

Сравнение физических и химических инактиваторов при разработке технологии создания вакцины на основе вируса Пуумала

С. С. Курашова^{*1}, М. С. Егорова¹, М. В. Баловнева¹, А. Н. Ветрова¹, А. С. Балкина¹, Р. Д. Теодорович¹, В. Г. Петров², Т. К. Дзагурова¹, Е. А. Ткаченко¹

¹ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова (МГУ имени М. В. Ломоносова)

Резюме

Актуальность. Среди природно-очаговых болезней человека ведущее место в России занимает геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), возбудители которой – ортохантавирусы входят в отряд *Bunyavirales*, семейство *Hantaviridae*. Более 98% случаев ГЛПС в России ассоциировано с вирусом Пуумала. Это тяжелое зоонозное заболевание, для которого отсутствует специфическое лечение. Ни одна вакцина для профилактики хантавирусных лихорадок не зарегистрирована ВОЗ.

Цель. Изучение влияния формальдегида, β -пропиолактона, перекиси водорода, ультрафиолетовых лучей, гамма-иррадиации и термоинактивации на иммуногенную активность инактивированного вакцинного препарата против хантавирусных лихорадок. **Материалы и методы.** Были приготовлены экспериментальные вакцинные препараты на основе вируса Пуумала, штамм PUU-TKD/VERO, инактивированные различными агентами (формальдегид, β -пропиолактон, перекись водорода, ультрафиолетовые лучи, гамма-иррадиация, термоинактивация). Осуществлена подборка временных интервалов, необходимые для полной инактивации вируса, а также дана оценка влияния инактиваторов на сохранность вирусной РНК и иммуногенную активность вакцинного препарата на моделях мышей BALB/c и сирийских хомяков. **Результаты.** Вакцинные препараты, инактивированные различными химическими и физическими способами, существенно различающимися по механизму взаимодействия с вирусом, не имели достоверных различий по иммуногенной активности, за исключением термоинактивации.

Заключение. В результате изучения установлены преимущества использования β -пропиолактона: короткое время инактивации вируса, его полный распад на нетоксичные соединения в течение нескольких часов и снижение общего количества белка после стерилизующей фильтрации, вероятно, за счет меньшей агрегации вирусных частиц и клеточных белков.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, инактивированные вакцины, β -пропиолактон, перекись водорода, ультрафиолетовое излучение, гамма-иррадиация, термоинактивация
Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: С. С. Курашова, М. С. Егорова, М. В. Баловнева и др. Сравнение физических и химических инактиваторов при разработке технологии создания вакцины на основе вируса Пуумала. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2024;23(4): 34-43. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-4-34-43>

Physical and Chemical Inactivators Evaluation for the Puumala Virus Vaccine Technology Development

SS Kurashova^{**1}, MS Egorova¹, MV Balovneva¹, AN Vetrova¹, AS Balkina¹, RD Teodorovich¹, VG Petrov², TK Dzagurova¹, EA Tkachenko¹

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences Lomonosov Moscow State University

Abstract

Relevance. Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is leading among natural focal human diseases in Russia, the causative agents of which - orthohantaviruses - belong to the order *Bunyavirales*, family *Hantaviridae*. More than 98% of HFRS cases in Russia are caused by the Puumala virus. It is a serious zoonosis for which there is still no specific treatment. The WHO has not approved a vaccine. **The aim of this study** was to investigate the effect of formaldehyde, β -propiolactone, hydrogen peroxide, ultraviolet rays, gamma irradiation and thermal inactivation on the immunogenic activity of inactivated vaccine preparations against HFRS.

^{*} Для переписки: Курашова Светлана Сергеевна, к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +79653093241, kurashova_ss@chumakovs.su. ©Курашова С. С. и др.

^{**} For correspondence: Kurashova Svetlana S., Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers «Chumakov FSC R&D IBP RAS» (Institute of Poliomyelitis), kurashova_ss@chumakovs.su. ©Kurashova SS, et al.

Materials and methods. To achieve this aim, experimental vaccine preparations based on the PUU-TKD/VERO strain of Puumala virus were prepared and inactivated using the methods described above. The time intervals required for complete inactivation of the virus were determined, and the effects of the inactivators on viral RNA and immunogenic activity of the vaccine preparations were evaluated in BALB/c mouse and Syrian hamster models. **Results.** According to our results, vaccine preparations inactivated by different chemical and physical methods, which differ significantly in the mechanism of the mechanism of interaction with the virus, show no significant differences in immunogenic activity, except for thermal inactivation. **Conclusion.** A certain advantage of β -propiolactone is the short virus inactivation time, its complete degradation into non-toxic compounds within a few hours, and the reduction of total protein content after sterilization filtration, which is probably due to less aggregation of virus particles and cellular proteins.

Keywords: hemorrhagic fever with renal syndrome, inactivated vaccines, β -propiolactone, hydrogen peroxide, ultraviolet radiation, gamma irradiation, thermal activation
No conflict of interest to declare.

For citation: Kurashova SS, Egorova MS, Balovneva MV, et al. Physical and Chemical Inactivators Evaluation for the Puumala Virus Vaccine Technology Development. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2024;23(4):34-43 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-4-34-43>

Введение

Среди природно-очаговых болезней человека ведущее место в России занимает геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС). Более 98% случаев ГЛПС в России ассоциировано с вирусом Пуумала. Основным природным резервуаром хантавирусов являются мелкие млекопитающие, преимущественно грызуны [1].

Возбудители ГЛПС – ортохантавирусы, в составе семейства *Hantaviridae* входят в отряд *Bunyavirales* и представляют собой одноцепочечные РНК-вирусы отрицательной полярности с трехсегментным геномом (сегменты S, M и L) [2].

При отсутствии специфического лечения наиболее эффективным способом борьбы с ГЛПС могла бы стать профилактическая вакцинация [3].

В производстве вакцинных препаратов могут использоваться различные физические и химические методы инаktivации вируса. Выбор инаktivаторов основан на механизме их действия, при котором вирус полностью теряет свою инфекционность, сохраняя белковые эпитопы, ответственные за иммуногенную активность вакцины [4].

Формальдегид (Ф) наиболее широко используется в производстве инаktivированных вакцин, несмотря на его неблагоприятное воздействие на антигенную структуру вирусов. Он быстрее взаимодействует с аминокислотами аминокислот с образованием производных метилена, чем с азотистыми основаниями нуклеиновых кислот. Следует отметить, что реакция формальдегида с аминокислотами обратима, то есть вирулентность может быть восстановлена [5]. Концентрация и режим применения формалина в производстве инаktivированных вакцин значительно варьируется: 0,05% при постоянном перемешивании при 37 °C в течение 48 часов для Сенекавируса А и для ротавирусов; 0,05% при комнатной температуре в течение 7 дней для вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки [6–8]. Встречаются и другие условия инаktivации, например, для коронавируса SARS-CoV-2 использовали 0,025% формальдегид

в течение 48 часов с последующей обработкой 0,05% β -пропиолактоном в течение 48 часов, для хантавирусов – 0,025% формальдегид при 6 ± 2 °C в течение 30 дней при постоянном перемешивании [9–11].

