

*Е. Г. Богомолова, О. А. Добровольская, Е. А. Федорова*  
**СРАВНЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ КАНДИДАТНОЙ  
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ  
РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА FLICVP6VP8 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ  
СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ**

*Научные руководители: канд. биол. наук, Духовлинов И.В.,  
д-р мед. наук, проф. Симбирцев А.С.*

*ФГУП «Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»  
ФМБА России, г. Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Самым эффективным способом борьбы с заболеванием считается вакцинация. По результатам экспериментов *in vivo* кандидатная вакцина на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 является протективной в отношении ротавирусов при интраназальном и парентеральном способах введения.

**Ключевые слова:** ротавирусная инфекция, вакцинопрофилактика, рекомбинантные белки.

**Resume.** Rotavirus infection is one of the leading causes of severe acute diarrhea among children under 5 years worldwide. Contagion with these viruses often leads to severe dehydration of organism. A timely vaccination is considered the most effective way of this disease's control. In experiments with a laboratory mouse model of rotavirus infection is shown a high level of protection occurs when candidate vaccine based on the recombinant FliCVP6VP8 protein administered intranasally and parenterally.

**Keywords:** rotavirus gastroenteritis, vaccine, recombinant protein.

**Актуальность.** По данным Всемирной организации здравоохранения, ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Ротавирус был открыт сравнительно недавно, лишь в начале 70х 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. Для профилактики ротавирусной инфекции применяются вакцины, основанные на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, размножающиеся в кишечнике человека. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков является более безопасным, поскольку не ассоциировано с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного.

Активный агент кандидатной вакцины, химерный рекомбинантный белок FliCVP6VP8, включает в себя высокоиммуногенные эпитопы капсидных белков ротавируса VP6 и VP8, а также фрагменты флагеллина *Salmonella typhimurium* в качестве внутримолекулярного адъюванта [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 [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 адьюванта на основе гибридного белка, содержащего фрагменты доменов FliC *Salmonella typhimurium*, позволяет увеличить степень его иммуногенности [5].

**Цель:** сравнение протективных свойств кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 при интраназальном и внутримышечном режимах введения.

**Задачи:**

1. Оценка выделения ротавирусного антигена животными, иммунизированными кандидатной вакциной на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 внутримышечно и интраназально.

2. Оценка уровня ротавирусспецифических антител IgA и IgG в сыворотке крови и смывах кишечника животных, иммунизированных кандидатной вакциной внутримышечно и интраназально.

2. Сравнение эффективности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 с эффективностью коммерческой вакцины Rotarix® (Glaxo Smith Kline).

**Материал и методы.** В качестве материала использовали лабораторные образцы кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8, полученные в лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России, г. Санкт-Петербург. В качестве препарата сравнения была использована коммерческая вакцина Rotarix® (GlaxoSmithKline), в качестве контрольного вещества - физиологический раствор.

Кандидатную вакцину и контрольное вещество животным вводили внутримышечно в квадрицепс левой конечности, либо интраназально, из расчета 20 мкг высокоочищенного белка FliCVP6VP8 на одну дозу, коммерческую вакцину – перорально. Животных иммунизировали однократно, либо двукратно с интервалом в 2 недели.

Лабораторная модель ротавирусной инфекции была разработана с использованием самок мышей линии BALB/c 9-12-недельного возраста. Для заражения использовали ротавирус мышей (штамм EDC, депонированный в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского под номером ГКВ М 2113). Спустя 21 сутки после последней иммунизации (однократной или двукратной) животных заражали штаммом EDC ротавируса мышей. Для заражения была взята в

100 раз превышающая 1 DD50 доза вируса ( $1 \times 10^6$  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. Спустя 8 суток после заражения животных умерщвляли методом декапитации. Уровень ротавирусного антигена в фекалиях и специфических IgA и IgG антител в сыворотках крови и смывах кишечника определяли методом ИФА.

**Результаты и их обсуждение.** Уровень ротавирусного антигена в фекалиях дважды иммунизированных кандидатной вакциной как интраназально, так и внутримышечно, и впоследствии зараженных ротавирусом EDC, животных был менее 10 нг/мл, также как и у животных, иммунизированных коммерческой вакциной. При однократной иммунизации кандидатной вакциной в обоих режимах введения, наблюдалось большее выделение ротавирусного антигена по сравнению с коммерческой вакциной (в обоих случаях 44 нг/мл по сравнению с  $<10$  нг/мл), однако существенно ниже, нежели у животных, получавших физиологический раствор - 635 нг/мл. Эти данные говорят о наличии протективного эффекта у кандидатной вакцины уже после однократного введения, однако после двух введений ее эффективность сравнима с таковой коммерческой вакцины. Протективный эффект кандидатной вакцины в отношении мышинового ротавируса ассоциировался с продукцией вирусспецифических IgA и IgG в сыворотке крови и в кишечнике иммунизированных животных. При двукратном внутримышечном введении кандидатной вакцины в смывах кишечника уровень специфических ротавирусных антител IgA составил  $66,3 \pm 1,4$  мкг/мл, IgG -  $16,4 \pm 1,7$  мкг/мл. Уровень противоротавирусных антител IgA и IgG составил 2,50 мкг/мл и 11,82 мкг/мл, соответственно, в сыворотке крови животных, иммунизированных кандидатной вакциной дважды внутримышечно. После двукратной интраназальной иммунизации наблюдалось формирование более высоких уровней вирусспецифических IgA и IgG в обоих исследованных биосубстратах, а именно в содержимом кишечника уровень ротавирус-специфических IgA и IgG составил  $76,3 \pm 1,4$  мкг/мл и  $26,4 \pm 1,7$  мкг/мл, соответственно, в сыворотке крови - IgA - 4,50 мкг/мл и IgG - 16,82 мкг/мл. При двукратном введении коммерческой вакцины уровень формирующих ротавирус-специфических антител IgA составил  $68,3 \pm 1,8$  мкг/мл и IgG -  $16,9 \pm 1,4$  мкг/мл в содержимом кишечника, IgA 2,40 мкг/мл и IgG 11,11 мкг/мл в сыворотке крови, что сопоставимо с двукратной иммунизацией лабораторных животных кандидатной вакциной на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8.

