

Черепушкин Станислав Андреевич

**РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ
ЧАСТИЦ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Научный руководитель:

Гребенникова Татьяна Владимировна, член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Института вирусологии им Д.И. Ивановского, руководитель лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Официальные оппоненты:

Свитич Оксана Анатольевна, академик РАН, профессор, доктор медицинских наук, директор ФБГНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России.

Гармонов Сергей Юрьевич, профессор, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества института нефти, химии и нанотехнологий ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Учёный секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.021

кандидат химических наук, доцент

Ольга Валерьевна Левицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) выделены в Государственной фармакопее РФ (XV издание) в отдельную группу по причине того, что производство данных препаратов отличается сложностью и многообразием технологических процессов. Качество ИЛП обеспечивается стандартизацией технологических процессов и методов контроля качества: используются только изученные, генетически стабильные производственные штаммы, для культивирования штаммов-продуцентов не используются сывороток животного происхождения, методы получения и биофармацевтические методы контроля качества должны быть разработаны и валидированы. Вакцины на основе рекомбинантных технологий являются вакцинами третьего поколения, отличаются благоприятным профилем безопасности и являются перспективными для изучения и внедрения иммунобиологическими лекарственными препаратами.

Ротавирусная инфекция остается основной причиной острого гастроэнтерита у детей, которая приводит к госпитализации 1,76 миллионов (*Hallowell, 2022*) и смерти 128,5 тысяч детей до 5 лет ежегодно (*Troeger, 2018*). Российская Федерация относится к регионам с высоким уровнем заболеваемости острыми кишечными инфекциями, причем на долю ротавирусной инфекции приходится около половины случаев установленной этиологии. Экономическая значимость ротавирусной инфекции в Российской Федерации в 2024 году оценивается в 11,3 млрд. рублей. Основным способом профилактики ротавирусной инфекции считается вакцинация. Несмотря на присутствие на рынке нескольких вакцин против ротавируса А человека разработка новых вакцин актуальна. Все зарегистрированные вакцины против ротавируса А являются живыми, при их применении возможны серьезные побочные эффекты, включая инвагинацию кишечника (*Yen, 2016*). Кроме того, ротавирус А имеет множество генотипов, часть из которых представлена только в определенных регионах, и не одна из существующих на рынке вакцин не соответствует полностью спектру генотипов ротавируса А, представленному в России.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время на мировом рынке представлены 4 преквалифицированных ВОЗ ротавирусные вакцины - RotaTeq, Rotarix, Rotasiil и Rotavac, а также 2 региональные вакцины - Rotavin-M1 (Вьетнам) и Lanzhou lamb rotavirus vaccine (Китай). С октября 2012 г. в России зарегистрирована вакцина RotaTeq, и входит в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям РФ (Приказ Минздрава России № 125н от 21.03.2014). Также одобрена для медицинского применения в России вакцина «Рота-V-Эйд» (российское торговое название препарата «Rotasiil», производимого «Serum Institute Of India»). При этом охват вакцинацией целевой когорты в целом по стране как в 2023 г. (12,07 %), так и в 2024 г. (15,09 %), оставался крайне низким для оказания влияния на заболеваемость (*Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия*

населения в Российской Федерации в 2024 году»).

Существует ряд исследований, доказывающих иммуногенность ротавирусных VLP (Virus-like particles, вирусоподобные частицы), полученных в различных системах экспрессии, в том числе в клетках насекомых (*Changotra, 2017*). Данная технология может быть использована для широкомасштабного производства VLP. Вакцины на основе VLP способны вызывать Т-клеточный, гуморальный, а также мукозальный иммунные ответы. При этом нормативная база для производства препаратов на основе VLP разработана недостаточно: ГФ РФ 15 не содержит ОФС, регламентирующих контроль качества лекарственных препаратов на основе VLP и препаратов, полученных в бакуловирусной системе экспрессии.

Объект исследования. *Объекты диссертационного исследования:* рекомбинантные бакуловирусы, содержащие оптимизированные клонированные последовательности генов, кодирующих белки VP2/VP6, а также VP4 и VP7 актуальных генотипов ротавируса А; трехслойные VLP на основе белков VP2, VP4, VP6 и VP7 ротавируса А, кандидатная VLP-вакцина с адъювантом на основе сквалена для профилактики ротавирусной инфекции.

Предмет исследования. *Предмет диссертационного исследования:* разработка методов получения и стандартизации рекомбинантных бакуловирусов, разработка методов получения, стандартизации и контроля качества VLP на основе белков ротавируса А, разработка методики определения остаточной ДНК клеток насекомых.

Цель исследования: стандартизация методов получения и контроля качества нового класса иммунобиологических лекарственных средств – VLP-вакцин, на примере VLP-вакцины против ротавируса А человека.

Задачи исследования:

1. Разработать методы получения рекомбинантных бакуловирусов, содержащих оптимизированные клонированные последовательности генов, кодирующих белки VP2/VP6, а также VP4 и VP7 актуальных генотипов ротавируса А.
2. Разработать методы контроля подлинности, стабильности и отсутствия посторонних агентов в рекомбинантных бакуловирусах, содержащих гены VP2, VP6, а также VP4 или VP7, наиболее актуальных для Российской Федерации генотипов ротавируса А.
3. Оптимизировать получение трехслойных VLP на основе белков VP2, VP4, VP6 и VP7 ротавируса А, методом ко-инфицирования рекомбинантными бакуловирусами культуры клеток насекомых
4. Разработать технологию очистки и методы контроля качества полученных VLP.
5. Разработать и валидировать метод определения остаточной ДНК клеток насекомых.

6. Определить состав кандидатной вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции и исследовать возможность использования полученных VLP в качестве антигена в кандидатной вакцине для профилактики ротавирусной инфекции.

Научная новизна. *Впервые* разработана технология получения и методы контроля оригинальных рекомбинантных бакуловирусов, содержащих оптимизированные клонированные последовательности генов, кодирующих белки VP2, VP6, VP4 и VP7 актуальных для России генотипов ротавируса А, охарактеризована их подлинность, стабильность и показано отсутствие посторонних агентов. *Впервые* получены трехслойные вирусоподобные частицы, имитирующие вирион ротавируса, содержащие белки нуклеокапсида VP2 и VP6, а также поверхностные белки VP4 и VP7, генотипов ротавируса G1, G2, G4, G9, P4, P8, исследованы их молекулярно-биологические особенности, разработаны методики контроля. Показана возможность использования разработанных VLP в качестве антигена в кандидатной вакцине для профилактики ротавирусной инфекции. *Впервые* разработана оригинальная специфичная и чувствительная тест-система на основе ПЦР в реальном времени для определения остаточной ДНК перевиваемой линии клеток насекомых *Trichoplusia ni*. Научная новизна исследования подтверждена патентами на изобретения № 2795055 С1, от 28.04.2023, приоритет от 28.12.2022 «Иммунобиологическое средство на основе вирусоподобных частиц для индукции специфического иммунитета против инфекции» и № 2829862 от 07.11.2024, приоритет от 07.04.2024 «Вакцина против ротавирусной инфекции человека на основе вирусоподобных частиц ротавируса».

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в разработке методов и подходов к производству и стандартизации лекарственных препаратов на основе VLP, может быть использована для конструирования современных эффективных отечественных иммунобиологических лекарственных препаратов, может быть включена в учебные пособия и программы курсов фармацевтической химии и вирусологии.