Вторым по частоте использования в производстве инаktivированных вакцин является β -пропиолактон (β -ПЛ). Он действует преимущественно на вирусную нуклеиновую кислоту, вызывая точечные мутации и блокируя репликацию вируса [12]. Поскольку β -пропиолактон в основном взаимодействует с ДНК или РНК, предполагается, что иммуногенные эпитопы белка будут незначительно повреждаться. Режим инаktivации вирусов β -пропиолактоном зависит от общего содержания белка в вируссодержащем субстрате и температуры взаимодействия. Увеличение концентрации β -пропиолактона может привести к нежелательным реакциям с вирусными белками и, как следствие, к снижению иммуногенности вакцины [12]. β -пропиолактон использовался для инаktivации вируса лихорадки долины Рифт по схеме – 0,2% в течение 3 часов при 37 °C с последующей инкубацией в течение ночи при 6 ± 2 °C, для возбудителя тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении – 0,025% в течение 24 часов при 6 ± 2 °C, для вирусов Пуумала, Хантаан, Сочи – 0,017% в течение 3 часов при 6 ± 2 °C [13–15]. Химические инаktivаторы вирусов являются мутагенами, поэтому они должны либо разлагаться/гидролизироваться, либо нейтрализоваться до безопасных продуктов (соединений). Известно, что β -пропиолактон гидролизует при комнатной температуре до нетоксичной 3-гидроксипропионовой кислоты за несколько часов [16].

Перекись водорода (H_2O_2) является сильным окислителем и успешно используется в качестве инаktivировывающего агента при создании вакцин против ДНК- и РНК-содержащих вирусов, включая вирусы лимфоцитарного хориоменингита, желтой лихорадки, лихорадки Западного Нила, оспы и оспы обезьян [17–19]. H_2O_2 разлагается

на нетоксичные продукты (воду и кислород) и требует более короткого времени для инактивации по сравнению с формалином. Инактивирование вируса H_2O_2 происходит вследствие повреждения генома, вызванного атакой гидроксильных радикалов на нуклеозиды, что приводит к одно- или двухцепочечным разрывам, в конечном счете ведущим к инактивации вируса [20].

Известно, что ультрафиолетовые лучи (УФ) повреждают нуклеиновые кислоты (ДНК/РНК), а также белки, ингибируя репликацию генома (транскрипцию) и, следовательно, предотвращая размножение вирусов. Ультрафиолетовые лучи, поглощаемые основаниями ДНК и РНК, приводят к фотохимическому слиянию двух соседних пиримидиновых оснований в ковалентно связанные димеры [21]. Также известно, что ультрафиолетовые лучи разрушают тирозин, триптофан и цистеин в смеси аминокислот [22]. Последнее было преодолено благодаря использованию очень узкого спектра волн ультрафиолетовых длин, который специфически воздействует на нуклеиновые кислоты в проточной среде из-за турбулентного потока вместе с вихрями Дина [23].

Гамма-иррадиация (γ -иррадиация), как физическое средство инактивации вируса, не является новым методом, поскольку в прошлом широко использовалась для создания экспериментальных вакцин против вирусов синего языка овец, натуральной оспы, Эболы, Марбурга и Ласса [24–26]. Гамма-иррадиация вызывает потерю вирусной инфекционности из-за различных повреждений структуры нуклеиновых кислот вирусов: разрыв водородных связей, появление сшивок, двухцепочечных разрывов цепей РНК, ДНК с небольшим влиянием на антигенную структуру и целостность белка (в отличие от химических инактиваторов) за счет высокой проникающей способности, позволяющей инактивировать вирусы в больших объемах, хранящихся в закрытых контейнерах и даже в замороженном состоянии, более того, нет необходимости удалять химическое соединение после инактивации. Несмотря на все преимущества, на сегодняшний день зарегистрированной вакцины, инактивированной γ -иррадиацией, не существует, что, вероятно, связано с успехом формальдегида и β -пропиолактона, а также конструктивными особенностями его использования в технологическом процессе производства [27].

Цель исследования – изучение влияния формальдегида, β -пропиолактона, перекиси водорода, ультрафиолетовых лучей, гамма-иррадиации и термоинактивации на иммуногенную активность инактивированного вакцинного препарата против хантавирусных лихорадок.

Материалы и методы

Вирус Пуумала культивировали в перевиваемой культуре клеток почки зеленой марышки Vero – (ATCC CCL-81), полученной из BO3 (WHO

VERO cell bank ECACC, Accession number 991042). Культивирование осуществляли при 37 ± 1 °C. В работе использовали вакцинный штамм вирусов Пуумала: ПУУ-ТКД/VERO, депонированный в Государственной коллекции вирусов (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского) под номером №1026 [28]. Все эксперименты с хантавирусами выполнялись в соответствии с правилами работы с патогенами II группы опасности (Санитарно-эпидемиологические правила и нормы – СанПиН 3.3686-21). Референс антитела – специфические антитела к вирусу Пуумала получены из сыворотки крови реконвалесцента ГЛПС с титром антител 1/65 000.

Титр вируса в полуфабрикате вакцинного препарата до инактивации оценивали по числу фокусобразующих единиц (ФОЕ/мл) по ранее описанной методике [28]. Хантавирусные антигены в инфицированных клетках выявляли непрямой методом флюоресцирующих антител (МФА) по ранее описанной методике [28]. Выделение РНК и определение количества копий РНК/мл методом ПЦР в реальном времени описаны в ранее опубликованной статье [29].

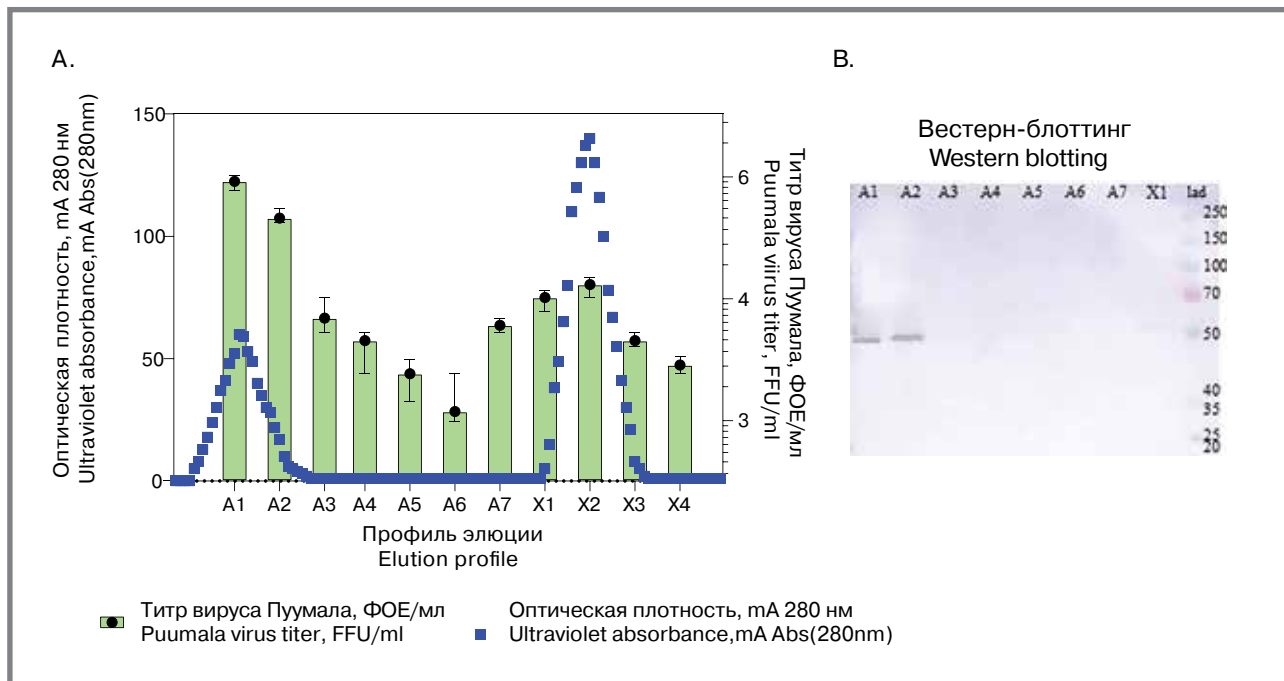
Получение первичного вирусного концентрата