Исследования показали, что нейтрализующая активность VP6-специфических антител реализуется за счет прямого ингибирования процесса репликации вирусов [6]. Внутримышечная иммунизация лабораторных мышей кандидатной противоротавирусной вакциной на основе капсидного белка ротавируса VP6, вызывает формирование протективного иммунного ответа против последующего заражения животных штаммом мышинового ротавируса EDIM [7]. Полученные в нашей работе результаты согласуются с описанными литературными данными. Испытываемая в данной работе кандидатная противоротавирусная вакцина на основе рекомбинантного белка

FliCVP6VP8 имеет существенные преимущества 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. Также кандидатная вакцина на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 обладает эффективностью, сравнимой с таковой коммерческой вакцины Rotarix® (Glaxo Smith Kline). В основе коммерческой вакцины Rotarix® (Glaxo Smith Kline) лежит живой штамм ротавируса человека, аттенуированный путем пассажа штамма вируса дикого типа в клеточной культуре. Эта вакцина содержит VP4 и VP7 наиболее распространенного штамма ротавирусов человека. Первоначальные клинические испытания вакцины проводились в Финляндии, где она продемонстрировала безопасность, иммуногенность и эффективность. Широкомасштабные клинические испытания охватили 11 стран Латинской Америки и Финляндию, вакцину получили более 63000 тысяч младенцев. Препарат вводили двукратно детям в возрасте 2 и 4 месяца. В течение 31 дня после вакцинации увеличение риска возникновения инвагинации кишечника, что является возможным побочным эффектом при применении живых противоротавирусных вакцин, зарегистрировано не было. В течение клинических испытаний в контрольной группе зарегистрировано семь случаев инвагинации, в сравнении с шестью у вакцинированных детей [8]. Поскольку кандидатная вакцина на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 не содержит живого компонента в своем составе, введение данной вакцины не ассоциировано с риском возникновения такого тяжелого побочного эффекта, как инвагинация кишечника.

#### **Выводы:**

1. 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, а также интраназальном введении в организм.
2. При двукратном применении кандидатная вакцина эффективнее, нежели в случае ее однократного введения.
3. Интраназальное использование кандидатного препарата по выраженности его иммунологической эффективности несколько превосходило парентеральное.
4. 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.

*E.G. Bogomolova, O.A. Dobrovolskaya, E.A. Federova*

### **COMPARISON OF THE PROTECTIVE PROPERTIES OF CANDIDATE VACCINE AGAINST ROTAVIRUS INFECTION BASED ON RECOMBINANT PROTEIN FLICVP6VP8 IN DIFFERENT ROUTES OF ADMINISTRATION**

*Tutors: I.V. Dukhovlinov, professor A.S. Simbirtsev*

*Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia*

## Литература

1. Bishop R.F., G.P. Davidson, I.H. Holmes, B.J. Ruck. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis // *Lancet* - 1973. – V. 2 – P. 1281-1283.
2. Schnagl R.D., I.H. Holmes. Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus) // *Journal of virology* - 1976. – V. 19. – N. 1. – P. 267-270.
3. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе VP6 и VP8 ротавируса человека группы А // *Инфекция И Иммунология*. 2014. Т. 4. С. 229 – 234.
4. Gil MT, de Souza CO, 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. – V. 13. – N. 2. – P. 187-200.
5. Balaram P, Kien PK, Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections // *Int. J. Med. Microbiol.*- 2009 - V. 299 – N. 3 – P. 177-185.
6. Aiyegbo MS, Sapparapu G, Spiller BW, Eli IM, Williams DR, Kim R, Lee DE, Liu T, Li S, Woods VL Jr., et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One* 2013; 8:e61101
7. Lappalainen S, Pastor AR, Tamminen K, López-Guerrero V, Esquivel-Guadarrama F, Palomares LA, 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. V. 10 - N. 7 - P. 2039–2047.
8. Bruijning-Verhagen P., Mangen J M-J., Felderhof M., Hartwig G N., van Houten M., Winkel L., de Waal J W., Bonten JM M.. Targeted rotavirus vaccination of high-risk infants; a low cost and highly cost-effective alternative to universal vaccination // *BMC Medicine*. – 2013. – V. 11. – P. 112.