Практическая значимость обусловлена тем, что разработанная технология получения вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных белков, синтезированных в бакуловирусной системе экспрессии использована для получения эффективной рекомбинантной отечественной шестивалентной вакцины против ротавирусной инфекции.

Разработанные методы стандартизации и контроля качества нового класса иммунобиологических лекарственных средств включены в промышленные регламенты производства (ПР № 01894956-229-22 и № 01894956-231-22), а также в нормативную документация вакцины «Гам-VLP-рота» (Вакцина на основе вирусоподобных частиц для профилактики ротавирусной инфекции человека, вызванной ротавирусом типа А), находящейся на финальной стадии клинических исследований, проводимых по Государственному заданию № 124020200094-2 Минздрава России.

Разработанная тест-система для определения остаточной ДНК клеток насекомых на основе ПЦР в реальном времени может быть универсальным методом контроля качества биотехнологических препаратов, полученных с использованием суспензионной перевиваемой культуры клеток насекомых *Trichoplusia ni*.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования послужили биофармацевтические подходы, позволяющие получить и стандартизовать устойчивые трехслойные олигомерные белковые частицы, содержащие поверхностные антигены, с оптимальной пространственной презентацией, а также разработать методы контроля качества. Методы контроля качества рекомбинантных бакуловирусов включали: подлинность и генетическую стабильность, определяемые методом ПЦР с электрофоретической детекцией и последующим секвенированием, ПЦР-РВ, испытания на культурах клеток. Методы контроля качества вирусоподобных частиц включали: определение концентрации общего белка колориметрическим методом с бицинхониновой кислотой, определение специфической активности методом ИФА, подлинность методом электрофореза с последующим иммуноблоттингом, исследование морфологии частиц с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, определение размера частиц методом динамического светорассеяния, определение остаточной ДНК клеток насекомых методом ПЦР-РВ. Методы контроля качества были выбраны в соответствии с ОФС.1.7.1.0007 ГФ РФ 15 «Лекарственные средства, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК», валидации аналитических методик проведены в соответствии с ОФС.1.1.0012 ГФ РФ 15 «Валидация аналитических методик».

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны методы получения и контроля качества главных и рабочих банков рекомбинантных бакуловирусов, содержащих клонированные последовательностями генов, кодирующих белки VP2, VP6, VP4 и VP7, актуальных для России генотипов ротавируса А: G1, G2, G4, G9, P4, P8.

2. Проведена оптимизация процесса ко-инфицирования клеток насекомых рекомбинантными бакуловирусами, которая позволила получить устойчивые трехслойные вирусоподобные частицы, содержащие белки ротавируса А актуальных генотипов. Разработанная технология очистки VLP позволила получить гомогенные препараты, имитирующие вирионы ротавируса А.

3. Разработаны методы контроля качества вирусоподобных частиц ротавируса А человека по показателям «Подлинность», «Концентрация общего белка», «Наличие ДНК клеточной культуры». Для контроля качества по показателю «Наличие ДНК клеточной культуры» разработана тест-система на основе ПЦР-РВ.

4. Смесь полученных VLP, содержащих поверхностные антигены, специфичные различным генотипам ротавируса, использована в качестве антигена в оригинальном экспериментальном иммунобиологическом лекарственном препарате против ротавирусной инфекции.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия в пунктах:

1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.
2. Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств.
3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность проведенного исследования обусловлена выбором адекватных методов исследования, использованием современного оборудования, всесторонним анализом полученных данных, практическим применением полученных результатов при создании методов контроля промежуточных полупродуктов и готового иммунобиологического лекарственного препарата - экспериментальной вакцины против ротавируса А человека «Гам-VLP-рота».

Апробация результатов диссертационной работы. Апробация работы была проведена на расширенном заседании лаборатории молекулярной диагностики в составе Испытательного Центра совместно с производителем лекарственных средств «Медгамал» филиалом ФГБУ «НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол №12 от 16.10.2025).

Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены конференциях: «International Conference "Perspective technologies in vaccination and immunotherapy"; Satellite Symposium "Viral infections and cancer, openings for vaccines», Москва, 27–29 октября 2020 года, Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики инфекционных и неинфекционных болезней: эпидемиологические, организационные и гигиенические аспекты», Москва, 16-18 ноября 2022 года, на XXI Конгрессе детских инфекционистов России. «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики. Детские инфекции», Москва, 15-16 декабря 2022, на Первом Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии, Москва, 2-3 марта 2023 г., на VII

съезде биофизиков России, Краснодар, 17-23 апреля 2023, а также на заседаниях ученого совета ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России.

Личный вклад автора. Диссертационная работа оформлена автором самостоятельно. Автор непосредственно участвовал в анализе филогенетических данных, самостоятельно получил рекомбинантные бакуловирусы, содержащие гены ротавируса А, участвовал в разработке технологии очистки VLP ротавируса А, анализировал результаты опытов на животных. При участии автора были собраны филогенетические данные, разработаны методы контроля главных и рабочих банков рекомбинантных бакуловирусов, оптимизирован процесс культивирования и ко-инфицирования клеток насекомых, разработаны методы контроля качества вирусоподобных частиц, проведена их валидация, наработан препарат для исследования иммуногенности и проведены исследования по подбору формуляции и оптимального способа введения. Соискатель в 5 научных работах является первым автором.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка используемой литературы, включающего 158 источников. Диссертация содержит 17 таблиц и 51 рисунок.

Публикации. По теме диссертации соискатель имеет 8 научных работ, из них 6 статей, опубликованных в научных изданиях, индексируемых в международных базах цитирования Scopus и CAS, 2 патента.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Глава 1 посвящена *обзору литературы* по теме диссертационного исследования. Приведены данные о возбудителе ротавирусной инфекции – ротавирусе А человека, его молекулярно-биологических характеристиках, организации генома, структуре капсида, особенностях цикла репликации и патогенеза инфекции. Представлен обзор существующих и перспективных вакцин против ротавирусной инфекции. Обобщены данные о преимуществах нового класса вакцин на основе вирусоподобных частиц, описаны подходы к их разработке и стандартизации, а также адъюванты, используемые при производстве VLP-вакцин. Описаны методы контроля качества вакцин на основе вирусоподобных частиц. Обсуждается актуальность разработки новой VLP-вакцины против ротавирусной инфекции.

В **Главе 2** диссертационной работы описаны материалы и методы, использованные в исследованиях:

Получение рекомбинантных бакуловирусов. Рекомбинантные бакуловирусы получены с помощью системы экспрессии Bac-to-Bac (Invitrogen) по методике производителя с использованием компетентных клеток DH10Bac. Трансфекцию перевиваемой линии клеток

Spodoptera frugiperda Sf-21 осуществляли очищенными препаратами бакмидной ДНК с применением катионного липосомного агента Cellfectin (Invitrogen).

Методы контроля главных и рабочих банков рекомбинантных бакуловирусов. Подтверждение подлинности бакуловирусов выполняли методом ПЦР (ОФС.1.7.2.0013.15 ГФ РФ 15) с детекцией целевых фрагментов с помощью электрофореза в 2% агарозном геле и последующим секвенированием. Испытание на наличие контаминации проводили методом ПЦР-РВ с использованием для контроля спироплазмы набора «Microsart AMP Mycoplasma» (Sartorius) согласно ОФС.1.7.2.0031.15 ГФ РФ 15, для контроля контаминацию вирусом Зика - «АмплиСенс® Zika virus-FL», вирусом Денге - «АмплиСенс® Dengue virus-FL», вирусом Западного Нила - «АмплиСенс® WNV-FL»). Испытания на наличие посторонних агентов проводили на клеточных культурах: Vero-B, СПЭВ, Sf-9 согласно ОФС.1.7.2.0006.15 ГФ РФ 15. Инфекционную активность бакуловирусов определяли методом титрования в монослойной культуре Sf-21. Проводили учет результатов титрования подсчетом бляшек, титр вируса выражали в БОЕ/мл.