Пул вирусодержащей культуральной жидкости объемом 5,5 литра с титром $5,5 \pm 0,2$ lg ФОЕ/мл и содержанием общего белка 1243 ± 31 мкг/мл очищали методом осветляющей фильтрации в асептических условиях на капсуле с полиэфирсульфоновой (ПЭС) мембраной с градиентом пористости 0,2 – 10 мкм (фильтр PPG060B01BA, 3M Cuno). Осветленную вирусодержащую культуральную жидкость концентрировали методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке на модулях VivaFlow 200 с пределом исключения белков с молекулярной массой 100 кДа ПЭС мембраной (Sartorius, VF20P4) согласно инструкции производителя с помощью перистальтического насоса (Masterflex L/S Easy Load Head For Precision Tubing, 07514-10). Объем полученного концентрата вместе со смывом составил 42 мл с титром $6,5 \pm 0,4$ lg ФОЕ/мл и общим белком 3308 ± 102 мкг/мл.

Получение вторичного концентрата

Дальнейшую очистку проводили методом хроматографии на приборе AKTA PURIFIER (Cytiva) и колонки серии HiScale (GE Healthcare) с использованием мультимодального сорбента Capto Core700 (CC700) (GE Healthcare). Уравновешивание колонки проводили трис-буфером (10 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl; pH 7,8). Градиентную хроматографию осуществляли с использованием трис-буфера на линии A1 и 1M NaCl (pH 7,8) – на линии B1. Объем нанесенного концентрата составил 10% от объема колонки. Оптическую плотность при фракционировании определяли при длине волны – 280 нм. Для установления профиля элюции собирали 7 фракций по 10 мл и 4 фракции по 50 мл (рис. 1А).

Рисунок 1. Профиль элюции хроматографической очистки первичного концентрата вируса Пуумала на колонке серии HiScale (GE Healthcare) с использованием мультимодального сорбента Capto Core 700 (CC700) (GE Healthcare) – А. Определение специфических белков в целевых фракциях методом вестерн-блоттинга – В
Figure 1. The chromatographic purification elution profile of the Puumala virus concentrate was performed on a HiScale series column (GE Healthcare) using a CaptoCore700 (CC700) multimodal sorbent (GE Healthcare) – A. Western blotting method was used to determine specific proteins only in the target fractions – B



Градиентная хроматография была выполнена трижды на разных сериях концентрата. Оценку эффективности очистки всех фракций осуществляли по титру вируса в Ig ФОЕ/мл, содержанию вирусной РНК методом ПЦР-РВ, общего белка методом Лоури без осаждения [30], электрофорезом и вестерн-блоттингом.

Электрофорез в денатурирующих условиях проводили в 10% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (Mini-Protein Tetra System, BIO-RAD) с использованием маркеров молекулярной массы PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder от 10 до 250 кДа (Thermo Scientific™). В качестве стандарта белка использовали бычий сывороточный альбумин (BSA, Combithek) (0,3–2 мкг/л). После электрофореза гель обрабатывали водным раствором с 10% уксусной кислотой и 40% этанола, затем белки окрашивали 0,22% Кумасси G-250 (Sigma). Гель сканировали в системе gel-doc GBOX-CHEMIXX6-E (SynGene).

Наличие вирусных белков в целевых фракциях подтверждали с помощью вестерн-блоттинга (в соответствии с Общим протоколом Вестерн-блоттингового бюллетеня производителя Bio-Rad 6376). После электрофореза осуществляли перенос с геля на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond ECL, Amersham) в однократном буферном растворе TBS-T (30,3 г Трис + 144 г глицина + 1000 мл воды Milli-Q, pH 8,3), используя мини-транс-Модуль (BIO-RAD). Пустые участки связывания мембраны блокировали 5% обезжиренным молоком (Bov's

Red Mill, США) в буфере TBS-T 1 час при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ на качающейся платформе (Multi Bio 3D, BIOSAN) и последующим инкубированием в том же буфере со специфичными хантавирусными IgG в разведении 1/150 (референс сыворотка), при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ на качающейся платформе 1 час. После отмывки гель инкубировали в тех же условиях с антителами Anti-Human IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega) в разведении 1:2500 и промывали. Наносили субстрат Bio-Rad Kit 1:1. Нитроцеллюлозную мембрану сканировали в системе gel-doc GBOX-CHEMIXX6-E (SynGene).

Объединенный пул целевых фракций, отвечающих критериям включения в хантавирусный вакцинный препарат (ХВП), делили на 9 равных частей и инактивировали различными способами, с последующей стерилизующей фильтрацией на одноразовом фильтре с ПЭС мембраной с размером пор 0,22 мкм (Millipore, 3M Cuno).

Инактивирование хантавирусного вакцинного препарата

Инактивацию полуфабриката формальдегидом и β -пропиолактоном проводили по ранее описанному способу [15]. Полученные хантавирусные вакцинные препараты обозначили, как ХВП-Ф и ХВП- β -ПЛ.

Исходный 30% раствор перекиси водорода (Carl Roth) стерилизовали мембранной фильтрацией и хранили в темном герметичном контейнере. К полуфабрикату добавляли 30% перекись водорода

в конечной концентрации 1,5% и 3%. Аликвоты отбирали каждые 5 мин в течение 1 часа для оценки кинетики инактивации вируса. После инактивации полуфабрикат обрабатывали каталазой в конечной концентрации 12,5 Ед/мл (MP Biomedica) в течение 10 мин при комнатной температуре для удаления остаточной перекиси водорода [19]. Полученный хантавирусный вакцинный препарат получил название: ХВП-Н₂O₂.

Термоинаktivация проводилась при температуре 6 ± 2 °C и 22 ± 2 °C в течение 30 дней и при 37 ± 1 °C в течение 6 дней. Вирусные аликвоты отбирали ежедневно. Полученный препарат получил название: ХВП-37.

Инаktivацию УФ-лучами проводили в капилляре с внутренним диаметром 1 мм и толщиной стенки 1,2 мм на расстоянии 5 см от источника излучения с максимальной длиной волны 253,7 нм и скоростью потока 2 мл/мин. Аликвоты отбирали через 1, 2, 3, 4 и 5 минут после включения лампы. Полученный препарат получил название: ХВП-УФ.

Инаktivацию замороженных образцов гамма-иррадиацией (объем 1 мл) проводили в контейнере для облучения γ -400 цезием-137 с мощностью дозы 2,2 Гр/мин (коэффициент вариации $\leq 10\%$) в течение 6 ч. Аликвоты отбирали через 1, 2, 4 и 6 часов воздействия. Образцы оставались замороженными в течение всего периода облучения. Полученный препарат получил название: ХВП- γ .

