



Иммуногенные свойства препарата, содержащего инактивированный β -пропиолактоном антиген вируса Чикунгунья

Игнатьев Г.М.^{1✉}, Каа К.В.¹, Антонова Л.П.¹, Отрашевская Е.В.², Ишмухаметов А.А.¹

¹Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Случаи лихорадки Чикунгунья зарегистрированы более чем в 100 странах Европы, Океании, Африки, Азии, Карибского бассейна, Америки. Поражения скелетно-мышечной системы, характерные для лихорадки Чикунгунья, могут длиться от нескольких месяцев до года и даже приводить к утрате трудоспособности. Считается, что перенесённая инфекция обеспечивает пожизненный иммунитет. Этот фактор, наряду с отсутствием специфической терапии, делает вакцинацию наиболее перспективным путём профилактики лихорадки Чикунгунья.

Целью настоящей работы было лабораторное изучение иммуногенных свойств препарата, содержащего инактивированный бета-пропиолактоном (β -ПЛ) антиген вируса Чикунгунья (ЧИКВ).

Материалы и методы. Очищенный инактивированный препарат с разными дозами антигена ЧИКВ был введён внутримышечно мышам BALB/c дважды с интервалом 14 сут. В динамике оценивали показатели гуморального и клеточного иммунитета в тестах ИФА, реакции нейтрализации и пролиферации спленоцитов.

Результаты. В ответ на введение инактивированного препарата антигена ЧИКВ наиболее выраженный иммунный ответ в ИФА и реакции нейтрализации отмечался для дозы 40 мкг. Стимуляция специфическим антигеном ЧИКВ вызывала выраженную пролиферацию спленоцитов иммунных животных. Максимальные показатели гуморального и клеточного иммунитета были отмечены у иммунизированных животных через 14 дней после 2-го введения препарата и сохранялись до конца срока наблюдения.

Обсуждение. Очищенный препарат, содержащий инактивированный β -ПЛ антиген ЧИКВ, обладал выраженными иммуногенными свойствами. Препарат, введённый мышам BALB/c двукратно с дозой инактивированного антигена ЧИКВ 40 мкг, вызывал формирование специфического гуморального иммунитета, характеризующегося появлением иммуноглобулинов класса G, обладающих вируснейтрализующей активностью, и формирование специфического клеточного ответа, характеризующегося пролиферацией спленоцитов в ответ на стимуляцию специфическим антигеном ЧИКВ.

Заключение. Очищенный инактивированный β -ПЛ препарат антигена ЧИКВ в дозе 40 мкг после двукратного введения мышам линии BALB/c продемонстрировал выраженную иммуногенность. Разработанный препарат может быть оценён как перспективный для профилактики лихорадки Чикунгунья с использованием дозы и схемы, апробированных в данном исследовании.

Ключевые слова: инактивированный антиген вируса Чикунгунья, мыши BALB/c, гуморальный и клеточный иммунитет

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Федерального научного центра исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (протокол № 2/20 от 26.03.2020).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Игнатьев Г.М., Каа К.В., Антонова Л.П., Отрашевская Е.В., Ишмухаметов А.А. Иммуногенные свойства препарата, содержащего инактивированный β -пропиолактоном антиген вируса Чикунгунья. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):519–527.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-159>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-159>

Immunogenic properties of the preparation containing the Chikungunya virus antigen inactivated by β -propiolactone

Georgy M. Ignatyev^{1✉}, Konstantin V. Kaa¹, Lilia P. Antonova¹, Alena V. Atrasheuskaya², Aidar A. Ishmukhametov¹

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Cases of Chikungunya fever have been reported in more than 100 countries in Europe, Oceania, Africa, Asia, the Caribbean, and America. The musculoskeletal disorders typical for Chikungunya fever can last from several months to a year and even lead to disability. The infection is believed to provide lifelong immunity. This factor and the lack of specific therapy make vaccination the most promising method for preventing Chikungunya fever.

Materials and methods. The purified inactivated preparation with the different doses of the CHIKV antigen was injected intramuscularly to BALB/c mice twice with an interval of 14 days. Indicators of humoral and cellular immunity were assessed in dynamics in ELISA, the neutralization test and proliferation test of splenocytes.

Results. The purified preparation containing the CHIKV antigen inactivated by beta-propiolactone had pronounced immunogenic properties. The most prominent immune response in ELISA and neutralization test was registered for a dose of 40 μ g. Stimulation with the specific CHIKV antigen caused a pronounced proliferation of animals' splenocytes. The peak values of specific humoral and cellular immunity parameters were registered 14 days after the second injection.

Discussion. The purified preparation containing the CHIKV antigen inactivated by beta-propiolactone had demonstrated the sufficient immunogenic properties. The immunizing dose of 40 μ g CHIKV selected as a result of the studies caused in BALB/c mice the development of the humoral immunity characterized by the specific IgG with neutralizing activity, and the specific cell immunity characterized by the animals' splenocytes proliferation after stimulation with CHIKV antigen.

