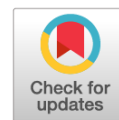


УДК 616.98+578.823.9:615.371  
DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ71134>



## ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ГИБРИДНОГО БЕЛКА

Е.А. Варюшина<sup>1</sup>, Г.В. Александров<sup>1</sup>, М.С. Захаров<sup>1</sup>, А.С. Кирьянова<sup>1</sup>, О.Э. Хуттунен<sup>1</sup>, А.Б. Румянцева<sup>1</sup>, И.Д. Митрофанов<sup>1</sup>, И.В. Бендт<sup>1</sup>, А.Э. Крылова<sup>1</sup>, А.Б. Чистякова<sup>1</sup>, Н.А. Артемова<sup>1</sup>, И.М. Шатилло<sup>2</sup>, Е.Г. Богомолова<sup>1</sup>, О.А. Добровольская<sup>1</sup>, С.А. Ищук<sup>1</sup>, И.В. Духовлинов<sup>1</sup>, А.С. Симбирцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Как цитировать: Варюшина Е.А., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Румянцева А.Б., Митрофанов И.Д., Бендт И.В., Крылова А.Э., Чистякова А.Б., Артемова Н.А., Шатилло И.М., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Ищук С.А., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С. Исследование иммуногенности и безопасности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного гибридного белка // Медицинский академический журнал. 2021. Т. 21. № 2. С. 87–98. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ71134>

Поступила: 31.05.2021

Одобрена: 17.06.2021

Принята: 21.06.2021

**Обоснование.** Ротавирусная инфекция — распространенная причина острого гастроэнтерита у детей как в развитых, так и в развивающихся странах. Вакцинация является единственным средством, которое позволяет предотвратить тяжелое и смертельное течение данного заболевания. Применяемые в настоящее время вакцины, основанные на использовании живых вирусов, могут обладать рядом побочных эффектов. Изучаемая кандидатная вакцина против ротавирусной инфекции создана на основе гибридного рекомбинантного белка FliCVP6VP8, который включает фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 ротавируса А, компоненты флагеллина *S. typhimurium* FliC.

**Цель работы** — изучение иммуногенности и безопасности препарата «Вакцина против ротавирусной инфекции, рекомбинантная» в доклинических исследованиях.

**Материалы и методы.** Иммуногенность вакцины (титр антител в крови, антиген-специфический пролиферативный ответ спленоцитов) изучена на мышах линии BALB/c. Острая и субхроническая токсичность, возможное раздражающее действие, пирогенность, анафилактическое действие и гиперчувствительность замедленного типа исследованы на лабораторных животных (мыши, крысы, морские свинки, кролики).

**Результаты.** Двукратная иммунизация кандидатной вакциной вызывала значительное повышение титров антител в сыворотке крови мышей по сравнению с титром у мышей контрольной группы. При анализе антиген-специфического пролиферативного ответа было выявлено, что после двукратной иммунизации кандидатной вакциной значения стимулированной пролиферации также значительно возросли. Доклинические тесты безопасности не показали токсичности при остром и хроническом введении вакцины. Был обнаружен иммуностимулирующий эффект препарата в тесте определения числа антителообразующих клеток с эритроцитами барана. Количество лейкоцитов крови увеличивалось при длительном введении вакцины.

**Заключение.** Проведенные нами доклинические исследования продемонстрировали иммуногенность и безопасность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции.

**Ключевые слова:** ротавирус; вакцина; иммуногенность; токсичность; анафилаксия; иммунотоксичность; доклинические исследования.

## STUDY OF IMMUNOGENICITY AND SAFETY OF A CANDIDATE ROTAVIRUS VACCINE BASED ON A RECOMBINANT HYBRID PROTEIN

Elena A. Varyushina<sup>1</sup>, Georgy V. Aleksandrov<sup>1</sup>, Mikhail S. Zakharov<sup>1</sup>, Anna S. Kirianova<sup>1</sup>, Olga E. Khuttunen<sup>1</sup>, Alina B. Rumyantseva<sup>1</sup>, Ilya D. Mitrofanov<sup>1</sup>, Irina V. Bendt<sup>1</sup>, Anna E. Krylova<sup>1</sup>, Anastasia B. Chistyakova<sup>1</sup>, Natalya A. Artemova<sup>1</sup>, Irina M. Shatillo<sup>2</sup>, Elena G. Bogomolova<sup>1</sup>, Olga A. Dobrovolskaya<sup>1</sup>, Sergey A. Ishuk<sup>1</sup>, Ilya V. Dukhovlinov<sup>1</sup>, Andrey S. Simbirtsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

To cite this article: Varyushina EA, Aleksandrov GV, Zakharov MS, Kirianova AS, Khuttunen OE, Rumyantseva AB, Mitrofanov ID, Bendt IV, Krylova AE, Chistyakova AB, Artemova NA, Shatillo IM, Bogomolova EG, Dobrovolskaya OA, Ishuk SA, Dukhovlinov IV, Simbirtsev AS. Study of immunogenicity and safety of a candidate rotavirus vaccine based on a recombinant hybrid protein. *Medical Academic Journal*. 2021;21(2):87–98. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ71134>

Received: 31.05.2021

Revised: 17.06.2021

Accepted: 21.06.2021

### Список сокращений

АОК — антителообразующие клетки; в/в — внутривенно; в/м — внутримышечно; ГЗТ — гиперчувствительность замедленного типа; ГФ — государственная фармакопея; Мф — макрофаг; ФИ — фагоцитарный индекс; ИР — изотонический раствор натрия хлорида; ФЧ — фагоцитарное число; у. е. — условные единицы; ЭБ — эритроциты барана; FliC — участок флагеллина *Salmonella*; ЕР — European Pharmacopoeia (Европейская Фармакопея); VP — virus protein (вирусный белок).

**BACKGROUND:** Rotaviruses are the main cause of acute gastroenteritis in children in both developed and developing countries. Vaccination is the only way to prevent severe and fatal course of this disease. Live attenuated viruses-based vaccines currently available can have a number of side effects. A candidate rotavirus vaccine reported is based on a hybrid recombinant protein FliCVP6VP8, which includes a VP6 protein fragment, a rotavirus A VP8 protein fragment, and *S. typhimurium* FliC flagellin components.

**AIM:** The aim was to evaluate the immunogenicity and safety of a preparation “Rotavirus vaccine, recombinant” in preclinical studies.

**MATERIALS AND METHODS:** The immunogenicity of vaccine (blood antibody titers, antigen-specific proliferative response of spleen cells) was evaluated in BALB/c mice. The acute and subchronic toxicity, the possible irritating effect, pyrogenicity and the anaphylactic effect and delayed type hypersensitivity were evaluated in laboratory mice, rats, Guinea pigs, and rabbits.