Аликвоты всех инаktivированных вакцинных

препаратов отбирали в установленное время и замораживали при -70 °C с последующей оценкой остаточной инфекционности вируса в пяти последовательных пассажах.

Инаktivированные образцы пятикратно последовательно пассировали в клетках Vero. На монослой культуры клеток Vero в культуральные флаконы 25 см² (SPL Lifesciences, 70125) наносили по 400 мкл исследуемой пробы. После контакта при 37 ± 1 °C в течение 1 часа монослой промывали трижды ФР и заливали по 8 мл среды Игла MEM, по два флакона на каждый вариант инаktivирования. Пассирование потенциально инфицированной культуры клеток Vero проводили каждые 7 дней. Методами МФА, титрования ФОЕ и определения вирусной РНК в ПЦР-РВ определяли выживший вирус в отобранных пробах клеточного лизата и культуральной жидкости после каждого пассажа. При отсутствии инфекционности после пяти последовательных пассажей приступали к контролю иммуногенной активности экспериментальных вакцинных препаратов.

Контроль иммуногенной активности хантавирусного вакцинного препарата выполняли на животных в соответствии с протоколом № 220921-1 от 22 сентября 2021 г., который был одобрен Комитетом по этике ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Животные были получены из филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий»

Рисунок 2. Содержание копий РНК вируса Пуумала и общего белка в полученных фракциях
Figure 2. The number of Puumala virus RNA copies and total protein in the fractions

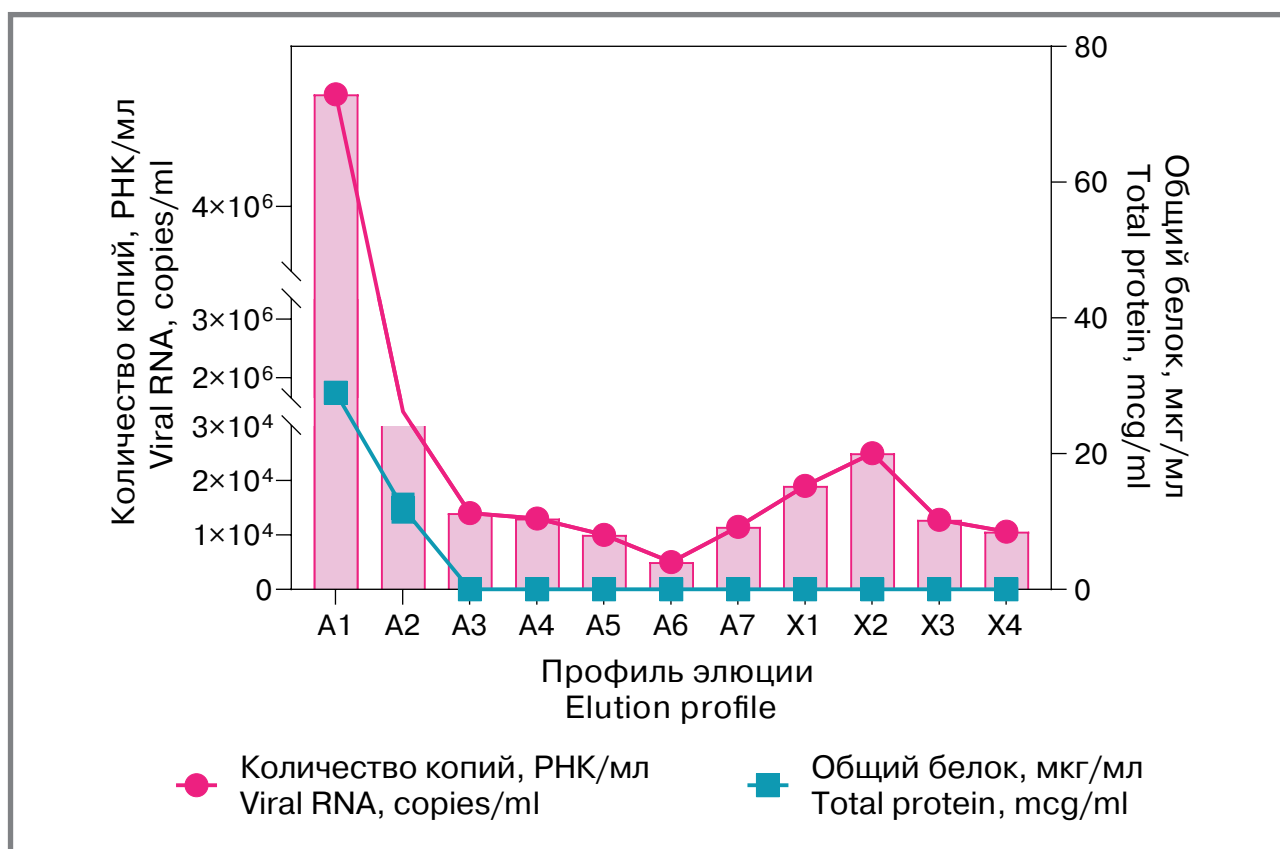
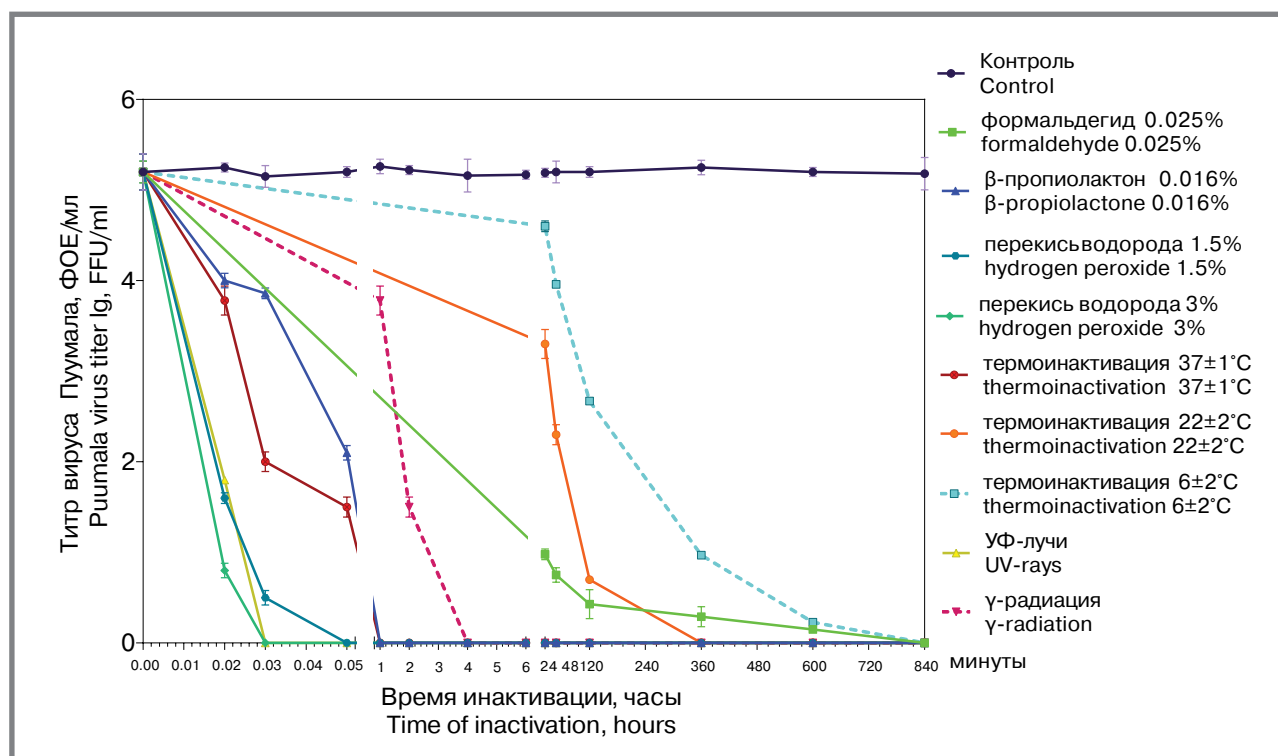


