

# ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ХАНТАВИРУСНЫХ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ПУУМАЛА



А.Н. Ветрова<sup>1,2</sup>, С.С. Курашова<sup>1</sup>, Р.Д. Теодорович<sup>1</sup>, Ю.В. Попова<sup>1</sup>, Е.А. Блинова<sup>3</sup>,  
П.А. Набатников<sup>1</sup>, Е.А. Ткаченко<sup>1</sup>, Т.К. Дзагурова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский  
Университет), Москва, Россия

<sup>3</sup> ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Резюме.** Стабильность цельновирioнных инактивированных вакцин в значительной степени зависит от формуляции готового препарата. В данном исследовании изучалось влияние на сохранность иммуногенных свойств экспериментального вакцинного препарата против геморрагической лихорадки с почечным синдромом условий хранения вакцинного полуфабриката и использование в составе вакцины человеческого сывороточного альбумина, широко используемого в качестве криопротектора. Для получения экспериментальной вакцины вирус Пуумала, размноженный в культуре клеток Vero, был сконцентрирован, инактивирован бета-пропиолактоном в разведении 1:6000 и очищен хроматографически на мультимодальном сорбенте Capto™ Core 700 (GE Healthcare, США). Содержание целевого компонента в вакцинном препарате составило  $2 \pm 0,2 \times 10^6$  копий РНК/мл. Гуморальный иммунный ответ на введение вакцинного препарата определяли по индукции нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*). Установлено, что инактивированный бета-пропиолактоном вирус Пуумала индуцирует выраженный гуморальный иммунный ответ, что свидетельствует о сохранности соответствующих иммуногенных эпитопов. Показано, что вирусная РНК более стабильна при хранении инактивированного вируса по сравнению с неинактивированным. В исследовании подтвержден факт полной инактивации вируса через 24 ч хранения при температуре 37°C. Отмечено значительное снижение иммуногенной активности вируса при термоинактивации, что подтверждает необходимость тщательного подбора условий хранения для термолабильных хантавирусов. Установлена прямая корреляция между титром вируса и количеством копий вирусной РНК/мл. Добавление человеческого сывороточного альбумина стабилизирует инфекционность вируса при хранении: титр вируса Пуумала оставался на неизменном уровне в течение 3 месяцев хранения при  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ , тогда как в материале без добавления альбумина титр снижался до неопределяемых значений. Добавление 0,1% человеческого сывороточного альбумина к инактивированному вирусному препарату способствует стабилизации его иммуногенных свойств при длительном хранении. Показано, что препараты с добавлением человеческого сывороточного альбумина (0,1–1%) дозозависимо более стабильны при многократном замораживании по показателям содержания вирусной РНК и иммуноген-

## Адрес для переписки:

Ветрова Анна Николаевна  
108819, Россия, Москва, пос. Московский, п. Института  
полиомиелита, двлд. 8, корп. 1, ФГАНУ Федеральный научный  
центр исследований и разработки иммунобиологических  
препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита).  
Тел.: 8 915 273-60-28.  
E-mail: ann.vetr.99@mail.ru

## Contacts:

Anna N. Vetrova  
108819, Russian Federation, Moscow, Settlement "Moskovskiy",  
Village of Institute of Poliomyelitis, Premises 8, build. 1, Chumakov  
Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-  
and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute  
of Poliomyelitis).  
Phone: +7 915 273-60-28.  
E-mail: ann.vetr.99@mail.ru

## Для цитирования:

Ветрова А.Н., Курашова С.С., Теодорович Р.Д., Попова Ю.В.,  
Блинова Е.А., Набатников П.А., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Влияние  
условий хранения на стабильность хантавирусных вакцинных  
препаратов на основе вируса Пуумала // Инфекция и иммунитет. 2023.  
Т. 13, № 2. С. 376–382. doi: 10.15789/2220-7619-OOS-2116

## Citation:

Vetrova A.N., Kurashova S.S., Teodorovich R.D., Popova Yu.V., Blinova E.A.,  
Nabatnikov P.A., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. Optimization of storage  
conditions for Puumala virus based vaccine // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 376–382.  
doi: 10.15789/2220-7619-OOS-2116

ности. Можно предполагать, что человеческий сывороточный альбумин способствует лучшей сохранности генетического материала вируса при хранении, а белковые эпитопы, ответственные за протективный иммунный ответ в форме индукции нейтрализующих антител, претерпевают в присутствии альбумина менее выраженные конформационные изменения. Эти данные указывают на целесообразность включения человеческого сывороточного альбумина в состав вакцинного препарата.

**Ключевые слова:** геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирус Пуумала, хантавирусный вакцинный препарат, нейтрализующие антитела, иммунный ответ, человеческий сывороточный альбумин.

