

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Куяров А. А.<sup>1</sup>, Миронов А. Ю.<sup>2,3</sup>, Куяров А. В.<sup>1</sup>, Даньшина Е. А.<sup>1,4</sup>

## СТРАТЕГИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ (НЕПОЛИО) ИНФЕКЦИИ

<sup>1</sup>БУ ВО ХМО-Югры «Сургутский государственный университет», 628403, Сургут, Россия;

<sup>2</sup>«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», 115682, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в ХМАО-Югре» Роспотребнадзора, 628011, Ханты-Мансийск, Россия

**Обоснование.** За последнее десятилетие в различных регионах мира отмечался высокий уровень заболеваемости энтеровирусными инфекциями (ЭВИ). Среди ЭВИ преобладали экзантемные формы, что связано с доминированием среди циркулирующих в популяции непوليوмиелитных энтеровирусов (НПЭВ) вида Энтеровирус А (ЭВА<sub>71</sub>, вирус Коксаки А<sub>6</sub>, А<sub>16</sub>, А<sub>10</sub>). В 2018 году Всемирная организация здравоохранения признала ЭВИ (в том числе, вызываемую ЭВА<sub>71</sub> и ЭВД<sub>68</sub>) кандидатом на включение в перечень заболеваний, возбудителей которых следует изучать в приоритетном порядке. ЭВИ, вызываемая НПЭВ, сохраняет свою актуальность в Российской Федерации в связи с широким распространением и активной циркуляцией эпидемических вариантов НПЭВ. Результаты филогенетического анализа последовательностей генома штаммов вирусов Коксаки А<sub>6</sub> и Коксаки А<sub>16</sub> указывают на их генетическое разнообразие и значительные отличия от штаммов, циркулировавших на территории Российской Федерации. Риски роста заболеваемости ЭВИ связаны с возможным возобновлением циркуляции, в первую очередь, вируса ЕСНО<sub>30</sub> эпидемических генотипов h и eC2, вируса ЕСНО<sub>9</sub> и ряда других энтеровирусов вида Энтеровирус В. Не исключена вероятность распространения Энтеровируса А<sub>71</sub>.

**Цель** - обобщить стратегические направления разработки вакцинопрофилактики энтеровирусной (неполио) инфекции.

**Материал и методы.** Проанализированы публикации открытых источников, размещенных в электронных базах PubMed, Medline и e-Library по ЭВИ за период с 2018 по 2023 год по вопросам разработки и регистрации вакцин за рубежом и в Российской Федерации.

**Результаты.** Энтеровирусная непوليوмиелитная инфекция и её проявление в виде синдрома «hand, foot and mouth disease» (HFMD) к настоящему времени превратились в глобальную общественную угрозу. Лицензирование вакцины против инактивированного энтеровируса А<sub>71</sub> (EV-A<sub>71</sub>) стало первым шагом в использовании вакцины для борьбы с HFMD. Новые проблемы возникают в связи с изменениями в спектре патогенов, в то время как вакцины, направленные против других распространённых серотипов, находятся на доклинической стадии. Миссия стратегии профилактики широкого спектра явно заключается в том, чтобы отдавать предпочтение поливалентным вакцинам. Предпринята попытка разработки поливалентных вакцин с помощью простой комбинации мощных одновалентных вакцин или создания химерных вакцин, состоящих из эпитопов, полученных из различных серотипов вирусов. В обзоре обобщены последние достижения в разработке вакцины против HFMD и обсуждаются следующие шаги на пути к созданию безопасной и эффективной вакцины против HFMD, способной вызывать перекрёстный защитный гуморальный иммунный ответ.

**Заключение.** Отсутствие широко используемых защитных вакцин делает энтеровирусы человека проблемными патогенами, вызывающими озабоченность общественного здравоохранения. Инактивированные вакцины EV-A<sub>71</sub> демонстрируют высокую эффективность, хорошую стойкость иммуногенности и приемлемые профили безопасности среди вакцинированного населения и эффективно снижают заболеваемость HFMD, особенно с тяжёлыми случаями. Однако возросла обеспокоенность в связи с изменениями в доминирующих штаммах вируса, вызывающих HFMD, и появлением новых серотипов, вызывающих заболевание. Поэтому крайне важно изучить состав поливалентной вакцины с защитой широкого спектра действия и достаточной безопасностью. Необходимы исследования, которые способствовали развитию направлений, включающих усовершенствованный дизайн вакцины и стратегию, более эффективного использования вектора вакцины наряду с разработкой новых платформ для вакцин. Актуально описание вариантов развития иммунологической памяти при заражении различными серотипами, что могло бы послужить руководством при разработке вакцины. Широкое распространение и активная циркуляция эпидемически значимых вариантов НПЭВ диктует необходимость повышенного внимания к разработке и регистрации отечественных вакцин.

**Ключевые слова:** непوليوмиелитные энтеровирусы; болезни рук, ног и полости рта (HFMD); вакцинопрофилактика

**Для цитирования:** Куяров А. А., Миронов А. Ю., Куяров А. В., Даньшина Е. А. Стратегические направления разработки вакцинопрофилактики энтеровирусной (Неполио) инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 10:18.

DOI: <https://doi.org/10.51620/EIB-2024-29-1-10-18>

**Для корреспонденции:** Куяров Александр Васильевич, д-р мед. наук, проф., профессор кафедры многопрофильной клинической подготовки медицинского института Сургутского государственного университета о); e-mail: [kujarov@mail.ru](mailto:kujarov@mail.ru)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 09.02.2023

Принята к печати 22.02.2024

Опубликовано 05.03.2024

Kuyarov A. A.<sup>1</sup>, Mironov A. Yu.<sup>2,3</sup>, Kuyarov A. V.<sup>1</sup>, Danshina E. A.<sup>1,4</sup>

## STRATEGIC DIRECTIONS FOR THE DEVELOPMENT OF VACCINE PROPHYLAXIS OF ENTEROVIRUS (NON-POLIO) INFECTION

<sup>1</sup>BU VO KHMO-Yugra "Surgut State University", 628403, Surgut, Russia;

<sup>2</sup>"Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G. N. Gabrichevsky" Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>academy of Postgraduate Education of the Federal State Budgetary Institution "Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the FMBA of Russia", 115682, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>FBUZ "Center of Hygiene and Epidemiology in KhMAO-Yugra" of Rospotrebnadzor, 628011, Khanty-Mansiysk, Russia

**Justification.** Over the past decade, there has been a high incidence of enterovirus infections (EVI) in various regions of the world. Exanthemic forms prevailed among EVI, which is associated with the dominance of Enterovirus A (EVA71, Coxsackie viruses A6, A16, A10) among non-polioviral enteroviruses (NPEV) circulating in the population. In 2018, the World Health Organization recognized EVI (including EVA71 and EVD68) as a candidate for inclusion in the list of diseases whose pathogens should be studied as a priority. EVI caused by NPEV remains relevant in the Russian Federation due to the widespread and active circulation of epidemic variants of NPEV. The results of phylogenetic analysis of the genome sequences of the Coxsackie A6 and Coxsackie A16 virus strains indicate their genetic diversity and significant differences from the strains circulating on the territory of the Russian Federation. The risks of an increase in the incidence of EVI are associated with the possible resumption of circulation, primarily of the ESNO30 virus of epidemic genotypes h and eS2, ESNO9 virus and a number of other enteroviruses of the Enterovirus type B. The probability of the spread of Enterovirus A71 is not excluded.

**The aim** - is to summarize the strategic directions for the development of vaccine prophylaxis of entero-viral (non-polio) infection.

