

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА FliCVP6VP8

Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С.

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Большинство детей инфицируется до достижения 5-летнего возраста. В России заболеваемость ротавирусной инфекцией постоянно растет, что объясняется как увеличением числа случаев инфицирования, так и совершенствованием способов диагностики данного заболевания. Иммуитет к ротавирусной инфекции нестойкий, поэтому заболевание может повторяться в течение жизни. Невосприимчивость у переболевших обусловлена формированием не только IgM- и IgG-, но и IgA-специфичных антител. На данный момент на мировом рынке отсутствуют препараты с прямым противоротавирусным действием, ввиду этого самым эффективным способом борьбы с данным заболеванием считается своевременная вакцинация. Существующие в настоящее время вакцины для профилактики ротавирусной инфекции основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного. В данной работе изучали протективную активность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции. Активный агент кандидатной вакцины — белок FliCVP6VP8 — включает фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 ротавируса А, а также компоненты флагеллина *Salmonella typhimurium* FliC в качестве адъюванта, компоненты соединены гибкими мостиками. Целью данного исследования было изучение эффективности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного FliCVP6VP8 на модели ротавирусной инфекции на лабораторных мышках линии Balb/c. Был показан высокий уровень защиты, возникающий при двукратном внутримышечном введении кандидатной вакцины. Полная защита от мышинного ротавируса EDC после его перорального введения иммунизированным кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции животным ассоциировалась с продукцией вирусспецифичных IgA и IgG в кишечнике животных и в сыворотке крови. Эффективность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 сопоставима с таковой коммерческой вакцины Rotarix® (Glaxo Smith Kline) при большей безопасности кандидатной вакцины, за счет отсутствия живого вируса в ее составе. Таким образом, полученные результаты говорят о целесообразности проведения дальнейших доклинических испытаний кандидатной противоротавирусной вакцины на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8.

Ключевые слова: ротавирусный гастроэнтерит, вакцина, протективность, лабораторная модель ротавирусной инфекции.

Адрес для переписки:

Духовлинов Илья Владимирович
ФГУП «Государственный научно-исследовательский
институт особо чистых биопрепаратов»
ФМБА России
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7.
Тел.: 8 (981) 881-82-01.
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

Address for correspondence:

Dukhovlinov Ilya V.
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations,
Federal Agency for Medicine and Biology
197110, Russian Federation, St. Petersburg,
Pudzhskaya str., 7.
Phone: 7 (981) 881-82-01.
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова, Е.А. Федорова,
А.С. Симбирцев «Исследование протективной активности
кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции
на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 417-424.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-417-424

© Духовлинов И.В. и соавт., 2016

For citation:

I.V. Dukhovlinov, E.G. Bogomolova, E.A. Fedorova,
A.S. Simbirtsev "Protective activity study of a candidate vaccine
against rotavirus infection based on recombinant protein
FliCVP6VP8", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 417-424.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-417-424

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-417-424>

PROTECTIVE ACTIVITY STUDY OF A CANDIDATE VACCINE AGAINST ROTAVIRUS INFECTION BASED ON RECOMBINANT PROTEIN FliCVP6VP8

Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Simbirtsev A.S.

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Rotavirus infection is among leading causes of severe diarrhea which often leads to severe dehydration, especially, in children under 5 years old. In Russia, the incidence of rotavirus infection is constantly increased, due to higher rates of actual rotavirus infection cases and improved diagnostics of the disease. Immunity to rotavirus is unstable, thus causing repeated infections *intra vitam*. Anti-infectious resistance in reconvalescents is explained by induction of specific IgM, IgG, and, notably, IgA antibodies. Due to absence of market drugs with direct action against rotavirus, a rational vaccination is considered the most effective way to control the disease. Currently available vaccines for prevention of rotavirus infection are based on live attenuated rotavirus strains, human and/or animal origin, which replicate in human gut. Their implementation may result into different complications. Meanwhile, usage of vaccines based on recombinant proteins is aimed to avoid risks associated with introduction of a complete virus into humans. In this paper, we studied protective activity of candidate vaccines against rotavirus.

