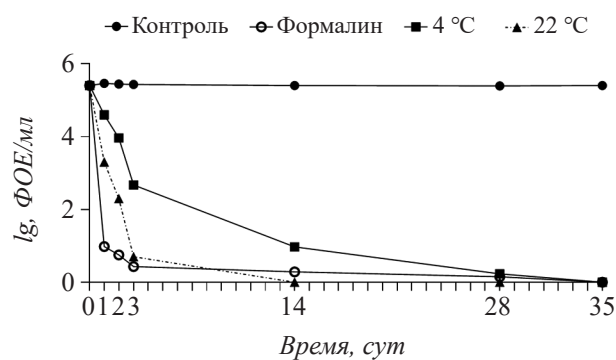
**Fig. 2.** The inactivation kinetics of Puumala virus when exposed to UV irradiation. The viral suspension was in a 3-mm layer at a distance of 24 cm from the source of short-wave UV rays (253.7 nm). The data presented are the average of three independent experiments statistically processed using a one-way ANOVA with Wilkinson test.

### Инаktivация формалином

В опубликованных ранее работах по изучению динамики инаktivирования хантавирусов при разных температурных режимах и при обработке разными концентрациями формалина была выбрана наиболее оптимальная схема, включающая инаktivирование вируса при температуре 4 °C в присутствии 0,025 % раствора формалина в течение 30 сут, что практически совпадает с естественной термоинаktivацией [5]. В нашем эксперименте был получен аналогичный результат: инаktivация 0,025% формалином при температуре 4 °C по времени занимала не менее месяца, термоинаktivация при 22 °C – 2 недели (рис.3).

### Контроль специфической активности

Для оценки специфической активности была предпринята попытка выявить корреляцию между содержанием копий вирусной РНК/мл и иммуногенностью. При анализе содержания вирусной РНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени все инаktivированные образцы имели положительные результаты амплификации. Из-за воздействия инаktivаторов на вирусную РНК была выявлена статистически значимая разница между контрольным образцом (вакцинный полуфабрикат до инаktivации) и образцами инаktivированными разными способами (анализ проведен с помощью одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Даннетта ( $p < 0,0001$ )) (рис. 4, табл.2).

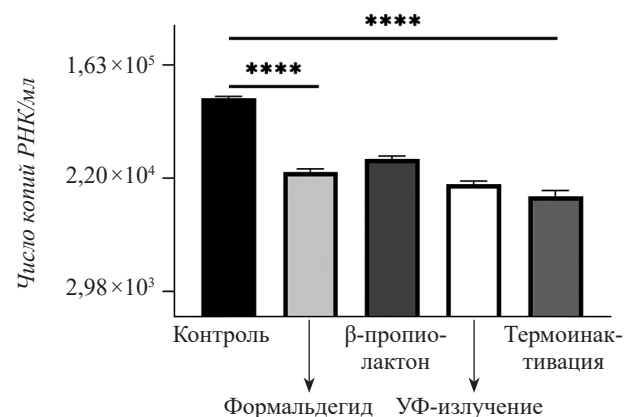


**Рис.3.** Кинетика инаktivации хантавирусов на примере вируса Пуумала формалином в конечном разведении 1/4000 и термоинаktivации при 4 °C и 22 °C. Представленные усредненные данные являются результатом трех независимых экспериментов, статистически обработанных с использованием одностороннего ANOVA с тестом Уилкинсона.

**Fig. 3.** The kinetics of inactivation of hantaviruses by the example of the Puumala virus, with formalin inactivation at a final concentration of 1/4000 and thermal inactivation at 4 °C and 22 °C. The data presented are the average of three independent experiments statistically processed using a one-way ANOVA with Wilkinson test.

### Специфический иммунный ответ

При введении мышам BALB/c вакцинных препаратов, инаktivированных формальдегидом, β-пропиолактоном, УФ-излучением, каких-либо побочных эффектов, как местного, так и общего характера, не наблюдали. Не выявлено статистически значимой разницы в титре нАТ, индуцируемых в ответ на иммунизацию моновакцинами, инаktivированными формалином, β-пропиолактоном, УФ-излучением (табл. 2, рис. 5). Таким образом, иммуногенность вакцинных препаратов ВАК-ПУУ, ВАК-ХТН и ВАК-Сочи, инаktivированных формальдегидом, β-пропиолактоном, УФ-излучением, не имела достоверных различий по результатам определения нейтрализующих