**Material and methods.** The publications of open sources published in the electronic databases PubMed, Medline and e-Library on EVI for the period from 2018 to 2023 on the development and registration of vaccines abroad and in the Russian Federation are analyzed.

**Results.** Enterovirus non-polioviral infection and its manifestation in the form of the syndrome "hand, foot and mouth disease" (HFMD) have now become a global public threat. Licensing of the vaccine against inactivated enterovirus A71 (EV-A71) was the first step in using the vaccine to combat HFMD. New problems arise due to changes in the pathogen spectrum, while vaccines against other common serotypes are at the preclinical stage. The mission of the broad spectrum prevention strategy is clearly to give preference to multivalent vaccines. An attempt has been made to develop polyvalent vaccines using a simple combination of powerful monovalent vaccines or the creation of chimeric vaccines consisting of epitopes derived from various serotypes of viruses. The review summarizes recent advances in the development of the HFMD vaccine and discusses the next steps towards creating a safe and effective HFMD vaccine capable of inducing a cross-protective humoral immune response.

**Conclusion.** The lack of widely used protective vaccines makes human enteroviruses problematic pathogens of public health concern. Inactivated EV-A71 vaccines demonstrate high efficacy, good immunogenicity resistance and acceptable safety profiles among the vaccinated population and effectively reduce the incidence of HFMD, especially with severe cases. However, there has been increased concern about changes in the dominant strains of the virus that cause HFMD and the emergence of new serotypes that cause the disease. Therefore, it is extremely important to study the composition of a polyvalent vaccine with broad-spectrum protection and sufficient safety. Research is needed that has contributed to the development of areas including improved vaccine design and strategy, more effective use of the vaccine vector, along with the development of new vaccine platforms. It is relevant to describe the variants of the development of immunological memory when infected with various serotypes, which could serve as a guide in the development of a vaccine. The widespread and active circulation of epidemiologically significant variants of NPEV dictates the need for increased attention to the development and registration of domestic vaccines.

**Key words:** non-polio enteroviruses; diseases of the hands, feet and oral cavity (HFMD); vaccine prophylaxis

**For citation:** Kuyarov A. A., Mironov A. Yu., Kuyarov A. V., Danshina E. A. Strategic directions for the development of vaccine prophylaxis of enterovirus (Non-viral) infection. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni (Epidemiology and infectious diseases)*. 2024; 101-8. DOI: <https://doi.org/10.51620/EIB-2024-29-1-10-18>

**For correspondence:** Kuyarov Alexander Vasilyevich, Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Multi-disciplinary Clinical Training of the Medical Institute of Surgut State University o); e-mail: [kujarov@mail.ru](mailto:kujarov@mail.ru)

### Information about authors:

Kuyarov A.A. <https://orcid.org/0000-0003-1346-4827>

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>

Kuyarov A. V., <https://orcid.org/0000-0001-8388-9607>;

Danshina E. A. <https://orcid.org/0000-0002-3382-2161>

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Financing.** The study was carried out within the framework of the industry program of Rospotrebnadzor.

Received 02/19/2023

Accepted 22.02.2024

Published 05.03.2024

**Введение.** За последнее десятилетие в различных регионах мира отмечается высокий уровень заболеваемости энтеровирусными инфекциями (ЭВИ). Наибольшее

число случаев регистрировалось в странах Юго-Восточной Азии и Тихоокеанского региона. В этих регионах в структуре клинических форм ЭВИ преоб-

ладают экзантемные формы, что связано с доминированием среди циркулирующих неполиомиелитных энтеровирусов (далее - НПЭВ) вида Энтеровирус А (ЭВА<sub>71</sub>, вирусов Коксаки А<sub>6</sub>, А<sub>16</sub>, А<sub>10</sub>). Распространение ЭВИ, связанной с формированием вариантов НПЭВ с повышенной нейровирулентностью, считается серьезной глобальной угрозой [1, 2].

В 2018 году Всемирная организация здравоохранения признала ЭВИ (в том числе вызываемую ЭВА<sub>71</sub> и ЭВД<sub>68</sub>) кандидатом на включение в перечень заболеваний, возбудителей которых следует изучать в приоритетном порядке. ЭВИ, вызываемая НПЭВ, сохраняет свою актуальность в Российской Федерации в связи с широким распространением и активной циркуляцией эпидемических вариантов НПЭВ. Актуален и риск завоза с сопредельных территорий и государств вирусов, ранее не встречавшихся в нашей стране. В 2020 году на фоне ограничительных мероприятий и многократного снижения заболеваемости ЭВИ снизилось и число идентифицированных энтеровирусов. В 2022 году рост числа случаев ЭВИ, в значительной степени, связан с распространением вирусов Коксаки А<sub>6</sub>, Коксаки А<sub>16</sub> и других вирусов вида Энтеровирус А. Рост заболеваемости ЭВИ в текущем году связан с активизацией и распространением вирусов ЕСНО<sub>6</sub>, ЕСНО<sub>11</sub>, Коксаки А<sub>9</sub>, ЕСНО<sub>9</sub>, и других вирусов вида Энтеровирус В [1].

Результаты филогенетического анализа последовательностей генома штаммов вирусов Коксаки А<sub>6</sub> и Коксаки А<sub>16</sub> указывают на их генетическое разнообразие и значительные отличия от штаммов, циркулировавших на территории Российской Федерации в прежние годы, в том числе в 2021 году, что связано с заносами новых вариантов энтеровирусов на территорию страны из-за рубежа. Риски роста заболеваемости ЭВИ связаны с возможным возобновлением циркуляции, в первую очередь, вируса ЕСНО<sub>30</sub> эпидемических генотипов h и eC2, вируса ЕСНО<sub>9</sub> и ряда других энтеровирусов вида Энтеровирус В. Не исключена и вероятность распро-

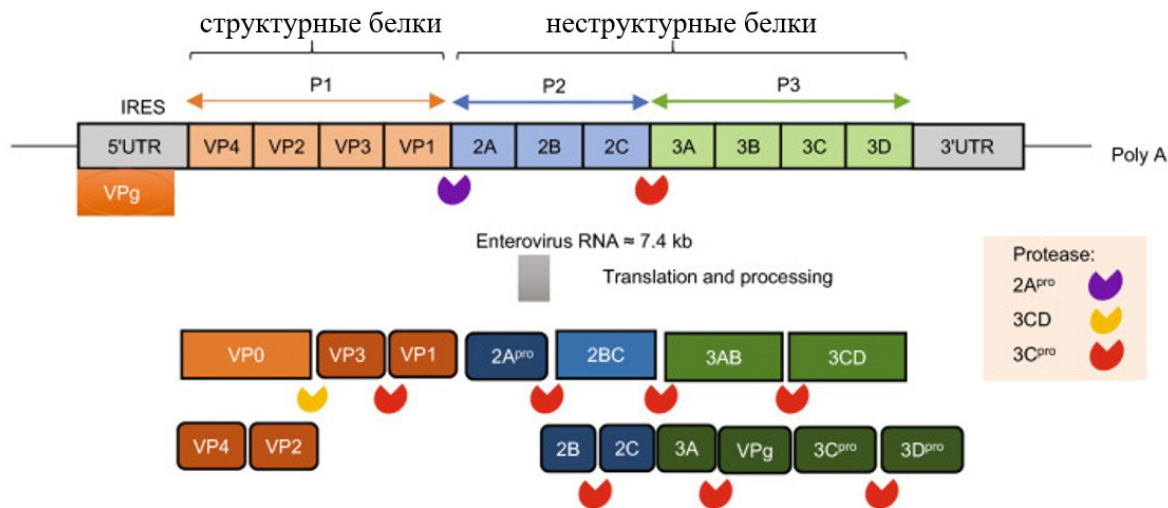
странения Энтеровируса А<sub>71</sub> [1, 2].