In this work we studied protective activity of a candidate vaccine against rotavirus infection based on recombinant FliCVP6VP8 protein which includes VP6 and VP8, as well as components of *Salmonella typhimurium* flagellin (FliC) as an adjuvant. Different components are joined by flexible bridges. Efficiency of the candidate vaccine was studied in animal model using Balb/c mice. We have shown high level of protection which occurs when the candidate vaccine is administered twice intramuscularly. Complete protection of animals against mouse rotavirus EDC after intramuscular immunization with a candidate vaccine was associated with arising rotavirus-specific IgA and IgG antibodies in serum and intestine of immunized animals. The efficacy of candidate vaccine based on recombinant protein FliCVP6VP8 against rotavirus infection was comparable to that of commercial Rotarix® vaccine (Glaxo Smith Kline), however, with higher safety of the candidate vaccine, due to absence of live virus in its composition. Hence, the results obtained justify further pre-clinical studies of the candidate vaccine based on a recombinant protein.

Keywords: rotavirus gastroenteritis, vaccine, recombinant fusion proteins, mouse model, protective activity

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Большинство детей инфицируется до достижения 5-летнего возраста. В России заболеваемость ротавирусной инфекцией постоянно растет, что объясняется как увеличением числа случаев инфицирования, так и совершенствованием способов диагностики данного заболевания.

Ротавирус был открыт сравнительно недавно, лишь в начале 70-х годов прошлого века [1]. Ротавирусы включают в семейство Reoviridae, род Rotavirus. Ротавирион представляет собой безоболочечный, сложноорганизованный трехслойный белковый капсид, который окружает

геном, представленный 11 сегментами двуцепочечной РНК [2].

Ротавирусы повреждают энтероциты, расположенные на микроворсинках тонкого кишечника, что приводит к снижению абсорбции и диарее. Широкий спектр клинических проявлений колеблется от преходящей легкой диареи до тяжелой диареи и рвоты, вызывающих дегидратацию, нарушение электролитного баланса, шок и при отсутствии лечения смерть.

Иммунитет к ротавирусной инфекции в большинстве случаев возникает в раннем детстве после перенесенного заболевания. Иммунитет нестойкий, поэтому у взрослых с низким уровнем антител заболевание может повториться. Невосприимчивость у переболевших обусловлена формированием не только IgM- и IgG-, но и IgA-антител.

Существующие в настоящее время вакцины для профилактики ротавирусной инфекции основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного.

Активный агент кандидатной вакцины — белок FliCVP6VP8 — включает фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 ротавируса А, а также компоненты флагеллина *Salmonella typhimurium* FliC в качестве адъюванта, компоненты соединены гибкими мостиками [3]. Полипептид внутреннего капсида VP6 является мажорным белком вириона, в экспериментах на лабораторных мышах показано, что он обеспечивает защиту новорожденных животных за счет индукции выработки нейтрализующих секреторных антител у беременных самок [4]. Выбранный фрагмент VP6 в составе гибридного белка имеет общие и гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса С, а также гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса В. Белок VP8 — N-концевой триптический фрагмент белка VP4 — является высокоиммуногенным полипептидом и индуцирует эффективную защиту против заболевания. Таким образом, представленные фрагменты являются консервативными частями белков VP6 и VP8, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфичные антитела. Данные антитела перекрестно реагируют с эпитопами среди различных штаммов ротавирусов А, В и С, гомологичными представленным фрагментам гибридного белка. Использование эпитопов нескольких белков увеличивает эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Использование безопасного и высокоэффективного адъюванта на основе гибридного белка, содержащего фрагменты доменов FliC *Salmonella typhimurium*, позволяет увеличить степень его иммуногенности [5].