**Рис. 4.** Содержание РНК (число копий/мл) вируса Пуумала в вакцинном препарате в зависимости от способа инаktivации: контроль - вакцинный полуфабрикат до инаktivирования; формалин в конечной концентрации 1/4000 в течение 35 сут; β-пропиолактон в конечной концентрации 1/6000 в течение 180 мин; УФ-излучение при толщине слоя 3 мм на расстоянии 24 см от источника коротковолновых ультрафиолетовых лучей 253,7 нм в течение 3 мин; термоинаktivация при 22 °C в течение 14 сут. Представленные усредненные данные являются результатом трех независимых экспериментов, статистически обработанных с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Даннетта. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

**Fig. 4.** Dependence of the RNA content (a number of copies/ml) of the Puumala virus in the vaccine preparation on the method of inactivation. Control - vaccine before inactivation; formalin at a final concentration of 1/4000 for 35 days; β-propiolactone at a final concentration of 1/6000 for 180 minutes; UV-irradiation: a virus-containing suspension in a 3-mm layer was placed at a distance of 24 cm from the source of short-wave UV light (253.7 nm) for 3 min; thermal inactivation at 22 °C for 14 days. The data presented are the average of three independent experiments statistically processed using a one-way ANOVA with the Dunnnett's multiple comparisons test. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

**Характеристика вакцинных препаратов ВАК-ПУУ, ВАК-ХТН и ВАК-Сочи, инактивированных разными способами**

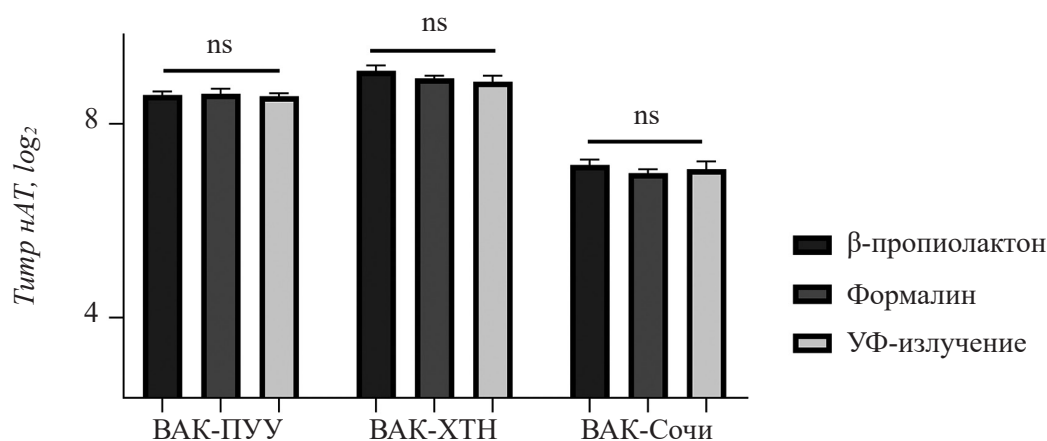
**Characterization of VAC-PUU, VAC-HTN and VAC-Sochi inactivated by different methods**

Инактивация	Титр, ФОЕ/мл	Число копий РНК/мл	Белок, мг/мл	Титр нАТ <sup>a</sup>
<b>ВАК-ПУУ</b>				
Без инаktivации <sup>b</sup>	5,4	(1,02±0,3) 10 <sup>5</sup>	65,37	Нет данных <sup>c</sup>
Формалин	0	(1,31±0,4) 10 <sup>4</sup>	62,4	8,8±0,08
β-пропиолактон	0	(2,02±0,34) 10 <sup>4</sup>	5,29	8,86±0,09
УФ-излучение	0	(2,16±0,41) 10 <sup>3</sup>	63,2	8,82±0,09
<b>ВАК-ХТН</b>				
Без инаktivации	6	(5,4±0,41) 10 <sup>6</sup>	86,63	Нет данных
Формалин	0	(4,98±0,37) 10 <sup>5</sup>	85,34	9,41±0,07
β-пропиолактон	0	(2,25±0,28) 10 <sup>5</sup>	15,01	9,6±0,09
УФ-излучение	0	(1,11±0,3) 10 <sup>4</sup>	84,12	9,3±0,08
<b>ВАК-Сочи</b>				
Без инаktivации	5,6	(5,03±0,23) 10 <sup>5</sup>	41,5	Нет данных
Формалин	0	(3,41±0,42) 10 <sup>4</sup>	40,23	6,7±0,07
β-пропиолактон	0	(4,53±0,31) 10 <sup>4</sup>	4,21	6,9±0,09
УФ-излучение	0	(2,3±0,4) 10 <sup>3</sup>	39,13	6,8±0,06

<sup>a</sup> Титр нейтрализующих антител в сыворотках мышей BALB/c в ответ на иммунизацию вакцинными препаратами (The titer of neutralizing antibodies in the BALB/c mice sera in response to vaccine immunization).