Культивирование клеток насекомых и ко-инфицирование. Для получения VLP использовали роллерное культивирование культуры клеток High Five в питательной среде Insect SFM 01 (Tofflon). Ко-инфицирование проводили, добавляя к культуре клеток набор из 2 вирусных банков рекомбинантных бакуловирусов. После продолжали роллерное культивирование в течение 7 дней при температуре 27°C.

Очистка вирусоподобных частиц. Культуральную жидкость, содержащую VLP, подвергали низкоскоростному центрифугированию при 1000 об/мин 10 мин и затем при 6000 об/мин 20 мин. Осветлённые суспензии, содержащие вирусоподобные частицы, наслаивали на 6 мл 35% (w/v) сахарозы, приготовленной на буфере TNC (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂; pH 7,4), затем центрифугировали в течение 2 ч при 28 000 об/мин (4°C; центрифуга Optima XE-100, ротор SW 32Ti, «Beckman Coulter»). Полученные осадки ресуспендировали в буфере TNC. Также для очистки использовали проточное центрифугирование (центрифуга Optima XE-100, ротор CF-32, Beckman Coulter). Концентрат VLP стерилизовали фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Методы контроля качества вирусоподобных частиц. Концентрацию общего белка определяли колориметрическим методом с бичинхониновой кислотой с помощью набора «BCA Protein Assay Kit» (Pierce) по ОФС.1.2.3.0012.15 ГФ РФ 15. Специфическую активность очищенных VLP оценивали методом ИФА с использованием антител специфичных к белку VP6 PVA (ОФС.1.7.2.0033.15 ГФ РФ 15). Анализ структурных белков PVA проводили методом электрофореза в 12% ПААГ с последующим иммуноблоттингом (ОФС.1.7.2.0022.15 ГФ РФ 15). Исследование морфологии частиц производили на просвечивающем электронном микроскопе

JEOL 2100, оборудованном катодом из гексаборита лантана, при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением $\times 25000$ с помощью ПЗС-камеры Gatan X100 с размером матрицы 2000×2000 пикселей. Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния на установке Malvern Zeta Sizer NANO. Определение остаточной ДНК клеток насекомых проводили методом ПЦР-РВ (ОФС.1.7.2.0013.15 ГФ 15).

Исследования иммуногенности на животных моделях. Для исследования использовали самок мышей линии Balb/c 3-4 недельного возраста массой 16-18 г. и новорожденных карликовых свиней. Для определения антител к белку VP6 в сыворотке крови лабораторных животных использовали метод непрямого ИФА (Филатов, 2023). Наличие вируснейтрализующих антител определяли в реакции нейтрализации *in vitro* с использованием клеточной линии MARC-145, чувствительной к РВА. Нейтрализующим титром сыворотки считали то ее наибольшее разведение, которое предупреждает образование ЦПД в культуре клеток. Пролиферацию моноцитов после стимуляции специфическим антигеном оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов, результаты выражали в виде индекса стимуляции пролиферации - отношения среднего количества бластов в присутствии стимуляторов к среднему количеству бластов в контроле, положительным считали результат более 2.

Статистический анализ и метрологическое обеспечение. Статистический анализ проводили с помощью программы STATISTICA 12.6 (StatSoft Inc., США). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Статистически значимым считалось значение $p < 0,05$. Валидации аналитических методик проводили согласно ОФС.1.1.0012 ГФ РФ 15.

Глава 3 диссертационной работы посвящена *результатам исследования и их обсуждению*.

Разработка методов получения рекомбинантных бакуловирусов, содержащих оптимизированные клонированные последовательности генов, кодирующих белки VP2/VP6, а также VP4 и VP7 актуальных генотипов ротавируса А

Изучение генетического разнообразия ротавирусов группы А, циркулировавших на территории г. Москвы в течение двух эпидемиологических сезонов 2018-2019 и 2019-2020 гг. было проведено для выявления актуальных генотипов ротавируса А. Исходя из полученных и литературных данных по циркуляции различных генотипов ротавируса А (РВА) человека на территории России, для включения в состав вакцины были выбраны гены следующих поверхностных белков ротавируса типа А: 2 варианта VP4: P[4], P[8] и 4 варианта VP7: G1, G2, G4 и G9. Также для сборки VLP необходимы белки VP2 и VP6 ротавируса А.

Последовательности генов белков VP4 и VP7, оптимизированные для наработки в клетках насекомых, были синтезированы и клонированы в трансферный вектор pFastBacHTA. Каждая последовательность была клонирована в отдельный трансферный вектор. Последовательности

генов белков VP2 и VP6, оптимизированные для наработки в клетках насекомых, были клонированы в трансферный вектор pFastBacDual, несущий оба целевых гена под разными промоторами. Транспозиция целевого гена из трансферных плазмид в бакуловирусный вектор (бакмиду) происходила в компетентных клетках *E. coli* штамма DH10Bac, содержащих бакуловирусную ДНК с сайтом транспозиции mini-attTn7 и плазмиду-хелпер, кодирующую фермент транспозазу. Отбор рекомбинантных клонов DH10Bac осуществлялся методом белой-голубой селекции, в выбранные колонии белого цвета перенос экспрессионной кассеты в бакуловирусный генотип подтверждался методом ПЦР. Выделенные рекомбинантные бакмиды смешивали с липосомным агентом Cellfectin для трансфекции клеток насекомых Sf-9. Попавшая в клетку бакмида инфекционна и запускает размножение рекомбинантного бакуловируса в клетке.

Разработка методов контроля подлинности, стабильности и отсутствия посторонних агентов в рекомбинантных бакуловирусах, содержащие гены VP2, VP6, а также VP4 или VP7, наиболее актуальных для Российской Федерации генотипов ротавируса А.

Были получены главные и рабочие банки для 7 рекомбинантных бакуловирусов, содержащие следующие гены: 1) VP2+VP6, 2) VP7 (G1), 3) VP7 (G2), 4) VP7 (G4), 5) VP7 (G9), 6) VP4 (P8), 7) VP4 (P8). Для каждого рекомбинантного бакуловируса была разработана спецификация для аттестации главных и рабочих банков по следующим показателям: подлинность и генетическая стабильность, вирусная безопасность (контаминация вирусами Зика, Денге 1-4 типов, Западного Нила), испытание на наличие спироплазмы (ОФС.1.7.2.0031.15 ГФ РФ 15), испытание на присутствие посторонних агентов на культурах клеток (ОФС.1.7.2.0006.15 ГФ РФ 15) и инфекционную активность методом бляшкообразования.

Методом ПЦР было доказано наличие вставки целевого гена (подлинность) в полученных рекомбинантных бакуловирусах (рисунок 1). Было показано отсутствие посторонних агентов, посторонних вирусов и спироплазмы и высокая инфекционная активность (таблица 1), позволяющая использовать полученные рекомбинантные бакуловирусы для инфицирования клеток насекомых и экспрессии в них белков ротавируса А человека. Генетическая стабильность полученных бакуловирусов была показана с 1 по 6 пассаж методом ПЦР фрагмента целевого гена с последующим электрофорезом и секвенированием.