Conclusion. The purified β -PL inactivated preparation of the CHIKV antigen at a dose of 40 μ g to demonstrated pronounced immunogenicity in BALB/c mice after two-dose immunization. The developed preparation can be considered as promising for the prevention of Chikungunya fever using the dose and scheme tested in this study.

Keywords: *inactivated virus Chikungunya antigen, mice BALB/c, humoral and cell immunity*

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of RAS (protocol No. 2/20, 26.03.2020).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Ignatyev G.M., Kaa K.V., Antonova L.P., Atrasheuskaya A.V., Ishmukhametov A.A. Immunogenic properties of the preparation containing the Chikungunya virus antigen inactivated by beta-propiolactone. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):519–527. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-159>

Введение

Лихорадка Чикунгунья (ЛЧ) представляет собой космополитический арбовирус, передающийся преимущественно комарами из рода *Aedes* (*A. aegypti* и *A. albopictus*). Подавляющее количество случаев ЛЧ — симптоматические (75–95%) [1]. Типичными симптомами ЛЧ являются высокая температура и поражения скелетно-мышечной системы, которые могут длиться от нескольких месяцев до года и более с утратой трудоспособности. Летальность при ЛЧ невысокая, с преимущественной регистра-

цией среди новорождённых, престарелых, а также пациентов с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем [2].

Такие факторы, как глобальное потепление, вырубка лесов и урбанизация, ведут к росту распространения арбовирусных инфекций, в том числе ЛЧ [3]. В 2007 г. локальная передача инфекции была впервые отмечена в Европе, когда в ходе локализованной вспышки на северо-востоке Италии было выявлено 197 заболевших. Тем самым подтвердилась возможность вспышек заболеваний, передава-

емых комарами *A. albopictus*, на территории Европы [4, 5]. Случаи ЛЧ зарегистрированы более чем в 100 странах Европы, Океании, Африки, Азии, Карибского бассейна, Южной и Северной Америки [4, 5].

РНК вируса Чикунгунья (далее — ЧИКВ) достаточно консервативна. Циркулирующие генотипы ЧИКВ генетически близки и составляют единый серотип. Перекрестная защита между разными штаммами ЧИКВ, а также взаимная перекрестная защита среди других альфа-вирусов были продемонстрированы на животных моделях [6, 7]. Считается, что перенесённая инфекция ЧИКВ обеспечивает пожизненный иммунитет, повторные случаи инфицирования практически не регистрируются [8–10]. Этот фактор, наряду с отсутствием специфической терапии как самой инфекции, так и её последствий, делает вакцинацию наиболее перспективным путём профилактики ЛЧ.

Впервые кандидатная вакцина для профилактики ЛЧ была разработана более 50 лет назад, когда V.R. Harrison и коллеги, используя инактивированный формалином штамм ЧИКВ 15561, получили специфический иммунный ответ у мышей и обезьян [11]. Для разработки профилактических вакцин против ЧИКВ используются разные технологические платформы. Вакцины на основе одного штамма ЧИКВ могут обеспечить длительную перекрестную защиту против гетерологичных штаммов вируса, что было продемонстрировано в экспериментах на мышах и макаках, несмотря на высокую вирулентность, проявленную некоторыми изолятами ЧИКВ [12].

Технология производства инактивированных вакцин является традиционной и успешной для большого количества вирусных вакцин. Данная технологическая платформа признана одной из наиболее безопасных [5], и разработка таких вакцин не требует генетических манипуляций с вирусом. Две формалин-инактивированные вакцины были разработаны с использованием разных штаммов ЧИКВ — азиатского 15561 и индийского DRDE-06, а также клеточной линии Vero и затем успешно прошли доклинические исследования на лабораторных животных, продемонстрировав свой иммуногенный потенциал [11, 13]. В относительно небольших сравнительных исследованиях на мышах линии BALB/c продемонстрировано преимущество инактивированного β -пропиолактоном (β -ПЛ) препарата антигена ЧИКВ над формалин-инактивированным препаратом в формировании специфического гуморального и клеточного иммунитета [14]. Атенуированные вакцины, разработанные для профилактики ЛЧ, ранее продемонстрировали высокую реактогенность в клинических исследованиях, в том числе за счёт реверсии мутаций в гене E2 ЧИКВ [5].

Целью настоящей работы было изучение иммуногенных свойств препарата, содержащего инак-

тивированный β -ПЛ антиген штамма Nic ЧИКВ (GenBank асс. по MN271692). Данный штамм ЧИКВ был адаптирован к клеточной линии Vero, наработан и инактивирован с помощью β -ПЛ. Очищенный препарат был внутримышечно введён мышам дважды с интервалом 14 дней; показатели гуморального и клеточного иммунитета были оценены в динамике.