**RESULTS:** Double immunization of mice with the candidate vaccine demonstrated a significant increase in antibody titers in mouse sera compared to that in control mice. Evaluation of antigen-specific proliferative response after double immunization with a candidate vaccine demonstrated a significant increase in the values of stimulated proliferation. Evaluation of safety through acute and chronic toxicity studies demonstrated no toxicity. The immunostimulatory effect of vaccine was demonstrated when evaluating the number of antibody-producing cells with sheep red blood cells as antigens. The number of white blood cells was demonstrated to increase after the prolonged vaccine administration.

**CONCLUSIONS:** The preclinical studies have demonstrated safety of the candidate rotavirus vaccine and its capability to produce the immune response.

**Keywords:** rotavirus, vaccine; immunogenicity; toxicity; anaphylaxis; immunotoxicity; preclinical studies.

## Обоснование

Ротавирусная инфекция — распространенная причина острого гастроэнтерита у детей как в развитых, так и в развивающихся странах [10, 15]. Ротавирусная инфекция приводит к 611 000 смертельных случаев от диареи в год [10]. Вакцинация является в настоящее время единственным средством, которое позволяет предотвратить тяжелое и смертельное течение данного заболевания [8, 13, 14]. В мире разработаны и применяют вакцины для профилактики ротавирусной инфекции, такие как Rotarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals Rixensart, Бельгия), RotaTeq® (Merck and Co., Inc. Whitehouse Station, New Jersey, США), Rotavac® (Индия) [8]. Данные вакцины основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, но использование в вакцинах даже ослабленного вируса может приводить к нежелательным рискам. Изучаемая кандидатная вакцина против ротавирусной инфекции создана на основе гибридного рекомбинантного белка FliCVP6VP8, который включает фрагмент вирусного белка virus protein 6 (VP6), фрагмент белка virus protein 8 (VP8) ротавируса А, компоненты флагеллина *Salmonella typhimurium* FliC. Создание гибридного белка FliCVP6VP8 подробно описано авторами ранее [1]. Выбранные фрагменты — это консервативные части белков VP6 и VP8, участвующие в развитии протективного иммунитета против ротавирусной инфекции. Вакцина содержит также компоненты флагеллина *S. typhimurium* FliC. Флагеллин обладает адьювантным потенциалом за счет провоспалительного и иммуностимулирующего действия [11, 18], поэтому

включение флагеллина в качестве адьюванта позволяет создавать безопасные, мощные вакцины. Ранее была продемонстрирована высокая эффективность кандидатной вакцины на модели ротавирусной инфекции у мышей Balb/c [2].

**Целью** данной работы было изучение иммуногенности и показателей безопасности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции в рамках доклинических исследований.

## Материалы и методы

Кандидатная вакцина «Вакцина против ротавирусной инфекции, рекомбинантная» представляет собой суспензию для внутримышечного (в/м) введения. Активный компонент вакцины — химерный белок FliCVP6VP8, полученный методом рекомбинантных ДНК-технологий. Культура клеток *E. coli* была трансформирована путем включения в их геном гена, кодирующего химерный белок из иммуногенных эпитопов двух поверхностных белков ротавируса VP6, VP8 и фрагмента флагеллина *S. typhimurium*. В качестве адьюванта в вакцине присутствует гидроксид алюминия. Одна ампула препарата содержит активный компонент — 0,02 мг рекомбинантного белка FliCVP6VP8; вспомогательные компоненты — 25,0 мг маннитола (European Pharmacopoeia, EP); 0,36 мг натрия сукцината (EP/The United States Pharmacopoeia, USP); 0,05 мг полисорбата 20 (EP); 0,5 мг гидроксида алюминия (EP); до 0,5 мл воды для инъекций (ФС.2.2.0019.15). Взрослая терапевтическая доза вакцины для человека при в/м введении составляет 0,5 мл. Фармацевтическую разработку композиции вакцины проводили

в рамках ПНИЭР «Доклинические исследования кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8» (ГК № 14.N08.12.1028).

Животные (мыши, крысы, кролики, морские свинки) поступали из питомника лабораторных животных «Рапполово» и содержались в условиях вивария. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии со стандартными операционными процедурами лаборатории. Основные правила содержания и ухода соответствовали Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Номер ветеринарного регистрационного удостоверения — 78-07095 от 31.05.2016. Эвтаназию проводили путем помещения животных (мышей и крыс) в камеру, содержащую CO<sub>2</sub>, и последующей декапитации. Объем работ и перечень процедур одобрен биоэтической комиссией института.

Иммуногенность кандидатной вакцины исследовали на мышах линии BALB/c 9–12-недельного возраста. Мыши были разделены на три группы (по 10 животных в каждой): первая группа — контроль — интактные животные; вторая группа — однократная иммунизация — введение препарата однократно на «0» день по 0,5 мл; третья группа — двукратная иммунизация — введение препарата на «0» день по 0,5 мл и на 14-й день опыта по 0,5 мл. На 28-е сутки опыта (14-й день после второй иммунизации) животных подвергали эвтаназии и после декапитации собирали кровь, из цельной крови получали сыворотку. У 5 мышей из первой группы и 10 мышей из третьей группы также получали селезенку для оценки антиген-специфической пролиферации спленоцитов.

Титр антител в сыворотках крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Покрывали целевым антигеном (гибридным рекомбинантным белком VP6VP8) в концентрации 3 мкг/мл (в 0,01 М натрий фосфатном буфере, рН 7,2–7,4) 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия). За титр антител принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность по крайней мере в 2 раза больше, чем сыворотка неиммунизированных мышей в том же разведении.

Для оценки антиген-специфической пролиферации спленоцитов клетки, полученные путем гомогенизации селезенки, инкубировали с конканавалином А или вакциной. Интенсивность пролиферации спленоцитов в образцах оценивали по интенсивности включения <sup>3</sup>H тимидина с помощью жидкостного сцинтиллятора (Rackbeta 1217, Wallac, Финляндия) и выражали в импульсах в минуту.

Доклинические исследования острой и хронической токсичности, местно-раздражающего действия проводили в соответствии с действующими методическими рекомендациями [3]. Острую токсичность оценивали на белых беспородных крысах обоего пола (вес — 180–200 г, возраст — 9–10 нед.) и белых беспородных мышах обоего пола (вес — 19–21 г, возраст — 9–10 нед.). Животные были разделены на группы (по 6 самок и 6 самцов в каждой), препарат вводили двумя путями: внутривенно (в/в) или в/м. Вакцину вводили в/м: мышам в 1, 2, 3 и 5 терапевтических человеческих дозах на животное; крысам в 2, 3, 5, 10 или 20 дозах. Вакцину вводили в/в: мышам в 1, 2 или 3 дозах; крысам в 2, 3, 5 или 10 дозах. Животным контрольных групп по той же схеме вводили изотонический раствор натрия хлорида (ИР). С 1-х по 14-е сутки после введения препарата ежедневно проводили клинический осмотр, взвешивание, измеряли потребление корма и воды, ректальную температуру с помощью термометров с ректальными датчиками Oakton Instruments (США). На 14-е сутки все животные были подвергнуты эвтаназии и патоморфологическому исследованию.