**Цель** - обобщить стратегические направления разработки вакцинопрофилактики энтеровирусной (неполио) инфекции.

**Материал и методы.** Проанализированы публикации открытых источников, размещённых в электронных базах данных PubMed, Medline, e-Library по ЭВИ за период с 2017 по 2023 год по вопросам разработки и регистрации вакцин за рубежом и в Российской Федерации.

**Структура, современная классификация, номенклатура энтеровирусов и связь с клиническими проявлениями.** Энтеровирусы - одноцепочечные РНК-геномные вирусы положительной полярности с размером генома приблизительно 7,4 кбайт. Геномная РНК является инфекционной, но её инфекционность примерно в 10<sup>6</sup> раз меньше, чем у интактного вириона. На 5'-конце расположен длинный нетранслируемый участок (600-1200 н. о.) необходимый для трансляции, вирулентности, возможно, инкапсидации. На 3'-конце расположен короткий участок (50-100 н. о.), необходимый для образования минус нити РНК. В остальной части генома закодирован один полипротеин из ~ 2100 аминокислот. Оба конца генома модифицированы: к 5'-концу присоединён небольшой белок VPg, 3'-конец полиаденилирован.

РНК энтеровирусов транслируется полисомами, синтезируется один полипротеин, поскольку у энтеровирусов имеется только один ген. Полипротеин имеет области с протеолитической активностью цистеин-протеазы, благодаря чему он разрезается на три белка-предшественника: P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>. Белок P<sub>1</sub> кодирует четыре структурных белка (VP<sub>4</sub>-VP<sub>2</sub>-VP<sub>3</sub>-VP<sub>1</sub>), белки P<sub>2</sub> и P<sub>3</sub> кодируют семь неструктурных белков (P2-2A, 2B, 2C; P3-3A, 3B, 3C, 3D). P<sub>2</sub> – источник белков, модифицирующих клетку-хозяина. Один из белков, происходящих из P<sub>3</sub>, - VPg, а другие белки этого предшественника являются вирусной репликазой и ферментами, модифицирующими поведение клетки-хозяина (см. рисунок) [3].



Четыре структурных белка собираются вместе, образуя основной строительный блок капсида вириона, а именно протомер. Пять протомеров объединяются, образуя пентамер, 12 пентамеров и вирусный геном образуют икосаэдрический вирион диаметром ~ 30 нм [3].

Международный комитет по систематике вирусов классифицирует энтеровирусы на 15 видов - энтеровирус (EV) от А до L и риновирус (RV) от А до С. RV-A, В и С и EV-A, В, С, D являются единственными видами энтеровирусов, поражающими людей [3].

Первоначально подвиды энтеровирусов классифицированы серологически на основе тестирования на перекрестную нейтрализацию и назывались «серотипами». В связи с широким использованием секвенирования генома для характеристики вирусов, классификация подвидов теперь основана на последовательности основного гипервариабельного капсидного белка VP<sub>1</sub>, и они называются «типами». На сегодняшний день идентифицировано 326 типов энтеровирусов среди 15 различных видов. Среди различных видов, которые поражают людей, к ним относятся 168 различных типов риновирусов, 3 типа полиовирусов и 103 других типа энтеровирусов. Типы энтеровирусов определяются на основе идентичности =>75% нуклеотидной и >85% аминокислотной последовательностей штамму-прототипу.

Новые типы энтеровирусов обозначаются с помощью префикса EV или RV, за которым следует буква вида и обозначение номера типа. По историческим причинам некоторые типы энтеровирусов назывались по-разному. Все ЕСНО-вирусы относятся к виду энтеровирусов В, однако они сокращаются с помощью префикса «Е» (например, E<sub>30</sub>), даже если они не относятся к виду энтеровирусов Е. Конкретные типы вируса Коксаки (CV) обозначаются префиксом CV и могут принадлежать либо к видам EV-A, EV-B, либо EV-C в зависимости от характеристик их последовательности VP<sub>1</sub> [3].

Регистрация крупными вспышками в Азиатско-Тихоокеанском регионе **энтеровирусной пузырчатки** или болезни рука-нога-рот (About Hand, Foot, and Mouth Disease — HFMD) указало на глобальную проблему общественного здравоохранения. Несколько вирусов идентифицированы в качестве основных патогенов, связанных с HFMD, и в этот список входят энтеровирус A<sub>71</sub> (EV-A<sub>71</sub>), вирус Коксаки A<sub>16</sub> (CV-A<sub>16</sub>), CV-A<sub>6</sub>, CV-A<sub>10</sub>, принадлежащие к роду *Enterovirus* семейства *Picornaviridae* [4]. HFMD часто встречается у детей в возрасте до пяти лет и, как правило, характеризуется везикулярной до экзантемой с самоограничением. По-видимому, существует связь между клиническими проявлениями и различиями серотипов: некоторые инфекции EV-A<sub>71</sub> приводят к серьёзным осложнениям, включая энцефалит ствола головного мозга, асептический менингит, острый вялый паралич, сердечно-лёгочную недостаточность или смерть, в то время как другие серотипы обычно вызывают клинику с лёгкими симптомами [5].

Исторически сложилось так, что на EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub> в первую очередь приходились глобальные вспышки HFMD; однако другие серотипы постепенно завоевывают доминирующее положение благодаря широкой вакцинации и защите с помощью инактивированных вакцин EV-A<sub>71</sub>. Действительно, CV-A<sub>6</sub> вытеснил EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub> в качестве преобладающего серотипа в 2013 году в Шанхае, и CV-A<sub>10</sub> постепенно стал доминирующим энтеровирусом, связанным с HFMD [6].

**Иммунные реакции хозяина на естественную инфекцию вирусами, связанными с HFMD.** Гуморальные иммунные реакции против вирусов, связанных с HFMD, продуцируют вирусспецифичные нейтрализующие

антитела, которых, как правило, достаточно для сдерживания распространения вируса и превращения HFMD в самоограничивающееся заболевание. Имеются сообщения о случаях заболевания у младенцев и детей младшего возраста, когда развивались тяжёлые осложнения, несмотря на нормальные или почти нормальные титры антител, по сравнению с пациентами с лёгкой формой HFMD, что указывает на то, что другие факторы способствуют развитию тяжелой формы заболевания [7].

На тяжесть заболевания могут влиять следующие факторы: состав IgG, состояние клеточного иммунитета, генетические вариации. В первую очередь, на тяжесть заболевания влияет изменение состава IgG. Различные подклассы IgG, синтез которых индицируется патогеном при вирусной инфекции, ведут себя по-разному при борьбе с вирусом. Подкласс IgG<sub>1</sub>, в меньшей степени, а подкласс IgG<sub>2</sub> в большей степени опосредуют нейтрализующую вирус активность, в то время как подкласс IgG<sub>3</sub> этого не делает. Следующий фактор - это изменение клеточного иммунитета. Циркулирующие вирусспецифичные CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Т-клетки и CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-клетки должны быть эффективно задействованы для своевременной элиминации инфицированных вирусом клеток и содействия выработке антител [7].

Фактор генетических вариаций. Могут существовать внутренние различия между индивидуумами в противодействии вирусной инфекции из-за унаследованных вариаций факторов хозяина, которые определяют восприимчивость к вирусу на клеточном и организменном уровнях. Среди трёх вышеупомянутых факторов клеточный иммунный ответ является наиболее достижимым звеном для специфической профилактики вакциной [5].