## OPTIMIZATION OF STORAGE CONDITIONS FOR PUUMALA VIRUS BASED VACCINE

Vetrova A.N.<sup>a,b</sup>, Kurashova S.S.<sup>a</sup>, Teodorovich R.D.<sup>a</sup>, Popova Yu.V.<sup>a</sup>, Blinova E.A.<sup>c</sup>, Nabatnikov P.A.<sup>a</sup>, Tkachenko E.A.<sup>a</sup>, Dzagurova T.K.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Central Research Institute of Epidemiology of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** We report the effects of storage conditions and human serum albumin addition to the vaccine composition on the immunogenic properties of an experimental vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. To obtain an experimental vaccine, the Puumala virus, propagated in Vero cells culture, was concentrated, inactivated with beta-propiolactone, and purified by chromatography on the Capto™ Core 700 multimodal sorbent (GE Healthcare). The target component in the vaccine was  $2 \pm 0.2 \times 10^6$  of viral RNA copies/ml. The humoral immune response to the vaccine was determined by measuring the neutralizing antibodies in the blood serum of immunized Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). It was revealed that the Puumala virus inactivated with beta-propiolactone induces a pronounced humoral immune response, which indicates preservation of relevant immunogenic epitopes. According to our study, viral RNA is more stable during storage of the inactivated vs. intact virus. It was confirmed that full virus inactivation occurred after 24 hours of storage at 37°C. A significant decrease in the virus immunogenicity during the thermal inactivation was noted, which confirms the need for careful selection of storage conditions for thermolabile Hantaviruses. A direct correlation was observed between viral titer and viral RNA copy number/ml. Adding human serum albumin stabilized viral infectivity during storage: Puumala virus titer remained at the same level for 3 months of storage at  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ , whereas without albumin, the titer decreased to undetectable level. The addition of 0.1% human serum albumin to the inactivated virus stabilized its immunogenic properties during long-term storage. It was shown that vaccine preparations with human serum albumin (0.1–1%) show higher dose-dependent stability upon repeated freezing assessed by detecting viral RNA level and their immunogenicity. It can be assumed that human serum albumin provides better preservation of viral genetic material during storage, as well the protein epitopes responsible for the protective immune response in the form of neutralizing antibodies induction, undergo less pronounced conformational changes in the presence of albumin. These data support the addition of human serum albumin to the vaccine formulation.

**Key words:** hemorrhagic fever with renal syndrome, Puumala virus, hantavirus vaccine, neutralizing antibodies, immune response, human serum albumin.

## Введение

При производстве цельновирионных вакцин для профилактики хантавирусных инфекций решающее значение имеет разработка и внедрение безопасных и технологичных способов инактивации и хранения хантавирусного вакцинного препарата. Для цельновирионных вакцин помимо выбора оптимального способа инактивирования большое значение имеет конечная формуляция вакцинного препарата, определяющая его стабильность на протяжении срока годности. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), который широко используется в качестве криопротектора, также применяется и в качестве стабилизирующей добавки в вакцины. В исследованиях с инкапсулированным антигеном гепатита В были установлены за-

щитные эффекты 0,5–1% ЧСА на стабильность HBsAg в периоде инкапсуляции, высвобождения и восстановления антигенности во время лиофилизации и эмульгирования. Кроме того, при иммунизации крыс Sprague-Dawley препаратом HBsAg-ЧСА наблюдалось повышение уровня анти-HBsAg IgG и Tх1 цитокинов в сравнении с препаратом без ЧСА [11]. В исследованиях Choo J. показано повышение иммунной активности аттенуированной вакцины против вируса Денге (bDENV2 HD-MAPs) при добавлении 1% ЧСА в сравнении с аналогичным препаратом без ЧСА, а также стабилизация антигенных структур вириона в процессе хранения в течение 6 месяцев при 4°C в высушенном виде [5]. ЧСА входит в состав вакцины от клещевого энцефалита FSME-Immun®, причем было показано, что его исключение из формуляции

вакцины приводило к увеличению уровней провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , что влияло на частоту побочных эффектов в виде лихорадки у вакцинированных [8]. В связи с отсутствием для возбудителя ГЛПС лабораторной модели инфекции, представляет интерес поиск чувствительной лабораторной модели для изучения иммуногенной активности вакцинного препарата. Ранее с этой целью мы использовали мышей BALB/c и морских свинок [3]. В данном эксперименте в качестве животной модели для иммунизации были использованы сирийские хомяки. Ответ иммунной системы хомяков на инфекции во многом близок к человеческому [9], более того, они являются основной лабораторной моделью для исследований хантавирусов, вызывающих хантавирусный пульмональный синдром [10]. Целью исследования было определение стабильности и иммуногенности препаратов вируса Пуумала при различных условиях хранения.