Рисунок 3. Кинетика инактивации вируса Пуумала в зависимости от способа инактивации
Figure 3. The Puumala virus inactivation kinetics depending on the method of inactivation



ФМБА. На начало исследования масса тела половозрелых самок мышей линии BALB/c составляла $20,0 \pm 2,0$ г, сирийских хомяков $46 \pm 2,0$ г. Экспериментальные животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления на протяжении всего эксперимента в специализированном виварии, сертифицированном для работы с патогенами II группы опасности. 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 г., дополненная в 2006 г., «Принципами надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009). В ходе экспериментов не было обнаружено ухудшения состояния здоровья животных.

Для определения уровня иммуногенной активности экспериментальных препаратов проводилась двукратная иммунизация животных с 14-дневным интервалом. Мышам линии BALB/c вводили 100 мкл препарата, сирийским хомякам – по 200 мкл в мышечную ткань обеих бедер. Животным контрольной группы вводился ФР в том же объеме и той же кратности. Иммунизацию и забор крови проводили в отдельном помещении – операционной, при исключении визуального и аудиального контакта животного, находившегося в эксперименте, с другими животными. Ежедневно на протяжении 28 дней от начала иммунизации учитывалось общее состояние животных визуально.

Эвтаназия животных после окончания эксперимента выполнялась декапитацией через 14 дней после второй иммунизации с тотальным забором крови.

Иммуногенную активность вакцинного препарата оценивали по уровню нейтрализующих антител (нАТ) в сыворотках крови экспериментальных животных в реакции нейтрализации (РН) по 50% подавлению фокусобразующих единиц в культуре клеток Vero (РН/ФОЕ/50), по титру специфических IgG методом иммуноферментного анализа по описанной ранее методике [28].

Статистический анализ данных

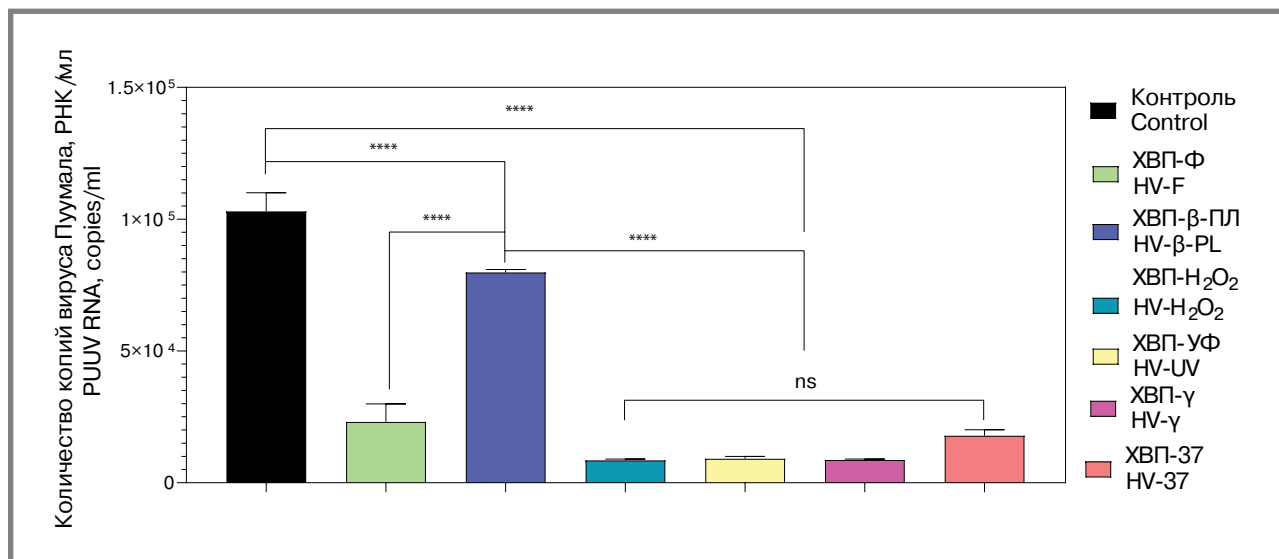
Все данные анализировали в программе GraphPad Prism версии 8.2.0. Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюка, Даннетта и Уилкинсона. Статистическая значимость для рисунков 4,5 указана как ns = несущественная, ** $p < 0,01$ и **** $p < 0,0001$.

Результаты

В процессе хроматографической очистки концентрата вируса Пуумала на мультимодальном сорбенте CC700 проводили элюирование с использованием градиента буфера В (1M NaCl). Хроматограмма, SDS-блот, вестерн-блот, титр вируса Пуумала, ПЦР-РВ, характеризующие фракции, показаны на рисунке 1. Целевыми фракциями рассматривались A1-A2, в которых титр вируса Пуумала был более $5 \pm 0,4$ lg ФОЕ/м и общий белок менее 30 ± 6 мкг/мл (рис. 1Б). SDS-PAGE использовался для оценки чистоты препарата

Рисунок 4. Снижение числа копий РНК/мл вируса при инаktivировании различными химическими и физическими методами

Figure 4. The Puumala virus RNA/ml copies number reduction during inactivation by various chemical and physical methods



и идентификации примесных белков в образцах (данные не показаны). Была подтверждена степень очистки на СС700, визуально наличие балластных белков в исследуемых фракциях не определялось. Вестерн-блот с антителами к белкам вируса Пуумала подтвердил, что специфический антиген превалировал в А1-А2 фракциях (рис. 1В). В этих же фракциях определялись максимальный титр вируса Пуумала и количество копий вирусной РНК (рис. 2).

Таким образом, для вакцинного препарата были отобраны фракции с титром вируса более $5 \pm 0,4$ lg ФОЕ/мл и общим белком менее 30 ± 6 мкг/мл. В окончательном виде экспериментальный вакцинный препарат состоял из пула фракций А1+А2, разведенного физиологическим раствором до содержания вируса $4,5 \pm 0,3$ lg ФОЕ/мл ($1 \times 10^4 \pm 98$ копий вирусной РНК/мл) и общего белка менее 20 ± 6 мкг/мл.

Полная инаktivация вируса Пуумала 0,025% формальдегидом при инкубации на шейкере при 6 ± 2 °C достигалась на 28–30-е сутки (рис. 3), что соответствовало термической инаktivации вируса при этой температуре и подтверждает полученные ранее результаты [10]. Термическая инаktivация при температуре 22 ± 2 °C заняла 2 недели, а при 37 ± 1 °C – сутки. β-пропиолактон в конечном разведении 0,016% инаktivировал вирус Пуумала в течение часа. Следует отметить, что при таком разведении время естественного гидролиза β-пропиолактона составляет 3 часа [12].