Материалы и методы

Вирус. В работе был использован штамм Nic ЧИКВ, полученный из рабочей коллекции вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН. История выделения и пассирования штамма ЧИКВ описана ранее [15]. Нуклеотидная последовательность штамма ЧИКВ представлена в GenBank, асс.по MN271692.

Клетки. Клетки Vero (производственный банк клеток ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН) культивировали в среде Игла MEM (производство ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН) с 5% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота («Gibco»).

Лабораторные животные. В исследовании использовали мышей линии BALB/c (гаплотип H-2^d) обоего пола массой 12–14 г. Животные были получены из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА.

Препараты. Для получения инактивированного препарата ранее адаптированный штамм Nic ЧИКВ нарабатывали на клетках Vero при роллерном культивировании. Множественность заражения составляла 0,0001 ТЦД₅₀ на 1 клетку. Инактивацию ЧИКВ проводили β -ПЛ в соотношении 1 : 1000 в течение 48 ч при 5°C при постоянном перемешивании. Инактивированную вирусосодержащую жидкость концентрировали в 50 раз методом ультрафильтрации с помощью концентратора «Vivaflow 100» («Sartorius»). Полученный инактивированный вирусный концентрат очищали с помощью эксклюзионной хроматографии на сорбенте «Sephacrose-6FF» («GE Healthcare»). Внутрипроизводственные контроли подтвердили стерильность препарата и отсутствие эндотоксинов. Содержание остаточной ДНК клеток Vero было менее 5 нг/мл, pH 7,4. Далее препарат инактивированного и очищенного антигена ЧИКВ был сорбирован на гидроксиде алюминия. Содержание гидроксида алюминия в конечной дозе препарата составляло 0,46 мкг на дозу. Инактивированный препарат ЧИКВ был произведён с разным содержанием антигена: 10, 25 и 40 мкг в одной дозе препарата. Однократно вводимый объём препарата составлял 0,5 мл.

Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения содержания антигена ЧИКВ проводили с помощью набора «БиоСкрин-Чикунгунья комплект G» («Биосервис») в соответствии с инструкцией производителя. Для калибровки использовали очищенный по описанной выше методике инак-

вирусовый ЧИКВ с известной концентрацией общего белка, который определяли по методу Лоури без осаждения в соответствии с ОФС «Определение белка» XIV Государственной фармакопеи РФ.

ИФА для определения титра антител ЧИКВ. Очищенный инактивированный антиген ЧИКВ сорбировали на 96-луночные планшеты в концентрации 100 нг на лунку в 0,01 М карбонат-гидрокарбонатном буфере с рН 9,6. Блокировку производили фосфатно-солевым буфером рН 7,2 с 1% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота («Gibco»). Перед проведением анализа образец сыворотки разводили 1 : 100 и далее шагом 2 — до 1 : 12 800. Инкубацию антигена с полученными сыворотками проводили при 37°C в течение 1 ч. Инкубацию со вторичным антивидовым НRP-конъюгатом проводили также при 37°C в течение 1 ч.

Иммунный комплекс выявляли с помощью готового субстрата ТМВ. Остановку реакции производили 2 М серной кислотой. Учёт реакции проводили при длине волны 450 нм. Каждое разведение сыворотки оценивали в 3 повторях.

Исследование пролиферативной активности спленоцитов. Оценку пролиферации спленоцитов осуществляли фотометрическим методом по ранее описанной методике [16]. Стоковый раствор PMS («Sigma»), приготовленный на фосфатно-солевом буфере (40 мкг/мл), длительное время хранился при –20°C в защищённом от света месте. Приготовление стокового раствора ХТТ («Sigma») на фосфатно-солевом буфере (1,25 мг/мл) проводили непосредственно перед использованием. Готовую смесь реагентов (ХТТ : PMS = 4 : 1) стерилизовали пропусканием через фильтр «Millex» (0,22 мкм, «Millipore») и добавляли в лунки (50 мкл/лунку) за 8 ч до окончания периода инкубации.

Оптическую плотность (ОП) регистрировали при длине волны 450 нм против контрольной длины волны 630 нм.

Результат теста рассчитывали по формуле:

$$ИС = ОП_C / ОП_K,$$

где ИС — индекс стимуляции; ОП_С — ОП в лунке со стимулированными спленоцитами; ОП_К — ОП в контрольных лунках.

При изучении клеточного иммунитета использовали следующие антигены: антиген ЧИКВ, инактивированный β-ПЛ (5 мкг/мл); антиген вируса SARS-CoV-2 — штамм Aydar-1, инактивированный β-ПЛ (5 мкг/мл), а также митогены: конканавалин А (КонА, «ICN», 5 мкг/мл) и липополисахарид *Salmonella typhimurium* (ЛПС, «Sigma», 5 мкг/мл). Каждый антиген и митоген использовали для стимуляции спленоцитов животных в 4 повторях.