Целью данного исследования было изучение эффективности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного FliCVP6VP8 на модели ротавирусной инфекции на лабораторных мышах.

Материалы и методы

Препарат кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции

Вакцина включает рекомбинантный белок FliCVP6VP8, представленный иммуногенными

эпитопами поверхностных белков ротавируса VP6, VP8, а также белка FliC-компонента флагеллы *Salmonella typhimurium*, соединенными гибкими мостиками, и гидроксид алюминия в качестве адъюванта. Белок получен с использованием технологии рекомбинантной ДНК, работа велась на культуре клеток *E. coli*.

Состав: 1 доза (0,5 мл) содержит активное вещество: 20 мкг высокоочищенного рекомбинантного белка FliCVP6VP8, гидроксид алюминия (адъювант) 0,5 мг; компоненты буфера: маннитол 25 мг, натрия сукцинат 0,36 мг, полисорбат-20 0,05 мг, вода для инъекций до 0,5 мл.

Препарат сравнения

В качестве препарата сравнения использовали моновалентную живую ротавирусную вакцину для орального применения Rotarix® (GlaxoSmithKline) (серия 81/234, срок годности до XII-2017).

Rotarix® представляет собой жидкую живую моновалентную вакцину аттенуированного штамма человеческого ротавируса RIX4414 (G1 и не-G1 серотипы: G2, G3, G4, G9), культивируемого на клетках Веро. Вакцина предназначена для профилактики ротавирусной инфекции и выпускается в виде суспензии для приема внутрь (1,5 мл/1 доза в полиэтиленовой тубе).

Состав: 1 доза (1,5 мл) содержит: живой ослабленный ротавирус человека (штамм RIX4414). Вспомогательные вещества: сахароза, динатрия адипат, среда DMEM, вода стерильная.

Контрольное вещество

В качестве контрольного вещества использовали физиологический раствор (0,9% раствор хлорида натрия).

Лабораторные животные

В экспериментах использовали самок мышей линии BALB/c 9-12-недельного возраста, которых содержали в стандартном виварии. Мыши поступили из питомника РАН «Рапполово» Ленинградской области.

Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Мыши находились по 10 особей в пластиковых клетках фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки.

Кормление животных — дважды в день. Регламентирующий документ на содержание животных: «Лабораторные животные». М., 2003. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ СР РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Иммунизация

Иммунизацию животных осуществляли шприцевым методом, при этом препарат кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции

и контрольное вещество вводили в квадрицепс левой конечности в объеме 500 мкл. После инъекции место введения обрабатывали раствором диоксида хлора (Clidox-S; Pharmacol, Naugatuck, Conn).

Препарат сравнения вводили животным перорально.

В обоих случаях схема иммунизации предусматривала либо однократное, либо двукратное введение иммунобиологических лекарственных препаратов. В последнем случае повторное введение каждого препарата осуществляли спустя 14 суток после первичной иммунизации. Численность каждой группы составляла 10 животных.

Заражение животных и получение материала на исследование

В исследовании был использован штамм EDC ротавируса мышей, депонированный в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского под номером ГKB М 2113. Спустя 21 сутки после последней иммунизации (однократной или двукратной) животных заражали штаммом EDC ротавируса мышей. В предварительных исследованиях было установлено, что 1 DD₅₀ (death dose) составила 1×10^4 БОЕ (бляшкообразующих единиц). Для заражения была взята в 100 раз превышающая 1 DD₅₀ доза вируса (1×10^6 БОЕ), которую животным вводили перорально в объеме 0,2 мл.

В первые 8 суток поствакцинального периода ежедневно после заражения у животных всех подопытных групп (по 3 животных из группы, которые были помещены в отдельные клетки) производили забор фекалий для последующего определения в них содержания вирусного антигена. Каждый образец фекалий был помещен в 500 мкл буферного раствора Earle (Gibco, Grand Island, N.Y.).