**Критические эпитопы, распознаваемые нейтрализующими антителами.** Как компоненты капсида вириона, VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> являются основными мишенями вируснейтрализующих антител человека. VP<sub>1</sub> участвует в образовании большинства вируснейтрализующих эпитопов, и его связывание может быть использовано для оценки эффективности вакцины. Белки VP<sub>2</sub> и VP<sub>3</sub> содержат меньше вируснейтрализующих эпитопов по сравнению с VP<sub>1</sub>, несмотря на структурное сходство. Среди распространённых энтеровирусов, связанных с HFMD, EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub> обладают высокой сохранностью капсидных белков, с идентичностью последовательностей примерно на 80%, и их вируснейтрализующие эпитопы в значительной степени перекрываются [8].

Вируснейтрализующие эпитопы подразделяются на линейные эпитопы и конформационные. Большинство линейных эпитопов расположены в петлях В-С, Е-Ф, G-Н, а также на С-конце VP<sub>1</sub>, петлях Е-Ф VP<sub>2</sub> и N-концевых областях VP<sub>3</sub>. CV-A<sub>16</sub> также имеет линейные эпитопы на дне каньона VP<sub>1</sub> и в петле G-Н VP<sub>3</sub> [9]. Сообщалось также о линейных вируснейтрализующих антигенных сайтах в петле Е-Ф CV-A<sub>10</sub> VP<sub>2</sub>, в петле G-Н, и на С-конце CV-A<sub>6</sub> VP<sub>1</sub> [10]. Идентификация консервативных нейтрализующих линейных эпитопов обеспечивает важные цели для разработки поливалентных вакцин [5]. Конформационные эпитопы, состоящие из аминокислот с прерывистой последовательностью, сближаются благодаря трёхмерному сворачиванию белка. Их определить сложнее по сравнению с

линейными эпитопами, поэтому для их окончательной валидации может потребоваться структурный анализ. Идентифицирован ряд конформационно вируснейтрализующих эпитопов, большинство из этих сайтов определены при исследованиях EV-A<sub>71</sub> [9].

Примечательным примером являются mAb E18/19, представляющие собой два антитела, образующихся при иммунизации незрелым вирусом EV-A<sub>71</sub>. Оба антитела нейтрализуют EV-A<sub>71</sub>, но с помощью различных механизмов. E18 связывается с EV-A<sub>71</sub> и вызывает изменение конформации связанного вируса, что способствует высвобождению вирусного генома и делает EV-A<sub>71</sub> инактивированным. E19 не индуцирует инъекцию генома. Структурный анализ показал, что E18 и E19 распознают конформационные эпитопы на капсиде EV-A<sub>71</sub>, но их мишени различны. Сайты связывания E18 расположены между протомерами VP<sub>4</sub>-VP<sub>2</sub>-VP<sub>3</sub>-VP<sub>1</sub>, а сайты E19 находятся исключительно в пределах одного промотора. Дополнительные конформационные эпитопы идентифицированы в других структурных особенностях капсидов EV-A<sub>71</sub>, включая пятикратную ось, «ручку» и петлю G-H, северный край каньона, дно каньона, южный край каньона, трёхкратное плато и двукратное плато. Исследования CV-A<sub>6</sub> показали, что существуют конформационные эпитопы, расположенные в петлях B-C, E-F, H-I VP<sub>1</sub> [5].

#### Одновалентные кандидаты в вакцины против HFMD

**Инактивированная цельновирусная вакцина.** По сравнению с другими вакцинами-кандидатами, инактивированные вакцины EV-A<sub>71</sub> являются единственными коммерческими вакцинами, присутствующими на рынке. Управление по контролю за продуктами и лекарствами КНР (FDA) выдало сертификаты на лекарственные препараты и лицензии на производство инактивированных вакцин EV-A<sub>71</sub> от 3 компаний: Sinovac, Vigoo, Китайской академии медицинских наук (CAMS). Все вакцины основаны на субгенотипе C<sub>4</sub> - наиболее распространённом в Китае генотипе, хотя с различным штаммом вируса и вариациями производственного процесса [3]. После успешных клинических испытаний I-III фазы недавнее крупномасштабное когортное исследование IV фазы лицензированной инактивированной вакцины EV-A<sub>71</sub> установило общую эффективность защиты от инфекции EV-A<sub>71</sub> на уровне 89,7% наряду с 4,58% зарегистрированных побочных реакций [11]. Помимо материкового Китая, инактивированные вакцины EV-A<sub>71</sub> также разработаны в Тайваньском регионе и Сингапуре, нацеленные на субгенотипы B<sub>3</sub> и B<sub>4</sub> соответственно. Вакцина EV-A<sub>71</sub>, разработанная в Тайваньском регионе, оценена в ходе клинических испытаний II фазы, в которых приняли участие в общей сложности 365 младенцев или детей в возрасте от 2 месяцев до 11 лет. Достигнута серопротекция (титр нейтрализации  $\geq 1:32$ ), длящейся в течение 2-х лет у большинства участников без сообщений о серьёзных побочных явлениях. Наблюдалась перекрёстная реакция против других генотипов штамма EV-A<sub>71</sub>, включая B<sub>5</sub>, C<sub>4a</sub>, C<sub>4b</sub>, C<sub>5</sub> [12]. Клиническое исследование III фазы началось в 2019 году. Проведено только маломасштабное клиническое испытание I фазы вакцины EV-A<sub>71</sub>, разработанной в Сингапуре. В исследовании утверждалось, что вакцина индуцирует высокий иммунный ответ про-

тив HFMD, вызванного EV-A<sub>71</sub>, хотя данные не были публично раскрыты. Иммунизации инактивированными вирионами, полученными из CV-A<sub>16</sub>, CV-A<sub>10</sub>, CV-A<sub>6</sub>, изучены только на животных моделях, результаты предоставили иммунологические и функциональные доказательства, подтверждающие их эффективность. Полученная сыворотка содержала высокие уровни вирусоспецифических нейтрализующих антител, а сыворотка от иммунизированных мышей-матерей обеспечивала защиту от летальных исходов, вызванных вирулентными вирусами, связанными с HFMD, когда её пассивно перенесли неонатальным мышам [13]. Инактивированная цельновирионная вакцина может представлять собой наиболее доступную моновалентную вакцину для специфической профилактики HFMD.

**Рекомбинантные субъединичные вакцины.** Вирусоподобные частицы (VLP) представляют собой особую форму рекомбинантных субъединичных вакцин против вирусов без оболочки и могут генерироваться рядом биосистем. Принцип EV VLPs заключается в совместной экспрессии генов, кодирующих предшественник капсидного белка P<sub>1</sub> и протеазу 3CD, что приводит к расщеплению P<sub>1</sub> на три капсидные субъединицы белков VP<sub>0</sub>, VP<sub>1</sub>, VP<sub>3</sub> под действием протеазы 3CD. VP<sub>0</sub>, VP<sub>1</sub>, VP<sub>3</sub> самостоятельно собираются в VLP, которые принимают естественную структуру вирусного капсида и после очистки могут служить потенциальными кандидатами на вакцину. VLP, полученные из видов EV-A<sub>71</sub>, CV-A<sub>16</sub>, CV-A<sub>6</sub>, CV-A<sub>10</sub>, успешно продуцируются в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [14]. Иммунизация мышей показала, что VLP способны вызывать высокие титры вируснейтрализующих антител и обеспечивать эффективную защиту от смертельного вирусного заболевания. VLP-вакцины против HFMD индуцируют высокий антигенспецифический B-клеточный иммунный ответ, сравнимый с инактивированными вакцинами. Получены EV<sub>71</sub>-VLPs у *Pichia pastoris*, достигнув высокого уровня экспрессии EV<sub>71</sub>-VLPs, превышающего 250 мг/л. Благодаря более высокому выходу целевого продукта и большей рентабельности, EV<sub>71</sub>-VLP, произведенные в *Pichia pastoris*, проходят клинические испытания, что является многообещающим началом для будущей коммерциализации вакцины [15].

