

На правах рукописи

БОГОМОЛОВА
Елена Григорьевна

СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ
БЕЛКОВ VP6 И VP8 РОТАВИРУСА ГРУППЫ А

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») и Федеральном государственном унитарном предприятии Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства России (ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России)

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН Симбирцев Андрей Семёнович

Официальные оппоненты:

Васин Андрей Владимирович - доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, директор

Субботина Татьяна Федоровна - доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел биохимии научно-образовательного института биомедицины, лаборатория биохимического мониторинга, заведующая

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится: « » 2019 г. в часов на заседании диссертационного совета Д001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») (197376, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ») по адресу 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ» и на сайте: <http://iems.pb.ru/science/diss/diss001-022-03/>

Автореферат разослан _____
(дата)

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Большинство детей инфицируется до достижения возраста 5 лет. Ротавирусы человека являются причиной более 150000 смертей младенцев и маленьких детей ежегодно, особенно в развивающихся странах (*WHO, 2013*). В России заболеваемость ротавирусной инфекцией постоянно растет, что объясняется как увеличением числа случаев инфицирования, так и совершенствованием способов диагностики данного заболевания.

Ротавирус был открыт начале 70х годов прошлого века (*Bishop et al., 1973; Flores et al., 1976*). Ротавирусы включают в семейство Reoviridae, род Rotavirus. Ротавирион представляет собой безоболочечный, сложно организованный трехслойный капсид, который окружает геном, представленный 11 сегментами двуцепочечной РНК (*Schnagl, Holmes, 1976*).

Род ротавирус подразделяют на серологические группы А-Е. Все эти группы инфицируют животных, но лишь группы А-С – человека. Ротавирусы повреждают энтероциты, расположенные на микроворсинках эпителия тонкого кишечника, что приводит к снижению абсорбции и диарее. Широкий спектр клинических проявлений колеблется от легкой диареи до тяжелой диареи и рвоты, вызывающих дегидратацию, нарушение электролитного баланса, шок и при отсутствии лечения смерть.

Иммунитет к ротавирусной инфекции в большинстве случаев возникает в раннем детстве после перенесенного заболевания. Иммунитет нестойкий, поэтому у взрослых с низким уровнем антител заболевание может повториться.

В рамках "Десятилетия детства» стартовавшего на основании Указа Президента Российской Федерации от 29 мая 2017 года № 240 "Об объявлении в Российской Федерации Десятилетия детства», в плане мероприятий поставлена задача включить в национальный календарь профилактических прививок иммунизацию от ротавирусной инфекции с 2020 года и предложить в связи с этим отечественный аналог зарубежным вакцинным препаратам. На данный момент отсутствуют препараты для профилактики ротавирусной инфекции российского производства.

Степень разработанности темы исследования

На данный момент на мировом рынке отсутствуют препараты с прямым противоротавирусным действием. Терапия ротавирусной инфекции сводится к минимизации последствий дегидратации организма, возникающей в процессе инфицирования. Наиболее эффективным способом профилактики ротавирусного гастроэнтерита считается вакцинация. Вплоть до широкого внедрения вакцинации против ротавирусной инфекции в 2006 году более 65% детей младше пяти лет как минимум однократно переносили данное заболевание. На данный момент две живые аттенуированные вакцины рекомендованы к применению более чем в 100 странах мира. Данные вакцины основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого либо животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека. Постлицензионные исследования данных препаратов показали их эффективность на уровне более 90% в предотвращении тяжелого ротавирусного гастроэнтерита. Однако при их использовании у 1-6 на 100000 вакцинированных младенцев регистрируются случаи вакцин-ассоциированной инвагинации кишечника, тяжелого осложнения, которое при отсутствии своевременного лечения приводит к летальному исходу (*Burnett et al., 2018*).

Существует ряд подходов к разработке вакцин для профилактики ротавирусного гастроэнтерита с улучшенными свойствами, среди которых разработка аттенуированных реассортантов наиболее часто встречающихся штаммов ротавируса, использование естественно аттенуированных линий ротавируса (неонатальных) - выделенных у пациентов, характеризующихся бессимптомной ротавирусной инфекцией, а также разработка рекомбинантных вакцин на основе полноразмерных ротавирусных белков, а также их частей.

Среди капсидных белков ротавируса группы А наиболее важными иммуногенами служат белки VP6 и VP8. Белок VP8 является N-концевым триптическим фрагментом белка наружного капсида VP4. Данный белок (VP8) является высокоиммуногенным полипептидом и индуцирует эффективную гомотипическую защиту против заболевания. В экспериментах на лабораторных мышах эффект наблюдали у детенышей, привитых данным полипептидом самок. Белок VP8 содержит пять нейтрализуемых эпитопов. Полипептид внутреннего капсида VP6 является мажорным белком вириона и обеспечивает защиту новорожденных животных за счет индукции выработки нейтрализующих секреторных антител, главным образом присутствующих в молоке

кормящей самки мыши (*Gill et al., 2010*). Таким образом, защиту ребенка от ротавирусной инфекции возможно обеспечить вакцинацией белками VP6 и VP8. В связи с этим представляется целесообразным использовать данные вирусные белки для конструирования генно-инженерных вакцинных препаратов.

При разработке рекомбинантных вакцинных препаратов важным аспектом является подбор адъюванта, увеличивающего эффективность вакцинации. Примерами широко используемых в настоящее время адъювантов являются флагеллин *Salmonella* и мутант дифтерийного токсина - CRM197. Данные белковые адъюванты имеют разные механизмы действия и активируют различные звенья иммунного ответа. Флагеллин, связываясь с Толл-рецептором-5, активирует механизмы врожденного иммунитета, тогда как CRM197 вызывает активацию Т-клеточного ответа, а именно - Т-хелперов. Выбор подходящего адъюванта повысит эффективность вакцинации и обеспечит более стойкий иммунитет к возбудителю заболевания.

Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать побочных эффектов, связанных с введением вируса в организм. Кроме того, их можно четко стандартизировать благодаря известным химическим свойствам и отсутствию дополнительных молекул в составе. Производство рекомбинантных вакцин более выгодно по сравнению с вакцинами на основе вирусов, поскольку не требует работы с патогеном, наработка вакцинных препаратов требует меньшего времени, себестоимость препаратов ниже.

Несмотря на то, что существует ряд кандидатных вариантов иммуногенов для разработки вакцины для профилактики ротавирусной инфекции, ни один из них не вошел в клиническую практику. Кроме того, вследствие высокой изменчивости ротавирусов, существует проблема создания универсальной вакцины против данного заболевания. Настоящая работа направлена на решение данного вопроса.

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования заключалась в создании и биохимической характеристике иммуногена на основе белков VP6 и VP8 ротавируса группы А.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Моделирование структуры гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 и кодирующих их генов на основе капсидных белков VP6 и VP8 ротавируса группы А.