Спустя 8 суток после заражения животных умерщвляли методом декапитации и производили тотальный забор крови от животных каждой группы, индивидуально от каждого животного. Из полученной крови готовили сыворотки, которые были в дальнейшем в качестве субстрата использованы для определения в них уровня общих (IgA, IgM и IgG) и IgG- или IgA-специфичных антиротавирусных антител.

Кроме этого методом ИФА в супернатантах субстратов кишечника подопытных животных определяли уровни ротавируссpezifичных и общих антител IgM, IgG, IgA. Супернатанты получали путем смывов физиологическим раствором содержимого кишечника через прямую кишку.

Выявление ротавирусного антигена методом иммуноферментного анализа

Фекальная суспензия (10 % [вес/объем]) проверялась на наличие ротавирусного антигена. В индивидуальную лунку 96-луночного план-

шета (Costar, Cambridge, Mass.) вносили 100 мкл коровьей антиротавирусной гипериммунной сыворотки в разведении 1:2000 на растворе, содержащем 1,5 мМ карбоната натрия и 3,5 мМ бикарбоната натрия. Планшеты инкубировали во влажной камере при температуре +4 °С. Далее планшеты промывали четыре раза отмывочным буфером, содержащим 1,73 М NaCl, 0,03 М KH₂PO₄, 0,13 М Na₂HPO₄, 0,25 % Tween 20 (Sigma, St. Luis, Mo.), и два раза дистиллированной водой. Затем в каждую лунку вносили 100 мкл 0,5 % желатина (Sigma) и 100 мкл 0,05% Tween 20, планшеты инкубировали при комнатной температуре 1 ч. Лунки четырехкратно промывали отмывочным буфером и дважды дистиллированной водой. В лунки вносили по 50 мкл исследуемого образца фекалий (опыт) либо раствора, содержащего 0,5 % желатин и 0,05 % Tween 20 (контроль). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего лунки промывали отмывочным буфером и дистиллированной водой. Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл разведенной 1:2000 кроличьей антиротавирусной гипериммунной сыворотки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. По истечении инкубации планшеты промывали отмывочным буфером и дистиллированной водой и в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата на основе щелочной фосфатазы и антикроличьих IgG козы (Cappel, Durham, N.C.). После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре планшеты промывали отмывочным буфером и дистиллированной водой и затем в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора 1 М диэтиламина и р-нитрофенил фосфата (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.). Инкубировали при комнатной температуре в течение 90 минут. Результаты регистрировали при длине волны $\lambda = 405$ нм на ИФА ридере (Dynatech). Проба считалась положительной, если оптическая плотность в экспериментальной лунке $> 0,1$ единицы и в 2 раза превышала оптическую плотность в соответствующих контрольных лунках.

Оценка выживаемости животных

Специальная серия исследований, выполненная на 60 мышах, была спланирована с целью оценки влияния иммунизации на выживаемость инфицированных животных. В этом случае животных иммунизировали согласно выбранным схемам. По окончании иммунизации за ними наблюдали в течение трех недель, после чего заражали мышинным ротавирусом перорально в дозе, в 1000 раз превышающей 1 DD₅₀ (1×10^7 БОЕ). За инфицированными животными наблюдали в течение 14 суток, ежедневно отмечая количество живых и погибших особей.

Оцениваемыми показателями служили процент выживших животных в группе и уровень

защиты, представляющий собой разность между показателями выживаемости в группах вакцинированных животных и контрольных группах.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка результатов выполнена на персональном компьютере при помощи пакета программ для статистической обработки данных STATISTICA for Windows 7.0 (StatSoft, США). К расчетам был принят критический уровень значимости $\alpha = 0,05$. Определяли средние значения исследованных показателей, стандартную ошибку средних показателей. Использованы стандартные методы параметрической и непараметрической статистики. Различия в концентрациях антител оценивали с использованием теста Манна–Уитни U. Сравнение результатов по Р критерию $< 0,05$ проводили только в тех случаях, когда были выявлены ощутимые различия в величинах оцененных показателей.