Таким образом, было доказано наличие вставки целевого гена (подлинность) в полученных рекомбинантных бакуловирусах, было показано отсутствие посторонних вирусов и спироплазмы в банках рекомбинантных вирусов и высокая инфекционная активность, позволяющая использовать полученные рекомбинантные бакуловирусы для инфицирования клеток насекомых и экспрессии в них белков ротавируса А человека.

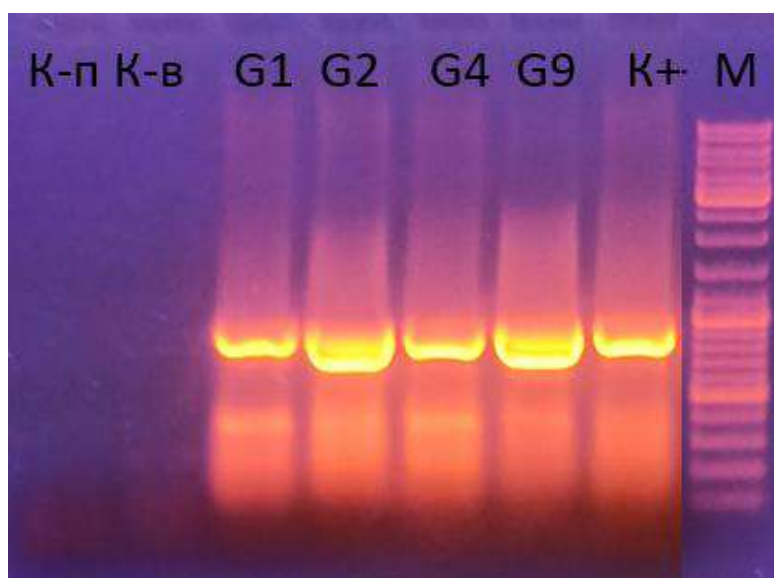


Рисунок 1. Подтверждение подлинности рекомбинантных бакуловирусов, содержащих клонированные последовательности гена, кодирующего белок VP7 методом ПЦР. (К-п) - отрицательный контроль; (К-в) – отрицательный контроль выделения; (G1), (G2), (G4), (G9) - тестируемые образцы бакуловирусов VP7(G1), (G2), (G4), (G9) соответственно, (K+) – положительный контроль, М - Маркер молекулярных масс.

Источник: Составлено автором

Таблица 1. Инфекционная активность рекомбинантных бакуловирусов.

Рекомбинантный бакуловир	Пассаж	Инфекционная активность на культуре Sf9, БОЕ/мл			
		Измерения			Среднее и доверительный интервал
VP2/VP6	4	$1,24 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6$	$(1,40 \pm 0,35) \times 10^6$
VP7 (G1)	4	$2,46 \times 10^5$	$2,86 \times 10^5$	$2,81 \times 10^5$	$(2,71 \pm 0,54) \times 10^5$
VP7 (G2)	4	$1,12 \times 10^5$	$1,28 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$	$(1,14 \pm 0,33) \times 10^5$
VP7 (G4)	4	$0,98 \times 10^6$	$1,05 \times 10^6$	$1,18 \times 10^6$	$(1,07 \pm 0,25) \times 10^6$
VP7 (G9)	4	$2,05 \times 10^5$	$2,43 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$	$(2,10 \pm 0,77) \times 10^5$
VP4 (P4)	4	$1,90 \times 10^5$	$1,78 \times 10^5$	$1,72 \times 10^5$	$(1,80 \pm 0,23) \times 10^5$
VP4 (P8)	4	$2,17 \times 10^5$	$2,82 \times 10^5$	$2,42 \times 10^5$	$(2,47 \pm 0,81) \times 10^5$

Оптимизация получения трехслойных VLP на основе белков VP2, VP6, VP4 и VP7 ротавируса А, методом ко-инфицирования рекомбинантными бакуловирусами культуры клеток насекомых

При оптимизации условий получения VLP был использован 2 пассаж рекомбинантных бакуловирусов, которыми заражали перевиваемую культуру клеток насекомых *Trihoplusia ni*

(High Five). Оценка накопления целевых продуктов проводилась при помощи электрофореза в ПААГ, а также ИФА. В результате были выявлены эффективные клоны для каждой конструкции, оптимальные соотношения бакуловирусов, экспрессирующих разные белки ротавируса при ко-инфицировании и изучена кинетика накопления VLP в культуральной жидкости. Оптимальный срок культивирования для всех вариантов составлял 7 дней.

Разработка технологии очистки и методы контроля полученных VLP.

Для очистки VLP использовали центрифугирование в растворе сахарозы на двух роторах: бакетном SW-32Ti и проточном CF-32. Были получены как двухслойные, так и трехслойные VLP РВА: из 2 белков VP2/VP6, из 3 белков VP2/VP6+разные генотипы VP4 или VP7 и из всех 4 белков. После очистки полученных частиц с помощью ультрацентрифугирования, методом электронной микроскопии показано, что во всех исследованных вариантах формируются VLP, соответствующие по морфологии и размеру вирусной частице ротавируса А (рисунок 2).

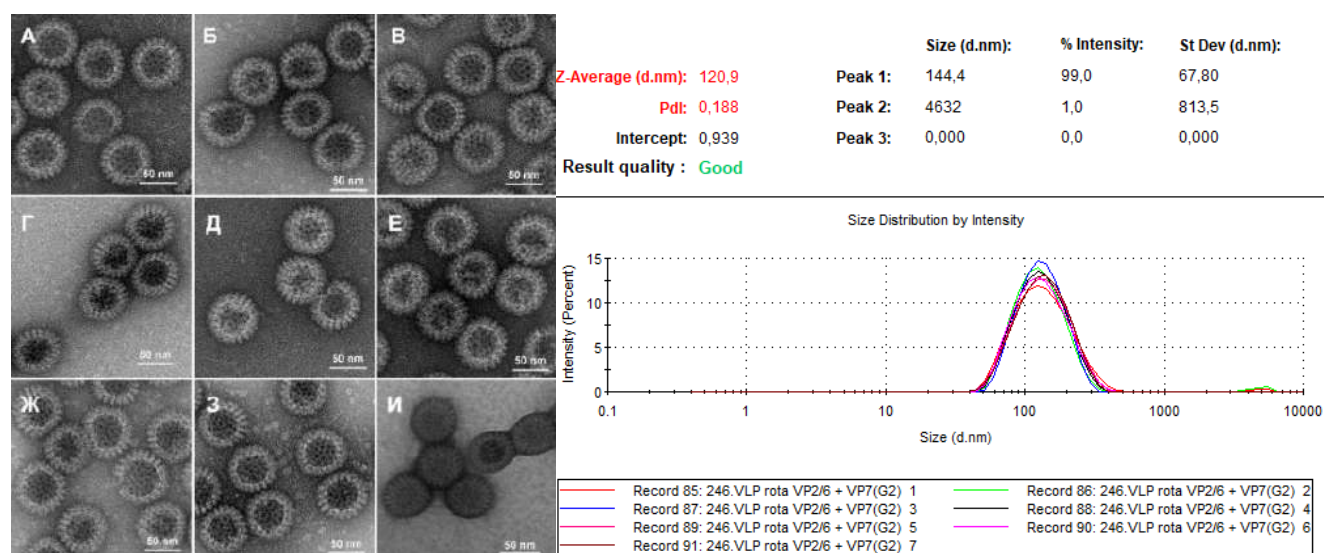


Рисунок 2. Слева: вирусоподобные (А–З) и вирусные частицы ротавируса А (указаны бакуловирусы, которыми были ко-инфицированы клетки *T. ni*. А – VP2/VP6; Б – V2/VP6+VP4(P8); В – VP2/VP6+VP4(P8); Г – VP2/VP6+VP7(G1); Д – VP2/VP6+VP7(G2); Е – VP2/VP6+VP7(G4); Ж – VP2/VP6+VP7(G9); З – VP2/VP6+VP4(P8)+VP7(G1); И – ротавирус А. Электронные микрофотографии, увеличение 25000х. Справа: Определение размера вирусоподобных частиц ротавируса А VP2/VP6+VP7(G2) методом динамического светорассеяния.