2. Создание штаммов-продуцентов гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 на основе клеток *E. coli*.
3. Разработка технологии выделения и очистки гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8.
4. Биохимическая характеристика свойств полученных гибридных белков.
5. Изучение иммуногенных свойств гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 у лабораторных животных.
6. Анализ вируснейтрализующей активности антител *in vitro*, образующихся при иммунизации лабораторных животных белками VP6VP8 и FliCVP6VP8.

Научная новизна

Разработанные гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 являются оригинальными и не имеют природных и синтетических аналогов. Созданы продуценты оригинальных гибридных белков, разработан протокол наработки и очистки в клетках *E. coli*, изучены биохимические свойства полученных белков. Изучены иммуногенные свойства белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 при иммунизации лабораторных мышей линии Balb/c с адъювантом (гидроксидом алюминия). Изучены иммуногенные свойства белка FliCVP6VP8 при внутримышечной иммунизации с белком CRM197 в качестве адъюванта. Впервые показано адъювантное действие рекомбинантного белка CRM197 при внутримышечном введении с противоротавирусным иммуногеном. Изучены протективные свойства специфичных к белкам VP6VP8 и FliCVP6VP8 поликлональных антител в экспериментах *in vitro* на культуре клеток. Показано наличие нейтрализующей активности антител сывороток животных, иммунизированных белками VP6VP8 и FliCVP6VP8. Изучены протективные свойства белка FliCVP6VP8 в экспериментах *in vivo* на лабораторной модели ротавирусной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты позволяют позиционировать гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 как перспективные иммуногены для создания кандидатной отечественной рекомбинантной вакцины против ротавирусной инфекции, а рекомбинантный белок CRM197 - как перспективный адъювант в составе кандидатной вакцины.

Полученные результаты позволяют предположить, что вакцина на основе белка FliCVP6VP8 будет обеспечивать универсальную защиту против ротавирусов за счет того,

что фрагмент белка VP6 в составе гибридного белка имеет общие и гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса С, а также гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса В. После введения данной вакцины у человека будет вырабатываться иммунитет к ротавирусам.

Результаты исследования создают возможность организации производства отечественной вакцины для профилактики ротавирусной инфекции, а также внедрения ее в клиническую практику здравоохранения.

Методология и методы исследования

Моделирование гибридных белков проводили с использованием алгоритма I-Tasser. Для анализа наличия В-клеточных эпитопов использовали пакет программ Veripred Linear Epitope Prediction 2.0. Анализ наличия Т клеточных эпитопов осуществлялся с помощью IEDB Analysis Resource. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью персонального компьютера с использованием программ Chromas, BioEdit v.5.0.9 и ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>).

Для экспрессии гибридных генов *vp6vp8* и *flicvp6vp8* в клетках *E.coli* использовали коммерческий вектор pET-28a(+) (Invitrogen, США), содержащий ориджин репликации, промотор для полимеразы фага Т7, *lac*-оператор, ген устойчивости к канамицину, стартовый кодон для трансляции клонированных фрагментов, фрагмент, кодирующий полигистидин, находящийся в рамке трансляции, на N-конце последовательности. Таким образом, любая клонированная в векторе нуклеотидная последовательность экспрессируется в виде белка, слитого с полигистидином, для удобства его дальнейшей очистки с использованием иммобилизованной металлоаффинной хроматографии. Для обеспечения работы *lac*-оперона плазмиды содержит фрагмент, кодирующий лактозный репрессор - *lacI*. Клонирование гибридных генов в векторе осуществляли по сайтам рестрикции XhoI и NdeI.

Для амплификации векторной ДНК использовали клетки *E. coli* DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)769 galUgalKλ- rpsLnupG.

Для экспрессии гибридных генов *vp6vp8* и *flicvp6vp8* использовали клетки *E. coli* BL21 Star (DE3), с генотипом F- ompThsdSB (rB-mB-) galdcn rne131 (DE3), содержащие в геноме λDe3 лизоген и мутацию rne131.

Для получения препарата высокоочищенного рекомбинантного белка CRM197, используемого в качестве адъюванта, использовали штамм-продуцент на основе клеток *E. coli* BL21 (DE3), полученный в ООО «РД-Биотех» и предоставленный для исследования.

Синтез последовательностей генов *vpbvp8* и *flicvpbvp8* осуществляли методом ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов (Majumder, 1992), синтезированных химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОССЕТ, Россия). Нарботку фрагментов ДНК для клонирования проводили методом ПЦР. Дизайн и анализ праймеров осуществлялся с помощью программы FastPCRv.4.0.27 (PCRTeam, Финляндия). Реакцию лигирования использовали для клонирования очищенных ПЦР-продуктов с «липкими» концами в векторе pET-28a (+) (Invitrogen, США).

Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили по методу Сэнджера (Sanger *et al.*, 1977) с использованием набора Applied Biosystems BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Индукцию экспрессии генов, кодирующих рекомбинантные белки, осуществляли в штаммах-продуцентах (*E. coli* BL21(DE3)) с использованием ИПТГ (Invitrogen, США) в конечной концентрации 0,1 мМ, 0,5 мМ и 1 мМ, а также по методу Штудииера (Studier, 2005). Результаты анализировали с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по Леммли (Laemmli, 1970). Анализ ПААГ гелей проводили с помощью программы ImageJ.

Очистку рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 осуществляли с помощью металлоаффинной хроматографии с последующей гель-фильтрацией. Рекомбинантный CRM197 получали с использованием металлоаффинной хроматографии с последующим диализом. Производили контроль качества полученных образцов белков. Подлинность рекомбинантного CRM197 подтверждали с помощью вестерн-блоттинга с использованием коммерческих антител к CRM197 (каталожный номер ab151222, Abcam, США). Концентрацию целевого белка в образце измеряли спектрофотометрическим методом Лоури. Анализ остаточных белков штамма продуцента осуществляли методом твердофазного ИФА с использованием коммерческого набора *E. coli* host cell protein ELISA kit (Cygnus technologies, США). Измерение остаточной ДНК штамма-продуцента проводили методом молекулярной гибридизации с помощью набора *E. coli* Host Cell DNA in tubes (Cygnus technologies, США). Остаточные эндотоксины в образцах определяли с помощью гель-тромб варианта ЛАЛ-теста. Масс-спектрометрический анализ проводили в ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Изучение иммуногенных свойств гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 проводили с использованием самок мышей линии Balb/c возраста 6-8 недель. Иммунизацию проводили внутримышечно с интервалом в 2 недели. По прошествии 2 недель после каждой иммунизации забирали кровь и в сыворотках измеряли титр специфических антител IgG методом твердофазного ИФА.

На базе инновационной лаборатории Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии (г. Минск, Белоруссия) было проведено изучение вирус-нейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных рекомбинантными белками VP6VP8 и FliCVP6VP8. Изучение проводили с использованием штамма ротавируса человека Минск-86 на перевиваемой культуре клеток МА-104 почки эмбриона макаки резус. Кроме того, были определены антитела к ротавирусам в сыворотках иммунизированных животных с использованием тест-системы Рота-АГ (Белоруссия).