Результаты

Оценка способности вакцинных препаратов индуцировать защиту против заражения мышинным ротавирусом EDC

Оценка способности вакцинных препаратов индуцировать защиту против заражения мышинным ротавирусом EDC показала их эффективность в данном аспекте (рис. 1).

Как следует из представленных данных, у контрольных животных (отрицательный контроль) в фекалиях достаточно интенсивно выявлялся ротавирусный антиген, причем заметных отличий в зависимости от кратности введения им физиологического раствора не выявлено. На этом фоне применение коммерческого препарата вне зависимости от схемы иммунизации оказалось достаточно эффективным и практически полностью предупреждало размножение ротавируса в организме животных. В обоих случаях количество выявляемого ротавируса в фекалиях < 10 нг/мл, то есть практически в 50–60 раз меньше, чем в контроле ($p < 0,001$). Оцениваемая кандидатная вакцина в этом плане не сильно уступала коммерческой, особенно в случае ее двукратного применения с интервалом 14 суток. При этом количество определяемого ротавирусного антигена в фекалиях < 10 нг/мл. Под влиянием кандидатной вакцины при ее однократном применении количество определяемого ротавирусного антигена в фекалиях составило 195 нг/мл, то есть при таком типе введения данная вакцина оказалась менее активной, что, возможно, связано с особенностями формирования иммунного ответа на сорбированные антигены.

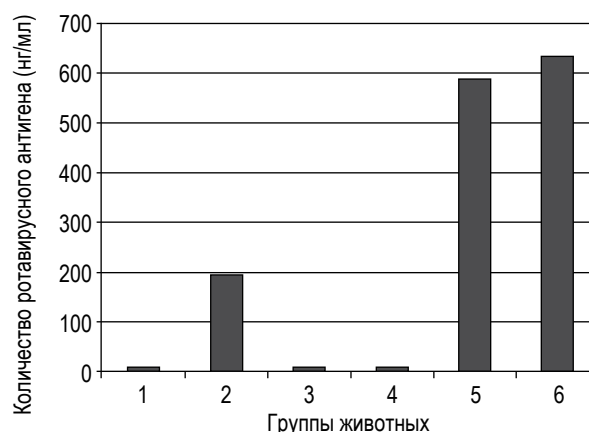


Рисунок 1. Диаграмма общего количества ротавирусного антигена в фекалиях мышей, отобранных в течение первых 7 суток после заражения мышинным ротавирусом EDC

Примечание. Группа 1 – животные, иммунизированные кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции, внутримышечно, двукратно с интервалом 14 суток. Группа 2 – животные, иммунизированные кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции, внутримышечно, однократно. Группа 3 – животные, иммунизированные вакциной Rotarix® (Glaxo Smith Kline), перорально, двукратно с интервалом 14 суток. Группа 4 – животные, иммунизированные вакциной Rotarix® (Glaxo Smith Kline), перорально, однократно. Группа 5 – животные, иммунизированные физиологическим раствором (отрицательный контроль), двукратно, внутримышечно. Группа 6 – животные, иммунизированные физиологическим раствором (отрицательный контроль), однократно, внутримышечно.

Оценка выживаемости животных

Для оценки выживаемости животных иммунизировали согласно выбранным схемам. Полученные результаты приведены на рисунке 2 (рис. 2).