Источник: Составлено автором

Был выбран вариант с использованием VLP из 3 белков, поскольку в этом случае проще оптимизировать стадию ко-инфицирования и контролировать правильность сборки частиц. При такой технологии вирусоподобные структуры, содержащие белки внешнего слоя 6 различных генотипов, производятся независимо, и очищенные субстанции затем объединяются в финальную композицию в равном соотношении.

Содержание VLP в полученных после очистки субстанциях было оценено по общей концентрации белка. Была разработана и валидирована методика определения общего белка в субстанциях колориметрическим методом с бичинхониновой кислотой согласно ОФС.1.2.3.0012.15 ГФ РФ 15. Методом динамического светорассеяния была подтверждена однородность частиц в полученных препаратах VLP, содержащих поверхностные белки всех исследованных генотипов (пример для VP2/VP6+VP7(G1) на рисунке 2). Метод динамического светорассеяния был выбран для подтверждения подлинности VLP. Белковый состав полученных VLP подтверждали методами ИФА и электрофореза в ПААГ с последующим иммуноблоттингом. Блот окрашивали антителами к полигистидиновой метке (детекция VP4, VP6, VP7) и антителами к eGFP (детекция VP2). Молекулярные массы белков соответствовали литературным данным (Jere K.C., 2014).

Разработка и валидация метода определения остаточной ДНК клеток насекомых

В связи с использованием клеток насекомых в производственных целях необходимо осуществлять контроль остаточной ДНК клеток-продуцентов в конечном продукте. Для этого была создана, апробирована и валидирована тест-система для определения остаточной ДНК клеток High-Five методом РВ-ПЦР. В качестве мишени для подбора праймеров и зонда была выбрана последовательность митохондриальной ДНК *Trichoplusia ni*, ген COX1, размером 997 п.н. Были подобраны следующие праймеры и проба: AATACCTATTATAATTGGAGGATT - ф, GGCAATATTAGATGAAAGAGGG - р, CAGGAAGTGGTTGAACAGTTTACCCC-Fam-BHQ - зонд. Был определен диапазон рабочих температур и получена калибровочная прямая для измерения количества остаточной ДНК в образцах. Чувствительность метода составила 4 пг/мл (рисунок 3).

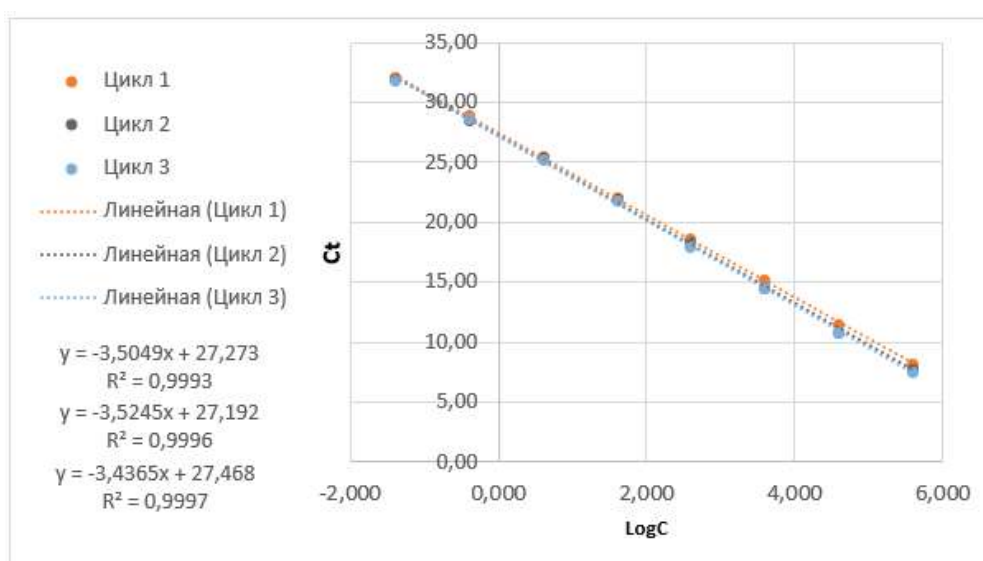


Рисунок 3. Калибровочная прямая для определения остаточной ДНК и определение чувствительности метода.

Источник: Составлено автором

Разработанная тест система была валидирована по показателям линейность, аналитическая область, предел количественного определения, правильность, повторяемость, промежуточная прецизионность. Коэффициент вариации внутри одного цикла не превышает 10 % (среднее значение по результатам измерения 3 образцов в 3 циклах – 4,5 %). Коэффициент вариации между циклами не превышает 15 % (среднее значение по результатам измерения 3 образцов – 11,8 %).

Результаты определения правильности методики представлены в таблице 2.

Таблица 2. Метрологические характеристики метода определения остаточной ДНК клеток насекомых при определении показателя правильности.

C, пг/мл	n	f	$\bar{X}_{cp.}$	S^2	S	$S_{cp.}$	P, %	t (P, f)	Δx	$\Delta x_{cp.}$	$\varepsilon_{cp.}$ %	RSD, %
100	9	8	104,2	119,3	10,9	3,6	95	2,31	25,2	8,4	8,1	10,5

Результаты валидационных испытаний методики определения остаточной ДНК культуры клеток *Trichoplusia ni* методом ПЦР в реальном времени удовлетворяет установленным требованиям и является пригодным для контроля качества по показателю «Наличие ДНК клеточной культуры».

Содержания остаточной ДНК клеток продуцентов по рекомендациям ВОЗ не должно превышать 10 нг на дозу. Измеренные значения остаточной ДНК клеток насекомых в очищенных VLP не превышали 0,3 нг/доза.

Определение состава кандидатной вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции и исследование возможности использования полученных VLP в качестве антигена в кандидатной вакцине для профилактики ротавирусной инфекции.

Исследования способа введения, дозы антигена в составе прототипной вакцины, а также доказательства эффективности использования адъюванта проводили на модели лабораторных животных: мышах линии Balb/c и новорожденных карликовых свиньях. В качестве антигена использовали суспензию очищенных VLP, содержащую равные количества 6 полученных частиц с разными генотипами поверхностных белков РВА. В качестве адъюванта использовали коммерческий адъювант SEPPIC® на основе эмульгированного сквалена в смеси с поверхностно-активными веществами. Суспензию VLP смешивали с адъювантом в соотношении 1:1.

Для определения эффективности использования адъюванта были сформированы 3 группы мышей линии Balb/c (самки, возраст 3-4 недели, масса 16-18 грамм). Каждую группу из 10 животных иммунизировали внутримышечно, трижды с интервалом в 10 дней. Группа № 1 была иммунизирована смесью VLP РВА (30 мкг/доза) с адъювантом (1:1), группа № 2 была иммунизирована смесью VLP РВА (30 мкг/доза) без адъюванта, группа № 3 (контроль) получала фосфатно-солевой буфер. Все иммунизации проводили в объёме 0,2 мл/мышь. Сыворотки для

определения титра антител к белку VP6 методом непрямого ИФА (Филатов, 2024) отбирали через 7 дней после второй и после третьей иммунизации. Исследование показало, что VLP в сочетании с адъювантом и без вызывают образование специфических IgG, а наибольший уровень антител наблюдается при введении с адъювантом после третьей иммунизации (рисунок 4А).