Реакцию нейтрализации (РН) проводили по ранее описанной методике [13] на 96-луночных планшетах с использованием культуры клеток Vero

и того же штамма ЧИКВ в дозе 100 ТЦД₅₀. Полученный результат переводили в log₂ для статистической обработки.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016». Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения среднего. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Дизайн исследования. Животные были разделены на группы по 25 мышей в каждой:

- группа А — иммунизированы внутримышечно препаратом в дозе 10 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента;
- группа В — иммунизированы внутримышечно препаратом в дозе 25 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента;
- группа С — иммунизированы внутримышечно препаратом в дозе 40 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента;
- группа D — контрольные животные, иммунизированные внутримышечно препаратом гидроксида алюминия в дозе 0,46 мкг/0,5 мл на 0-е и 14-е сутки эксперимента.

Иммунизацию животных проводили внутримышечно (бедренная мышца), разделив 1 дозу на 2 введения, по 0,25 мл препарата в каждую конечность. У животных всех групп до проведения 1-й иммунизации (0-е сутки), до проведения 2-й иммунизации (на 14-е сутки), а также на 21, 28 и 35-е сутки эксперимента (7, 14 и 21-е сутки после 2-й иммунизации соответственно) производили забор крови из глазной вены. Кровь пулировали, после центрифугирования разливали по пробиркам в объёме 200 мкл и хранили при –70°C для последующего одномоментного исследования. Во всех группах на каждую точку забора крови использовали 4 животных.

У животных групп С и D одновременно со взятием крови выделяли селезёнку для дальнейшего получения суспензии спленоцитов.

Все процедуры на отдельных мышах проводили вне визуального, аудиального или обонятельного контакта с другими животными. Работу с животными проводили в соответствии с международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» ETS № 123 (Страсбург, 1986), Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Результаты

Доза препарата, содержащего 10 мкг антигена ЧИКВ, вызывала незначительный подъём специфици-

ческих антител в группе А после 2-й иммунизации с падением к 35-м суткам наблюдения (табл. 1). Введение дозы препарата, содержащего 25 мкг антигена ЧИКВ, привело к формированию достаточно высокого уровня специфических антител в группе В на 14-е сутки после 2-й иммунизации, который, однако, также снизился к 35-м суткам наблюдения (табл. 1). В сыворотке животных группы С, привитых дважды дозой 40 мкг антигена ЧИКВ, уже через 7 сут отмечался подъём специфических IgG, превосходящий максимальные значения IgG в группах А и В. Максимальный титр специфических IgG в сыворотке животных группы С превосходил таковые в группе А в 16 раз и в группе В — в 4 раза. Максимальные титры специфических IgG сохранялись у животных группы С до конца срока наблюдения.

В сыворотке животных группы А вируснейтрализующие IgG были зарегистрированы однократно на 14-е сутки после 2-й иммунизации (табл. 2). Показатели вируснейтрализующих антител, сформировавшихся у животных группы В на введение препарата, содержащего 25 мкг антигена ЧИКВ, на все сроки наблюдения были достоверно выше таковых ($p < 0,05$) в группе А и достоверно ниже ($p < 0,05$) показателей, сформировавшихся на введение препарата, содержащего 40 мкг антигена ЧИКВ в группе С (табл. 2). Максимальный уровень вируснейтрализующих IgG в группе В отмечался аналогично титрам в ИФА через 14 сут после 2-й иммунизации с дальнейшим падением. В ответ на введение инактивированного препарата с разным содержанием

антигена ЧИКВ наиболее выраженный иммунный ответ, как и в ИФА, отмечался для дозы антигена ЧИКВ 40 мкг/0,5 мл. В группе С максимальный прирост специфических антител был на 14-е сутки после 2-го введения препарата и сохранялся до конца срока наблюдения.

У животных контрольной группы D специфические IgG в ИФА и РН не выявлялись в сыворотке ни в одной из контрольных точек (данные не приведены).

Для дальнейших исследований клеточного иммунного ответа был выбран препарат с дозой антигена ЧИКВ 40 мкг как обеспечивший наиболее выраженный и стабильный гуморальный иммунный ответ у мышей линии BALB/c после двукратной иммунизации.

Влияние иммунизации инактивированным препаратом антигена ЧИКВ на функциональное состояние лимфоцитов (спленоцитов) мышей BALB/c и, соответственно, на формирование специфического клеточного ответа оценивали в реакции пролиферации спленоцитов. Как следует из представленных в табл. 3 данных, использованные в реакции вирусные антигены, специфический ЧИКВ и гетерологичный SARS-CoV-2 *in vitro* не вызывали подавления пролиферации спленоцитов на 0-е сутки у животных в группе С и в контрольной группе D (табл. 3).