Полная инаktivация вируса в присутствии 3% H₂O₂ была достигнута через 5 минут и 1,5% – через 30 минут. УФ-лучи инаktivировали вирус за 1 минуту, а γ-иррадиация – за 4 часа. Необходимым условием для гамма-иррадиации было поддержание проб в замороженном состоянии на протяжении всего эксперимента.

Самое высокое содержание РНК вируса Пуумала в инаktivированных образцах было обнаружено

после инаktivации β-пропиолактоном (рис. 4). Как УФ-лучи, так и γ-иррадиация значительно повреждала геном вируса, что было подтверждено снижением количества копий РНК/мл более чем в 20 раз по сравнению с β-пропиолактоном. Степень повреждения РНК не повлияла на обнаружение вирусных белков в иммуноблоте с референс-сывороткой реконвалесцента ГЛПС (см. рис. 4).

После иммунизации мышей BALB/c вакцинными препаратами, инаktivированными различными способами, побочных эффектов, как местных, так и общих, не наблюдалось. Нарастание массы тела было равномерным во всех группах без отклонений.

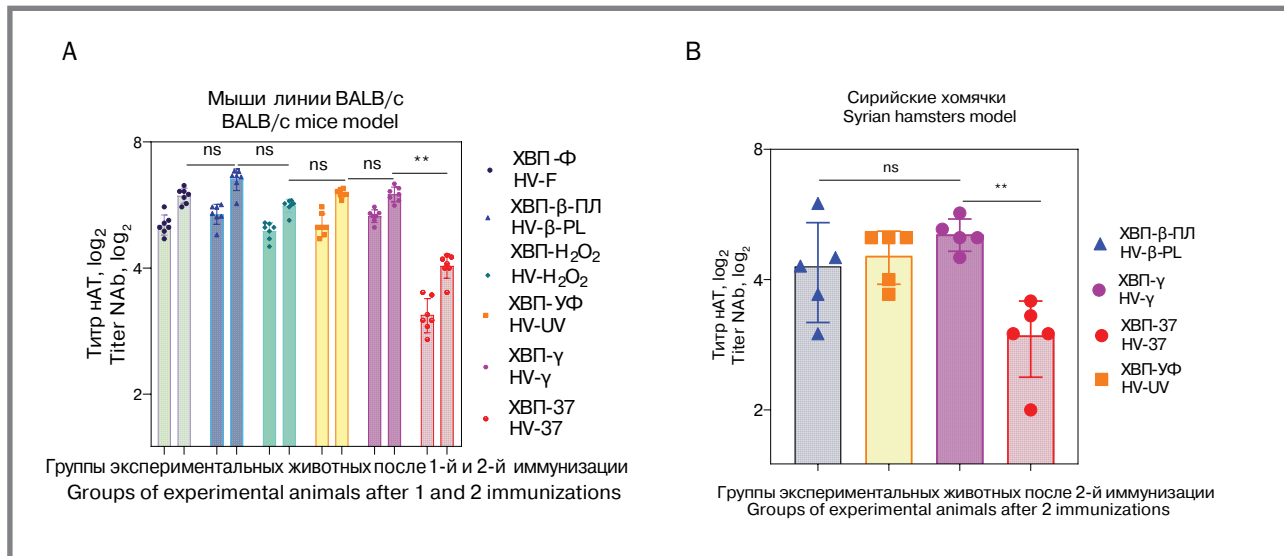
Разницы в иммунном ответе (титр нейтрализующих антител) после инаktivации вируса формальдегидом, β-пропиолактоном, перекисью водорода, гамма- и УФ излучением, как после первой, так и после второй иммунизации не наблюдали (рис. 5). Исключение составил ХВП-37, уровень иммуногенной активности которого был значительно ниже ($p < 0,0001$).

Стоит отметить, что во всех испытываемых группах наблюдали статистически значимое нарастание титра НАТ от 14-го и 28-го дня после первой иммунизации. Среднее значение нейтрализующих антител после первой иммунизации составило $5,15 \pm 0,4 \log_2$, а после второй – $6,03 \pm 0,3 \log_2$. Титры IgG, обнаруженные методом ИФА в сыворотке крови мышей BALB/c, коррелировали с титром НАТ. Аналогичные результаты были получены в эксперименте на сирийских хомяках, однако иммунный ответ был незначительно ниже, что может быть связано с видовыми отличиями иммунной системы животных.

Закключение

Выполненные исследования позволили сделать следующие выводы.

Рисунок 5. Титр нейтрализующих антител (НАТ) в сыворотках крови мышей BALB/c после первой (I) и второй (II) иммунизации (А) и сирийских хомячков после второй иммунизации (В) хантавирусным вакцинным препаратом (ХВП), инактивированным физическими и химическими способами
Figure 5. Neutralizing antibodies (NAb) titer in the blood sera of BALB/c mice after the first (I) and second (II) immunizations (A) and Syrian hamsters after the second immunization (B) with hantavirus vaccine (HV) inactivated by physical and chemical methods



Сорбент СС700, которому свойственно разделение и по массе, и по отношению к ионной силе раствора, позволяет осуществлять максимальную очистку от балластных белков, что делает его перспективным для использования на стадии препаративной хроматографической очистки хантавирусов.

В производстве инактивированных вакцин выбор инактивирующего агента основывается на максимальной сохранности исходной антигенной структуры вируса при необратимом повреждении его репликативного механизма.

Основными показателями качества инактивированных вакцинных препаратов являются их безопасность и высокая иммуногенность. При введении мышам BALB/c и сирийским хомякам экспериментальных хантавирусных вакцинных препаратов каких-либо побочных эффектов не наблюдали. Выраженная иммуногенная активность вакцинных препаратов, инактивированных различными химическими и физическими методами, за исключением термоинактивации, позволяет судить о сохранности иммуногенных эпитопов, независимо от степени повреждения вирусной РНК.

Наиболее перспективным химическим инактиватором, по результатам наших исследований, является β-пропиолактон, использование которого при конструировании вакцинных препаратов обеспечивает высокую иммуногенную активность. Существенными технологическими преимуществами бета-пропиолактона являются короткое время инактивирования вируса и полный распад его

на нетоксичные соединения в течение нескольких часов при комнатной температуре, совпадающее со временем инактивации вируса, а также сниженное содержание общего белка в препарате.

Физические методы инактивации пока не получили практического применения, возможно, это связано с проблемой контролируемого дозирования, особенно при масштабировании технологического процесса производства.

Экспериментально доказана возможность применения γ-иррадиации и УФ-лучей при производстве инактивированного вакцинного препарата против вируса Пуумала. При существенном повреждении генома вируса белковая оболочка под воздействием γ-иррадиации и УФ-лучей, по всей вероятности, повреждается незначительно, что подтверждается высокой иммуногенной активностью соответствующих инактивированных препаратов. Несомненным достоинством этих способов инактивирования вирусов является отсутствие химических соединений (инактивирующих агентов) в составе вакцинного препарата. В этой связи целесообразным является проведение дальнейших исследований по технологическому усовершенствованию и масштабированию физических методов инактивации вирусов.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 122041800054-7, на базе ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Литература

- Kruger D.H., Figueiredo L.T.M., Song J.W., et al. Hantaviruses — globally emerging pathogens. *Journal of clinical virology*. 2015. Vol. 64, P. 128–136.
- Parvate A., Williams E.P., Taylor M.K., et al. Diverse Morphology and Structural Features of Old and New World Hantaviruses. *Viruses*. 2019. Vol. 11, № 9, P. 862.