Для оценки местно-раздражающего действия трем кроликам породы Шиншилла, самцам (вес — 2–2,5 кг, возраст — 2–3 мес.), на слизистую оболочку правого глаза наносили 0,1 мл вакцины, на слизистую оболочку левого глаза — 0,1 мл ИР. Возможную реакцию регистрировали в течение 24 ч с момента нанесения растворов.

Хроническую токсичность изучали на белых беспородных крысах обоего пола (вес — 180–200 г, возраст — 9–10 нед.). Вакцину вводили ежедневно в/м в течение 30 дней. Крысы были разделены на четыре группы (по 10 самок и 10 самцов в каждой). Животным контрольных групп вводили ИР. Вакцину вводили в 1, 2 или 3 человеческих терапевтических дозах. В течение периода введения препарата регистрировали массу и температуру тела, потребление корма и воды, анализировали поведенческую и двигательную активность, состояние сердечно-сосудистой системы, выполняли офтальмологические тесты и оценивали респираторную функцию. По окончании курса введения препарата проводили клинический анализ крови на анализаторе Abacus Junior vet5 (Diatron, Германия) и на мазках крови; биохимический анализ крови — на анализаторе Erba Chem 7 (Mannheim, Германия), а также анализ мочи — на анализаторе DocUReader (Elektronika, Венгрия) согласно методикам производителей. Затем крыс подвергали эвтаназии, осуществляли патоморфологическое и патогистологическое исследования.

Анализ пирогенности был проведен на кроликах породы Шиншилла, самцах (вес — 2–2,5 кг, возраст — 2–3 мес.), в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ XIII, ОФС 1.2.4.0005.15) [4]. Вакцину вводили в ушную вену в объеме 0,2 мл/кг.

Аллергенную активность препарата оценивали по реакциям общей и активной кожной анафилаксии и по реакции, отражающей гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) [3]. Реакцию общей анафилаксии (анафилактический шок) проводили на морских свинках обоего пола (вес — 200–250 г, возраст — 5–6 нед.). Животные были разделены на три группы (по 5 самок и 5 самцов в каждой). Животные контрольной группы получали ИР — первая инъекция подкожно, две последующие в/м через день. Животные первой и второй групп по той же схеме получали вакцину в дозе 0,5 мл или 1,5 мл на животное соответственно. Через 21 день после первого введения всем животным внутрисердечно вводили разрешающую дозу вакцины. Интенсивность анафилактического шока учитывали в индексах по Weigle [17]. Реакцию активной кожной анафилаксии проводили на белых беспородных мышах, мышах — гибридах F1 (CBA × C57Bl/6) обоего пола (вес — 19–21 г, возраст — 9–10 нед.). Мыши были разделены на три группы (по 5 самок и 5 самцов в каждой). Животные контрольной группы получали ИР — первая инъекция подкожно, две последующие в/м через день. Мыши в первой и во второй группах по той же схеме получали вакцину по 0,5 или 1,0 мл на животное соответственно. Через 21 день после первой инъекции вакцины всем мышам внутрикожно вводили вакцину в концентрации, не вызывающей кожно-раздражающего действия. Через 20 мин после введения препарата всем животным вводили в/в по 0,5 мл 1 % раствора красителя синего Эванса. Через 30 мин мышей умерщвляли и определяли размеры синего пятна на внутренней стороне кожи в месте введения препарата. Реакцию ГЗТ проводили на белых беспородных мышах, мышах — гибридах F1 (CBA × C57Bl/6) обоего пола (вес — 19–21 г, возраст — 9–10 нед.). Мыши были разделены на две группы (по 10 самок и 10 самцов в каждой). Животным опытной группы ежедневно в течение 7 дней в/в вводили вакцину в дозе 0,5 мл на животное. Животные контрольной группы по той же схеме получали ИР. Через 5 сут после последней инъекции всем мышам в подушечку задней лапы вводили 50 мкл вакцины, в контралатеральную лапу — ИР. Через 24 ч проводили эвтаназию, обе лапы отрезали выше пяточного сустава и взвешивали. Индекс реакции подсчитывали в процентах прироста

массы лапы, в которую вводили препарат ( $M_o$ ), по отношению к массе контрольной лапы ( $M_k$ ) по формуле  $((M_o - M_k) / M_k) \cdot 100$ .

Иммунотоксичность исследовали на основании рекомендаций ГОСТ 58173-2018 [5]. Количество антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана (ЭБ) в селезенке мыши определяли на гибридах F1 (CBA × C57Bl/6), которые были разделены на три группы (по 6 самок и 6 самцов в каждой). Мышам в контрольной группе однократно в/м вводили ИР, животным в первой и во второй группах по той же схеме вводили вакцину по 0,5 мл или по 1,0 мл на животное. Через час после введения вакцины или ИР все животные были проиммунизированы внутрибрюшинной инъекцией ЭБ в субоптимальной дозе  $5 \cdot 10^7$  эритроцитов на мышь. Количество АОК в селезенке мышей подсчитывали на 5-е сутки после иммунизации. Определяли количество АОК в селезенках методом локального гемолиза в геле агарозы по методу N.K. Jerne [9]. Реакцию ГЗТ против ЭБ проводили на мышах — гибридах F1 (CBA × C57Bl/6), которые были разделены на три группы (по 6 самок и 6 самцов в каждой). Мышам в контрольной группе однократно в/м вводили ИР, в опытных группах по той же схеме — вакцину: в первой группе — по 0,5 мл, во второй группе — по 1,0 мл. Через час после введения вакцины или ИР все животные были сенсibilизированы однократным подкожным введением в межлопаточную область 0,05 мл раствора, содержащего  $2 \cdot 10^5$  ЭБ. На 5-е сутки после сенсibilизации всем животным в подушечку задней лапы вводили  $10^8$  ЭБ в 0,05 мл ИР (разрешающая инъекция). В контралатеральную лапу вводили ИР в том же объеме. Через 24 ч оценивали реакции и подсчитывали индекс, как описано выше. Был проведен дополнительный эксперимент по оценке обратимости наблюдаемых изменений в реакции ГЗТ к ЭБ. Его отличием от первого эксперимента был 10-дневный интервал между введением вакцины и сенсibilизацией животных ЭБ.

Оценку фагоцитарной функции перитонеальных макрофагов (Мф) выполняли на мышах — гибридах F1 (CBA × C57Bl/6), которые были разделены на три группы (по 6 самок и 6 самцов в каждой). Мышам в контрольной группе однократно в/м вводили ИР, в опытных группах по той же схеме животным вводили вакцину: в первой группе — по 0,5 мл, во второй группе — по 1,0 мл. Через сутки после инъекции вакцины осуществляли эвтаназию мышей и промывали брюшную полость культуральной средой. По 2 мл клеточной взвеси с концентрацией клеток  $2 \cdot 10^6$ /мл вносили в 40 мм чашки Петри и инкубировали

в термостате при 37 °С в течение часа, отмывали неадгезированные клетки, после чего добавляли в среду опсонизированные дрожжи и инкубировали еще час. Препараты фиксировали и окрашивали по Романовскому – Гимзе. Под микроскопом подсчитывали количество фагоцитировавших дрожжи Мф, высчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) (отношение количества фагоцитировавших Мф к общему количеству Мф, умноженное на 100 %) и среднее количество поглощенных дрожжей одним Мф — фагоцитарное число (ФЧ), которое выражали в условных единицах (у. е.).