## Материалы и методы

Вакцинный штамм PUU-TKD-VERO вируса Пуумала, размноженный в культуре клеток Vero, был сконцентрирован методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке, как было описано ранее [4]. Хроматографически

очищенный на мультимодальном сорбенте Capto™ Core 700 (GE Healthcare, США) препарат вируса Пуумала с титром  $6,0 \pm 0,5$  lg ФОЕ/мл ( $7 \pm 0,33 \times 10^6$  копий РНК/мл) разводили физиологическим раствором до  $4,5 \pm 0,5$  lg ФОЕ/мл ( $2 \pm 0,2 \times 10^6$  копий РНК/мл). Контрольный образец полученного препарата в аликвотах по 1 мл хранили при температуре  $-70 \pm 2^\circ\text{C}$ . Половину полученного препарата инактивировали бетапропиолактоном в разведении 1:6000 (И-ПУУ). Варианты условий хранения препаратов вируса Пуумала — 3 месяца при температуре  $6 \pm 2^\circ\text{C}$ ; 6 суток при  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ ; многократное замораживание материала — 5 и 40 раз при температуре  $-70 \pm 2^\circ\text{C}$ , в том числе с добавлением ЧСА в качестве стабилизатора, представлены в табл.

Контроль на остаточную инфекционность И-ПУУ оценивали в трех последовательных пассажах методами флюоресцирующих антител (МФА) [1], титрованием фокусобразующих единиц (ФОЕ) [6] и определением вирусной РНК в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) [7]. Иммуногенную активность И-ПУУ оценивали на самках сирийских хомяков в возрасте 2 недель и весом  $48 \pm 0,3$  г. Согласно утвержденному на Этическом комитете заключению, данное исследование соответствует положениям Хельсинской декларации и не нарушает биоэти-