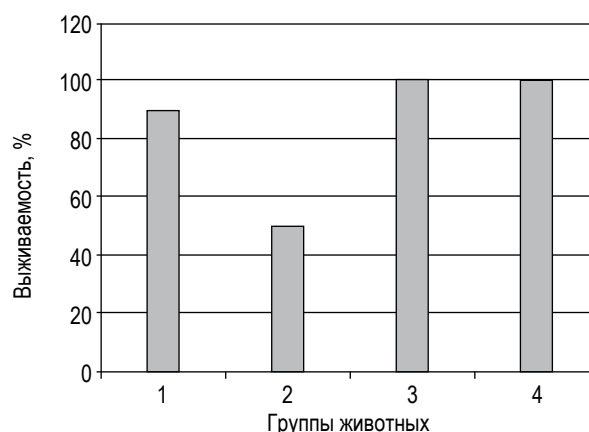


Рисунок 2. Диаграмма защитной эффективности ротавирусных вакцин различной природы в отношении экспериментальной инфекции, вызванной мышинным ротавирусом EDC

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Как следует из представленных выше данных, иммунизация вакцинами против ротавирусной инфекции обеспечивает надежный уровень защиты животных от заражения мышинным ротавирусом. Коммерческий препарат в 100% случаев препятствовал гибели животных как при однократном, так и двукратном применении. Кандидатная вакцина на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 также оказалась весьма эффективной – в случае двукратного применения вакцина обеспечивала защиту 90% инфицированных мышей, в случае однократного применения – 50% животных.

Оценка уровня ротавируспецифичных антител IgA и IgG в сыворотках крови и содержимом кишечника

Результаты оценки уровня ротавируспецифичных антител IgA и IgG в сыворотке крови приведены на рисунке 3 (рис. 3).

Как видно из приведенных данных, при введении кандидатной вакцины на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 в сыворотке крови наблюдается формирование уровня ротавируспецифичных антител, как IgA, так и IgG, сопоставимого с уровнем, наблюдаемым при введении коммерческого препарата – живой вакцины против ротавирусной инфекции Rotarix. Так, при двукратной иммунизации кандидатной вакциной доля ротавируспецифичных IgA от общего количества IgA антител составила 18,82%, по сравнению с 18,36%, выявленной при двукратном введении коммерческой вакцины. Аналогично выявили долю ротавируспецифичных IgG антител от общего количества IgG в размере 5,93% против 5,64% в случае двукратного введения коммерческой вакцины. Доля ротавируспецифичных от общего количества антител у животных, получавших физиологический раствор, составила менее 0,01% в случае IgA и менее 1% в случае IgG. Следует отметить, что доля ротавируспецифичных IgA несколько выше при двукратной иммунизации кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции, тогда как доля ротавируспецифичных IgG при обеих схемах иммунизации практически не имеет различий.

Данные по продукции вирусспецифичных IgA и IgG в смывах кишечника животных, иммунизированных кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции, представлены ниже (рис. 4).

Как видно из приведенных данных, при введении кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции в содержимом кишечника наблюдается уровень ротавируспецифичных антител IgG, сопоставимый с уровнем, наблюдаемым при введении коммерческого препарата – живой вакцины против ротавирусной инфекции Rotarix, при

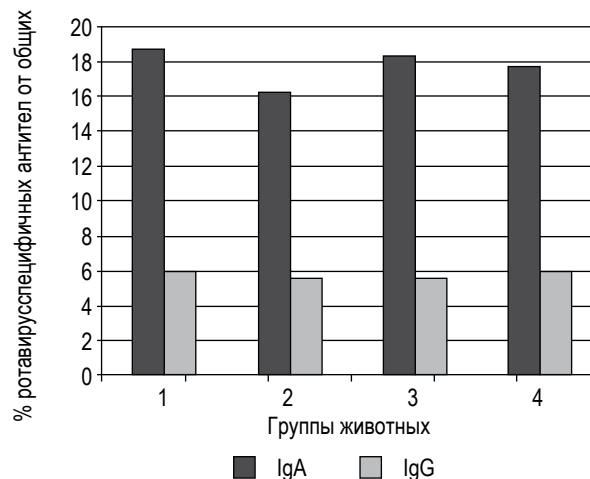


Рисунок 3. Диаграмма относительного количества продуцируемых ротавируспецифичных антител IgA и IgG в сыворотке крови в зависимости от схемы иммунизации