Статистический анализ выполняли в программе Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation). Результаты представлены в виде средних значений и ошибок среднего ( $M \pm m$ ) или стандартных отклонений ( $M \pm \sigma$ ). Показатели между группами сравнивали с помощью непарного  $t$ -критерия Стьюдента с неравными отклонениями, а также  $U$  критерия Манна – Уитни. Отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследований

### Исследование иммуногенности кандидатной вакцины

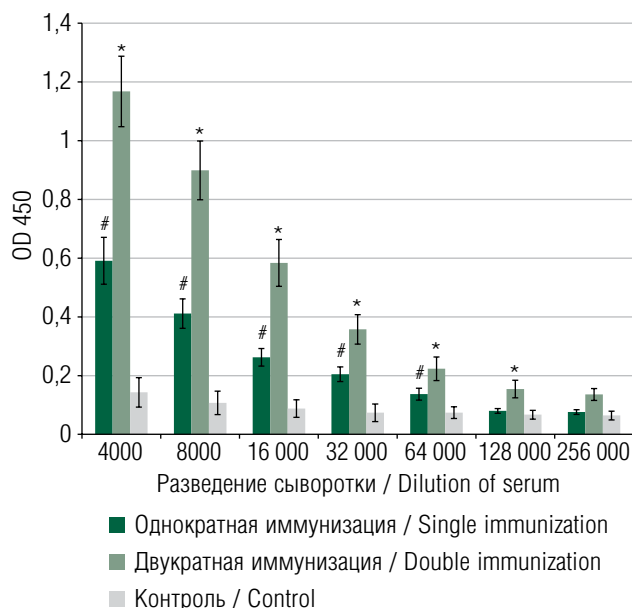
Для оценки иммуногенных свойств кандидатной вакцины определяли титр антител в сыворотках крови иммунизированных животных. На рис. 1 представлены результаты определения титров антител при использованных схемах вакцинации. Из полученных данных следует, что введение кандидатной вакцины вызывает значительное повышение титров антител в сыворотках крови мышей по сравнению с титрами мышей в контрольной группе. При этом при схеме опыта с двукратной иммунизацией формируются более высокие титры антител (1 : 128 000) в сравнении с таковыми при однократной иммунизации (1 : 64 000).

### Исследование антиген-специфического пролиферативного ответа

Результаты анализа антиген-специфического пролиферативного ответа представлены на рис. 2. Из полученных данных следует, что в группе животных, получивших по схеме двукратную иммунизацию кандидатной вакциной, значения стимулированной пролиферации значительно превосходят аналогичные показатели в контрольной группе животных. У мышей, иммунизированных кандидатной вакциной, пролиферативный ответ на вакцину или на конкавалин А (положительный контроль стимуляции) увеличился в среднем в 2 раза. Различия с контрольной группой были статистически достоверными.

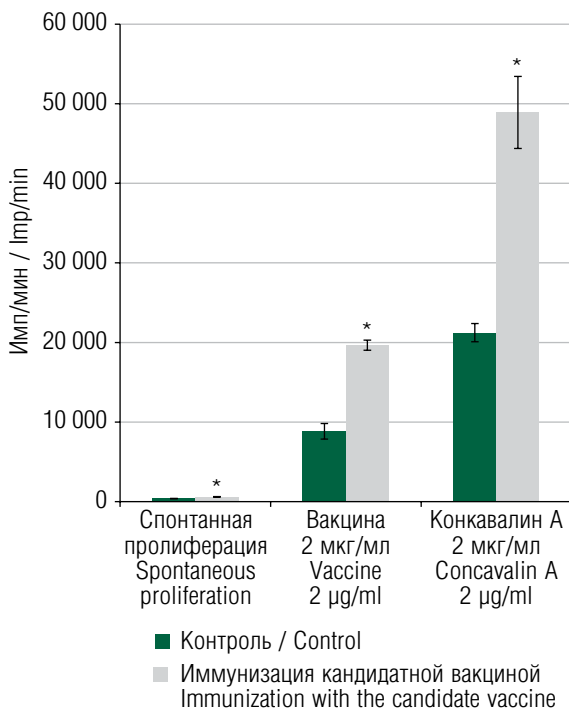
## Изучение острой токсичности и местно-раздражающего действия

В течение всего периода наблюдения после в/м или в/в введения мышам и крысам исследуемой кандидатной вакцины летальных исходов не наблюдали. При ежедневном клиническом осмотре не были выявлены симптомы интоксикации животных, значительные различия между группами, связанные с введением кандидатной вакцины, в поведении, питании и потреблении воды, динамике прироста массы тела, ректальной температуре. Патоморфологическое исследование крыс и мышей, проведенное в конце эксперимента, также не показало значимых различий между группами. При наружном осмотре у животных не было обнаружено отклонений от нормы. При вскрытии — положение внутренних органов анатомически правильное,



**Рис. 1.** Диаграмма зависимости оптической плотности при длине волны 450 нм от степени разведения сыворотки иммунизированных животных в эксперименте по определению иммуногенности кандидатной вакцины методом иммуноферментного анализа; # различия между группами «однократная иммунизация» и «контроль» достоверны,  $p < 0,05$ ; \* различия между группами «двукратная иммунизация» и «контроль» достоверны,  $p \leq 0,05$ ; количество мышей в группах  $n = 10$ ;  $M \pm m$ ; результаты между группами сравнивали по  $U$  критерию Манна – Уитни. OD — оптическая плотность

**Fig. 1.** Diagram of the dependence of optical density at a wavelength of 450 nm on the degree of dilution of the serum of immunized animals in an experiment to determine the immunogenicity of a candidate vaccine by ELISA; # the differences between the groups “single immunization” and “control” are significant,  $p < 0.05$ ; \* the differences between the groups “double immunization” and “control” are significant,  $p \leq 0.05$ ; number of mice in groups  $n = 10$ ;  $M \pm m$ ; results between groups were compared using the Mann-Whitney  $U$  test. OD — optical density



**Рис. 2.** Диаграмма уровня включения  $^3\text{H}$  тимидина в эксперименте по оценке антиген-специфической пролиферации спленоцитов; \*различия с контрольной группой достоверны,  $p < 0,01$ ; количество мышей в группах: контроль  $n = 5$ , иммунизация вакциной  $n = 10$ ;  $M \pm s$ ; результаты между группами сравнивали по  $U$  критерию Манна – Уитни. Имп/мин — импульсы в минуту

**Fig. 2.** Diagram of the level of incorporation of  $^3\text{H}$  thymidine in an experiment to assess antigen-specific proliferation of splenocytes; \*differences with the control group are significant,  $p < 0,01$ ; number of mice in groups: control  $n = 5$ , immunization with vaccine  $n = 10$ ;  $M \pm s$ ; results between groups were compared using the Mann-Whitney  $U$  test. Imp/min — impulses per minute

а сами органы без патологических изменений. Массовые коэффициенты внутренних органов мышей и крыс также значимо не различались между группами животных, получавших кандидатную вакцину или ИР. При анализе кожи и мышц в местах введения отсутствовали выраженное местно-раздражающее действие, отек или гиперемия. В отдельном эксперименте оценивали возможное местно-раздражающее действие на кроликах. При наблюдении в течение 24 ч не было выявлено патологических изменений (отека или гиперемии глаз) у животных.