**Таблица. Условия хранения**

Table. Storage conditions

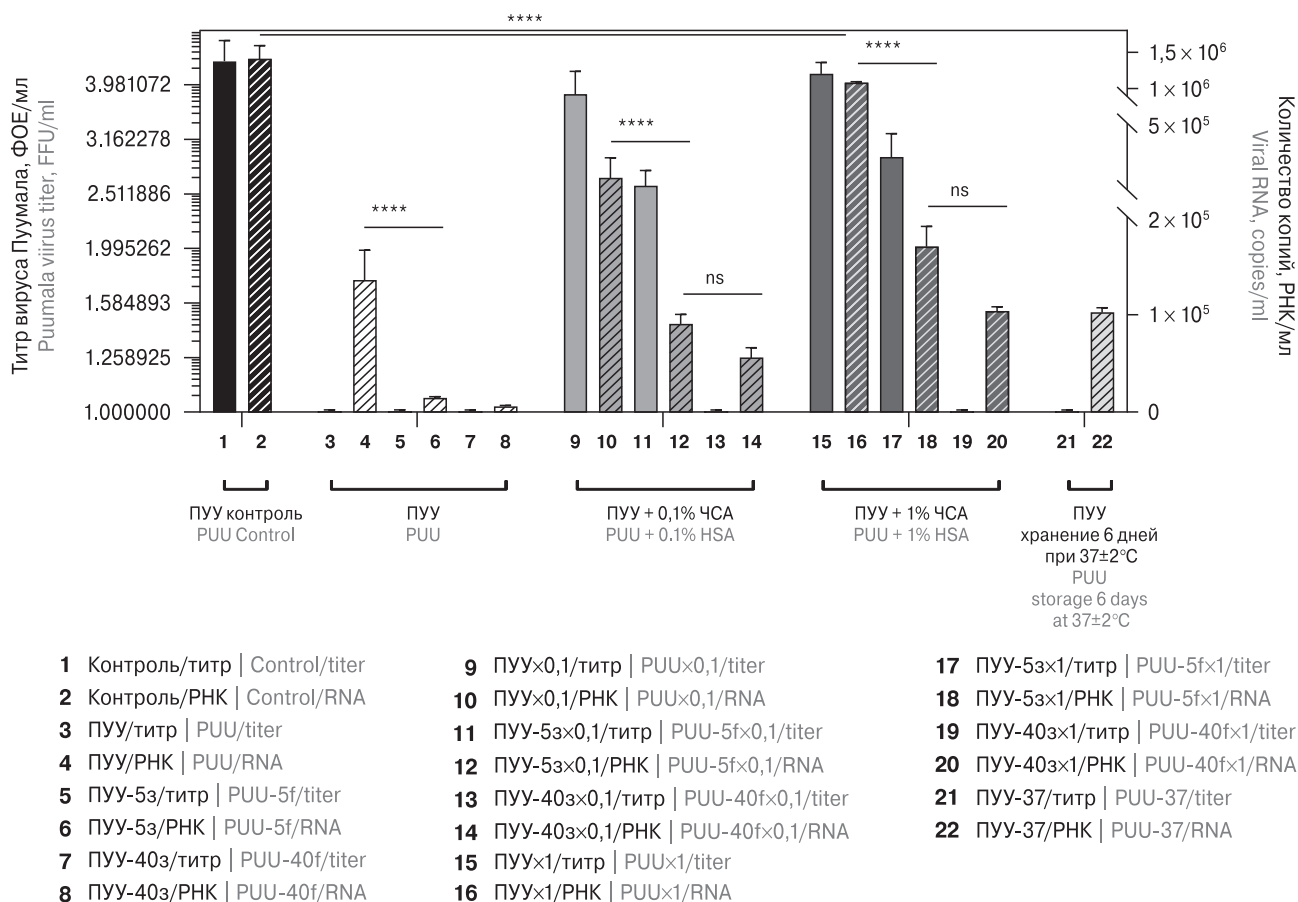
Условия хранения Storage conditions	Вирус Пуумала (ПУУ) Puumala virus (PUU)	Инактивированный вирус Пуумала (И-ПУУ) Inactivated Puumala virus (I-PUU)
<b>3 месяца при <math>6 \pm 2^\circ\text{C}</math></b> 3 months at $6 \pm 2^\circ\text{C}$	<b>ПУУ</b> PUU	<b>И-ПУУ</b> I-PUU
<b>6 суток при <math>37 \pm 2^\circ\text{C}</math></b> 6 days at $37 \pm 2^\circ\text{C}$	<b>ПУУ-37</b> PUU-37	<b>И-ПУУ-37</b> I-PUU-37
<b>Замораживание 5 раз при <math>-70 \pm 2^\circ\text{C}</math></b> Freezing 5 times at $-70 \pm 2^\circ\text{C}$	<b>ПУУ-5з</b> PUU-5f	<b>И-ПУУ-5з</b> I-PUU-5f
<b>Замораживание 40 раз при <math>-70 \pm 2^\circ\text{C}</math></b> Freezing 40 times at $-70 \pm 2^\circ\text{C}$	<b>ПУУ-40з</b> PUU-40f	<b>И-ПУУ-40з</b> I-PUU-40f
<b>3 месяца при <math>6 \pm 2^\circ\text{C} + 0,1\%</math> ЧСА</b> 3 months at $6 \pm 2^\circ\text{C} + 0,1\%$ HSA	<b>ПУУ <math>\times 0,1</math></b> PUU $\times 0,1$	<b>И-ПУУ <math>\times 0,1</math></b> I-PUU $\times 0,1$
<b>6 суток при <math>37 \pm 2^\circ\text{C} + 0,1\%</math> ЧСА</b> 6 days at $37 \pm 2^\circ\text{C} + 0,1\%$ HSA	<b>ПУУ-37 <math>\times 0,1</math></b> PUU-37 $\times 0,1$	<b>И-ПУУ-37 <math>\times 0,1</math></b> I-PUU-37 $\times 0,1$
<b>Замораживание 5 раз при <math>-70 \pm 2^\circ\text{C} + 0,1\%</math> ЧСА</b> Freezing 5 times at $-70 \pm 2^\circ\text{C} + 0,1\%$ HSA	<b>ПУУ-5з <math>\times 0,1</math></b> PUU-5f $\times 0,1$	<b>И-ПУУ-5з <math>\times 0,1</math></b> I-PUU-5f $\times 0,1$
<b>Замораживание 40 раз при <math>-70 \pm 2^\circ\text{C} + 0,1\%</math> ЧСА</b> Freezing 40 times at $-70 \pm 2^\circ\text{C} + 0,1\%$ HSA	<b>ПУУ-40з <math>\times 0,1</math></b> PUU-40f $\times 0,1$	<b>И-ПУУ-40з <math>\times 0,1</math></b> I-PUU-40f $\times 0,1$
<b>3 месяца при <math>6 \pm 2^\circ\text{C} + 1\%</math> ЧСА</b> 3 months at $6 \pm 2^\circ\text{C} + 1\%$ HSA	<b>ПУУ <math>\times 1</math></b> PUU $\times 1$	<b>И-ПУУ <math>\times 1</math></b> I-PUU $\times 1$
<b>6 суток при <math>37 \pm 2^\circ\text{C} + 1\%</math> ЧСА</b> 6 days at $37 \pm 2^\circ\text{C} + 1\%$ HSA	<b>ПУУ-37 <math>\times 1</math></b> PUU-37 $\times 1$	<b>И-ПУУ-37 <math>\times 1</math></b> I-PUU-37 $\times 1$
<b>Замораживание 5 раз при <math>-70 \pm 2^\circ\text{C} + 1\%</math> ЧСА</b> Freezing 5 times at $-70 \pm 2^\circ\text{C} + 1\%$ HSA	<b>ПУУ-5з <math>\times 1</math></b> PUU-5f $\times 1$	<b>И-ПУУ-5з <math>\times 1</math></b> I-PUU-5f $\times 1$
<b>Замораживание 40 раз при <math>-70 \pm 2^\circ\text{C} + 1\%</math> ЧСА</b> Freezing 40 times at $-70 \pm 2^\circ\text{C} + 1\%$ HSA	<b>ПУУ-40з <math>\times 1</math></b> PUU-40f $\times 1$	<b>И-ПУУ-40з <math>\times 1</math></b> I-PUU-40f $\times 1$