Изучение иммуногенных свойств рекомбинантного белка FliCVP6VP8 при совместном внутримышечном введении с белковым адьювантом - рекомбинантным CRM197 проводили на самках мышей линии Balb/c возраста 6-8 недель. После двукратной внутримышечной иммунизации с интервалом в 2 недели были определены титры специфических антител субизотипов IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

Совместно с ООО «Инновабио» на базе ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ (г. Санкт-Петербург) было проведено изучение протективной активности иммуногена FliCVP6VP8 на модели ротавирусной инфекции. Исследование было выполнено на 6-8-недельных мышак-самцах линии Balb/c. В экспериментах использовали штамм ротавируса мыши EDI. В качестве препарата сравнения служила коммерческая вакцина Rotarix (GlaxoSmithKline), в качестве отрицательного контроля - физиологический раствор. Препараты вводили однократно, либо двукратно с интервалом в две недели. Коммерческую вакцину, согласно инструкции по применению, вводили животным перорально, физиологический раствор - внутримышечно. Белок FliCVP6VP8 вводили лабораторным животным либо внутримышечно, либо интраназально. В ходе экспериментов были изучены выделение ротавирусного антигена с фекалиями иммунизированных и затем зараженных животных, а также уровень специфических и общих антител классов IgG и IgA в смывах кишечника и сыворотках крови испытываемых животных.

Положения, выносимые на защиту

1. Смоделированы и созданы гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8.

2. Разработана технология очистки гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 с использованием хроматографических методов.
3. Разработанные гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 являются высокоиммуногенными и индуцируют выработку высокого титра специфических антител в сыворотке крови иммунизированных животных. Антитела взаимодействуют с антигенами ротавируса и обладают вируснейтрализующей активностью.
4. Гибридный белок FliCVP6VP8 обеспечивает защиту от ротавирусной инфекции, блокируя размножение вируса.
5. Гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 являются перспективными иммуногенами для разработки кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции.
6. Белок CRM197 является перспективным адъювантом для разработки кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается выполненными наблюдениями, иллюстрированными множественным фактическим материалом - 52 рисунками, а именно электрофореграммами, столбчатыми диаграммами, а также 23 таблицами, 4 последовательностями аминокислот и нуклеотидов, комплексным анализом полученных результатов с привлечением современных методов, в том числе статистической обработки данных.

Материалы диссертационного исследования были представлены на двенадцати конференциях: I международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, г. Новосибирск, 2014; международная конференция «ГМО: история, достижения, социальные и экологические риски», г. Санкт-Петербург, 2014 г.; 18-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2014 г.; 19-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2015 г.; VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», г. Новосибирск, 2015 г.; «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину», г. Санкт-Петербург, 2015 г.; 20-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2016 г.; III Всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», г. Санкт-Петербург, 2016 г.; LXXI Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных

«Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017», г. Минск, Белоруссия, 2017 г.; Тринадцатая Евразийская научная конференция «Донозология-2017», г. Санкт-Петербург, 2017 г.; XXV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», г. Москва, 2018 г.; Научно-практическая конференция молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний», г. Москва, 2018 г. По теме диссертации опубликованы 7 статей, 1 патент на изобретение, 1 заявка на изобретение и 12 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 228 страницах машинописного текста, содержит 4 приложения. Список литературы содержит 207 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы освещены данные об истории открытия ротавируса, его строении и классификации, рассмотрены эпидемиология и патогенез ротавирусной инфекции, а также способы ее лечения и профилактики. Приведена справка о стратегиях профилактики ротавирусного гастроэнтерита, применяющихся на данный момент, и разрабатываемых вакцинах. Приведено обоснование выбора предложенных белковых молекул для индукции протективного ответа против ротавируса.

Для создания иммуногенов были выбраны капсидные белки ротавируса группы А - VP6 и VP8.

Белок наружного капсида VP4 ответственен за адаптацию ротавирусов к росту *in vitro*, контролирует их вирулентность на уровне организма, является вирусным гемагглютинином и, по-видимому, обеспечивает проникновение вируса в клетку. В экспериментах с использованием нейтрализующих моноклональных антител к VP4 показано, что они обеспечивают протективный иммунитет против гомологичного и некоторых гетерологичных серотипов ротавируса. Гемагглютинин ротавирусов не является гликопротеином.

Гемагглютинирующий и нейтрализуемый домены находятся в N-концевой части белка VP4 ротавируса. Белок VP8 является N-концевым триптическим фрагментом белка VP4. Данный белок (VP8) является высокоиммуногенным полипептидом и индуцирует эффективную гомотипическую защиту против заболевания. В экспериментах на лабораторных мышах эффект наблюдали у детенышей, привитых данным полипептидом самок. Белок VP8 содержит пять нейтрализуемых эпитопов.

Полипептид внутреннего капсида VP6 является мажорным белком вириона и обеспечивает защиту новорожденных животных за счет индукции выработки нейтрализующих секреторных антител, главным образом присутствующих в молоке кормящей самки (*Gil e al., 2000*).

Таким образом, защиту ребенка от ротавирусной инфекции возможно обеспечить вакцинацией белками VP6 и VP8. Использование антигена на основе единой конструкции, содержащей последовательности белков VP6 и VP8, предпочтительнее в плане удобства его получения и очистки. Производство гибридного белка, содержащего не полноразмерные белки, а их иммуногенные эпитопы, более выгодно.

Гибридный белок, полученный в данной работе, FliCVP6VP8, включает фрагмент белка VP6 (286-397 а.о.), фрагмент белка VP8 (402-458 а.о.) ротавируса А, фрагмент белка VP6 имеет общие и гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса С, а также компоненты флагеллина – FliC1 (1-169 а.о.) и FliC2 (182–276 а.о.) в качестве внутримолекулярного адъюванта, компоненты соединены гибкими мостиками. Гибридный белок VP6VP8 включает фрагмент белка VP6 (1 - 112 а.о.), фрагмент белка VP8 (117- 175 а.о.) ротавируса группы А. Представленные фрагменты белков представляют собой консервативные части белков VP6 и VP8, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфические антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами среди различных штаммов ротавирусов групп А, В и С. Использование эпитопов нескольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины и расширить спектр ее активности, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Использование внутримолекулярного адъюванта в составе конструкции позволяет увеличить ее иммуногенность. На данный момент флагеллин является одним из наиболее перспективных и хорошо изученных адъювантов нового поколения, поэтому было принято решение использовать его как компонент гибридного иммуногена. Помимо флагеллина, в качестве эффективного адъюванта сейчас широко используется мутант дифтерийного токсина - белок CRM197. Была проведена оценка возможности

использования рекомбинантного белка CRM197 в качестве адъюванта при разработке противоротавирусной вакцины.