**Рекомбинантные вирусно-переносящие вакцины.** Гены P<sub>1</sub> и 3CD EV-A<sub>71</sub> встроены в геном вируса везикулярного стоматита (VSV), для создания рекомбинантного VSV для получения VLPs, защищающих новорожденных мышей от летального заражения вирусом. Новая рекомбинантная аденовирусная вакцина Ad-EV VLP с генами P<sub>1</sub> и 3CD EV-A<sub>71</sub>, встроенными в геном аденовируса для экспрессии VLPs, индуцирует специфичные к EV-A<sub>71</sub> вируснейтрализующие антитела и Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-сбалансированный клеточный иммунный ответ у иммунизированных мышей, тогда как инактивированная вакцина EV-A<sub>71</sub> активирует только Th<sub>2</sub>-опосредованные вируснейтрализующие антительные реакции для защиты от вирусной инфекции. Иммуногенность эпитопа 71-6 (aa 176-190 из VP<sub>3</sub>) протестирована с использованием частицы P норовируса в качестве носителя вакцины, сыворотка мышей, иммунизированных полученной химерной частицей P, способна защитить мышей-сосунов от смертельной дозы EV-A<sub>71</sub> [3].

**Разработка поливалентных вакцин.** Пациенты с рецидивирующим HFMD являются чётким индикатором отсутствия эффективной перекрёстной реактивности среди серотипов, что указывает на необходимость разработки поливалентной вакцины. Предпринят ряд попыток разработать вакцину, включающую несколько серотипов. Наиболее простой подход состоит в простом объединении существующих одновалентных вакцин в один препарат. Проведены исследования, показывающие, что иммунизация комбинированными мультисеротипными вакцинами в форме либо активированного вируса, либо VLP приводит к эффективной защите от соответствующих вирусов без вмешательства, что свидетельствует об отсутствии перекрёстного серотипического эффекта. Данный подход является многообещающим в обеспечении решения проблемы мультизащиты, но сталкивается с проблемами относительно надёжности и высокой стоимости. Изучен альтернативный подход с использованием химерных вакцин, полученных с помощью генно-инженерного вектора, для совместной экспрессии вирусных белков или пептидов нескольких серотипов, что достигается путём частичной антигенной замены и вставки [3].

**Инактивированные поливалентные вакцины.** Подход к двухвалентной вакцине впервые опробован на двух приоритетных патогенах EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub>. Вакцина, разработанная путём сочетания инактивированных вирусов EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub>, индуцировала сбалансированный иммунитет у мышей на модели против инфекции EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub>. На модели макак-резусов внутрикожная иммунизация двумя дозами двухвалентной инактивированной вакцины EV-A<sub>71</sub>/CV-A<sub>16</sub> показала превосходное сдерживание вируса и защиту без иммунопатологического эффекта от последующего заражения вирусом EV-A<sub>71</sub> или CV-A<sub>16</sub> [16]. Инактивированные цельновирионные CV-A<sub>6</sub> и CV-A<sub>10</sub> комбинированные вакцины индуцируют антигенспецифические системные иммунные реакции, вызывают активную иммунизацию для достижения уровня защиты >80% при борьбе с гомотипическими и гетеротипными инфекциями CV-A<sub>6</sub> и CV-A<sub>10</sub> [17].

Трёхвалентная вакцина-кандидат, содержащая инактивированные EV-A<sub>71</sub>, CV-A<sub>16</sub>, CV-A<sub>6</sub>, обеспечивает полную защиту от летального заражения EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub>, защита от заражения CV-A<sub>6</sub> достигнута в исследовании пассивного переноса с использованием сыворотки, полученной при иммунизации трёхвалентной вакцины. Другая инактивированная трёхвалентная вакцина CV-A<sub>6</sub>, CV-A<sub>10</sub>, CV-A<sub>16</sub> индуцирует достаточный титр вируснейтрализующих антител и клеточно-опосредованный иммунный ответ, и отсутствие перекрёстной защиты против гетерологичных штаммов [18]. Эти результаты указывают на отсутствие иммунологической интерференции между антигенами в их способности индуцировать вирусспецифический иммунный ответ, что обеспечивает подтверждение концепции поливалентных вакцин для широкой защиты от HFMD.

**Многовалентные VLPs вакцины.** Двухвалентная вакцина EV-A<sub>71</sub>/CV-A<sub>16</sub>-VLPs индуцирует сбалансированный вируснейтрализующий гуморальный иммунный ответ и пассивно защищает мышей от инфекций EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub>. Четырёхвалентная вакцина, включающая CV-A<sub>10</sub>-VLP, EV-A<sub>71</sub>-VLP, CV-A<sub>16</sub>-VLP, CV-A<sub>6</sub>-VLP,

вызывает длительно сохраняющиеся антигенспецифические реакции сывороточных антител и титры нейтрализации против EV-A<sub>71</sub>, CV-A<sub>16</sub>, CV-A<sub>10</sub> и CV-штаммов A<sub>6</sub> аналогичны одновалентным вакцинам, что указывает на хорошую совместимость между четырьмя антигенами в комбинированной вакцине [19].

**Химерные вакцины.** Химерный вирус EV-A<sub>71</sub>, в котором эпитоп VP<sub>1</sub> (aa 210-225) заменен эпитопом CV-A<sub>16</sub>, сконструирован с использованием метода обратной генетики для получения двухвалентной вакцины-кандидата EV-A<sub>71</sub>/CV-A<sub>16</sub>. Другая попытка заключалась в замене нейтрализующего EV-A<sub>71</sub> эпитопа SP<sub>70</sub> эпитопом CV-A<sub>16</sub> с образованием химерных вирусоподобных частиц EV-A<sub>71</sub> (ChiEV-A<sub>71</sub> VLPs); иммунизация мышей ChiEV-A<sub>71</sub> VLPs вызывала устойчивые Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-зависимые иммунные ответы против EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub>. Пассивная иммунизация сыворотками, полученными против VLPs ChiEV-A<sub>71</sub>, обеспечивала полную защиту от летального заражения EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub> новорожденных мышей. Структурные исследования показали, что замена эпитопа SP<sub>70</sub> преобразует потенциал поверхностного заряда VLP в сочетании с вариациями в аминокислотных последовательностях, что, скорее всего, объясняет дополнительную вируснейтрализующую способность VLP ChiEV-A<sub>71</sub>. Недавно опубликованный патент показал, что VLP EV-A<sub>71</sub>, содержащий полипептиды CV-A<sub>16</sub> VP<sub>1</sub>, поддерживает важные эпитопы вируснейтрализующих антител самого EV-A<sub>71</sub>, а VLP CV-A<sub>16</sub>, содержащий полипептиды EV-A<sub>71</sub> VP<sub>1</sub>, вызывает защитный вируснейтрализующий гуморальный иммунный ответ, направленный против вирусов EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub> (PCT/MY2017/050059-US2019/0224304 A<sub>1</sub>). Замена и включение ключевых пептидов/белков между серотипами в одну конструкцию является рациональным методом создания поливалентной вакцины против HFMD [19].