ческих правил обращения с животными, участвующими в экспериментах (выписка № 100622-5 от 10.06.2022 г.). Самки хомяков были рандомизированно распределены по 6 особей в каждой группе. Образцы И-ПУУ вводили по 200 мкл в мышечную ткань бедра по схеме: 2 иммунизации с двухнедельным интервалом. Через 14 дней после второй иммунизации все животные были подвергнуты эвтаназии путем декапитации после введения в наркоз сначала стандартной дозой комбинации препаратов Золетил-Ксила [Золетил (10 мг/кг) + Ксила (1 мг/кг)], а затем тройной дозой этих препаратов. Сыворотки крови животных трехкратно исследовали в реакции нейтрализации в клеточной культуре Vero. Результат представлен в виде среднегеометрического значения титра (СГТ) нейтрализующих антител (нАТ) в двоичных логарифмах по 50% редукции числа фокусобразующих единиц (РН/ФОЕ/50). Для количественной оценки РНК в образцах хантавирусного препарата использовали ПЦР в режиме реального времени со штаммоспецифичными праймерами Ufa\_F, Ufa\_R, и зондом Ufa\_Z. Количественное содержание живого вируса ПУУ оценивали по титру вируса методом определения числа фокусобразующих единиц в культуре клеток Vero. Результаты

обработаны и проанализированы в программе GraphPad Prism 8.4.3. Представленные усредненные данные являются результатом трех независимых экспериментов, статистически обработанных с использованием одностороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки: ns — не значима, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## Результаты

Титр вируса ПУУ без добавления человеческого сывороточного альбумина снижался через 3 месяца хранения при температуре  $6\pm 2^\circ\text{C}$  до неопределяемого уровня по сравнению с контрольным образцом (рис. 1). Хранение ПУУ при  $37^\circ\text{C}$  приводило к полной инактивации через 24 ч вне зависимости от добавления 0,1% и 1% человеческого сывороточного альбумина в образцы (данные не показаны). Это подтверждает необходимость тщательного подбора условий хранения, предотвращающих термоинактивацию термолabileльных хантавирусов. Добавление 0,1% и 1% человеческого сывороточного альбумина в образцы, хранившиеся при температуре  $6\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3 месяцев, стабилизировало титр вируса на уровне



**Рисунок 1. Зависимость стабильности неинaktivированного вируса Пуумала (ПУУ) от условий хранения**  
Figure 1. A relation between the stability of non-inactivated Puumala virus (PUU) and storage conditions



3,7±0,5 lg ФОЕ/мл. В препарате ПУУ, не содержащем ЧСА, титр вируса после 5- и 40-кратной заморозки снижался до неопределяемых значений. При добавлении 0,1% и 1% человеческого сывороточного альбумина к образцам, после 5-кратного замораживания титр вируса снижался до 2,6±0,3 и 3,2±0,2 lg ФОЕ/мл соответственно по сравнению с контролем (p < 0,0001). После 40-кратной заморозки титр вируса снижался до неопределяемых значений (p < 0,0001).