В разделах, посвященных результатам и обсуждениям результатов диссертационного исследования, описаны этапы проведенной работы - моделирование гибридных белков, их получение, контроль качества полученных образцов, анализ иммуногенной и протективной активности гибридных белков, получение кандидатного белкового адъюванта - рекомбинантного CRM197, контроль качества полученного образца, а также исследование его способности усиливать гуморальный ответ на целевой иммуноген - рекомбинантный белок FliCVP6VP8.

Получение белков VP6VP8 и FliCVP6VP8

Основываясь на данных эпидемиологических исследований, для дизайна иммуногена были выбраны ротавирусы группы А. Молекулярный дизайн рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 был проведен с использованием компьютерных программ. Последовательности белков VP6 и VP8 были получены из базы данных www.ncbi.nlm.nih.gov. Были смоделированы две белковые конструкции, содержащие высокоиммуногенные консервативные эпитопы капсидных белков ротавируса группы А. Поиск Т-клеточных эпитопов осуществляли по аллели HLA-A*01:01. Существует множество вариантов аллелей генов, кодирующих молекулы HLA. Их изучение и характеристика строится на серологических и молекулярно-генетических методах анализа. В результате существования такого разнообразия аллелей генов *hla*, презентация антигенов в каждом конкретном организме индивидуальна, что обуславливает образования широкого спектра форм иммунного ответа на разработанные гибридные белки.

Далее выбранные консервативные участки анализировали на наличие в них Т - и В - клеточных эпитопов. Для анализа использовали пакет программ Veripred Linear Epitope Prediction 2.0. В результате были выбраны фрагменты аминокислотных последовательностей, содержащие В - клеточные эпитопы. Анализ наличия Т - клеточных эпитопов осуществлялся с помощью IEDB Analysis Resource. Участки аминокислотных последовательностей, содержащих предсказанные эпитопы, были объединены в кандидатную структуру иммуногена, после чего было осуществлено пространственное моделирование полученного гибридного белка. Для получения наиболее приближенных к реальности результатов в автоматическом режиме использовали алгоритм I-Tasser. Данный анализ проводился в течение четырех дней. С использованием данного алгоритма для мультидоменного белка были получены данные с достоверностью 75%. Для получения

более точных данных разбили белок на используемые домены, провели их моделирование с использованием I-Tasser и далее провели их докинг.

Смоделированный гибридный белок VP6VP8 состоит из 175 а.о. Анализ аминокислотной последовательности данного белка с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) показал, что гибридный белок стабилен и имеет молекулярную массу 19,4 кДа, pI 4,41. Смоделированный гибридный белок FliCVP6VP8 состоит из 458 а.о. Анализ аминокислотной последовательности данного белка с помощью ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) показал, что гибридный белок стабилен и имеет молекулярную массу 48,6 кДа, pI 4,6.

С использованием алгоритма I-Tasser были получены модели пространственной структуры белков VP6VP8 и FliCVP6VP8. Наиболее вероятные модели представлены на рисунке 1.

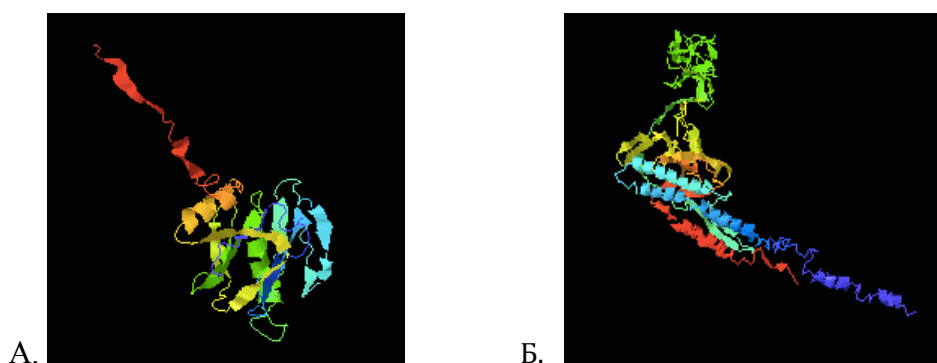
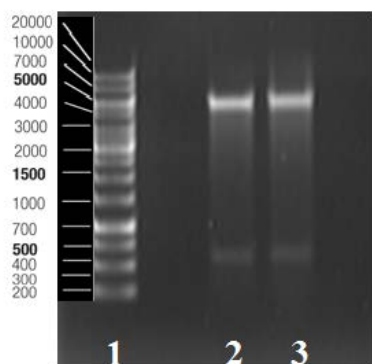


Рисунок 1 - А. Пространственная структура белка VP6VP8. Б. Пространственная структура белка FliCVP6VP8.

При разработке терапевтических препаратов следует оценивать риск провокации ими аутоиммунных реакций. Учитывая тот факт, что разработанные гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 являются искусственными и в природе не встречаются, было важно определить степень их гомологии по отношению к белкам организма человека. Анализ с использованием программы Blast не выявил гомологии белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 ни с одним из белков протеома человека, что исключает потенциальную возможность возникновения аутоиммунных или иммуносупрессивных реакций в ответ на введение разработанных антигенов и, соответственно, говорит об их безопасности в данном аспекте.

Аминокислотные последовательности белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 перевели в нуклеотидные и оптимизировали их для экспрессии в клетках *E. coli*. Синтезированные гены клонировали в экспрессионном векторе pET-28a (+). Для амплификации плазмид были получены штаммы на основе клеток *E. coli* DH10 B/R, для продукции целевых белков - на основе *E. coli* BL21 (DE3). Наличие вставок целевых генов *vp6vp8* и *flicvp6vp8* в полученных

плазмидных ДНК было показано с помощью ПЦР, рестрикционного анализа, а также секвенирования (Рисунки 2-3).

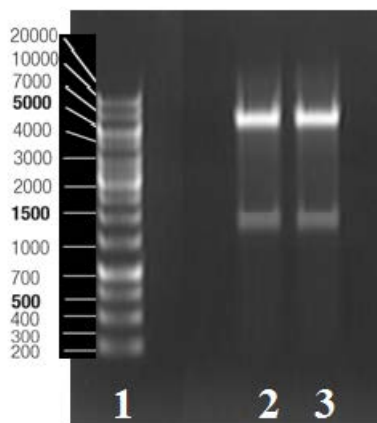


А

610 620
 VP6VP8 (Ref.) AAAGACGCTCGTGACAAAATCGTTG
 Forward.....
 670 680
 VP6VP8 (Ref.) CAGCAGTTCAACCAGATGATCATCA
 Forward.....

Б

Рисунок 2 - А. Электрофореграмма результатов рестрикции плазмиды pET-28a(+)-vp6vp8 рестриктазами FastDigest NdeI и FastDigest XhoI (Thermo Scientific, США), 0,8% агарозный гель. 1 - маркер Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (ThermoScientific, США); 2,3 - плазида pET-28a (+)-vp6vp8 после обработки рестриктазами XhoI и NdeI. Б. Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей, выявленных в результате секвенирования, относительно рассчитанной нуклеотидной последовательности.