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

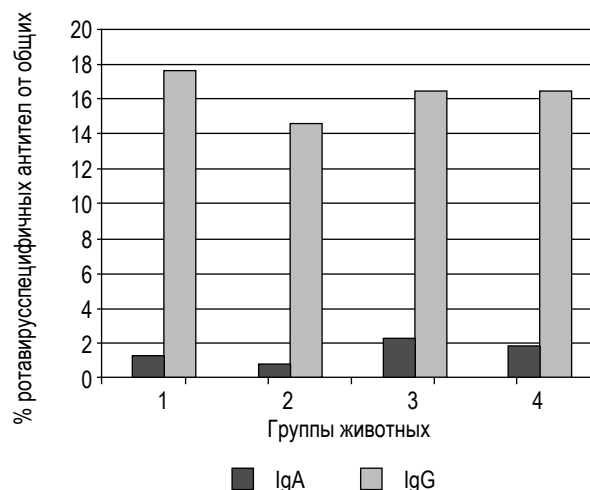


Рисунок 4. Диаграмма относительного количества продуцируемых ротавируспецифичных антител IgA и IgG в смывах кишечника в зависимости от схемы иммунизации

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

этом уровень IgA несколько уступает при иммунизации кандидатной вакциной по сравнению с коммерческим препаратом. Так, при двукратной иммунизации кандидатной вакциной доля ротавируспецифичных IgA от общего количества IgA антител составила 1,30%, по сравнению с 2,30%, выявленной при двукратном введении коммерческой вакцины. Аналогично выявили долю ротавируспецифичных IgG антител от общего количества IgG в размере 17,68% против 16,50% в случае двукратного введения коммерческой вакцины. Доля ротавируспецифичных

от общего количества антител у животных, получавших физиологический раствор, составила менее 0,01% в случае IgA- и IgG-антител. Следует отметить, что доля ротавируспецифичных IgA и IgG при двукратном введении кандидатной вакцины несколько выше, нежели при ее однократном применении (1,30% против 0,86% и 17,68% против 14,60% соответственно).

Обсуждение

По результатам проведенных исследований протективности разработанную кандидатную вакцину на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 можно охарактеризовать как эффективную в плане защиты от ротавирусной инфекции при ее внутримышечном введении в организм. Оценка способности кандидатной вакцины индуцировать защиту против заражения мышинным ротавирусом EDC показала ее эффективность в данном аспекте. Животные, дважды иммунизированные вакциной на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 и впоследствии зараженные ротавирусом EDC, характеризовались уровнем определяемого ротавирусного антигена в фекалиях < 10 нг/мл, так же как и животные, иммунизированные коммерческой вакциной. Полная защита от мышинного ротавируса после его перорального введения иммунизированным кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции животным ассоциировалась с продукцией вирусспецифичных IgA в кишечнике животных и в сыворотке крови, а также вирусспецифичных IgG в этих же биосубстратах. При двукратном применении кандидатная вакцина эффективнее, нежели в случае ее однократного введения, что можно объяснить особенностями формирования иммунного ответа к сорбированным на гидроксиде алюминия антигенам.

В настоящее время на мировом рынке доступны вакцины на основе живого аттенуированного штамма ротавируса. Применение данных вакцин связано с риском возникновения тяжелого побочного эффекта — инвагинации кишечника, который был зарегистрирован при применении первой лицензированной вакцины RotaShield, отозванной вскоре после регистрации [6]. В силу

того, что разрабатываемая кандидатная вакцина не содержит живого компонента в своем составе, ее использование не связано с увеличением риска возникновения данного патологического состояния. Эффективность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 сопоставима с таковой коммерческой вакцины Rotarix® (Glaxo Smith Kline) при большей безопасности кандидатной вакцины, за счет отсутствия живого вируса в ее составе.