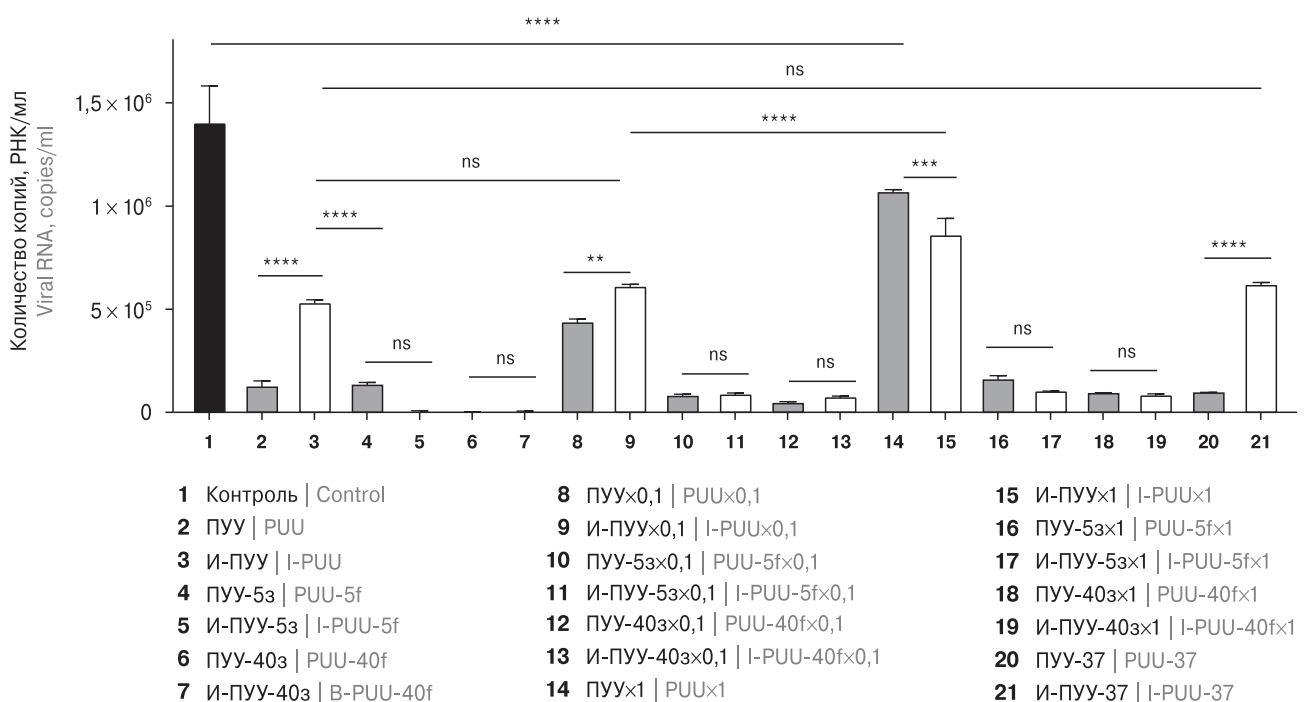
Количество копий вирусной РНК/мл при сравнении с контрольным образцом статистически значимо снизилось (p < 0,0001) в образце без ЧСА и с 0,1% ЧСА; для образца с 1% ЧСА снижение не наблюдалось (рис. 1). Замораживание образцов приводило к значимому снижению числа копий РНК/мл до 5,41±0,3 × 10<sup>3</sup> (p < 0,0001) при сравнении с образцами, хранившимися при 6±2°C в течение 3 месяцев, вне зависимости от добавления человеческого сывороточного альбумина. Стоит отметить, что наибольшее количество детектируемой РНК как после 5-кратной, так и после 40-кратной заморозки, выявляли при добавлении 1% ЧСА. Хранение образца при 37°C также достоверно снижало количество определяемой РНК/мл. Для препарата ПУУ была установлена прямая зависимость степени сохранности вирусной РНК от количества добавленного человеческого сывороточного альбумина. Установлена прямая корреляция между титром вируса и количеством копий РНК/мл. Эта зависимость сохранялась и при снижении титра вируса в результате хра-

нения. Добавление даже 0,1% человеческого сывороточного альбумина приводило к менее значительному снижению титра вируса и количества копий РНК, но корреляция сохранялась. Увеличение концентрации ЧСА приводило к статистически значимой сохранности титра вируса и количества копий РНК/мл.

Инактивированный вирус обладал большей стабильностью при хранении, в сравнении с ПУУ (рис. 2). Было показано, что вирусная РНК, несмотря на значительное повреждение при инактивации [2], стабильно определялась в течение 24–32 месяцев хранения при температуре 6±2°C, в отличие от ПУУ, что свидетельствует о наличии некоторой РНК-стабилизирующей активности самого бета-пропиолактона. Добавление человеческого сывороточного альбумина дополнительно стабилизировало И-ПУУ при хранении. При этом эффект коррелировал с концентрацией ЧСА. В образцах, подвергнутых 5- и 40-кратному замораживанию, и хранившихся 6 суток при 37°C, было отмечено достоверное снижение количества копий РНК (p < 0,0001), обратно пропорциональное концентрации человеческого сывороточного альбумина.

Данные, полученные в этом эксперименте, имеют нормальное распределение (данные не показаны).

Для оценки влияния человеческого сывороточного альбумина на иммуногенную активность И-ПУУ была выбрана концентрация 0,1%. На модели сирийских хомячков (рис. 3) были показаны значительные различия в иммуногенной актив-



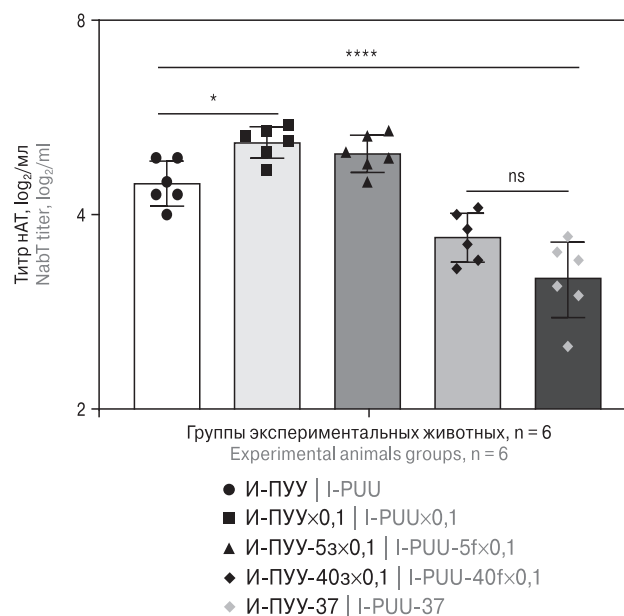
**Рисунок 2. Анализ стабильности инактивированного бета-пропиолактоном вируса Пуумала (И-ПУУ)**  
 Figure 2. A stability analysis for Puumala virus inactivated by beta-propiolactone (I-PUU)