3. Современные технологии конструирования вакцин для профилактики хантавирусных лихорадок: Современные вакцины: технологии разработки и области применения. Ткаченко Е. А., Дзагурова Т. К., Ткаченко П. Е., Ишмухаметов А. А., ред. М.: ООО «Группа Ремедиум», 2017. С. 103–147.
4. Jagannathan S., Gandhi P. R., Vijayakumar R. Kinetics analysis of beta-propiolactone with tangential flow filtration (TFF). *Journal of Biological Sciences*. 2013. Vol. 13. № 6. P. 521–527.
5. Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Вурусны и вирусные вакцины. М.: Библионика; 2007. С. 524.
6. Li N., Qiao Q.L., Guo H.F., et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a novel Senecavirus A strain-based inactivated vaccine in mice. *Research in Veterinary Science*. 2022. Vol. 142. P. 133–140.
7. Zhou Y., Hu X., Chen R., et al. Impact of maternal and pre-existing antibodies on immunogenicity of inactivated rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2022. Vol. 40, № 28. P. 3843–3850.
8. Berber E., Çanakoğlu N., Tonbak Ş., et al. Development of a protective inactivated vaccine against Crimean–Congo hemorrhagic fever infection. *Heliyon*. 2021. Vol. 7. № 10.
9. Chen H., Xie Z., Long R., et al. Immunological evaluation of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in rhesus macaques. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*. 2021. Vol. 23. P. 108–118.
10. 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. Т. 6. С. 47–53.
11. Egorova M.S., Kurashova S.S., Dzagurova T.K., et al. Effect of Virus-Inactivating Agents on the Immunogenicity of Hantavirus Vaccines against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56. P. 940–947.
12. Lei S., Gao X., Sun Y., et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of β -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018. Vol. 8. № 6. P. 373–377.
13. Ronchi G.F., Testa L., Iorio M., et al. Immunogenicity and safety studies of an inactivated vaccine against Rift Valley fever. *Acta Tropica*. 2022. Vol. 232. P. 106498.
14. Li A., Dai X., Chen L., et al. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated SFTS vaccine candidate in mice. *Biosafety and Health*. 2022. Vol. 4. № 1. P. 45–52.
15. Курашова С. С., Ишмухаметов А. А., Егорова М. С. и др. Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2018. Т. 17. № 4. С. 26–29.
16. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., et al. Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides implications for the inactivation of viruses. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286. № 42. P. 36198–36214.
17. Walker J.M., Raué H.P., Slika M.K. Characterization of CD8+ T cell function and immunodominance generated with an H_2O_2 -inactivated whole-virus vaccine. *Journal of virology*. 2012. Vol. 86. № 24. P. 13735–13744.
18. Archana T., Poer DeRaad D., Slika M., et al. Advanced oxidation technology for the development of a next-generation inactivated West Nile virus vaccine. *Vaccine*. 2019. Vol. 37. № 30. P. 4214–4221.
19. Abd-Elghaffar A.A., Ali A.E., Boseila A.A., et al. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. *Vaccine*. 2016. Vol. 34. № 6. P. 798–802.
20. Termini J. Hydro peroxide – induced DNA damage and mutations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000. Vol. 450, № 1–2. P. 107–124.
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. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275. № 35. P. 26732–26742.
22. Tanaka T., Nogariya O., Shionoiri N., et al. Integrated molecular analysis of the inactivation of a non-enveloped virus, feline calicivirus, by UV-C radiation. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2018. Vol. 126. № 1. P. 63–68.
23. Vaidya V., Dhare R., Agnihotri S., et al. Ultraviolet-C irradiation for inactivation of viruses in foetal bovine serum. *Vaccine*. 2018. Vol. 36. № 29. P. 4215–4221.
24. Campbell C. H. Immunogenicity of bluetongue virus inactivated by gamma irradiation. *Vaccine*. 1985. Vol. 3. № 5. P. 401–406.
25. Marennikova S. S., Macevič G. R. Experimental study of the role of inactivated vaccine in two-step vaccination against smallpox. *Bulletin of the World Health Organization*. 1975. Vol. 52. № 1. P. 51.
26. Elliott L.H., McCormick J.B., Johnson K.M. Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1982. Vol. 16. № 4. P. 704–708.
27. Furuya Y. Return of inactivated whole-virus vaccine for superior efficacy. *Immunology and cell biology*. 2012. Vol. 90. № 6. P. 571–578.
28. Дзагурова Т. К., Ткаченко Е. А., Ишмухаметов А. А. и др. Штамм вируса для изготовления вакцинных препаратов против геморрагической лихорадки с почечным синдромом (варианты), Патент МПК C12N7/00, № 2683508С1. Россия. 2019.
29. Егорова М. С., Курашова С. С., Ишмухаметов А. А. и др. Разработка метода количественного определения вирусной РНК для контроля специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Вопросы вирусологии. 2021. Т. 66. № 1. С. 65–73.
30. Waterborg J.H. The Lowry method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*. 2009. P. 7–10.