При клиническом осмотре значимых различий между контрольными и опытными группами крыс не было, гибели животных не наблюдали. Отсутствовали различия в динамике прироста массы тела, потреблении корма и воды между всеми группами. При анализе спонтанной двигательной активности животных и их поведения в арене открытого поля, электрокардиограммы

и артериального давления, частоты дыхательных движений и офтальмологических тестов, а также силовых показателей и болевой чувствительности не обнаружено различий между животными опытными и контрольных групп по результатам физиологических исследований до начала эксперимента и на 30-й день исследования.

При оценке состава периферической крови было показано, что после 30-дневного периода введения кандидатной вакцины увеличилось общее количество лейкоцитов крови и относительное количество палочкоядерных нейтрофилов в группах животных, получавших вакцину в разных дозах, изменения были аналогичными как у самцов, так и у самок. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Не обнаружено различий между контрольной и опытной группами по результатам исследований биохимических показателей крови, миеограммы, анализу мочи и оценке функциональной активности почек. Патоморфологическое исследование на 30-е сутки не показало отклонений от нормы и различий между опытными и контрольной группами крыс. Кожа в месте инъекций была без визуальных изменений. При изучении мышц в месте инъекций отмечено, что у животных контрольной группы обнаруживались гематомы, у животных опытных групп помимо гематом в ряде случаев наблюдались небольшие нагноения. Не было достоверных различий в массовых коэффициентах органов между экспериментальными группами. По данным патогистологического исследования образцов тканей крыс, получавших кандидатную вакцину в максимальной дозе, а также животных контрольной группы значимые патологические изменения отсутствовали.

### Результаты оценки пирогенности

На первом этапе сумма индивидуальных максимальных повышений температур ( $\Delta t$ ) у кроликов составила  $2,4^\circ\text{C}$ , поэтому был проведен второй этап испытаний. Сумма индивидуальных максимальных повышений температур ( $\Delta t$ ) на втором этапе составила  $2,5^\circ\text{C}$ , то есть суммарное повышение индивидуальных температур по результатам двух этапов равнялось  $4,9^\circ\text{C}$ . Эти показатели превышают порог апиогенности ( $4,8^\circ\text{C}$ ), что позволяет заключить, что исследуемая кандидатная вакцина обладает пирогенным эффектом.

### Результаты изучения аллергизирующего действия

При оценке реакции гиперчувствительности немедленного типа (анафилактическая реакция) у морских свинок в опытных группах,

Влияние ежедневного внутримышечного введения вакцины на показатели периферической крови самцов белых крыс на 30-е сутки

Effect of daily intravenous administration of the vaccine on the peripheral blood parameters of male white rats on day 30

Показатель	$M \pm m$			
	Экспериментальные группы (доза вакцины, мл)			
	контроль $n = 10$	0,5 $n = 10$	1,0 $n = 10$	1,5 $n = 10$
Количество лейкоцитов, $10^9/л$	$7,36 \pm 0,53$	$8,92 \pm 0,41^*$	$8,88 \pm 0,34^*$	$9,01 \pm 0,46^*$
Количество эритроцитов, $10^{12}/л$	$8,20 \pm 0,38$	$8,33 \pm 0,21$	$7,98 \pm 0,26$	$7,86 \pm 0,37$
Концентрация гемоглобина, г/л	$165,3 \pm 3,80$	$158,30 \pm 4,00$	$160,20 \pm 3,30$	$165,20 \pm 3,70$
Гематокрит, %	$47,80 \pm 0,60$	$47,20 \pm 0,40$	$47,50 \pm 0,40$	$47,00 \pm 0,70$
Средний объем эритроцита, фл	$54,30 \pm 0,60$	$54,40 \pm 0,30$	$55,90 \pm 0,60$	$54,20 \pm 0,40$
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	$18,50 \pm 0,30$	$17,20 \pm 0,50$	$18,40 \pm 0,30$	$18,70 \pm 0,50$
Количество тромбоцитов, $10^9/л$	$692,70 \pm 16,00$	$713,40 \pm 24,50$	$701,60 \pm 24,50$	$691,70 \pm 17,20$
Палочкоядерные нейтрофилы, %	$1,70 \pm 0,20$	$2,80 \pm 0,40^*$	$2,90 \pm 0,30^*$	$3,10 \pm 0,30^*$
Сегментоядерные нейтрофилы, %	$18,00 \pm 0,80$	$18,10 \pm 1,20$	$18,80 \pm 0,70$	$20,70 \pm 0,70^*$
Базофилы, %	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Эозинофилы, %	$1,30 \pm 0,30$	$1,20 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,30$	$1,10 \pm 0,30$
Моноциты, %	$2,40 \pm 0,30$	$2,30 \pm 0,40$	$2,10 \pm 0,30$	$2,20 \pm 0,30$
Лимфоциты, %	$76,00 \pm 0,70$	$75,30 \pm 1,00$	$74,50 \pm 0,90$	$72,60 \pm 0,70^*$
Плазматические клетки, %	$0,60 \pm 0,30$	$0,30 \pm 0,20$	$0,40 \pm 0,20$	$0,30 \pm 0,20$

\* различия с контролем достоверны при  $p < 0,05$ .

сенсibilизированных вакциной в одной или трех прививочных дозах (0,5 или 1,5 мл соответственно), при введении разрешающей дозы препарата через 21 день (1,5 или 4,5 мл соответственно) развивался выраженный анафилактический шок с гибелью животных в 100 % случаев. Анафилактический индекс, рассчитанный для обеих опытных групп, составил 4,0 (индексы по Weigle). У животных контрольной группы анафилаксия не наблюдалась, анафилактический индекс равнялся нулю.