ности пяти вариантов хранения И-ПУУ: 3 месяца при  $6\pm 2^\circ\text{C}$  без добавок (И-ПУУ); 3 месяца при  $6\pm 2^\circ\text{C}$  с добавлением 0,1% ЧСА (И-ПУУ-0,1) или после 5-кратной заморозки (И-ПУУ-5з  $\times$  0,1), или после 40-кратной заморозки (И-ПУУ-40з  $\times$  0,1); 6 суток при  $37^\circ\text{C}$  (И-ПУУ-37). Более высокий титр нАТ отмечен при добавлении 0,1% человеческого сывороточного альбумина ( $p = 0,0152$ ). При этом статистически значимых различий в титре нАТ между группами И-ПУУ и И-ПУУ-5з  $\times$  0,1 выявлено не было. И-ПУУ, хранившийся 6 дней при  $37^\circ\text{C}$ , обладал меньшей иммуногенной активностью (СГТ =  $3\pm 0,5 \log_2$ ) в сравнении с И-ПУУ ( $p < 0,0001$ ), что свидетельствует о значительном термическом разрушении иммуногенных эпитопов, сопровождающемся и значительным повреждением вирусной РНК. Также достоверно более низкий уровень нАТ определялся в группе после иммунизации И-ПУУ-40з  $\times$  0,1 в сравнении с И-ПУУ ( $p < 0,0001$ ). Таким образом, наблюдалась прямая зависимость между повреждением вирусной РНК в результате термического воздействия при хранении и уровнем иммуногенной активности для И-ПУУ-37 и И-ПУУ-40з  $\times$  0,1.

Исследования подтвердили факт потери вирулентной и иммуногенной активности вируса Пуумала при термоинактивации, а также установили влияние условий хранения на детектируемые уровни вирусной РНК. Установлена прямая корреляция между титром вируса и количеством копий РНК/мл. Эта зависимость сохранялась и при снижении титра вируса в результате хранения. Добавление даже 0,1% ЧСА приводило к менее значительному снижению титра вируса и количества копий РНК. Добавление ЧСА к инактивированному вирусу приводило к стабилизации иммунного ответа, а также способствовало стабилизации вирусной РНК на разных этапах хранения И-ПУУ, включая многократное замораживание. Можно предполагать, что белковые эпитопы, ответственные за протективный иммунный ответ, претерпевают менее выраженные конформационные изменения в присутствии ЧСА.

## Список литературы/References

1. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Петров В.А. Эффективность применения культуральных антигенов для серодиагностики ГЛПС с помощью метода иммунофлюоресценции // Вопросы вирусологии. 1988. № 1. С. 71–75. [Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Petrov V.A. The effectiveness of culture antigens for HFRS serodiagnostics by means of the immunofluorescence method. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1988, no. 1, pp. 71–75. (In Russ.)]
2. Егорова М.С., Курашова С.С., Дзагурова Т.К., Баловнева М.В., Ишмухаметов А.А., Ткаченко Е.А. Влияние инактивирующих вирус агентов на иммуногенность вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Биотехнология. 2020. Т. 36, № 2. С. 64–73. [Egorova M.S., Kurashova S.S., Dzagurova T.K., Balovneva M.V., Ishmukhametov A.A., Tkachenko E.A. The effect of virus inactivating agents on the immunogenicity of vaccines against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Biotechnologiya = Biotechnology*, 2020, vol. 36, no. 2, pp. 64–73. (In Russ.)] doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-64-73
3. Курашова С.С., Баловнева М.В., Ишмухаметов А.А., Теодорович Р.Д., Попова Ю.В., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Гуморальный иммунный ответ после иммунизации морских свинок вакцинным препаратом на основе вируса Пуумала // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 971–975. [Kurashova S.S., Balovneva M.V., Ishmukhametov A.A.,



**Рисунок 3. Зависимость иммуногенной активности инактивированного бета-пропиолактоном хантавирусного вакцинного препарата от условий хранения**

Figure 3. A relation between the immunogenicity of beta-propiolactone inactivated hantavirus vaccine and storage conditions

**Примечание.** Титры нейтрализующих антител определяли в сыворотках крови сирийских хомяков ( $n = 6$ ) после двукратной иммунизации в неразведенном виде: хранение 3 месяца при  $6\pm 2^\circ\text{C}$  без добавок (И-ПУУ); хранение 3 месяца при  $6\pm 2^\circ\text{C}$  с добавлением 0,1% ЧСА (И-ПУУ  $\times$  0,1) или после 5кратной заморозки (И-ПУУ-5з  $\times$  0,1), или после 40-кратной заморозки (И-ПУУ-40з  $\times$  0,1); хранение 6 суток при  $37^\circ\text{C}$  (И-ПУУ-37). Титры нАТ измеряли методом РН/ФОВ/50.