<sup>b</sup> Исходный вакцинный полуфабрикат до инаktivации (Vaccine semi-product before inactivation).

<sup>c</sup> Живой вирус не вводится экспериментальным животным (We cannot introduce live virus to experimental animals).



**Рис. 5.** Титр нейтрализующих антител при иммунизации мышей BALB/c вакцинными препаратами ВАК-ПУУ, ВАК-ХТН, ВАК-Сочи, инаktivированными разными способами: формалин в конечной концентрации 1/4000 в течение 35 сут; β-пропиолактон в конечной концентрации 1/6000 в течение 180 мин; УФ-излучение при толщине слоя 3 мм на расстоянии 24 см от источника коротковолновых ультрафиолетовых лучей 253,7 нм в течение 3 мин. Представленные усредненные данные являются результатом трех независимых экспериментов, статистически обработанных с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка.

**Fig. 5.** The neutralizing antibodies titers of BALB / c mice after immunization with vaccines VAC-PUU, VAC-HTN, VAC-Sochi, which were inactivated in different ways: formalin at a final concentration 1/4000 for 35 days; β-propiolactone at a final concentration 1/6000 for 180 minutes; with UV radiation at a thickness 3 mm of layer and 24 cm distance from a source of short-wave ultraviolet rays (253.7 nm). The data presented are the average of three independent experiments statistically processed using a one-way ANOVA with the Tukey's multiple comparisons test.

антител, которые, как известно, являются детерминантами протективного иммунного ответа.

Основной антиген хантавирусов, на который вырабатываются нАТ, – гликопротеины оболочки  $G_n$  и  $G_c$ . При создании инактивированной вакцины важную роль играет выбор инактивирующего агента – чтобы при инаktivации вирусов минимально повреждалась структура антигенных детерминант вируса. В настоящее время наиболее широкое распространение для инаktivации патогенов получил формальдегид, возможно, из-за многолетнего опыта его использования, что упрощает путь лицензирования вакцин. Формалин действует как алкилирующий агент, образуя как белок-белковые, так и РНК/ДНК-белковые сшивки [27]. Формалин способствует агрегации целевых и нецелевых белков (фрагменты цитоскелета клеток-продуцента вакцины), в результате чего при очистке вируса (гель фильтрация) балластные белки не отделяются. Это приводит к увеличению концентрации общего белка и снижению качества вакцинного препарата. Время инаktivирования вируса формалином практически совпадает с временем термоинаktivации (при 4 °С) и составляет не менее 30 сут, что значительно увеличивает длительность технологического процесса, и, кроме того, дополнительно требует нейтрализации остаточного формальдегида и контроля его наличия в вакцине. Термоинаktivация при 22 °С значительно короче по времени и занимает 14 сут, однако приводит к выраженному снижению количества копий РНК/мл в вакцинном полуфабрикате.

Механизм действия  $\beta$ -пропиолактона заключается в алкилировании в основном пуриновых оснований ДНК и РНК, что сопровождается образованием ковалентных связей внутри и между цепями нуклеиновых кислот и приводит к ошибкам репликации/транскрипции. Понятно, что модифицированная таким образом вирусная РНК не может быть использована полимеразой в качестве матрицы, а значит предотвращается репликация вируса [28]. В отличие от формалина,  $\beta$ -пропиолактон в водных растворах гидролизуеться через несколько часов при 25 °С (время полной инаktivации вируса) с образованием нетоксичных, неканцерогенных продуктов [25].

УФ-излучение инаktivировывает вирусы в результате фотохимического повреждения их нуклеиновых кислот, наиболее распространенным из которых считается образование димеров циклобутан-пиримидина. Такие повреждения необратимы из-за отсутствия соответствующих механизмов репарации [29], что в итоге приводит к нарушению репликации вирусной РНК. Вызывая глубо-

кие изменения в геноме, УФ-излучение не оказывает существенного влияния на белковую оболочку, вследствие чего инаktivированные вирусы способны сохранять свою антигенную и иммуногенную активность [30].

Специфическая активность инаktivированного вакцинного материала определялась нами по количеству копий РНК/мл, которое соответствует содержанию инаktivированных вирусных частиц, являющихся иммуногенными. Оценка иммуногенности вакцины является определяющим показателем ее эффективности. При анализе иммуногенных свойств моновакцин против вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи, инаktivированных формалином,  $\beta$ -пропиолактоном и УФ-излучением, достоверной разницы выявлено не было. Иммуногенность моновакцин сохранялась на высоком уровне во всех группах (рис. 5).