При оценке реакции активной кожной анафилаксии результаты измерения диаметров цветных пятен, образовавшихся на месте введения разрешающей дозы кандидатной вакцины, показали, что в контрольной группе мышей средние размеры пятен составили  $1,40 \pm 0,24$  мм у самцов и  $1,80 \pm 0,20$  мм у самок ( $M \pm m$ ). В опытных группах, в которых вакцину вводили в одной (0,5 мл) и двух прививочных дозах (1,0 мл), после введения разрешающей дозы анафилактическая реакция возникала у всех животных. Средние размеры пятен составили при дозе 0,5 мл:  $6,20 \pm 0,20$  мм у самцов и  $6,40 \pm 0,24$  мм у самок; при дозе

1,0 мл:  $7,60 \pm 0,24$  мм у самцов и  $7,60 \pm 0,24$  мм у самок ( $M \pm m$ ). Различия по диаметру пятна у животных опытных групп по сравнению с животными контрольной были достоверны при  $p < 0,05$ . Достоверные различия между опытными группами, а также половые различия не обнаружены.

После сенсibilизации 0,5 мл вакцины, по данным оценки реакции ГЗТ, индексы изменения массы лапы у мышей составили в контрольной группе у самцов  $5,1 \pm 0,9$  %, у самок —  $5,1 \pm 0,8$  %; в опытной группе у самцов —  $5,2 \pm 0,9$  %, у самок —  $5,2 \pm 0,9$  % ( $M \pm m$ ). Значимые различия по индексу массы лапы между группами не наблюдались, что говорит об отсутствии реакции ГЗТ в ответ на препарат.

### Результаты оценки иммунотоксичности

Результаты определения числа АОК, образующихся в селезенке мышей в ответ на ЭБ после однократного введения кандидатной вакцины в дозах 0,5 и 1,0 мл, представлены в табл. 2. Как следует из данных, применение вакцины привело к статистически значимому увеличению количества АОК.

Таблица 2 / Table 2

Влияние вакцины на число антителообразующих клеток в селезенке мышей  
Effect of the vaccine on the number of antibody-forming cells in the spleen of mice

Группа	Количество антителообразующих клеток (на $10^6$ спленоцитов), $M \pm m$	
	самцы	самки
Контроль	$11,7 \pm 1,1$	$11,8 \pm 1,4$
Первая (вакцина 0,5 мл)	$24,7 \pm 1,5^*$	$23,8 \pm 1,6^*$
Вторая (вакцина 1,0 мл)	$25,7 \pm 1,8^*$	$24,2 \pm 1,3^*$

\* различия с контрольной группой достоверны при  $p < 0,05$ , количество мышей в группе — 12 (по 6 самцов и 6 самок).

Таблица 3 / Table 3

Влияние вакцины на развитие гиперчувствительности замедленного типа  
Effect of the vaccine on the development of delayed-type hypersensitivity

Группа	$M \pm m$	
	Индекс реакции, %	
	самцы	самки
	Иммунизация эритроцитами барана в день вакцинации	
Контроль	$54,7 \pm 1,9$	$55,7 \pm 2,2$
Первая (вакцина 0,5 мл)	$37,7 \pm 2,1^*$	$38,5 \pm 1,7^*$
Вторая (вакцина 1,0 мл)	$34,5 \pm 1,6^*$	$34,0 \pm 1,8^*$
	Иммунизация эритроцитами барана спустя 10 дней после вакцинации	
Контроль	$48,5 \pm 2,2$	$50,0 \pm 2,2$
Первая (вакцина 0,5 мл)	$50,3 \pm 1,9$	$52,5 \pm 2,5$
Вторая (вакцина 1,0 мл)	$49,8 \pm 2,3$	$51,5 \pm 2,2$

\* различия с контрольной группой достоверны при  $p < 0,05$ , количество мышей в группе — 12 (по 6 самцов и 6 самок).

Развитие реакции ГЗТ у мышей с использованием ЭБ в качестве антигена оценивали после однократного введения вакцины в дозах 0,5 мл (первая группа) и 1,0 мл (вторая группа). Результаты представлены в табл. 3. В первом эксперименте сенсибилизацию мышей ЭБ проводили в один день с введением вакцины: отмечали уменьшение интенсивности развития реакции ГЗТ к ЭБ в обеих опытных группах по сравнению с контролем. Для оценки обратимости данного эффекта был поставлен дополнительный эксперимент, в котором сенсибилизацию мышей ЭБ осуществляли спустя 10 дней после однократного введения изучаемой вакцины.

Иммунизация животных ЭБ привела к развитию выраженной реакции ГЗТ во всех экспериментальных группах, что говорит об обратимости наблюдавшихся изменений.

Фагоцитарную функцию Мф оценивали после однократного введения вакцины в дозах

0,5 мл (первая группа) и 1,0 мл (вторая группа). У самцов в контрольной группе фагоцитарный индекс (ФИ) составил  $55,8 \pm 2,5$  %, фагоцитарное число (ФЧ) равнялось  $2,5 \pm 0,2$  у. е.; в первой группе ФИ —  $57,0 \pm 2,1$  % и ФЧ —  $3,3 \pm 0,4$  у. е.; во второй группе ФИ —  $57,8 \pm 2,4$  % и ФЧ —  $3,2 \pm 0,5$  у. е. соответственно ( $M \pm m$ ); у самок результаты были сходными. Таким образом, введение вакцины не влияло на фагоцитарную функцию Мф.

### Обсуждение

Вакцины на основе рекомбинантных белков являются новыми, безопасными и перспективными препаратами для профилактики ряда инфекционных заболеваний, вот почему разработка таких вакцин активно ведется в настоящее время [16]. Данные вакцины обладают рядом важных преимуществ, таких как фармакологическая чистота, а также более низкая



себестоимость. Иммуногенность кандидатной вакцины была исследована на модели мышинной ротавирусной инфекции (заражение мышью Valb/c ротавирусом штамма EDC), которую применяют для изучения эффективности и иммуногенности подобных препаратов. Так, Lapalainen и соавт. использовали модель мышинной ротавирусной инфекции (заражение штаммом EDIM) для изучения формирования защитного иммунного ответа на кандидатную вакцину на основе белка VP6 [19]. При оценке иммуногенности рекомбинантных гибридных белков VP6VP8 ранее было показано, что данные белки обладают высокой антигенной активностью. При этом применение компонентов флагеллина в составе гибридного белка позволяет повысить ответ на вакцинацию [6]. При последующем исследовании кандидатной вакцины на основе белка FliCVP6VP8 был продемонстрирован высокий уровень защиты от мышинного ротавируса EDC, которая ассоциировалась с продукцией вирусспецифических иммуноглобулинов — IgA и IgG в кишечнике и сыворотке крови [2]. В нашей работе в рамках изучения иммуногенных свойств двукратная иммунизация кандидатной вакциной оказалась более эффективной, чем однократная, в отношении повышения титра антител и усиления пролиферации спленоцитов у мышей Valb/c. Результаты согласуются с полученными ранее данными о том, что при двукратной иммунизации наблюдается высокий уровень защиты от ротавирусной инфекции [2]. Ранее мы установили, что протективная активность кандидатной вакцины сопоставима с активностью препарата сравнения — коммерческой вакцины Rotarix (Glaxo Smith Kline) — при большей безопасности кандидатной вакцины [2]. Следует отметить, что все коммерческие вакцины против ротавирусной инфекции содержат живой вирус, что осложняет их использование в качестве препарата сравнения, так как для этого необходимы особые условия.