References

1. Kruger DH, Figueiredo LTM, Song JW, et al. Hantaviruses—globally emerging pathogens. *Journal of clinical virology*. 2015;64:128–136. doi: 10.1016/j.jcv.2014.08.033
2. Parvate A., Williams EP, Taylor MK, et al. Diverse Morphology and Structural Features of Old and New World Hantaviruses. *Viruses*. 2019;11(9):862. doi: 10.3390/v11090862
3. Modern technologies for the construction of vaccines for the prevention of hantavirus fever: Modern vaccines: development technologies and applications. Ed.: Tkachenko EA, Dzagurova TK, Tkachenko PE, Ishmukhametov AA. M.: Remedium Group LLC; 2017. P. 103–147 (In Russ.).
4. Jagannathan S, Gandhi PR, Vijayakumar R. Kinetics analysis of beta-propiolactone with tangential flow filtration (TFF). *Journal of Biological Sciences*. 2013;13(6):521–527. doi: 10.3923/jbs.2013.521.527
5. Sergeev VA, Nepoklonov EA, Aliper TI. Virusy i virusnye vakciny. M.: Bibliionika, 2007. P. 524 (In Russ.).
6. Li N, Qiao QL, Guo HF, et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a novel Senecavirus A strain-based inactivated vaccine in mice. *Research in Veterinary Science*. 2022;142:133–140. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.12.010
7. Zhou Y, Hu X, Chen R, et al. Impact of maternal and pre-existing antibodies on immunogenicity of inactivated rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2022;40(28):3843–3850. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.05.036
8. Berber E, Çanakoğlu N, Tonbak Ş, et al. Development of a protective inactivated vaccine against Crimean–Congo hemorrhagic fever infection. *Heliyon*. 2021;7(10). doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08161
9. Chen H, Xie Z, Long R, et al. Immunological evaluation of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in rhesus macaques. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*. 2021;23:P. 108–118. doi: 10.1016/j.omtm.2021.08.005
10. Tkachenko EA, Ishmukhametov AA, Dzagurova TK, et al. Razrabotka eksperimental'no-promyshlennoj tekhnologii proizvodstva vakciny dlya profilaktiki gemoragicheskoy lihoradki s pochechnym sindromom. Remedium. Zhurnal o rossijskom rynke lekarstv i medicinskoj tekhnike. 2015;6:47–53 (In Russ.).
11. Egorova MS, Kurashova SS, Dzagurova TK, et al. Effect of Virus-Inactivating Agents on the Immunogenicity of Hantavirus Vaccines against Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020;56: 940–7. doi: 10.1134/S0003683820090045
12. Lei S, Gao X, Sun Y, et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of β -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018;8(6):373–7. doi: 10.1016/j.jpba.2018.06.003
13. Ronchi GF, Testa L, Iorio M, et al. Immunogenicity and safety studies of an inactivated vaccine against Rift Valley fever. *Acta Tropica*. 2022;232:106498. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106498
14. Li A, Dai X, Chen L, et al. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated SFTS vaccine candidate in mice. *Biosafety and Health*. 2022;4(1):45–52. doi: 10.1016/j.bshealth.2021.12.008
15. Kurashova SS, Ishmukhametov AA, Egorova MS, et al. Comparative Characteristics of Inactivation Agents for HFRS Vaccine Development. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(4):26–9 (In Russ.). doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29
16. Uittenbogaard JP, Zomer B, Hoogerhout P, et al. Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides implications for the inactivation of viruses. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(42):36198–36214. doi: 10.1074/jbc.M111.279232
17. Walker JM, Raué HP, Slika MK. Characterization of CD8+ T cell function and immunodominance generated with an H_2O_2 -inactivated whole-virus vaccine. *Journal of Virology*. 2012;86(24):13735–13744. doi: 10.1128/JVI.02178-12
18. Archana T, Poer DeRaad D, Slika M, et al. Advanced oxidation technology for the development of a next-generation inactivated West Nile virus vaccine. *Vaccine*. 2019;37(30):4214–4221. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.12.020
19. Abd-Elghaffar AA, Ali AE, Boseila AA, et al. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. *Vaccine*. 2016;34(6):798–802. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.041
20. Termini J. Hydro peroxide – induced DNA damage and mutations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000;450(1–2):107–124. doi: 10.1016/S0027-5107(00)00019-1
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. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(35):26732–26742. doi: 10.1074/jbc.M001450200
22. Tanaka T, Nogariya O, Shionoiri N, et al. Integrated molecular analysis of the inactivation of a non-enveloped virus, feline calicivirus, by UV-C radiation. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2018;126(1):63–8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.018

23. Vaidya V, Dhare R, Agnihotri S, et al. Ultraviolet-C irradiation for inactivation of viruses in foetal bovine serum. *Vaccine*. 2018;36(29):4215–4221. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.06.008
24. Campbell C. H. Immunogenicity of bluetongue virus inactivated by gamma irradiation. *Vaccine*. 1985;3(5):401–6. doi: 10.1016/0264-410x(85)90131-8
25. Marennikova SS, Macevič GR. Experimental study of the role of inactivated vaccine in two-step vaccination against smallpox. *Bulletin of the World Health Organization*. 1975;52(1):51.
26. Elliott LH, McCormick JB, Johnson KM. Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1982;16(4):704–8. doi: 10.1128/jcm.16.4.704-708.1982
27. Furuya Y. Return of inactivated whole-virus vaccine for superior efficacy. *Immunology and cell biology*. 2012;90(6):571–8. doi: 10.1038/icb.2011.70
28. Dzagurova TK, Tkachenko EA, Ishmukhametov AA, et al. Virus strain for producing vaccine drugs against hemorrhagic fever with renal syndrome (options). Patent IPC C12N7/00, No. 2683508C1. Russia. 2019 (In Russ.).
29. Egorova MS, Kurashova SS, Ishmukhametov AA, et al. Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Voprosy Virusologii*. 2021;66(1):65–73 (In Russ.). doi: 10.36233/0507-4088-30
30. Waterborg JH. The Lowry method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*. 2009;7–10. doi: 10.1385/0-89603-062-8:1

Об авторах

- **Светлана Сергеевна Курашова** – к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +79653093241, kurashova_ss@chumakovs.su. ORCID 0000-0001-9934-699X
- **Мария Сергеевна Егорова** – к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +79773541619, masha_0787@mail.ru, ORCID 0000-0003-3642-6444
- **Мария Владимировна Баловнева** – к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +79067535180, MashaSm@yandex.ru, ORCID 0000-0003-2198-7521
- **Анна Николаевна Ветрова** – лаборант-исследователь лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +79152736028, ann.vetr.99@mail.ru, ORCID 0000-0003-1143-9732
- **Александра Сергеевна Балкина** – научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +79296637029, ale-bal@yandex.ru, ORCID 0000-0002-9704-7774
- **Ростислав Дмитриевич Теодорович** – научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +79621389452, rostislavteo@mail.ru, ORCID 0000-0003-2117-597X
- **Владимир Геннадьевич Петров** – к. х. н., доцент, химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова.
- **Тамара Казбековна Дзагурова** – д. м. н., заведующая лабораторией геморрагических лихорадок ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +7(495)531-01-70 (лаб. 37-20), dzaguron@gmail.com
- **Евгений Александрович Ткаченко** – д. м. н., руководитель научного направления ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). +7(985)784-30-51, evgeniytkach@mail.ru, ORCID 0000-0002-6829-1241

Поступила: 12.02.2024. Принята к печати: 06.05.2024.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0,

About the Authors

- **Kurashova Svetlana Sergeevna** – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers of M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute). +79653093241, kurashova_ss@chumakovs.su. ORCID 0000-0001-9934-699X
- **Maria S. Egorova** – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers of M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute). +79773541619, masha_0787@mail.ru. ORCID 0000-0003-3642-6444
- **Maria V. Balovneva** – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers of M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute). +79067535180, MashaSm@yandex.ru. ORCID 0000-0003-2198-7521
- **Anna N. Vetrova** – research laboratory assistant of Hemorrhagic of M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute). +79152736028, ann.vetr.99@mail.ru, ORCID 0000-0003-1143-9732
- **Alexandra S. Balkina** – Researcher of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers of M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute). +79296637029, ale-bal@yandex.ru, ORCID 0000-0002-9704-7774
- **Rostislav D. Teodorovich** – Researcher of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers of M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute). +79621389452, rostislavteo@mail.ru, ORCID 0000-0003-2117-597X
- **Vladimir G. Petrov** – Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University. +79163221713, vladimir.g.petrov@gmail.com, ORCID 0000-0001-6071-8127
- **Tamara K. Dzagurova** – Dr. Sci. (Med.), Head of the laboratory of hemorrhagic fevers of M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute). +7(495)531-01-70 (lab. 37-20), dzaguron@gmail.com. ORCID 0000-0002-6656-1682
- **Evgeniy A. Tkachenko** – Dr. Sci. (Med.), Scientific supervisor of M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Drugs of the Russian Academy of Sciences (Polio Institute). +7(985)784-30-51, evgeniytkach@mail.ru, ORCID 0000-0002-6829-1241

Received: 12.02.2024. Accepted: 06.05.2024.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0,