Пролиферативная реакция спленоцитов животных обеих групп на стимуляцию *in vitro* митогенами КонА и ЛПС была достаточно выраженной и достоверно превосходила таковую при использова-

Таблица 1. Титр специфических антител в сыворотке мышей линии BALB/c, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ в динамике

Table 1. Dynamic changes in specific IgG titers in sera of BALB/c mice immunized with the preparation with different concentration of CHIKV antigen

Группа / Group	ИФА IgG, титр / ELISA IgG, titer			
	14-е сутки / day 14	21-е сутки / day 21	28-е сутки / day 28	35-е сутки / day 35
A	1 : 200	1 : 400	1 : 400	1 : 200
B	1 : 200	1 : 800	1 : 1600	1 : 800
C	1 : 1600	1 : 3200	1 : 6400	1 : 6400

Таблица 2. Показатели вируснейтрализующих антител в сыворотке мышей линии BALB/c, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ, в динамике ($M \pm SD$)

Table 2. Dynamic changes in virus-neutralizing antibodies in sera of BALB/c mice immunized with the preparation with different concentration of CHIKV antigen ($M \pm SD$)

Группа / Group	РН, \log_2 / Neutralization test, \log_2			
	14-е сутки / day 14	21-е сутки / day 21	28-е сутки / day 28	35-е сутки / day 35
A	2,19 ± 0,19	2,30 ± 0,19	3,10 ± 0,07	2,21 ± 0,10
B	3,10 ± 0,07	3,30 ± 0,23	4,17 ± 0,15*	3,45 ± 0,15
C	4,84 ± 0,14	5,50 ± 0,15	6,84 ± 0,31**	6,84 ± 0,31**

Примечание. * $p < 0,05$ относительно исходных показателей на 0-е сутки; ** $p < 0,05$ относительно аналогичных показателей в группе В.
Note. * $p < 0.05$ in comparison with day 0; ** $p < 0.05$ in comparison to those in group B.

Таблица 3. Динамика пролиферативной активности спленоцитов мышей BALB/c, иммунизированных препаратом с разным содержанием антигена ЧИКВ ($M \pm SD$)**Table 3.** Proliferative activity of splenocytes from BALB/c mice immunized with the preparation contained different CHIKV antigen dose ($M \pm SD$)

Группа Group	Антиген Antigen	ИС спленоцитов / Splenocytes stimulation index				
		0-е сутки / day 0	14-е сутки / day 14	21-е сутки / day 21	28-е сутки / day 28	35-е сутки / day 35
С	ЧИКВ / CHIKV	1,04±0,08	1,30±0,10 [#]	1,58±0,10 [#]	1,66±0,12 [#]	1,60±0,10 [#]
	SARS-CoV-2	1,02 ± 0,08	1,03 ± 0,10	1,02 ± 0,08	1,04 ± 0,10	1,02±0,08
	КонА / ConA	3,60 ± 0,12	3,50 ± 0,14	3,56 ± 0,12	3,50 ± 0,14	3,60±0,12
	ЛПС / LPS	1.85 ± 0,10	1.90 ± 0,10	1,85 ± 0,10	1,90 ± 0,10	1,85±0,10
D	ЧИКВ / CHIKV	1,02 ± 0,08	1,08 ± 0,10	1,08 ± 0,10	1,06 ± 0,10	1,04±0,08
	SARS-CoV-2	1,02 ± 0,08	1,04 ± 0,08	1,02 ± 0,10	1,04 ± 0,08	1,02±0,08
	КонА / ConA	3,56 ± 0,12	3,65 ± 0,14	3,60 ± 0,12	3,50 ± 0,14	3,50±0,12
	ЛПС / LPS	1.80 ± 0,10	1.90 ± 0,10	1.85 ± 0,10	1.90 ± 0,10	1.80±0,10

Примечание. На 14-е сутки после забора крови у 4 животных все оставшиеся животные были иммунизированы дважды. * $p < 0,05$ относительно исходных показателей на 0-е сутки; # $p < 0,05$ относительно аналогичных показателей в группе D.

Note. On day 14 after blood sampling from 4 mice all other animals were inoculated twice. * $p < 0.05$ in comparison with day 0; # $p < 0.05$ in comparison to those in group D.

нии вирусных антигенов на все сроки наблюдения ($p < 0,05$).

Спленоциты неиммунных животных группы D отвечали выраженной пролиферацией на стимуляцию *in vitro* только митогенами Т- и В-клеток (КонА и ЛПС), но не пролиферировали при стимуляции вирусными антигенами — как антигеном ЧИКВ, так и антигеном SARS-CoV-2 на все сроки наблюдения (табл. 3).