А

210
 FliCVP6VP8 (ref.) TACCGCTATCGAACGTCCTG
 Forward.....
 Reverse-----
 260
 FliCVP6VP8 (ref.) ACGACGCTGCTGGTCAGGC
 Forward.....
 Reverse-----

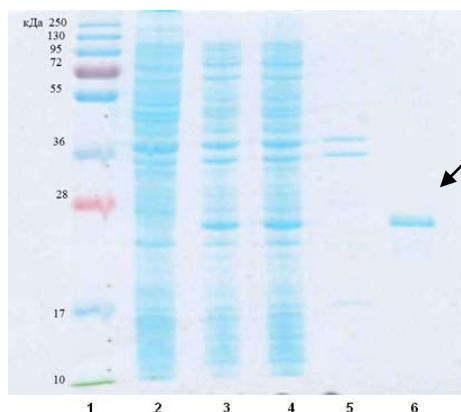
Б

Рисунок 3 - А. Электрофореграмма результатов рестрикции плазмиды pET-28a (+)-fliCvp6vp8 рестриктазами FastDigest NdeI и FastDigest XhoI (ThermoScientific, США), 0,8% агарозный гель. 1 - маркер GeneRuler 1 kb DNALadder (Thermo Scientific, США); 2,3 - плазида pET-28a (+)-fliCvp6vp8 после обработки рестриктазами XhoI и NdeI. Б. Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей, выявленных в результате секвенирования, относительно рассчитанной нуклеотидной последовательности.

При разработке оптимального протокола индукции экспрессии гибридных генов выяснили, что использование автоиндукции (0,2% лактозой по методу Штудиера) для синтеза гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 приводит к лучшим результатам, то есть к большему выходу целевых белков, по сравнению с полученным при использовании в качестве индуктора 1 mM ИПТГ.

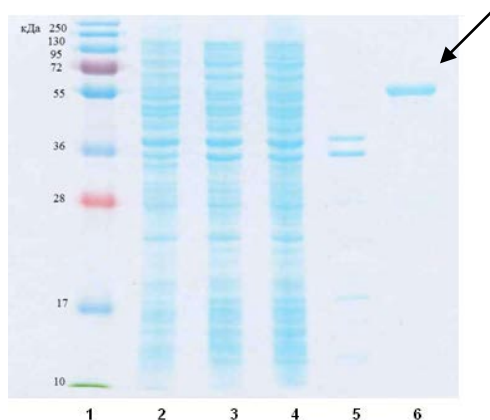
Для разработки протокола очистки белков была определена их локализация в клетках штамма-продуцентов - оба рекомбинантных белка накапливаются в виде телец включения.

В результате последовательного применения металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации получено 120 мг высокоочищенного препарата белка VP6VP8 и 200 мг высокоочищенного препарата белка FliCVP6VP8 (Рисунки 4-5).



1 – маркер PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, США); 2 – лизат клеток штамма-продуцента BL21(DE3) pET-28a (+)-vp6vp8 до индукции; 3 - лизат клеток штамма-продуцента BL21(DE3)pET-28a(+)-vp6vp8 после индукции 0,2% лактозой; 4 – осадок после лизиса клеток штамма-продуцента BL21(DE3)pET-28a(+)-vp6vp8 после индукции 0,2% лактозой; 5 - супернатант после лизиса клеток штамма-продуцента BL21(DE3)pET-28a(+)-vp6vp8 после индукции 0,2% лактозой; 6 – препарат очищенного белка VP6VP8.

Стрелка указывает на целевой белок VP6VP8. Рисунок 4 - Электрофореграмма результатов очистки белка VP6VP8, 12,5% ПААГ, 0,1% додецилсульфат натрия.



1 – маркер PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, США); 2 – лизат клеток штамма-продуцента BL21(DE3) pET-28a (+)-fliCvp6vp8 до индукции; 3- лизат клеток штамма-продуцента BL21(DE3)pET-28a(+)-fliCvp6vp8 после индукции 0,2% лактозой; 4 – осадок после лизиса клеток штамма-продуцента BL21(DE3) pET-28a (+)-fliCvp6vp8 после индукции 0,2% лактозой; 5 - супернатант после лизиса клеток штамма-продуцента BL21(DE3) pET-28a (+)-fliCvp6vp8 после индукции 0,2% лактозой; 6 – препарат очищенного белка FliCVP6VP8.

Стрелка указывает на целевой белок FliCVP6VP8. Рисунок 5 - Электрофореграмма результатов очистки белка FliCVP6VP8, 12,5% ПААГ, 0,1% додецилсульфат натрия.

После всех этапов очистки выход белка VP6VP8 составил 18 мг из 1 литра жидкой культуры клеток *E. coli* BL21(DE3) штамма-продуцента (ОП600 15 О.Е.), белка FliCVP6VP8 - 15 мг.

Для подтверждения соответствия аминокислотных последовательностей полученных образцов очищенных иммуногенов VP6VP8 и FliCVP6VP8 рассчитанным, они были проанализированы масс-спектрометрически с предварительной обработкой трипсином (Рисунки 6-7).

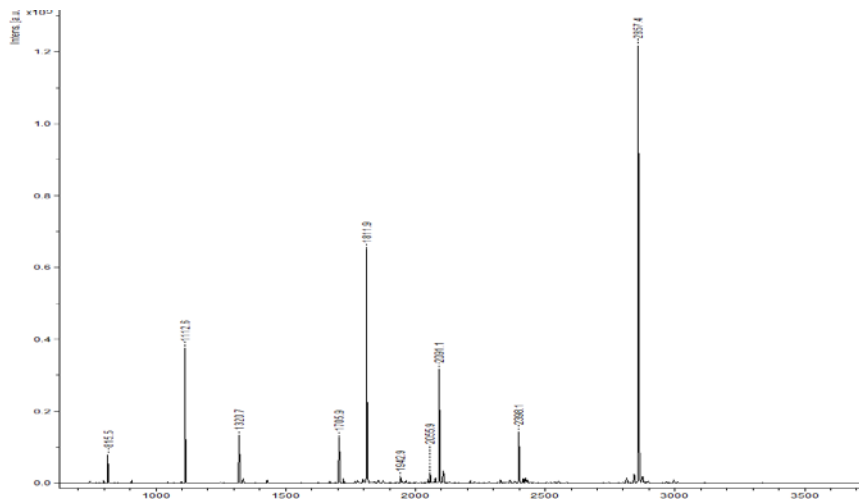


Рисунок 6. Масс-спектр образца очищенного белка VP6VP8.