**Рекомбинантные вирусно-переносящие вакцины.** Двухвалентные химерные VLP, представляющие SP<sub>70</sub> эпитопов петли E-F VP<sub>1</sub> и VP<sub>2</sub> (aa 141-155) EV-A<sub>71</sub>, используют основной белок вируса гепатита В (HBs) в качестве носителя (HBs-E1/2) и индуцируют более высокие титры IgG и нейтрализации EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub>, чем иммунизация с помощью только одного эпитопа, включенного в HBs. Пассивная иммунизация рекомбинантными частицами HBs-E2 защищает новорожденных мышей от смертельных инфекций EV-A<sub>71</sub> и CV-A<sub>16</sub>, а эпитоп VP<sub>2</sub> является иммунодоминантным для двух серотипов.

Другой двухвалентный химерный VLP, использующий основной носитель усечённого вируса гепатита В (ТНbС), демонстрирует консервативные эпитопы EV-A<sub>71</sub> в SP<sub>90</sub> (aa 208-222) VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub> (aa 248-263), CV-A<sub>16</sub> в РЕР<sub>91</sub> (aa 271-285) VP<sub>1</sub>, индуцирующие гуморальные и клеточные иммунные ответы и защищающие мышей-сосунков, рожденных от матерей, умерших от инфекции EV-A<sub>71</sub> и частично от инфекции CV-A<sub>16</sub> [19]. Интеграция химерных VLP в новые вирусные векторы индуцирует эффект поливалентности, характеризующийся усилением системного иммунного ответа.

**Экспериментальная модель на животных и её применение.** Модели на мышах и на приматах являются двумя основными моделями на животных для оценки вакцин против HFMD. В мышинной модели для оценки иммуногенности используют взрослых мышей BALB/c

или ICR в возрасте 6-8 недель. Наиболее распространённая стратегия вакцинации - прайм-буст, при которой вакцина вводится два или три раза с интервалом в 2-4 недели внутривенным (внутрибрюшинным) или внутримышечным (внутримышечно) путём. Поскольку вирусы, связанные с HFMD, вызывают слабо выраженную клиническую картину у взрослых мышей, защитная эффективность экспериментальных вакцин должна быть исследована на мышцах-сосунках, которые более восприимчивы к вирусной инфекции, чем взрослые мыши, возможно, из-за их незрелой иммунной системы [20].

Исследования по изучению вирусов, связанных с HFMD, на модели нечеловекообразных приматов, ограничены, но результаты многообещающие. Сообщалось, что при заражении CV-A<sub>16</sub> через назальную инсuffляцию у макак-резусов появились пузырьки на слизистой оболочке полости рта и конечностях, что является классическим клиническим проявлением инфекции HFMD. Однако, у инфицированных макак не вырабатывались специфичные к CV-A<sub>16</sub> вируснейтрализующие антитела и Т-клетки иммунной памяти. Переливание сывороток от макак, иммунизированных инактивированной вакциной CV-A<sub>16</sub>, не обеспечило защиты от вирусной инфекции у молодых макак-реципиентов. Это свидетельствует о том, что иммунологический механизм инфекции CV-A<sub>16</sub> нуждается в дальнейшем изучении [19].

**Отечественные исследования действия потенциальных компонентов нереплицирующихся субъединичных вакцин против энтеровирусов.** Объектами исследования являлись рекомбинантный белок VP<sub>2</sub> энтеровируса ECHO<sub>30</sub>, вирусоподобные частицы, собранные из: 1) цельного норовирусного белка VP<sub>1</sub>; 2) из норовирусного белка VP<sub>1</sub> без наружного Р-домена; 3) из химерных молекул, состоящих из белка VP<sub>2</sub> ECHO<sub>30</sub>, слитого с норовирусным белком VP<sub>1</sub> без Р-домена. Использованные белки и частицы являются оригинальными продуктами генной инженерии, разработанными и полученными коллективом лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И. Н. Блохиной Роспотребнадзора с использованием методических, включающих извлечение дендритных клеток из моноцитов крови человека *in vitro*, выделение CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-клеток магнитной сепарацией, лазерная проточная цитометрия, иммуноферментный анализ [21, 22].

Поскольку ранее показано, что вирусоподобные частицы, собранные из белка VP<sub>1</sub> норовируса, эффективно фагоцитируются дендритными клетками человека и индуцируют их созревание вне зависимости от наличия или отсутствия наружного Р-домена, в соответствии с этим, замена Р-домена на гетерологичный антиген может быть произведена без существенной потери иммуногенности частиц, что открывает возможности создания вакцин на основе собранных в частицы химерных белков, использующих иммуностимулирующие свойства вирусоподобных частиц норовируса для усиления иммунного ответа на антигены другого возбудителя. Показано, что вирусоподобные частицы из химерных молекул, содержащих антигены энтеровируса ECHO<sub>30</sub> и последовательность норовирусного VP<sub>1</sub>, эффективно стимулируют фенотипическое созревание моноцитарных дендритных клеток человека, которое проявляется в увеличении экспрессии мембранных молекул HLA-DR, CD<sub>80</sub>, CD<sub>83</sub>, CD<sub>86</sub> и CCR7. По своей

способности стимулировать созревание дендритных клеток химерные вирусоподобные частицы не отличаются от исходных норовирусных частиц. Белок VP<sub>2</sub> энтеровируса ECHO<sub>30</sub>, не собранный в вирусоподобные частицы, не оказывает существенного влияния на фенотип дендритных клеток. В функциональном отношении, созревание дендритных клеток, индуцированное норовирусными или химерными вирусоподобными частицами, проявляется в усилении продукции дендритными клетками провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО-α, противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Инкубация дендритных клеток с норовирусными или химерными вирусоподобными частицами увеличивает способность дендритных клеток индуцировать трансформацию малых CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лимфоцитов в лимфобласты. Инкубация с вирусоподобными частицами не изменяет сильную способность дендритных клеток стимулировать продукцию ключевых цитокинов Т-хелперов первого и семнадцатого типов в аллогенной смешанной культуре CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лимфоцитов и дендритных клеток. Полученные результаты свидетельствуют об иммуногенности вирусоподобных частиц, собранных из слитых белков норовируса и энтеровируса. Использованные вирусоподобные частицы являются прототипом для создания новых вакцин [21].

**Получение прототипа вакцины против возбудителя серозного менингита энтеровируса ECHO<sub>30</sub>.** Для оптимизации процессов синтеза, выделения, очистки рекомбинантных белков VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> и исследования их самосборки *in vitro* используются такие методические подходы, как компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, методы молекулярного клонирования, методы культивирования микроорганизмов, очистка белков методом металлоаффинной хроматографии, электрофорез белков в ПААГ, вестерн-блот, иммуноферментный анализ.

Показано, что с использованием полученных ранее штаммов-продуцентов оптимизированы условия получения рекомбинантных белков VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> вируса E<sub>30</sub> (VP<sub>1</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>2</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>3</sub>E<sub>30</sub>). Отработанные методы включают синтез белков в клетках продуцентах, осаждение клеток центрифугированием, лизис и разрушение клеток путём обработки лизоцимом и замораживанием, выделение нерастворимых белков центрифугированием, их очистку методом аффинной хроматографии, ренатурацию, очистку полученных препаратов от эндотоксинов и стерилизацию фильтрацией. Технологические подходы позволяют получать очищенные белки VP<sub>1</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>2</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>3</sub>E<sub>30</sub> из биомассы штамма-продуцента с возможностью масштабирования до промышленных объёмов. При исследовании самосборки рекомбинантных белков VP<sub>1</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>2</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>3</sub>E<sub>30</sub> обнаружено, что полученные белки образуют высокомолекулярные комплексы молекулярной массой 200 кДа и больше. Наличие комплексов, выявляемых в мягких условиях проведения электрофореза, свидетельствует о способности полученных белков к самосборке. Показано, что белки VP<sub>1</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>2</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>3</sub>E<sub>30</sub> распознаются в разных сочетаниях присутствующими в крови антителами класса IgM. Общая встречаемость IgM-антител против полученных рекомбинантных белков не превышает 7,8% в разных возрастных группах. Оптимизированы процессы синтеза, выделения, очистки рекомбинантных белков VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> и исследование

их самосборки *in vitro* [21, 22].