Результаты исследований различных групп ученых показали, что VP6-специфичные антитела имеют прямую противоротавирусную активность. Нейтрализующая активность проявляется за счет ингибирования процесса репликации вирусов [7, 8]. Совместные исследования финских и мексиканских ученых показали, что иммунизация лабораторных мышей кандидатной противоротавирусной вакциной, активным агентом которой является капсидный белок ротавируса VP6, вызывает формирование протективного иммунного ответа против последующего заражения животных штаммом мышинного ротавируса EDIM [9]. Полученные авторами результаты согласуются с результатами, полученными в данной работе — наблюдается формирование нейтрализующих IgG- и IgA-антител как в сыворотке крови, так и на слизистой кишечника, также существенно снижается выделение ротавирусного антигена с фекалиями иммунизированных животных по сравнению с неиммунизированным контролем после заражения штаммом мышинного ротавируса EDIM. Следует заметить, что кандидатная противоротавирусная вакцина на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 имеет ряд преимуществ по сравнению с вакциной на основе полноразмерного ротавирусного белка VP6. Использование антигенных эпитопов позволяет создать более активный и универсальный иммуноген, обеспечивающий перекрестную защиту против различных штаммов ротавируса.

Таким образом, полученные результаты говорят о целесообразности проведения дальнейших доклинических испытаний кандидатной противоротавирусной вакцины на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8.

Список литературы / References

1. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе VP6 и VP8 ротавируса человека группы А // *Инфекция и иммунитет*, 2014. Т. 4. С. 229-234. [Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Simbirtsev A.S. Development of fusion recombinant proteins based on VP6 and VP8 of human rotavirus A. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 3, pp. 229-234. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2014-3-229-234>.

2. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J.. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 1973, Vol. 2, pp. 1281-1283.
3. Schnagl R.D., Holmes I.H. Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus). *Journal of Virology*, 1976, Vol. 19, no. 1, pp. 267-270.
4. Gil M.T., de Souza C.O., Asensi M., Buesa J. Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8* subunit of the VP4 capsid protein. *Viral Immunol.*, 2000, Vol. 13, no. 2, pp. 187-200.
5. Balaram P., Kien P.K., Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2009, Vol. 299, no. 3, pp. 177-185.
6. Anderson E.J. Time to Begin a New Chapter and Expand Rotavirus Immunization. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 59, no. 7, pp. 982-986.
7. Lee S., Belitsky B.R., Brinker J.P., Kerstein K.O., Brown D.W., Clements J.D., Keusch G.T., Tzipori S., Sonenshein A.L., Herrmann J.E. Development of a Bacillus subtilis-based rotavirus vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, Vol. 17, pp. 1647-1655.
8. Aiyegbo M.S., Sapparapu G., Spiller B.W., Eli I.M., Williams D.R., Kim R., Lee D.E., Liu T., Li S., Woods V.L. Jr. et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, p. 61101.
9. Lappalainen S., Pastor A.R., Tamminen K., López-Guerrero V., Esquivel-Guadarrama F., Palomares L.A., Vesikari T., Blazevic V. Immune responses elicited against rotavirus middle layer protein VP6 inhibit viral replication *in vitro* and *in vivo*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, Vol. 10, no. 7, pp. 2039-2047.

Авторы:

Духовлинов И.В. — к.б.н., начальник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Богомолова Е.Г. — младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Федорова Е.А. — научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, директор ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory for Genetically Engineered Vaccines, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Bogomolova E.G., Junior Research Associate, Laboratory for Genetically Engineered Vaccines, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Fedorova E.A., Research Associate, Laboratory for Genetically Engineered Vaccines, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 16.06.2016

Отправлена на доработку 20.06.2016

Принята к печати 06.07.2016

Received 16.06.2016

Revision received 20.06.2016

Accepted 06.07.2016