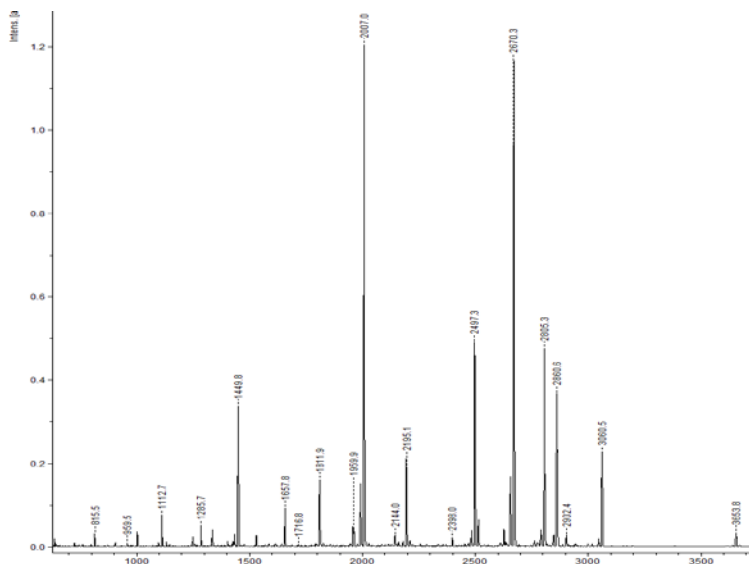


Рисунок 7. Масс-спектр образца очищенного белка FliCVP6VP8.

Анализ полученных спектров триптических фрагментов белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 показал соответствие аминокислотных последовательностей очищенных образцов иммуногенов рассчитанным.

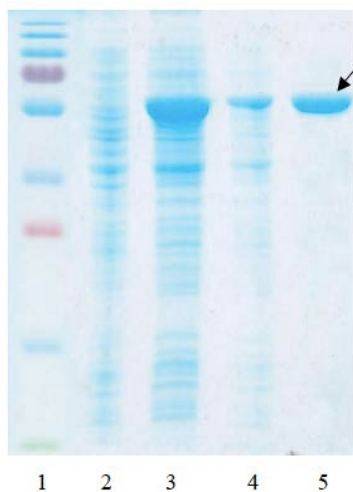
Был проведен контроль качества полученных образцов белков. По усредненным данным, концентрация остаточной ДНК *E. coli* в образцах рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 составляет 0,92 и 0,67 нг на 1 мг белка, соответственно. Концентрация остаточного белка *E. coli* составляет 8,72 и 5,94 нг на 1 мг белка, соответственно, для образцов белков VP6VP8 и FliCVP6VP8. В обоих образцах содержится менее 2,5 едЭ/мг белка. Таким образом, анализ очищенных образцов белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 показал,

что в результате проведенных очисток получены образцы рекомбинантных белков, характеризующихся фармацевтически приемлемой чистотой.

Получение и характеристика рекомбинантного белка CRM197

Штамм-продуцент рекомбинантного белка CRM197 на основе клеток *E. coli* BL21 (DE3) был получен в ООО «РД-Биотех».

Был подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок CRM197, заключающийся в автоиндукции экспрессии по методу Штудьера. Очистку проводили с использованием металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях с последующим диализом для обеспечения рефолдинга рекомбинантного белка (Рисунок 8). Было проведено подтверждение подлинности полученного белкового адьюванта методом вестерн-блоттинга с использованием коммерческих антител, специфичных к белку CRM197 (Рисунок 9). При проведении анализа полученного образца рекомбинантного белка CRM197 определили, что он связывается с коммерческими анти-CRM197 антителами.



1 – маркер молекулярного веса Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, США); 2 – лизат клеток штамма-продуцента белка CRM197 до индукции; 3 - лизат клеток штамма-продуцента белка CRM197 после индукции 1 mM ИПТГ, 37°C; 4 - тельца включения; 5 – фракция 200 mM имидазола. Стрелка указывает на целевой белок CRM197.

Рисунок 8 - Электрофореграмма результатов очистки рекомбинантного белка CRM197 на сорбенте Ni-NTA сефароза.



1 - маркер молекулярного веса (Thermo Scientific, США); 2 - Образец CRM197, 100 нг; 3 - Образец CRM197, 500 нг.

Рисунок 9. Результаты вестерн-блот анализа рекомбинантного белка CRM197.

По результатам проведенных исследований качества полученного образца, концентрация остаточных белков в образце рекомбинантного белка CRM197 составила 7,9 нг/мг белка, остаточной ДНК штамма-продуцента - 1,3 нг/мг белка, количество единиц эндотоксина в образцах рекомбинантного белка CRM197 составило менее 6,25 едЭ/мг. Таким образом, полученный белковый адъювант характеризовался фармацевтически приемлемой чистотой и был использован для проведения иммунологических исследований (*Ph. Eur.* 9.6, 50211, 2018).

Результаты исследования рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 в экспериментах *in vivo* и *in vitro*

Разработанные оригинальные белки являются высокоиммуногенными, что проявляется в формировании высокого титра специфических антител в ответ на их внутримышечное введение. На лабораторных мышах линии Balb/c показана высокая иммуногенность разработанных белков - после второго внутримышечного введения белка FliCVP6VP8 и после третьего внутримышечного введения белка VP6VP8 наблюдалось формирование титра специфических антител на уровне 1:128000 (Рисунок 10).

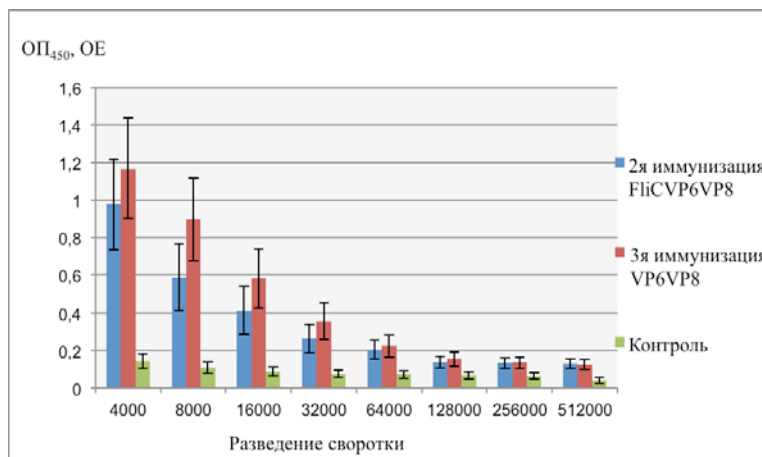


Рисунок 10 - Диаграмма титра антител сывороток иммунизированных животных после второго введения гибридного рекомбинантного белка FliCVP6VP8 и третьего введения VP6VP8.

Было показано, что антитела, вырабатываемые в ответ на иммунизацию белками VP6VP8 и FliCVP6VP8, обладают способностью связывать антигены ротавируса человека штамма «Минск-86». Кроме того, на культуре клеток МА-104 почки эмбриона макаки резус показано вируснейтрализующее действие сывороток крови лабораторных животных, иммунизированных белками VP6VP8 и FliCVP6VP8 по отношению к ротавирусу штамма «Минск-86».