Разработанные методы позволяют получать рекомбинантные белки VP<sub>1</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>2</sub>E<sub>30</sub>, VP<sub>3</sub>E<sub>30</sub>, применимые для ретроспективного сероэпидемиологического исследования распространенности вируса E<sub>30</sub>, оценки напряженности иммунитета, для использования в качестве антигена в составе вакцины.

**Заключение.** Отсутствие широко используемых защитных вакцин делает энтеровирусы человека проблемными патогенами, вызывающими озабоченность общественного здравоохранения. Инактивированные вакцины EV-A<sub>71</sub> демонстрируют высокую эффективность, высокую иммуногенность и приемлемые профили безопасности среди вакцинированного населения и эффективно снижают заболеваемость HFMD, особенно тяжёлыми формами. Возросла обеспокоенность в связи с изменениями в доминирующих штаммах вируса, вызывающих HFMD, и появлением новых серотипов, вызывающих заболевание. Поэтому крайне важно изучить состав поливалентной вакцины с защитой широкого спектра действия и достаточной безопасностью. Важны исследования, способствующие развитию направлений, включающих усовершенствованный дизайн вакцины и стратегию более эффективного использования вектора вакцины наряду с разработкой новых платформ для вакцин. Важны исследования по описанию вариантов развития иммунологической памяти при заражении различными серотипами энтеровирусов, что могло бы послужить ориентиром при разработке вакцины. Широкое распространение и активная циркуляция эпидемически значимых вариантов НПЭВ диктует необходимость повышенного внимания к разработке и регистрации отечественных вакцин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Об эпидемиологической ситуации по ЭВИ. Документ создан в электронной форме. № 02/23135-2022-27 от 29.11.2022. <https://nsaldago.ru/economy/business/media/2022/12/7/ob-epidemiologicheskoy-situatsii-po-evi/>.
2. Brown D.M., Zhang Y., Scheuermann R.H. Microorganisms. epidemiology and sequence-based evolutionary analysis of circulating non-polio Enteroviruses. *Microorganisms*. 2020 Nov 25; 8(12):1856. DOI: 10.3390/microorganisms8121856.
3. He X., Zhang M., Zhao C., Zheng P., Zhang X., Xu J. From Monovalent to Multivalent Vaccines, the Exploration for Potential Preventive Strategies Against Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD). *Viol. Sin*. 2021 Apr; 36(2):167-75. DOI: 10.1007/s12250-020-00294-3.
4. Bian L., Gao F., Mao Q., Sun S., Wu X., Liu S. et al. Hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A10: more serious than it seems. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther*. 2019 Apr; 17(4):233-42. DOI: 10.1080/14787210.2019.1585242.
5. Fang C.Y., Liu C.C. Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease. *Expert. Rev. Vaccines*. 2018 Sep; 17(9):819-31. DOI: 10.1080/14760584.2018.1510326.
6. Fan S., Liao Y., Jiang G., Jiang L., Wang L., Xu X. et al. Study of integrated protective immunity induced in rhesus macaques by the intradermal administration of a bivalent EV71-CA16 inactivated vaccine. *Vaccine*. 2020 Feb 18; 38(8):2034-44. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.12.057.
7. Aw-Yong K.L., NikNadia N.M.N., Tan C.W., Sam I.C., Chan Y.F. Immune responses against enterovirus A71 infection: Implications for vaccine success. *Rev. Med. Virol*. 2019 Sep; 29(5):e2073. DOI: 10.1002/rmv.2073.
8. Anasir M.I., Poh C.L. Advances in antigenic peptide-based vaccine

- and neutralizing antibodies against viruses causing hand, foot, and mouth disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20(6):1256. DOI: 10.3390/ijms20061256.
9. Lin J.Y., Kung Y.A., Shih S.R. Antivirals and vaccines for Enterovirus A71. *J. Biomed. Sci*. 2019 Sep 3; 26(1):65. DOI: 10.1186/s12929-019-0560-7.
10. Dai W., Xiong P., Zhang X., Liu Z., Chen J., Zhou Y. et al. Recombinant virus-like particle presenting a newly identified coxsackievirus A10 neutralization epitope induces protective immunity in mice. *Antiviral. Res*. 2019 Apr; 164:139-46. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.02.016.
11. Guan X., Che Y., Wei S., Li S., Zhao Z., Tong Y. et al. Effectiveness and safety of an inactivated enterovirus 71 vaccine in children aged 6-71 months in a phase IV study. *Clin. Infect. Dis*. 2019. DOI:10.1093/cid/ciz1114.
12. Huang L.M., Chiu C.H., Chiu N.C., Lin C.Y., Li M.T. et al. Immunogenicity, safety, cross-reaction, and immune persistence of an inactivated enterovirus A71 vaccine in children aged from two months to 11 years in Taiwan. *Vaccine*. 2019 Mar 22; 37(13):1827-35. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.02.023.
13. Stone V.M., Hankaniemi M.M., Laitinen O.H., Sioofy-Khojine A.B., Lin A., Lozano I.M.D., Mazur M.A., Marjomäki V., Loré K., Hyöty H. et al. A hexavalent Coxsackievirus B vaccine is highly immunogenic and has a strong protective capacity in mice and nonhuman primates. *Sci. Adv*. 2020; 6:eaaz2433. DOI: 10.1126/sciadv.aaz2433.
14. Zhang W., Dai W., Zhang C., Zhou Y., Xiong P., Wang S., Ye X., Liu Q., Zhou D., Huang Z. A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity. *Emerg. Microbes Infect*. 2018 May 18; 7(1):94. DOI: 10.1038/s41426-018-0094-1.
15. Yang Z., Gao F., Wang X., Shi L., Zhou Z., Jiang Y. et al. Development and characterization of an enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLPs) vaccine produced in *Pichia pastoris*. *Hum. Vaccin Immunother*. 2019. DOI:10.1080/21645515.2019.1649554:1-9.
16. Stone V.M., Hankaniemi M.M., Svedin E., Sioofy-Khojine A., Oikarinen S., Hyöty H. et al. A Coxsackievirus B vaccine protects against virus-induced diabetes in an experimental mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2018; 61:476-81. DOI: 10.1007/s00125-017-4492-z.
17. Zhang Z., Dong Z., Wang Q., Carr M.J., Li J., Liu T. et al. Characterization of an inactivated whole-virus bivalent vaccine that induces balanced protective immunity against coxsackievirus A6 and A10 in mice. *Vaccine*. 2018 Nov 12; 36(46):7095-7104. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.09.069.
18. Lim H., In H.J., Lee J.A., Sik Yoo J., Lee S.W., Chung G.T. et al. The immunogenicity and protection effect of an inactivated coxsackievirus A6, A10, and A16 vaccine against hand, foot, and mouth disease. *Vaccine*. 2018 Jun 7; 36(24):3445-52. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.05.005.
19. Zhang X., Zhang Y., Li H., Liu L. Hand-Foot-and-Mouth Disease-Associated Enterovirus and the Development of Multivalent HFMD Vaccines. *Int. J. Mol. Sci*. 2022 Dec 22; 24(1):169. DOI: 10.3390/ijms24010169.
20. Fang C.Y., Liu C.C. Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease. *Expert. Rev. Vaccines*. 2018 Sep; 17(9):819-31. DOI: 10.1080/14760584.2018.1510326.
21. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2022. ISBN 978-5-7508-1910-2. [https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/594/sqywwl4tg5arqff6xv15dss0l7vvuank/Gosudarstvennyy-doklad.-O-sostoyanii-sanitarno\\_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-Rossiyskoy-Federatsii-v-2021-godu.pdf](https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/594/sqywwl4tg5arqff6xv15dss0l7vvuank/Gosudarstvennyy-doklad.-O-sostoyanii-sanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-Rossiyskoy-Federatsii-v-2021-godu.pdf).
22. Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А. и др. Получение вирусоподобных частиц норовируса (Caliciviridae; Norovirus), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (Picornaviridae; Enterovirus). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 383-9. DOI: 10.36233/0507-4088-79.