Сыворотки мышей после третьей иммунизации VLP в сочетании с адъювантом были исследованы в реакции нейтрализации с ротавирусами трех различных генотипов для определения способности смеси VLP стимулировать иммунитет к большинству представленных в России генотипам. Нейтрализующие антитела были выявлены ко всем трем исследованным генотипам: G1P[8], G3P[8] и G9P[4]. Средние геометрические значения титров составил 1/182, 1/242 и 1/226 соответственно (рисунок 4Б). В сыворотках животных контрольной группы нейтрализующие антитела ни к одному из исследованных генотипов ротавируса не были выявлены.

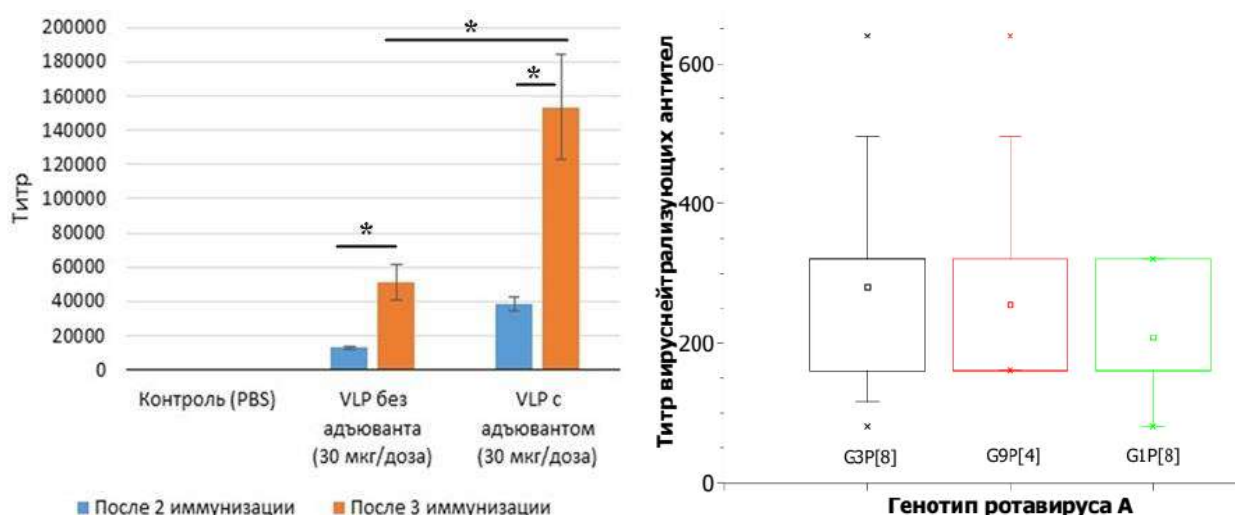


Рисунок 4. А. Обнаружение специфических IgG к белку VP6 при введении с адъювантом и без адъюванта методом ИФА. Б. Титр вируснейтрализующих антител к разным генотипам ротавируса в реакции нейтрализации в сыворотках мышей после 3 иммунизации

Источник: Составлено автором

Для подбора иммунизирующей дозы кандидатной вакцины на модели новорожденных карликовых свиней выбрали внутримышечный и интраназальный способ введения вакцины, как наиболее перспективные в клинической практике. Смесь VLP вводили с адъювантом SEPPIC® на основе эмульгированного сквалена, который показал свою эффективность на модели мышей. Тестировали 3 дозы: 30, 150 и 750 мкг/мл. Введение осуществляли трехкратно. На 0, 14, 28 и 42 дни исследования у животных определяли уровень специфических антител методом ИФА, результаты на 28 и 42 дни представлены на рисунке 5А. Определение уровня нейтрализующих антител в реакции нейтрализации против штамма G1P[8] проводили на 28 и 42 день

исследования. Результаты представлены на рисунке 5Б. Через 10 дней после первой иммунизации у всех животных отбирали периферическую кровь для оценки уровня Т-клеточного иммунитета.

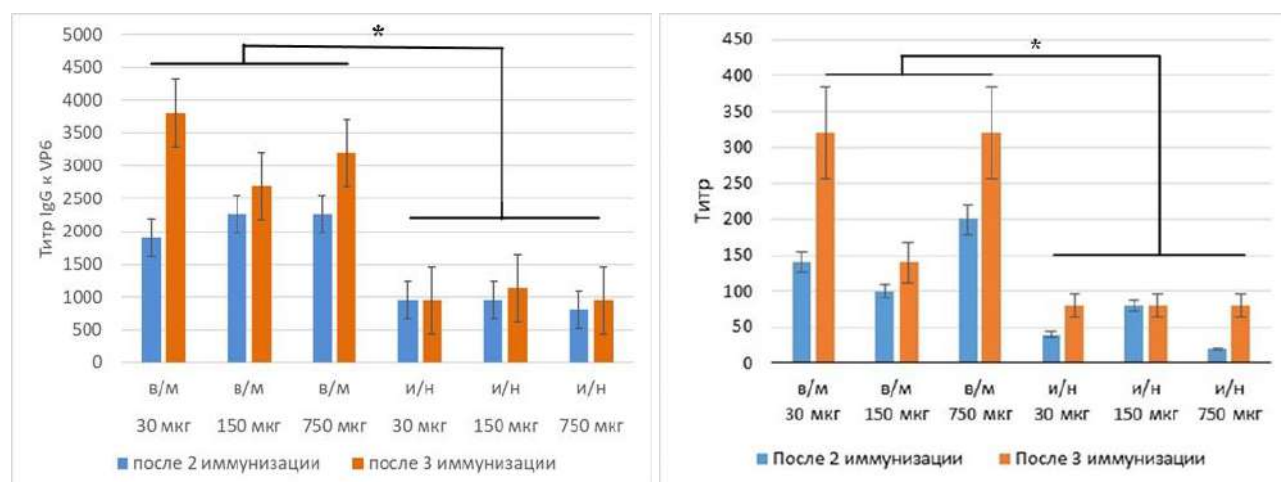


Рисунок 5. А. Выявление специфических IgG к белку VP6 РВА методом непрямого ИФА в сыворотках крови поросят после 2 и 3 иммунизации. **Б.** Титр вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации сывороток поросят после 2 и 3 иммунизации.

Источник: Составлено автором

Иммунизация увеличивала индекс стимуляции пролиферации в реакции бласттрансформации лимфоцитов, что свидетельствует о формировании Т-клеточного иммунитета. Было показано, что уже после второй иммунизации животных прототипной вакциной на основе VLP внутримышечно уровень специфических антител возрастает и увеличивается после трехкратной иммунизации. Иммунизация животных прототипной вакциной на основе VLP интраназально вызывала более слабый иммунный ответ по сравнению с внутримышечным введением. Образование вируснейтрализующих антител наблюдается после второй иммунизации прототипной вакциной на основе VLP во всех исследуемых дозах. Более эффективный способ иммунизации –внутримышечный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были получены и стандартизированы рекомбинантные бакуловирусы, содержащие оптимизированные для экспрессии в клетках насекомых последовательности генов ротавируса А: 4 наиболее представленных генотипа VP7 (G1, G2, G4, G9) и 2 генотипа VP4 (P4, P8), а также VP2 и VP6, обеспечивающие необходимые антигенные детерминанты и сборку вирусоподобных частиц. Были разработаны методы контроля для 7 главных и 7 рабочих банков полученных рекомбинантных бакуловирусов.