Как следует из представленных в табл. 3 данных, спленоциты мышей BALB/c, иммунизированных инактивированным препаратом ЧИКВ в группе С, отвечали на стимуляцию *in vitro* специфическим антигеном ЧИКВ, начиная с 14-х суток после 1-й иммунизации. Результаты, полученные на 14-е сутки, свидетельствуют о том, что после однократной иммунизации ИС спленоцитов достоверно превосходит этот же показатель на 0-е сутки ($p < 0,05$). На 21, 28 и 35-е сутки эксперимента у иммунизированных животных ИС спленоцитов на антиген ЧИКВ достоверно превосходит аналогичный показатель на 14-е сутки после 1-й иммунизации ($p < 0,05$). ИС спленоцитов в ответ на стимуляцию антигеном ЧИКВ у животных группы С после 2-й иммунизации достиг максимума на 28-е сутки эксперимента. Статистически достоверная разница между ИС спленоцитов антигеном ЧИКВ у животных групп С и D на всём сроке наблюдения свидетельствует о специфичности пролиферативной реакции спленоцитов у иммунных животных.

Обсуждение

Консервативность вирусной РНК ЧИКВ, перекрёстная защита между разными штаммами ЧИКВ, пожизненный иммунитет и практическое отсутствие повторных случаев инфицирования [8–10],

а также отсутствие специфической терапии как самой инфекции, так и её последствий делает вакцинацию наиболее перспективным путём профилактики ЛЧ.

Два основных вида традиционных вакцин — инактивированные и аттенуированные — имеют преимущество с точки зрения экономической эффективности и устоявшихся нормативных стандартов. Эти преимущества упрощают исследования и разработку технологии, а также лицензирование для удовлетворения спроса и профилактики заболевания. Главным преимуществом инактивированных вакцин являются их безопасность при отсутствии риска реверсии вирулентности, стабильность и минимальные проблемы хранения и транспортировки. Определённым недостатком является необходимость многократных бустерных доз для выработки и поддержания эффективного иммунного ответа.

Для производства цельновирионных инактивированных вакцин используются различные технологии инаktivации вирусов, такие как ультрафиолетовое облучение, формалин или β-ПЛ.

Известно, что инаktivация вируса формалином происходит за счёт моногидроксиметилирования аденина, сшивания белков путём образования интер- и внутримолекулярных метиленовых мостиков, а также сшивания РНК вируса с белками капсида, а также сшивания РНК вируса с белками капсида, что приводит к блокировке чтения генома. Таким образом, формальдегид может нарушать структуру вируса и приводить к низкой иммуногенности некоторых вирусных вакцин [17]. Тем не менее предыдущие исследования формалин-инактивированных вакцин для профилактики ЛЧ [13, 14] показали их достаточный иммуногенный потенциал, продемонстрировав выработку специфических вируснейтрализующих антител [11, 13, 14], а также

развитие клеточного иммунитета [13] в доклинических исследованиях. Клеточный иммунитет при ЛЧ остаётся малоизученным, однако доказана его критическая роль для контроля и клиренса ЧИКВ [18].

β -ПЛ широко используется для инактивации вирусов, как например, в вакцинах для профилактики бешенства, гриппа, желтой лихорадки и коронавируса, в основном действуя как алкилирующий агент на гуанин вирусной ДНК или РНК [19]. Свойство β -ПЛ алкилировать преимущественно вирусный геном способствует развитию протективного иммунного ответа на ведение вакцины [17]. Однако полностью исключить модификацию вирусных белков при воздействии β -ПЛ нельзя. Как показало проведённое ранее исследование, количество и характер модификаций вирусных компонентов, как белков, так и ДНК или РНК, зависят от концентрации β -ПЛ, типа буфера, pH, а также внутренней реакционной способности отдельных нуклеофильных групп [19]. Таким образом, условия инактивации вируса β -ПЛ при производстве вакцины должны быть максимально оптимизированы, чтобы, с одной стороны, добиться полной инактивации вируса, а с другой — устойчиво высокой иммуногенности вакцины.

В данном исследовании продемонстрирована иммуногенность инактивированного β -ПЛ препарата для профилактики ЛЧ. Максимальный прирост специфических антител наблюдался у привитых животных всех экспериментальных групп через 14 сут после 2-го введения. Специфические вируснейтрализующие антитела сохранялись у животных экспериментальных групп до конца срока наблюдения. Наилучший результат со стороны гуморального иммунитета, как в реакции ИФА, так и в РН, зарегистрирован после иммунизации животных препаратом, содержащим 40 мкг антигена ЧИКВ. В группе животных, привитых препаратом, содержащим 40 мкг в дозе, максимальные показатели гуморального иммунитета сохранялись до конца срока наблюдения. В то же время в группах животных, привитых меньшими дозами (10 и 25 мкг) антигена ЧИКВ, показатели гуморального иммунитета снижались к 21-м суткам после 2-й иммунизации.