Note. The neutralizing antibody titer ( $n = 6$ ) were determined in Syrian hamsters blood sera after dual immunization in undiluted form: storage for 3 months at  $6\pm 2^\circ\text{C}$  without additives (I-PUU); storage for 3 months at  $6\pm 2^\circ\text{C}$  with 0.1% HSA (I-PUU  $\times$  0.1) or after freezing 5 times (I-PUU-5f  $\times$  0.1), or after freezing 40 times (I-PUU-40f  $\times$  0.1); storage for 6 days at  $37^\circ\text{C}$  (I-PUU-37). The neutralizing antibodies titer (NAb) was determined by the focus reduction neutralization test (FRNT50) using Vero cells.

- Teodorovich R.D., Popova Yu.V., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. Immune response evaluation in the guinea pigs after immunization with the experimental Puumala virus vaccine. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 971–975. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-IRE-1956
4. Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Синугина А.А., Коротина Н.А., Набатников П.А., Соцкова С.Е., Баловнева М.В., Малкин А.Е. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Ремедиум. 2015. Т. 6. С. 47–53. [Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Sinyugina A.A., Korotina N.A., Nabatnikov P.A., Sotskova S.E., Balovneva M.V., Malkin A.E. Development of experimental and industrial technology for the production of a vaccine for the prevention of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Remedium = Remedium*, 2015, vol. 6, pp. 47–53. (In Russ.)]
  5. Choo J.J.Y., McMillan C.L.D., Fernando G.J.P., Hall R.A., Young P.R., Hobson-Peters J., Muller D.A. Developing a stabilizing formulation of a live chimeric dengue virus vaccine dry coated on a high-density microarray patch. *Vaccines (Basel)*, 2021, vol. 9, no. 11: 1301. doi: 10.3390/vaccines9111301
  6. Dzagurova T.K., Klempa B., Tkachenko E.A., Slyusareva G.P., Morozov V.G., Auste B., Kruger D.H. Molecular diagnostics of hemorrhagic fever with renal syndrome during a Dobrava virus infection outbreak in the European part of Russia. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 12, pp. 4029–4036. doi: 10.1128/JCM.01225-09
  7. Egorova M.S., Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Balovneva M.V., Deviatkin A.A., Safonova M.V., Ozherelkov S.V., Khapchaev Y.K., Balkina A.S., Belyakova A.V., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. [Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Vopr. Virusol.*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 65–73. (In Russ.). doi: 10.36233/0507-4088-30
  8. Marth E., Kleinhapfl B. Albumin is a necessary stabilizer of TBE-vaccine to avoid fever in children after vaccination. *Vaccine*, 2001, vol. 20, no. 3–4, pp. 532–537. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00329-2
  9. Miao J., Chard L.S., Wang Z., Wang Y. Syrian hamster as an animal model for the study on infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 2329. doi: 10.3389/fimmu.2019.02329
  10. Safronetz D., Ebihara H., Feldmann H., Hooper J.W. The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res.*, 2012, vol. 95, no. 3, pp. 282–292. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.06.002
  11. Xu W., He J., Wu G., Xiong F., Du H., Wang G. Stabilization and immune response of HBsAg encapsulated within poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres using HSA as a stabilizer. *Int. J. Pharm.*, 2015, vol. 496, no. 2, pp. 332–341. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.004

**Авторы:**

**Ветрова А.Н.**, лаборант-исследователь лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия; студент магистратуры направления «Биотехнология» ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

**Курашова С.С.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

**Теодорович Р.Д.**, научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

**Попова Ю.В.**, научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

**Блинова Е.А.**, младший научный сотрудник научной группы геномной инженерии и биотехнологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Набатников П.А.**, ведущий технолог ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

**Ткаченко Е.А.**, д.м.н., профессор, руководитель научного направления ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

**Дзагурова Т.К.**, д.м.н., зав. лабораторией геморрагических лихорадок ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия.

**Authors:**

**Vetrova A.N.**, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation; Magistracy Student of Biotechnology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

**Kurashova S.S.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

**Teodorovich R.D.**, Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

**Popova Yu.V.**, Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

**Blinova E.A.**, Junior Researcher, Science Team for Genetic Engineering and Biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russian Federation;

**Nabatnikov P.A.**, Leading Technologist, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

**Tkachenko E.A.**, DSc (Medicine), Professor, Scientific Supervisor, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation;

**Dzagurova T.K.**, DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russian Federation.