Было оптимизировано получение трехслойных вирусоподобных частиц, методом ко-инфицирования клеток насекомых 2 рекомбинантными бакуловирусами. Была разработана технология очистки полученных вирусоподобных частиц с помощью ультрацентрифугирования в сахарозе. Разработаны и валидированы методы контроля качества трехслойных

вирусоподобных частиц. Соответствие морфологии и размера частиц вирионам ротавируса было подтверждено методами электронной микроскопии и динамического светорассеяния, а наличие всех экспрессированных белков ротавируса методами ИФА и иммуноблоттинга. Для контроля содержания остаточной ДНК клеток *Trichoplusia ni* в образцах VLP разработана тест-система на основе ПЦР с чувствительность 4 пг/мл.

Исследования по оптимизации состава кандидатной вакцины и выбору способа введения на модели мышей и новорожденных карликовых свиней показали, что наибольший уровень антител наблюдался при внутримышечном способе введения VLP в смеси с адьювантом на основе сквалена в соотношении 1:1. При внутримышечном и интраназальном способах введения в дозах 30, 150 и 750 мкг с адьювантом выявляются специфические IgG к белку VP6 РВА и вируснейтрализующие антитела, что свидетельствует об иммуногенности прототипной вакцины на основе VLP.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и стандартизованы методы получения рекомбинантных бакуловирусов, содержащих оптимизированные клонированные последовательности генов, кодирующих белки VP2, VP6, а также 4 генотипов VP7 (G1, G2, G4, G9) и 2 генотипов VP4 (P4, P8), ротавируса А, выбранные на основе филогенетических исследований, которые имеют инфекционную активность $1,14 \times 10^5 - 1,4 \times 10^6$ БОЕ/мл и могут быть использованы для получения вирусоподобных частиц ротавируса А в клетках насекомых.

2. Разработаны методы контроля отсутствия посторонних агентов в рекомбинантных бакуловирусах, содержащих гены VP2, VP6, а также VP4 или VP7, наиболее актуальных для Российской Федерации генотипов ротавируса А, с помощью ПЦР, а также метод контроля подлинности и стабильности рекомбинантных бакуловирусов с помощью ПЦР с последующим электрофорезом и секвенированием. Генетическая стабильность рекомбинантных бакуловирусов показана в течение как минимум 6 пассажей.

3. Ко-инфицирование клеток насекомых рекомбинантными бакуловирусами с последующей очисткой методом ультрацентрифугирования позволяет получить однородные трехслойные вирусоподобные частицы, содержащие белки VP2, VP6, а также VP4 или VP7 ротавируса А актуальных генотипов, размером, определенным методом лазерной дифракции, от 120 нм до 190 нм и полностью соответствующие по морфологии вириону ротавируса А.

4. Показано, что разработанная тест-система для определения остаточной ДНК клеток насекомых на основе ПЦР в реальном времени позволяет с высокой специфичностью определять количество остаточной ДНК суспензионной культуры клеток насекомых *Trichoplusia ni* в образцах вирусоподобных частиц с чувствительностью 4 пг/мл, коэффициентом вариации при определении повторяемости 4,5%, а при определении промежуточной прецизионности 11,8 %.

5. Оптимизирован состав кандидатной вакцины, показано, что при трехкратной иммунизации мышей линии BALB/c более высокий титр специфических IgG антител к ротавирусу после третьей иммунизации наблюдается при введении смеси VLP с адьювантом на основе эмульгированного сквалена, чем без адьюванта (1/153 600 и 1/51 200 соответственно).

6. Вирусоподобные частицы ротавируса А с поверхностными белками, соответствующими актуальным циркулирующим патогенам, в дозе 30 мкг в сочетании с адьювантом на основе сквалена после двух и трехкратной иммунизации стимулирует у новорожденных карликовых свиней образование специфических IgG к ротавирусу А (среднегеометрические значения титров 1/1903 и 1/3805 соответственно), вирус-нейтрализующих антител (среднегеометрические значения титров 1/135 и 1/320 соответственно) и увеличивает индекс стимуляции пролиферации в реакции бласттрансформации лимфоцитов, т.е. стимулирует клеточный иммунитет, что дает возможность использования смеси полученных VLP в качестве антигена в кандидатной вакцине для профилактики ротавирусной инфекции.

Список сокращений и условных обозначений

IgG — Иммуноглобулин G	и/н — интраназальный
MARC-145 — клеточная линия почки эмбриона макаки резус	ИФА — иммуноферментный анализ
PBS — фосфатный буферный раствор	ОФС — общая фармакопейная статья
VERO — клеточная линия почки африканской зеленой мартышки	ПААГ — полиакриламидный гель
VLP — Virus-like particles / вирусоподобные частицы	п.н. — пар нуклеотидов
БОЕ — бляшкообразующая единица	ПААГ — полиакриламидный гель
в/м — внутримышечный	ПЦР — полимеразная цепная реакция
ВОЗ — Всемирная ассоциация здравоохранения	ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени
ГФ РФ — Государственная Фармакопея Российской Федерации	РВА — ротавирус человека А
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота	РНК — рибонуклеиновая кислота
ИЛП — иммунобиологические лекарственные препараты	СПЭВ — клеточная линия почки эмбриона свиньи

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Международные базы цитирования:

1. **Черепушкин С. А.** Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) человека / **С. А. Черепушкин**, В. В. Цибезов, А. Г. Южаков, О. Е. Латышев, К. П. Алексеев, Э. Г. Алтаева, К. М. Хаметова, Г. К. Воркунова, К. А. Южакова, Т. В. Гребенникова // Вопросы вирусологии. — 2021. — Т. 66. — N. 1. — С. 55–64. DOI:10.36233/0507-4088-27
2. Yuzhakov A. Prevalence and Genetic Diversity of Group A Rotavirus Genotypes in Moscow (2019–2020) / A. Yuzhakov, K. Yuzhakova, N. Kulikova, L. Kisteneva, **S. Cherepushkin**, S. Smetanina, M. Bazarova, A. Syroeshkin, T. Grebennikova // Pathogens. — 2021. — V. 10. — N. 6. — P. 674. DOI: 10.3390/pathogens10060674
3. Филатов И. Е. Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА / И. Е. Филатов, В. В. Цибезов, М. В. Баландина, С. Н. Норкина, О. Е. Латышев, О. В. Елисеева, **С. А. Черепушкин**, О. А. Верховский, Т. В. Гребенникова // Вопросы вирусологии. — 2023. — Т. 68. — N. 2. — С. 161–171. DOI: 10.36233/0507-4088-169
4. Syroeshkin, A.V. Radiothermal Emission of Nanoparticles with a Complex Shape as a Tool for the Quality Control of Pharmaceuticals Containing Biologically Active Nanoparticles / A.V. Syroeshkin, G.V. Petrov, V.V. Taranov, T.V. Pleteneva, A.M. Koldina, I. A. Gaydashev, E. S. Kolyabina, D. A. Galkina, E. V. Sorokina, E. V. Uspenskaya, I. V. Kazimova, M. A. Morozova, V. V. Lebedeva, **S. A. Cherepushkin**, I. V. Tarabrina, S. A. Syroeshkin, A. V. Tertyshnikov, T. V. Grebennikova // Pharmaceuticals. — 2023. — V. 15. — N. 3. — P. 966. DOI:10.3390/pharmaceutics15030966
5. Костина Л. В. Исследование безопасности и иммуногенности вакцины на основе VLP для профилактики ротавирусной инфекции на модели новорожденных карликовых свиней / Л. В. Костина, И. Е. Филатов, О. В. Елисеева, О. Е. Латышев, Я. Ю. Чернорыж, К. И. Юрлов, Е. И. Леснова, К. М. Хаметова, **С. А. Черепушкин**, Т. А. Савочкина, В. В. Цибезов, К. Л. Крышень, Л. И. Алексеева, Т. В. Гребенникова // Вопросы вирусологии. — 2023. — Т. 68. — N. 5. — С. 415–428. DOI:10.36233/0507-4088-194
6. Филатов И. Е. Определение специфической активности ротавирусной вакцины на основе вирусоподобных частиц с использованием иммуноферментного анализа: разработка и валидация методики / И. Е. Филатов, М. М. Силаенкова, В. В. Цибезов, М. В. Баландина, С. Н. Норкина, О. Е. Латышев, О. В. Елисеева, **С. А. Черепушкин**, Т. В. Гребенникова // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2024. — Т. 24. — N. 4. — С. 435–448. DOI:10.30895/2221-996X-2024-24-4-389-402