#### REFERENCES



1. About the epidemiological situation of EVI. The document was created in electronic form. No. 02/23135-2022-27 from 11/29/2022. <https://nsaldago.ru/economy/business/media/2022/12/7/ob-epidemiologicheskoy-situatsii-po-evi/>. (in Russian)
2. Brown D.M., Zhang Y., Scheuermann R.H. Microorganisms. epidemiology and sequence-based evolutionary analysis of circulating non-polio Enteroviruses. *Microorganisms*. 2020 Nov 25; 8(12):1856. DOI: 10.3390/microorganisms8121856.
3. He X., Zhang M., Zhao C., Zheng P., Zhang X., Xu J. From Monovalent to Multivalent Vaccines, the Exploration for Potential Preventive Strategies Against Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD). *Viol. Sin.* 2021 Apr; 36(2):167-75. DOI: 10.1007/s12250-020-00294-3.
4. Bian L., Gao F., Mao Q., Sun S., Wu X., Liu S. et al. Hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A10: more serious than it seems. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2019 Apr; 17(4):233-42. DOI: 10.1080/14787210.2019.1585242.
5. Fang C.Y., Liu C.C. Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease. *Expert. Rev. Vaccines*. 2018 Sep; 17(9):819-31. DOI: 10.1080/14760584.2018.1510326.
6. Fan S., Liao Y., Jiang G., Jiang L., Wang L., Xu X. et al. Study of integrated protective immunity induced in rhesus macaques by the intradermal administration of a bivalent EV71-CA16 inactivated vaccine. *Vaccine*. 2020 Feb 18; 38(8):2034-44. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.12.057.
7. Aw-Yong K.L., NikNadia N.M.N., Tan C.W., Sam I.C., Chan Y.F. Immune responses against enterovirus A71 infection: Implications for vaccine success. *Rev. Med. Virol.* 2019 Sep; 29(5):e2073. DOI: 10.1002/rmv.2073.
8. Anasir M.I., Poh C.L. Advances in antigenic peptide-based Vaccine and neutralizing antibodies against viruses causing hand, foot, and mouth disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(6):1256. DOI: 10.3390/ijms20061256.
9. Lin J.Y., Kung Y.A., Shih S.R. Antivirals and vaccines for Enterovirus A71. *J. Biomed. Sci.* 2019 Sep 3; 26(1):65. DOI: 10.1186/s12929-019-0560-7.
10. Dai W, Xiong P, Zhang X, Liu Z, Chen J, Zhou Y, Ye X, Zhang C. Recombinant virus-like particle presenting a newly identified coxsackievirus A10 neutralization epitope induces protective immunity in mice. *Antiviral. Res.* 2019 Apr; 164:139-46. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.02.016.
11. Guan X., Che Y., Wei S., Li S., Zhao Z., Tong Y. et al. Effectiveness and safety of an inactivated enterovirus 71 vaccine in children aged 6-71 months in a phase IV study. *Clin. Infect. Dis.* 2019. DOI:10.1093/cid/ciz1114.
12. Huang L.M., Chiu C.H., Chiu N.C., Lin C.Y., Li M.T., Kuo T.Y. et al. Immunogenicity, safety, cross-reaction, and immune persistence of an inactivated enterovirus A71 vaccine in children aged from two months to 11 years in Taiwan. *Vaccine*. 2019 Mar 22; 37(13):1827-35. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.02.023.
13. Stone V.M., Hankaniemi M.M., Laitinen O.H., Sioofy-Khojine A.B., Lin A., Lozano I.M.D. et al. A hexavalent Coxsackievirus B vaccine is highly immunogenic and has a strong protective capacity in mice and nonhuman primates. *Sci. Adv.* 2020; 6:eaa2433. DOI: 10.1126/sciadv.aaz2433.
14. Zhang W., Dai W., Zhang C., Zhou Y., Xiong P., Wang S. et al. A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity. *Emerg. Microbes Infect.* 2018 May 18; 7(1):94. DOI: 10.1038/s41426-018-0094-1.
15. Yang Z., Gao F., Wang X., Shi L., Zhou Z., Jiang Y. et al. Development and characterization of an enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLPs) vaccine produced in *Pichia pastoris*. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019. DOI:10.1080/21645515.2019.1649554:1-9.
16. Stone V.M., Hankaniemi M.M., Svedin E., Sioofy-Khojine A., Oikarinen S., Hyöty H. et al. A coxsackievirus B vaccine protects against virus-induced diabetes in an experimental mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2018; 61:476–81. DOI: 10.1007/s00125-017-4492-z.
17. Zhang Z., Dong Z., Wang Q., Carr M.J., Li J., Liu T. et al. Characterization of an inactivated whole-virus bivalent vaccine that induces balanced protective immunity against coxsackievirus A6 and A10 in mice. *Vaccine*. 2018 Nov 12; 36(46):7095-7104. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.09.069.
18. Lim H., In H.J., Lee J.A., Sik Yoo J., Lee S.W., Chung G.T. et al. The immunogenicity and protection effect of an inactivated coxsackievirus A6, A10, and A16 vaccine against hand, foot, and mouth disease. *Vaccine*. 2018 Jun 7; 36(24):3445-52. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.05.005.
19. Zhang X., Zhang Y., Li H., Liu L. Hand-foot-and-mouth disease-associated Enterovirus and the development of multivalent HFMD vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* 2022 Dec 22; 24(1):169. DOI: 10.3390/ijms24010169.
20. Fang C.Y., Liu C.C. Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease. *Expert. Rev. Vaccines*. 2018 Sep; 17(9):819-31. DOI: 10.1080/14760584.2018.1510326.
21. On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2021: State Report. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being; 2022. ISBN 978-5-7508-1910-2. <https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/594/sqywwl4tg5arqff6xv15dss017vuvank/Gosudarstvennyy-doklad.-O-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-Rossiyskoy-Federatsii-v-2021-godu.pdf>. About the epidemiological situation of EVI. The document was created in electronic form. No. 02/23135-2022-27 from 11/29/2022. <https://nsaldago.ru/economy/business/media/2022/12/7/ob-epidemiologicheskoy-situatsii-po-evi/>. (in Russian)
22. Novikov D.V., Melentyev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Yu., Novikova N.A., Lapin V.A. et al. Obtaining virus-like particles of norovirus (Caliciviridae; Norovirus) containing the VP1 protein of enterovirus Echovirus 30 (Picornaviridae; Enterovirus). *Voprosy virusologii*. 2021; 66(5): 383–9. DOI: 10.36233/0507-4088-79. (in Russian)