Результаты исследования пролиферации спленоцитов иммунных животных позволяют сделать заключение, что при иммунизации препаратом, содержащим разные дозы инактивированного антигена ЧИКВ, у мышей BALB/c формировался клон клеток памяти, которые при повторной встрече со специфическим антигеном реагировали выраженной пролиферацией. Результаты исследования пролиферации спленоцитов иммунных лабораторных животных в ответ на стимуляцию специфическим антигеном ЧИКВ *in vitro* продемонстрировали результаты, сходные с результатами исследования показателей гуморального иммунитета в ИФА и РН. Максимальный прирост ИС спленоцитов *in vitro* наблюдался у при-

витых животных через 14 сут после 2-го введения препарата и сохранялся до конца срока наблюдения в группе животных, привитых препаратом, содержащим 40 мкг антигена ЧИКВ в дозе 0,5 мл.

Препарат инактивированного β -ПЛ ЧИКВ, наработанного на производственном банке клеток Vero, аттестованном в соответствии с ОФС «Требования к клеточным культурам — субстратам производства иммунобиологических препаратов» XIV Государственной Фармакопеи РФ, с гидроокисью алюминия в качестве адьюванта продемонстрировал выраженные иммуногенные свойства при двукратном введении мышам BALB/c. β -ПЛ имеет очевидные преимущества перед формалином, в том числе в формировании более выраженного специфического поствакцинального гуморального и клеточного иммунитета при использовании для инактивации ЧИКВ [14]. Учитывая быстрый рост адаптированного к клеткам Vero ЧИКВ, данная технологическая платформа позволяет производителю, использующему клетки Vero для производства других инактивированных вирусных вакцин, достаточно быстро произвести вакцину для профилактики ЛЧ. Таким образом, полученные в представленной работе результаты позволяют оценить инактивированный препарат антигена ЧИКВ в дозе 40 мкг/0,5 мл как перспективный.

Заключение

Очищенный инактивированный β -ПЛ препарат антигена ЧИКВ продемонстрировал выраженный иммуногенный потенциал. Выбранная в результате исследований иммунизирующая доза антигена ЧИКВ 40 мкг/0,5 мл при двукратном введении мышам линии BALB/c вызывает формирование как специфического гуморального иммунитета, характеризующегося появлением IgG, обладающих вируснейтрализующей активностью, так и специфического клеточного иммунного ответа, характеризующегося выраженной пролиферацией спленоцитов при стимуляции специфическим антигеном ЧИКВ *in vitro*.

Представленные результаты позволяют оценить препарат как перспективный для профилактики ЛЧ с использованием дозы и схемы, апробированных в данном исследовании.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Weaver S.C., Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(13): 1231–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>
2. Simon F., Javelle E., Cabie A., Bouquillard E., Troisgros O., Gentile G., et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). *Med. Mal. Infect.* 2015; 45(7): 243–63. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>
3. Schrauf S., Tschismarov R., Tauber E., Ramsauer K. Current efforts in the development of vaccines for the prevention of Zika

- and Chikungunya infections. *Front. Immunol.* 2020; (11): 592. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00592>
4. Reyes-Sandoval A. 51 years in of Chikungunya clinical vaccine development: A historical perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(10): 2351–8. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1574149>
 5. Erasmus J.H., Rossi S.L., Weaver S.C. Development of vaccines for Chikungunya fever. *J. Inf. Dis.* 2016; 214(S5): S488–96. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw271>
 6. Porterfield J.S. Cross-neutralization studies with group A arthropod-borne viruses. *Bull. WHO.* 1961; 24(6): 735–41.
 7. Hearn H.J., Rainey C.T. Cross protection in animals infected with group A arboviruses. *J. Immunol.* 1963; 90: 720–4.
 8. Powers A.M., Brault A.C., Tesh R.B., Weaver S.C. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 1): 471–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>
 9. Galatas B., Ly S., Duong V., Baisley K., Nguon K., Chan S., et al. Long-lasting immune protection and other epidemiological findings after Chikungunya emergence in a Cambodian Rural Community, April (2012). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(1): e0004281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004281>
 10. Pierro A., Rossini G., Gaibani P., Finarelli A.C., Moro M.L., Landini M.P., et al. Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from the acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy. *New Microbes New Infect.* 2015; 7: 23–5. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.04.002>
 11. Harrison V.R., Eckels K.H., Bartelloni P.J., Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed chikungunya vaccine. *J. Immunol.* 1971; (107): 643–6.
 12. Langsjoen R.M., Haller S.L., Roy C.J., Vinet-Oliphant H., Bergen N.A., Erasmus J.H., et al. Chikungunya virus strains show lineage-specific variations in virulence and cross-protective ability in murine and nonhuman primate models. *mBio.* 2018; 9(2): e02449-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02449-17>
 13. Tiwari M., Parida M., Santhosh S.R., Khan M., Dash P.K., Rao P.V. 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>
 14. Kumar M., Sudeep A.B., Arankalle V.A. 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>
 15. Игнатъев Г.М., Каа К.В., Оксанич А.С., Антонова Л.П., Самарцева Т.Г., Мефед К.М. и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(3): 227–32. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
 16. Mayer U.B., Haller C., Haidinger W., Atrasheuskaya A., Bukin E., Lubitz W., et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect. Immun.* 2005; (8): 4810–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4810-4817.2005>
 17. Delrue I., Verzele D., Maddar A., Nauwynck J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert. Rev. Vaccines.* 2012; 11(6): 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
 18. Davenport B.J., Bullock C., McCarthy M.K., Hawman D.W., Murphy K.M., Kedl R.M., et al. Chikungunya virus evades antiviral CD8T cell responses to establish persistent infection in joint-associated tissues. *J. Virol.* 2020; (94): e02036-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>
 19. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(42): 36198–214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>