Наиболее перспективным инаktivатором хантавирусов по результатам наших исследований является  $\beta$ -пропиолактон: время инаktivации в пределах нескольких часов, снижается агрегация инаktivированных вирусных частиц и фрагментов клеточных белков, что приводит к уменьшению концентрации общего белка в вакцинном препарате, отсутствует необходимость контроля остаточного инаktivированного агента в вакцине, поскольку он полностью разрушается [25]. Определяющей характеристикой при этом являлось сохранение специфической активности и выраженная иммуногенность вакцины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т. К., Ишмухаметов А.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России: успехи и актуальные проблемы на современном этапе. *Биомедицина XXI века: достижения и перспективные направления развития. Сб. научных трудов*, 2016, 331–344.
2. Briese T., Alkhovskiy S., Beer M. et al. Create a new order, *Bunyavirales*, to accommodate nine families (eight new, one renamed) comprising thirteen genera. International Committee on Taxonomy of Viruses, Budapest, Hungary, 2016
3. Hepojoki, J., Strandin, T., Lankinen, H., et al. Hantavirus structure–molecular interactions behind the scene. *J. Gen. Virol.*, 2012, 93(8), 1631–1644. doi: org/10.1099/vir.0.042218-0
4. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д. и др. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (история, проблемы и перспективы изучения). *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, 2016, 15(3), 23–34. doi: 10.31631/2073-3046-2016-15-3-23-34



5. Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Ткаченко П.Е. [Перевод с английского под редакцией А.А. Ишмухаметова] Современные технологии конструирования вакцин для профилактики хантавирусных лихорадок. В кн. Современные вакцины: технологии разработки и области применения. Москва: Ремедиум, 2017, 103–147.
6. Бархалева О. А., Воробьева М. С., Ладыженская И. П. и др. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2011, 1(41), 27–30.
7. Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К. и др. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Ремедиум*, 2015, (6), 47–53.
8. Martin S. S., Bakken R. R., Lind C. M., et al. Comparison of the immunological responses and efficacy of gamma-irradiated V3526 vaccine formulations against subcutaneous and aerosol challenge with Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB. *Vac.*, 2010, 28(4), 1031–1040. doi: org/10.1016/j.vaccine.2009.10.126
9. Alsharifi M., Müllbacher A. The  $\gamma$ -irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88(2), 103–105. doi: 10.1038/icb.2009.81
10. Budowsky E. I., Kostyuk G.V., Kost A.A., et al. Principles of selective inactivation of viral genome. *Arch. Virolog.*, 1981, 68(3-4), 239–247. doi: 10.1007/bf01314578
11. Nims R. W., Plavsic M. Polyomavirus inactivation—a review. *Biologicals*, 2013, 41(2), 63–70. doi: org/10.1016/j.biologicals.2012.09.011
12. Sanders B., Koldijk M., Schuitemaker H. Inactivated viral vaccines. *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control*, Berlin, Nunnally, B.K., Turula, V.E., Sitrin, R.D. (Eds.), Heidelberg; Springer, 2015, 45–80.
13. Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Вирусы и вирусные вакцины. Москва: Библионика, 2007, 186–201.
14. Jian Y, Gao J, Zhang O., et al. Development of gas chromatography for determination of  $\beta$ -propiolactone (BPL) content and analysis of BPL hydrolysis. *Chin. J. Biol*, 2010, 23(8), 323–324.
15. Jiang, J. J., Qi, F. C., Hu, Y. L., et al. Inactivation of hepatitis A virus with  $\beta$ -propiolactone. *Chin. J. Biol*, 2012, (25), 529–530.
16. Shan G.Z., Ma X., Hong J.I., et al., Determination of residual  $\beta$ -propiolactone inactivated rabies virus concentrate by gas chromatography, *Chin. Pharm. J.*, 2014, (25), 2357–2359. doi: 10.1016/j.jpha.2018.06.003
17. Maté U., Solomon J. J., Segal A. In vitro binding of  $\beta$ -propiolactone to calf thymus DNA and mouse liver DNA to form 1-(2-carboxyethyl) adenine. *Chem. Biol Interact*, 1977, 18(3), 327–336. doi: 10.1016/0009-2797(77)90018-7
18. Colburn N. H., Richardson R. G., Boutwell R. K. Studies of the reaction of  $\beta$ -propiolactone with deoxyguanosine and related compounds. *Biochem. Pharmacol.*, 1965, 14(7), 1113–1118. doi: 10.1016/0006-2952(65)90040-7
19. Uittenbogaard J. P., Zomer B., Hoogerhout P., et al. Reactions of  $\beta$ -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides implications for the inactivation of viruses. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(42), 36198–36214.
20. Wigginton K.R., Pecson B.M., Sigstam T., et al. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46(21), 12069–12078. doi: 10.1021/es3029473
21. Perdiz D., Gróf P., Mezzina M., et al. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells possible role of dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J. Biol. Chem*, 2000, 275(35), 26732–26742. doi: 10.1074/jbc.M001450200
22. Burke M., Augenstein L. A comparison of the effects of ultraviolet and ionizing radiations on trypsin activity and on its constituent amino acids *Biochemical Journal*, 1969, 114(3), 535–545. doi: 10.1042/bj1140535
23. Епринцев А. Т., Попов В. Н., Федорин Д. Н. Идентификация и исследование экспрессии генов: учебно-методическое пособие для вузов. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2008, 14-15.
24. Ткаченко Е. А., Бернштейн А. Д., Дзагурова Т. К., и др. Сравнительный анализ эпидемических вспышек геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванных вирусами Пуумала и Добrava/Белград. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, 2005, (4), 28–34.
25. Lei S., Gao X., Sun Y., et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of  $\beta$ -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis. *J. Pharm. Anal.*, 2018, 8(6), 373–377. doi: 10.1016/j.jpha.2018.06.003
26. Vaidya V., Dhere R., Agnihotri S., et al. “Ultraviolet-C irradiation for inactivation of viruses in foetal bovine serum. *Vaccine*, 2018, 36(29), 4215–4221.
27. Hartman F. W., LoGrippo G. A. Beta-propiolactone in sterilization of vaccines, tissue grafts, and plasma. *J. Am. Med. Assoc.*, 1957, 164(3), 258–260. doi: 10.1001/jama.1957.02980030034008
28. Perrin P., Morgeaux S. Inactivation of DNA by  $\beta$ -propiolactone. *Biologicals*, 1995, 23(3), 207–211. doi: 10.1006/biol.1995.0034
29. Leo G., Altucci C., Bourgoin-Voillard S., et al. Ultraviolet laser-induced cross-linking in peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2013, 27(14), 1660–1668. doi: 10.1002/rcm.6610
30. Saito I., Matsuura T. Chemical aspects of UV-induced crosslinking of proteins to nucleic acids. Photoreactions with lysine and tryptophan. *Acc. Chem. Res*, 1985, 18(5), 134–141. doi: 10.1021/ar00113a002