Таким образом, дозы кандидатной вакцины в тысячи раз большие, чем разовая терапевтическая доза для человека, нетоксичны для грызунов, поскольку не вызывают ни летальности, ни симптомов интоксикации животных. На основании оценки местно-раздражающего действия в сочетании с данными патоморфологического исследования можно заключить, что изучаемая кандидатная вакцина не оказывает раздражающего действия при однократном местном применении. При длительном использовании в течение 30 дней в высоких дозах, превышающих в тысячи раз дозу для человека, кандидатная вакцина не вызывает токсичности, что говорит о ее высокой безопасности.

Выявленная пирогенность может быть проявлением биологического действия, поскольку в состав вакцины входит флагеллин, который, как известно, обладает свойством индуцировать провоспалительные цитокины [18]. Проявление лейкоцитоза в периферической крови, сопровождавшегося увеличением количества палочкоядерных нейтрофилов, может свидетельствовать об иммуностимулирующем действии препарата. Известно, что флагеллин способен активировать функцию нейтрофилов посредством связывания с TLR5 (Toll-like receptor 5 — Толл-подобный рецептор) на поверхности этих клеток [12]. При длительном ежедневном введении высоких доз кандидатной вакцины наблюдали проявления местно-раздражающего действия, что может быть следствием использования в составе адьюванта. Воспалительные реакции в месте введения также могут служить признаком стимуляции иммунной системы. Наблюдаемый побочный эффект не является противопоказанием для клинических испытаний препарата из-за его умеренного проявления, а также из-за того, что при клиническом применении вакцину планируется вводить лишь двукратно.

В связи с тем что нами была выявлена анафилактическая активность кандидатной вакцины, необходимо уточнить, что активное образование антител и аллергические реакции у лабораторных животных следует рассматривать как предостережение, но не как противопоказание для проведения клинических исследований. Так, для лекарственных препаратов на основе человеческих белков тесты анафилаксии на морских свинках достаточно часто бывают положительными, но эти результаты не являются прогностическими для пациентов [7]. Реакций ГЗТ в ответ на иммунизацию кандидатной вакциной не отмечено. Показано выраженное неспецифическое иммуностимулирующее действие кандидатной вакцины в отношении гуморального иммунного ответа, поскольку в ответ на введение ЭБ увеличивалось количество АОК в селезенке. Выявленное ингибирующее воздействие на развитие реакции ГЗТ к ЭБ (иммунотоксический эффект) носило обратимый характер, и нарушенные функции полностью восстанавливались спустя 10 дней после однократного введения, что может свидетельствовать об иммуномодулирующей активности кандидатной вакцины.

Таким образом, проведенные в рамках доклинических испытаний исследования продемонстрировали иммуногенность и безопасность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции. Данная кандидатная вакцина может быть рекомендована для дальнейших испытаний.

## Дополнительная информация

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного контракта № 14.N08.12.1028 от 01.06.2015 с Минобрнауки РФ по теме «Доклинические исследования кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного гибридного белка».

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

## Список литературы

1. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А // *Инфекция и иммунитет*. 2014. Т. 4, № 3. С. 229–234. DOI: 10.15789/2220-7619-2014-3-229-234
2. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С. 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
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. Часть первая. Москва, 2013.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание: в 3 т. М., 2015.
5. ГОСТ 58173-2018. Средства лекарственные для медицинского применения. Исследования иммунотоксичности лекарственных средств, предназначенных для человека. Москва: Стандартинформ, 2018.
6. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С. Изучение иммуногенности гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015. Т. 14, № 2(81). С. 96–101. DOI: 10.31631/2073-3046-2015-14-2-96-101
7. ГОСТ Р 56699-2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации. Москва: Стандартинформ, 2016.
8. Bhandari N., Rongsen-Chandola T., Bavdekar A. et al. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet*. 2014. Vol. 383, No. 9935. P. 2136–2143. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62630-6
9. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells // *Science*. 1963. Vol. 140, No. 3365. P. 405. DOI: 10.1126/science.140.3565.405
10. Elliott E.J. Acute gastroenteritis in children // *BMJ*. 2007. Vol. 334, No. 7583. P. 35–40. DOI: 10.1136/bmj.39036.406169.80
11. Hajam I.A., Dar P.A., Shah Nawaz I. et al. Bacterial flagellin – a potent immunomodulatory agent // *Exp. Mol. Med*. 2017. Vol. 49, No. 9. P. e373. DOI: 10.1038/emm.2017.172

12. Hayashi F., Means T.K., Luster A.D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function // *Blood*. 2003. Vol. 102, No. 7. P. 2660–2669. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1078
13. Munos M.K., Walker C.L.F., Black R.E. The effect of rotavirus vaccine on diarrhea mortality // *Int. J. Epidemiol*. 2010. Vol. 39, No. Suppl 1. P. i56–i62. DOI: 10.1093/ije/dyq022
14. Parashar U.D., Alexander J.P., Glass R.I. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children // *MMWR Recomm. Rep*. 2006. Vol. 55, No. RR–12. P. 1–13.
15. Revelas A. Acute gastroenteritis among children in the developing world // *South Afr. J. Epidemiol. Infect*. 2012. Vol. 27, No. 4. P. 156–162. DOI: 10.1080/10158782.2012.11441503
16. Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Potapchuk M.V. et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2E peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2E // *Vaccine*. 2015. Vol. 33, No. 29. P. 3398–3406. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.04.073
17. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit // *J. Immunol*. 1960. Vol. 85. P. 469–477.
18. Wyant T.L., Tanner M.K., Szein M.B. Salmonella typhi flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes // *Infect. Immun*. 1999. Vol. 67, No. 7. P. 3619–3624. DOI: 10.1128/IAI.67.7.3619-3624.1999
19. Lappalainen S., Pastor A.R., Tamminen K. et al. Immune responses elicited against rotavirus middle layer protein VP6 inhibit viral replication *in vitro* and *in vivo* // *Hum. Vaccin Immunother*. 2014. Vol. 10, No. 7. P. 2039–2047. DOI: 10.4161/hv.28858

## References

1. Dukhovlinov IV, Bogomolova EG, Fedorova EA, Simbirtsev AS. Development of hybrid recombinant proteins based on VP6 proteins and VP8 rotavirus human group A. *Infection and Immunity*. 2014;4(3):229–234. (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-2014-3-229-234
2. Dukhovlinov IV, Bogomolova EG, Fedorova EA, Simbirtsev AS. Study of the protective activity of the candidate vaccine against rotavirus infection based on the recombinant protein FliCVP6VP8. *Medical immunology*. 2016;18(5):417–424. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2016-5-417-424
3. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv. Ed. by A.N. Mironov. Part one. Moscow; 2013. (In Russ.)
4. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii XIII izdaniye: v 3 t. Moscow; 2015. (In Russ.)
5. GOST 58173-2018. Sredstva lekarstvennyye dlya medicinskogo primeneniya. Immunotoxicity investigations intended for humans pharmaceuticals. Moscow: Standartinform; 2018. (In Russ.)
6. Dukhovlinov IV, Bogomolova EG, Fedorova EA, Simbirtsev AS. Study of the immunogenicity of hybrid recombinant proteins based on VP6 and VP8 proteins of rotavirus human group A. *Epidemiology and Vac-*