Патенты:

7. Гребенникова, Т. В. Иммунобиологическое средство на основе вирусоподобных частиц для индукции специфического иммунитета против инфекции, вызываемой ротавирусом А человека : патент № 2795055 Рос. Федерация : МПК А61К 39/12 (2006.01), А61Р 31/12 (2006.01) / Т. В. Гребенникова, О. В. Елисеева, О. Е. Латышев, **С. А. Черепушкин**, Т. Е. Савочкина, В. В. Цибезов, В. В. Лебедева, В. Ф. Ларичев, М. И. Мусиенко, К. М. Хаметова, К. А. Южакова, Н. Ю. Куликова, Г. К. Воркунова, В. М. Кондратьева, Я. Ю. Чернорыж, Е. И. Леснова, С. Н. Норкина, А. Л. Гинцбург ; заявитель и патентообладатель ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. — № 2022134305 ; заявл. 28.12.2022 ; опубл. 28.04.2023, Бюл. № 13. — 15 с.

8. Гребенникова, Т. В. Вакцина против ротавирусной инфекции человека на основе вирусоподобных частиц ротавируса : патент № 2829862 Рос. Федерация : МПК А61К 39/12 (2006.01), А61Р 31/12 (2006.01) / Т. В. Гребенникова, О. В. Елисеева, Л. В. Костина, О. Е. Латышев, И. Е. Филатов, **С. А. Черепушкин**, В. В. Цибезов, О. Н. Зайкова, А. А. Плотников, В. В. Лебедева, М. А. Лосич, К. М. Хаметова, С. Н. Норкина, М. М. Силаенкова, К. А. Южакова, Н. Ю. Куликова, Л. М. Алимбарова, А. А. Лазаренко, Н. П. Банковская, Т. В. Крестьянова, З. Б. Иванова, А. Л. Гинцбург ; заявитель и патентообладатель ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. — № 2024109876 ; заявл. 07.04.2024 ; опубл. 07.11.2024, Бюл. № 31. — 18 с.

Конференции:

9. **Cherepushkin S. A.** Development and production of rotavirus virus-like particles relevant for the Russian Federation G/P combinations of genotypes / **S. A. Cherepushkin**, K. P. Alekseev, E. G. Altaeva, O. E. Latyshev, V. V. Tsibezov, A. G. Yuzhakov, O. S. Sokolova, T. V. Grebennikova // International Conference "Perspective Technologies In Vaccination and Immunotherapy"; Satellite Symposium "Viral infections and cancer, openings for vaccines". — 2020. — N.4. — С. 22-23

10. **Черепушкин С. А.** Изучение иммуногенности и безопасности прототипной вакцины для профилактики ротавирусной инфекции на основе вирусоподобных частиц / **С. А. Черепушкин**, О. В. Елисеева, О. Е. Латышев, К. М. Хаметова, В. В. Лебедева, В. В. Цибезов, Д. Ю. Якунин, Т. В. Гребенникова // Материалы XXI конгресса детских инфекционистов России. Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики. Детские инфекции. — 2022. — N. 21(2S). — С. 97.

11. **Черепушкин С. А.** Доклинические исследования безопасности вакцины на основе вирусоподобных частиц для профилактики инфекции, вызываемой ротавирусом А человека / **С. А. Черепушкин**, В. В. Лебедева, О. В. Елисеева, О. Е. Латышев, К. М. Хаметова, И. Е. Филатов, Т. Е. Савочкина, Д. Ю. Якунин, Т. В. Гребенникова // Материалы конгресса. РКММИ 2023. Сборник тезисов. — 2023. — С. 55-57.

12. **Черепушкин С. А.** Изучение структуры вирусоподобных частиц SARS-COV-2 и ротавируса А человека методами крио-электронной, просвечивающей и аналитической микроскопии. / **С. А. Черепушкин**, А. В. Моисеенко, Т. С. Трифонова, Т. Е. Савочкина, И. Е. Филатов, М. Г. Карлова, Т. В. Гребенникова, О. С. Соколова // Сборник научных трудов VII съезда биофизиков России. Сборник материалов съезда. В 2-х томах. — 2023. — С. 50-51.

Черепушкин Станислав Андреевич

(Российская Федерация)

РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Диссертационная работа посвящена разработке методов получения, стандартизации и контроля качества VLP-вакцин, на примере VLP-вакцины против ротавируса А человека. Получены и охарактеризованы банки рекомбинантных бакуловирусов, содержащие оптимизированные для экспрессии в клетках насекомых последовательности генов ротавируса А: VP2, VP4 (генотипы P4, P8), VP6, VP7 (генотипы G1, G2, G4, G9). Получены и очищены трехслойные вирусоподобные частицы ротавируса А. Разработаны и валидированы методы контроля качества полученных VLP. Разработана ПЦР тест-система для контроля содержания остаточной ДНК клеток *Trichoplusia ni*. Подобрана формуляция кандидатной VLP-вакцины против ротавируса А, показана её иммуногенность на двух животных моделях.

Cherepushkin Stanislav Andreevich

(Russian Federation)

DEVELOPMENT OF A VIRUS-LIKE PARTICLE VACCINE CANDIDATE AGAINST
ROTAVIRUS INFECTION

The dissertation work is devoted to the development of methods for the production, standardization and quality control of VLP vaccine against human rotavirus A. Master virus banks of recombinant baculoviruses containing rotavirus A genes (VP2, VP4 genotypes P4, P8, VP6, VP7 genotypes G1, G2, G4, G9) optimized for expression in insect cells were obtained and characterized. Three-layered rotavirus A virus-like particles have been produced and purified. Quality control methods for rotavirus VLPs have been developed and validated. A PCR test system has been developed to control the content of residual DNA from *Trichoplusia ni* cells. The formulation of a candidate VLP vaccine against rotavirus A has been selected, and its immunogenicity has been shown in two animal models.

Подписано в печать: 14.11.2025
Заказ № 21283. Тираж 100 экз.
Бумага офсетная. Формат 60х90/16.
Типография «Автореферат.ру»
ОГРНИП 320774600073831
119313, Москва, ул. Марии Ульяновой, д.3, к.1
+7 (977) 518-13-77, +7 (499) 788-78-56
www.avtoreferat.ru, e-mail: riso@mail.ru