REFERENCES

1. Weaver S.C., Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(13): 1231–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>
2. Simon F., Javelle E., Cabie A., Bouquillard E., Troisgros O., Gentile G., et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). *Med. Mal. Infect.* 2015; 45(7): 243–63. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>
3. Schrauf S., Tschismarov R., Tauber E., Ramsauer K. Current efforts in the development of vaccines for the prevention of Zika and Chikungunya infections. *Front. Immunol.* 2020; (11): 592. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00592>
4. Reyes-Sandoval A. 51 years in of Chikungunya clinical vaccine development: A historical perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019; 15(10): 2351–8. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1574149>
5. Erasmus J.H., Rossi S.L., Weaver S.C. Development of vaccines for Chikungunya fever. *J. Inf. Dis.* 2016; 214(S5): S488–96. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw271>
6. Porterfield J.S. Cross-neutralization studies with group A arthropod-borne viruses. *Bull. WHO.* 1961; 24(6): 735–41.
7. Hearn H.J., Rainey C.T. Cross protection in animals infected with group A arboviruses. *J. Immunol.* 1963; 90: 720–4.
8. Powers A.M., Brault A.C., Tesh R.B., Weaver S.C. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 1): 471–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>
9. Galatas B., Ly S., Duong V., Baisley K., Nguon K., Chan S., et al. Long-lasting immune protection and other epidemiological findings after Chikungunya emergence in a Cambodian Rural Community, April (2012). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(1): e0004281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004281>
10. Pierro A., Rossini G., Gaibani P., Finarelli A.C., Moro M.L., Landini M.P., et al. Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from the acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy. *New Microbes New Infect.* 2015; 7: 23–5. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.04.002>
11. Harrison V.R., Eckels K.H., Bartelloni P.J., Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed chikungunya vaccine. *J. Immunol.* 1971; (107): 643–6.
12. Langsjoen R.M., Haller S.L., Roy C.J., Vinet-Oliphant H., Bergen N.A., Erasmus J.H., et al. Chikungunya virus strains show lineage-specific variations in virulence and cross-protective ability in murine and nonhuman primate models. *mBio.* 2018; 9(2): e02449-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02449-17>
13. Tiwari M., Parida M., Santhosh S.R., Khan M., Dash P.K., Rao P.V. 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>
14. Kumar M., Sudeep A.B., Arankalle V.A. 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>
15. Ignat'ev G.M., Kaa K.V., Oksanich A.S., Antonova L.P., Samartseva T.G., Mefed K.M., et al. Indication and identification of dengue and chikungunya viruses in *Aedes* spp. Mosquitoes captured in Central America. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(3): 227–32. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4> (in Russian)

16. Mayer U.B., Haller C., Haidinger W., Atrasheuskaya A., Bukin E., Lubitz W., et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect. Immun.* 2005; (8): 4810–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4810-4817.2005>
17. Delrue I., Verzele D., Madder A., Nauwynck J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert. Rev. Vaccines.* 2012; 11(6): 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
18. Davenport B.J., Bullock C., McCarthy M.K., Hawman D.W., Murphy K.M., Kedl R.M., et al. Chikungunya virus evades antiviral CD8T cell responses to establish persistent infection in joint-associated tissues. *J. Virol.* 2020; (94): e02036-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>
19. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(42): 36198–214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>

Информация об авторах

Игнатъев Георгий Михайлович[✉] — д.м.н., профессор, зам. руководителя направления по качеству и инновационным разработкам ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, ignatjev_gm@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Каа Константин Владимирович — м.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>

Антонова Лилия Петровна — м.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1221-1134>

Отрашевская Елена Викторовна — главный специалист отдела научных исследований и опытно-конструкторских работ СПбНИИВС ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Ишмухаметов Айдар Айратович — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 28.04.2021;
принята к публикации 22.07.2021;
опубликована 18.10.2021

Information about the authors

Georgy M. Ignatyev[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, Deputy Head, Department for quality and innovative development, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, ignatjev_gm@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Konstantin V. Kaa — junior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>

Lilia P. Antonova — junior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1221-1134>

Alena V. Atrasheuskaya — senior specialist, R&D Department, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Aidar A. Ishmukhametov — D. Sci. (Med.), Professor, General Director, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 28.04.2021;
accepted for publication 22.07.2021;
published 18.10.2021