Результаты исследования возможности использования рекомбинантного белка CRM197 в качестве белкового адъюванта для иммунизации совместно с рекомбинантным FliCVP6VP8 показали, что после двукратной иммунизации лабораторных мышей смесью рекомбинантных белков FliCVP6VP8 и CRM197 наблюдается формирование титра специфических антител субизотипа IgG1 на уровне 1:8000, субизотипа IgG2a - 1:32000, субизотипа IgG2b - 1:4000, формирование специфических антител субизотипа IgG3 не наблюдалось. В результате двукратной иммунизации испытуемых животных рекомбинантным белком FliCVP6VP8 наблюдается формирование титра специфических антител субизотипа IgG1 на уровне 1:4000, субизотипа IgG2a - 1:8000, формирование специфических антител субизотипов IgG2b и IgG3 не наблюдалось. Анализ спектра субизотипов специфических антител IgG, формирующихся в ответ на двукратное внутримышечное введение рекомбинантного белка FliCVP6VP8 в отдельности или совместно с рекомбинантным белком CRM197, говорит о том, наблюдается иммунный ответ, характерный для белковых антигенов. Доминирующими являются антитела субизотипа IgG2a, ответственные за связывание белковых антигенов, и не выявляются антитела субизотипа IgG3, связывающие преимущественно углеводные антигены. Невысокий титр специфичных IgG1 говорит о потенциально низкой активации тучных клеток в ответ на введение иммуногенов и их вероятной низкой аллергизирующей активности. Кроме того, отличительной чертой формирующегося иммунного ответа является низкий уровень специфических антител IgG2b, которые в случае иммунизации животных рекомбинантным белком FliCVP6VP8 в отдельности не отличаются от контроля. Эти данные говорят о перспективности использования рекомбинантного белка CRM197 в качестве адъюванта при разработке кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции.

При изучении действия разработанного иммуногена FliCVP6VP8 в экспериментах на лабораторной модели ротавирусной инфекции было обнаружено, что уровень ротавирусного антигена в фекалиях дважды иммунизированных белком FliCVP6VP8 как интраназально, так и внутримышечно, и впоследствии зараженных ротавирусом EDI, животных был менее 10 нг/мл, также как и у животных, иммунизированных коммерческой вакциной. При однократной иммунизации белком FliCVP6VP8 при обоих режимах введения, наблюдалось более интенсивное выделение ротавирусного антигена по сравнению с коммерческой вакциной (в обоих случаях 44 нг/мл по сравнению с <10 нг/мл), однако существенно ниже, нежели у животных, получавших физиологический раствор - 635 нг/мл. После иммунизации белком FliCVP6VP8 наблюдалось формирование вирусспецифичных антител IgA и IgG в сыворотке крови и в кишечнике опытных животных. После интраназальной иммунизации наблюдалось формирование более

высоких уровней вирусспецифичных IgA и IgG в обоих исследованных биологических материалах. При иммунизации белком FliCVP6VP8 совместно с гидроксидом алюминия были получены следующие результаты. После однократной внутримышечной и интраназальной иммунизации наблюдалось выделение ротавирусного антигена на уровне 195 нг/мл и 44 нг/мл, соответственно. После двух введений белка FliCVP6VP8 совместно с гидроксидом алюминия наблюдалось выделение ротавирусного антигена на уровне менее 10 нг/мл в случае обоих режимов введения, также, как и у животных, иммунизированных коммерческой вакциной. Животные, иммунизированные физиологическим раствором, демонстрировали выделение ротавирусного антигена на высоком уровне (более 600 нг/мл). После иммунизации белком FliCVP6VP8 совместно с гидроксидом алюминия также наблюдалось формирование вирусспецифичных антител IgA и IgG в сыворотке крови и в кишечнике опытных животных.

Таким образом, в опытах *in vivo* показано, что разработанный гибридный рекомбинантный белок FliCVP6VP8 обладает протективными свойствами и формирует защитный иммунный ответ против ротавирусной инфекции как при его внутримышечном, так и при интраназальном введении в организм. Белок по иммунологической активности сопоставим с коммерческой вакциной Rotarix® (GlaxoSmithKline), использованной перорально согласно инструкции по ее применению. По отдельным характеристикам, особенно касающимся эффективности белка с адьювантом при однократном применении, интраназальный способ введения препарата обеспечивал формирование у животных такого же уровня защиты, что и двукратное с интервалом 14 суток использование белка с адьювантом. В этих же условиях формирование специфических антител было более выражено.

Следует отметить, что исследования различных групп ученых показали, что антитела, специфичные к капсидному белку ротавируса VP6 имеют прямую противоротавирусную активность. Нейтрализующая активность проявляется за счет ингибирования процесса репликации вирусов (Aiyegbo *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2010). Совместные исследования финских и мексиканских ученых показали, что иммунизация лабораторных мышей кандидатной противоротавирусной вакциной, активным агентом которой является капсидный белок ротавируса VP6, вызывает формирование протективного иммунного ответа против последующего заражения животных штаммом EDIM ротавируса мыши (Lappalainen *et al.*, 2014). Полученные учеными результаты согласуются с результатами, полученными в данной работе. Следует заметить, что кандидатная противоротавирусная вакцина на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 имеет ряд преимуществ по сравнению с вакциной на основе полноразмерного белка VP6 ротавируса. Использование антигенных эпитопов

позволяет создать более активный и универсальный иммуноген, обеспечивающий перекрестную защиту против различных штаммов ротавируса. Также кандидатная вакцина на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 имеет преимущества по сравнению с существующими на данный момент коммерческими вакцинами, основанными на живых штаммах ротавируса. При сравнимой эффективности, кандидатная вакцина более безопасна, поскольку не содержит в своем составе живого вирусного компонента, который размножается в кишечнике вакцинируемого. Из данного факта следует, что кандидатная вакцина на основе рекомбинантного белка не несет потенциального риска возникновения тяжелого побочного эффекта инвагинации кишечника, опасность которого существует при использовании живых аттенуированных вакцин для профилактики ротавирусной инфекции.

ВЫВОДЫ

1. С использованием компьютерных методов смоделированы и получены структуры оригинальных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 на основе капсидных белков VP6 и VP8 ротавируса группы А.
2. Разработана технология выделения и очистки гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 из клеток высокопродуктивных штаммов *E. coli*. Высокая продуктивность штаммов была достигнута путем оптимизации кодонного состава генов, кодирующих рекомбинантные белки, для экспрессии в клетках *E. coli*, а также автоиндукции экспрессии 0,2% лактозой (по Штудиеру).
3. Охарактеризованы биохимические свойства полученных гибридных белков - молекулярная масса белка VP6VP8 составляет 19,4 кДа, pI 4,41, белок FliCVP6VP8 имеет молекулярную массу 48,6 кДа, pI 4,6. Масс-спектрометрический анализ полученных иммуногенов показал соответствие их аминокислотных последовательностей рассчитанным.
4. Полученные рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 обладают высокой иммуногенностью при введении лабораторным животным, стимулируя выработку высокого титра специфических IgG и IgA антител, взаимодействующих с антигенами ротавируса и определяемых в сыворотках крови, а также на слизистой кишечника.
5. В экспериментах в культуре клеток продемонстрировано наличие вируснейтрализующей активности у антител сывороток крови животных, иммунизированных рекомбинантными белками FliCVP6VP8 и VP6VP8.
6. При совместном введении иммуногена FliCVP6VP8 с рекомбинантным белком CRM197 наблюдался более высокий титр специфичных к антигенам вируса антител IgG по