- cial Prevention*. 2015;14(2(81)):96–101. (In Russ.). DOI: 10.31631/2073-3046-2015-14-2-96-101
7. GOST R 56699–2015. Medicines for medical applications. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. General recommendations. Moscow: Standartinform; 2016. (In Russ.)
  8. Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Bavdekar A, et al. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014;383(9935):2136–2143. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62630-6
  9. Jerne NK, Nordin AA. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*. 1963;140(3365):405. DOI: 10.1126/science.140.3565.405
  10. Elliott EJ. Acute gastroenteritis in children. *BMJ*. 2007;334(7583):35–40. DOI: 10.1136/bmj.39036.406169.80
  11. Hajam IA, Dar PA, Shah Nawaz I, et al. Bacterial flagellin – a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. 2017;49(9):e373. DOI: 10.1038/emm.2017.172
  12. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102(7):2660–2669. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1078
  13. Munos MK, Walker CLF, Black RE. The effect of rotavirus vaccine on diarrhea mortality. *Int J Epidemiol*. 2010;39(Suppl 1):i56–i62. DOI: 10.1093/ije/dyq022
  14. Parashar UD, Alexander JP, Glass RI. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. *MMWR Recomm Rep*. 2006;55(RR–12):1–13.
  15. Revelas A. Acute gastroenteritis among children in the developing world. *South Afr J Epidemiol Infect*. 2012;27(4):156–162. DOI: 10.1080/10158782.2012.11441503
  16. Tsybalova LM, Stepanova LA, Potapchuk MV, et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2E peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2E. *Vaccine*. 2015;33(29):3398–3406. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.04.073
  17. Weigle WO, Cochrane CG, Dixon FJ. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J Immunol*. 1960;85:469–477.
  18. Wyant TL, Tanner MK, Szein MB. Salmonella typhi flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes. *Infect Immun*. 1999;67(7):3619–3624. DOI: 10.1128/IAI.67.7.3619-3624.1999
  19. Lappalainen S, Pastor AR, Tamminen K, et al. Immune responses elicited against rotavirus middle layer protein VP6 inhibit viral replication *in vitro* and *in vivo*. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(7):2039–2047. DOI: 10.4161/hv.28858

#### Информация об авторах / Information about the authors

**Елена Анатольевна Варюшина** — д-р биол. наук, ведущий биотехнолог лаборатория биохимии белка. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: elenavaryush@gmail.com.

**Георгий Вячеславович Александров** — канд. биол. наук, заместитель начальника отдела доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: g.v.alexandrov@hpb.spb.ru.

**Михаил Сергеевич Захаров** — консультант, отдел доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: m.s.zakharov@hpb.spb.ru.

**Анна Сергеевна Кирьянова** — специалист по качеству, отдел обеспечения качества. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: a.s.kiryanova@hpb.spb.ru.

**Ольга Эрнестовна Хуттунен** — биолог, отдел доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: o.e.khuttunen@hpb.spb.ru.

**Алина Борисовна Румянцева** — старший биолог, отдел доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: a.b.rumyantseva@hpb.spb.ru.

**Elena A. Varyushina** — Dr. Sci. (Biology), Leading Biotechnologist, Protein Biochemistry Laboratory. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: elenavaryush@gmail.com.

**Georgy V. Alexandrov** — PhD, Deputy Head, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: g.v.alexandrov@hpb.spb.ru.

**Mikhail S. Zakharov** — consultant, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: m.s.zakharov@hpb.spb.ru.

**Anna S. Kiryanova** — Quality Specialist, Quality Assurance Department. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a.s.kiryanova@hpb.spb.ru.

**Olga E. Huttunen** — biologist, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: o.e.khuttunen@hpb.spb.ru.

**Alina B. Rumyantseva** — Senior Biologist, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a.b.rumyantseva@hpb.spb.ru.

## Информация об авторах / Information about the authors

*Илья Дмитриевич Митрофанов* — биолог, отдел доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: i.d.mitrofanov@hpb.spb.ru.

*Ирина Владимировна Бендт* — старший биотехнолог, отдел доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: i.v.bendt@hpb.spb.ru.

*Анна Эдуардовна Крылова* — биолог, отдел доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: a.e.polyanskaya@hpb.spb.ru.

*Анастасия Борисовна Чистякова* — биолог, отдел доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: a.b.chistyakova@hpb.spb.ru.

*Наталья Александровна Артемова* — старший биолог, отдел доклинических исследований. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: n.a.artemova@hpb.spb.ru.

*Ирина Михайловна Шатилло* — канд. мед. наук, доцент кафедры педиатрии с курсом неонатологии. ФГБУ «Северо-западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: elenavaryush@gmail.com.

*Елена Григорьевна Богомолова* — заместитель начальника лаборатории генетической инженерии вакцин. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

*Ольга Андреевна Добровольская* — младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

*Сергей Александрович Ищук* — младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

*Илья Владимирович Духовлинов* — канд. биол. наук, начальник лаборатории генетической инженерии вакцин. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

*Андрей Семенович Симбирцев* — д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории биохимии белка. ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: a.s.simbirtsev@hpb.spb.ru.

*Ilya D. Mitrofanov* — biologist, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: i.d.mitrofanov@hpb.spb.ru.

*Irina V. Bendt* — Senior Biotechnologist, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: i.v.bendt@hpb.spb.ru.

*Anna E. Krylova* — biologist, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a.e.polyanskaya@hpb.spb.ru.

*Anastasia B. Chistyakova* — biologist, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a.b.chistyakova@hpb.spb.ru.

*Natalya A. Artemova* — Senior Biologist, Department of Preclinical Research. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: n.a.artemova@hpb.spb.ru.

*Irina M. Shatillo* — MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pediatrics with a course in Neonatology. North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: elenavaryush@gmail.com.

*Elena G. Bogomolova* — Deputy Head of the Laboratory for Vaccine Genetic Engineering. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

*Olga A. Dobrovolskaya* — Junior Researcher, Laboratory for Genetic Engineering of Vaccines. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

*Sergey A. Ischuk* — Junior Researcher, Laboratory for Genetic Engineering of Vaccines. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

*Ilya V. Dukhovlinov* — PhD, Head of the Laboratory for Genetic Engineering of Vaccines. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: bogomolovaele@inbox.ru.

*Andrey S. Simbirtsev* — Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher of the Protein Biochemistry Laboratory. State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a.s.simbirtsev@hpb.spb.ru.

## ✉ Контактное лицо / Corresponding author

*Елена Анатольевна Варюшина* / *Elena A. Varyushina*  
E-mail: elenavaryush@gmail.com