## Effect of Virus Inactivating Agents on the Immunogenicity of Hantavirus Vaccines against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

M. S. EGOROVA<sup>1,\*</sup>, S. S. KURASHOVA<sup>1</sup>, T. K. DZAGUROVA<sup>1</sup>, M. V. BALOVNEVA<sup>1</sup>,  
A. A. ISHMUKHAMETOV<sup>1,2</sup>, and E. A. TKACHENKO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia*

<sup>2</sup>*Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia*

\**e-mail*: masha\_0787@mail.ru

Received November 20, 2019

Revised December 28, 2019

Accepted March 31, 2020

**Abstract**—Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is an acute zoonotic disease caused by orthohantaviruses Puumala, Dobrava-Belgrad (4 genotypes), Hantaan (genotype Amur) and Seoul. In the Russian Federation, HFRS takes a leading place among all natural focal human diseases. Formalin,  $\beta$ -propiolactone, and ultraviolet radiation were tested to select the optimal method of virus inactivation during the development of the whole-virion vaccine against HFRS. The specific activity and the immunogenicity of the vaccine were determined, respectively, by the number of copies of viral RNA/mL and by the titer of neutralizing antibodies in the BALB/c mice blood serum in response to immunization. An analysis of the immunogenicity of vaccines inactivated with formalin,  $\beta$ -propiolactone or UV radiation did not reveal significant differences in the level of neutralizing antibodies they induced. At the same time,  $\beta$ -propiolactone has obvious technological advantages compared to formalin and UV radiation: the time of inactivation of hantavirus is reduced tenfold, neutralization of the inactivator and control of its content in the final vaccine are not required, and the amount of total protein in the vaccine decreases.

*Keywords*: hemorrhagic fever with renal syndrome, hantaviruses, inactivated vaccines, neutralizing antibodies, formalin,  $\beta$ -propiolactone, ultraviolet

**doi**: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-64-73