сравнению с введением рекомбинантного белка FliCVP6VP8 отдельно, что делает белок CRM197 перспективным адъювантом для разработки кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертации

1. Богомолова, Е.Г. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А / И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т. 4, № 3. - С. 229–234.
2. Богомолова, Е.Г. Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli* / И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская, Е.Н. Черняева, Р.И. Аль-Шехадат, А.С. Симбирцев // Инфекция и иммунитет. - 2015. - Т. 5, № 1. С. 37–44.
3. Богомолова, Е.Г. Изучение иммуногенности гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А / И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2015. Т. 81, № 2. - С. 96-102.
4. Богомолова, Е.Г. Разработка кандидатной субстанции рекомбинантного белка CRM197 / Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская, А.А. Мироткина, Р.И. Аль-Шехадат, Е.А. Федорова, И.В. Духовлинов, А.С. Симбирцев // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2016. - Т. 86, №1. - С. 93-98.
5. Богомолова, Е.Г. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 / И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Медицинская иммунология. - 2016. - Т. 18, № 5. - С. 417-424.
6. Богомолова, Е.Г. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 / Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Медицинский академический журнал. - 2016. - Т. 16, №3. - С. 391-393.
7. Богомолова, Е.Г. Изучение продукции нетоксичного варианта дифтерийного токсина CRM197 в клетках *Escherichia coli* / И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская, С.А. Ищук, Е.А. Федорова, Н.А. Климов, А.С. Симбирцев // Медицинский академический журнал. - 2018. - Т. 18, №1.- С. 64-70.

Патентные документы

1. Патент 2649132 Российская Федерация. Способ получения активного начала вакцины против ротавирусной инфекции - белка FliCVP6VP8 [Текст] / Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, О.А. Добровольская, Е.А. Федорова, С.А. Ищук, А.С. Симбирцев, заявл. 03.08.2017, опубл. 29.03.2018, Бюл. №10. – 13 с.

Работы, опубликованные в иных научных изданиях

1. Богомолова, Е.Г. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А и изучение их антигенности / Е. Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Сборник тезисов 18 Международной Пущинской школы-конференции «Биология - наука 21 века» - г. Пушкино, Россия - 21 - 25 апреля 2014 г. - С. 11-12.
2. Богомолова, Е.Г. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 И VP8 ротавируса человека группы А и изучение их антигенных свойств / Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Сборник тезисов Международной конференции «OpenBio» - г. Новосибирск, Россия - 7 октября 2014 г. - С. 16-17.
3. Богомолова, Е.Г. Изучение иммуногенности гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А / Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Сборник тезисов Международной конференции «ГМО: история, достижения, социальные и экологические риски» - г. Санкт-Петербург, Россия - 16 декабря 2014 г. - С. 42-43.
4. Богомолова, Е.Г. Получение рекомбинантного CRM197 в клетках *E. coli* / И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская, Е.Н. Черняева, Р.И. Аль-Шехадат, А.С. Симбирцев // Сборник тезисов Международной конференции «ГМО: история, достижения, социальные и экологические риски» - г. Санкт-Петербург, Россия - 16 декабря 2014 г.
5. Богомолова, Е.Г. Изучение иммуногенных свойств гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 И VP8 ротавируса человека группы А / Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Сборник тезисов 19 Международной Пущинской школы-конференции «Биология - наука 21 века» - г. Пушкино, Россия - 20 - 24 апреля 2015 г. - С. 62-63.
6. Богомолова, Е.Г. Создание иммуногена на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А / Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, А.С.

Симбирцев // Сборник тезисов VII российского симпозиума «Белки и пептиды» - г. Новосибирск, Россия - 12 - 17 июля 2015 г. - С. 194.

7. Богомолова, Е.Г. Создание иммуногена на основе капсидных белков ротавируса человека группы А Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Сборник тезисов конференции «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» - Санкт-Петербург, Россия - 10 - 12 Ноября 2015 г.

8. Богомолова, Е.Г. Разработка кандидатной субстанции рекомбинантного белка CRM197 / А.А. Мировская, Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская // Сборник тезисов 20 Международной Пушинской школы-конференции «Биология - наука 21 века» - г. Пущино, Россия - 18 - 22 апреля 2016 г. - С. 232-233.

9. Богомолова, Е.Г. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 / Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев // Медицинский академический журнал. - 2016. - Т. 16, №3. - С. 391-393.

10. Богомолова, Е.Г. Сравнение протективных свойств кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 при различных способах введения / Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская // Сборник тезисов докладов LXXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых - г. Минск, Белоруссия - 17 - 19 апреля 2017 г. - С. 215.

11. Богомолова, Е.Г. Доклинические исследования кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 / Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская, Е.А. Федорова., И.В. Духовлинов, А.С. Симбирцев // Сборник тезисов XXV Российского национального конгресса «Человек и лекарство» - г. Москва, Россия - 9 - 12 апреля 2018 г. - С. 28-29.

12. Богомолова, Е.Г. Разработка кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 / Е.Г. Богомолова, И.В. Духовлинов // Сборник тезисов докладов Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» - г. Москва, Россия - 17 - 18 апреля 2018 г. - С. 11-12.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

A _{485/525}	значения абсорбции при длинах волн 485 и 525 нм.
a.o.	аминокислотные остатки
БОЕ	бляшкообразующие единицы
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДДС-Na	додецилсульфат натрия
едЭ	единицы эндотоксина
ИЛ-1	интерлейкин-1
ИЛ-4	интерлейкин-4
ИЛ-5	интерлейкин-5
ИНФ α	интерферон α
ИПТГ	изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
ИФА	иммуноферментный анализ
ЛД	летальная доза
ЛПС	липополисахариды
об./мин	обороты в минуту
o.e.	оптические единицы
ОП	оптическая плотность
ПААГ	полиакриламидный гель
ПАМП	патоген-ассоциированный молекулярный паттерн
п.о.	пары оснований
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ТМБ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
ТЦД50	тканевая цитопатическая доза
ЭПР	эндоплазматический ретикулум
CRMs	cross-reacting materials, «кросс-реактивные» формы дифтерийного токсина
ENS	enteric nervous system, нервная система кишечника
GRAVY	grand average of hydropathicity
HB-EGF	гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста
Ni-HTU	Ni-нитрилотриуксусная кислота
PEDV	эпизоотическая диарея свиней
RV1	моновалентная проворотавирусная вакцина
RV5	пентовалентная проворотавирусная вакцина
TLR	Toll-like receptor (Толл-подобный рецептор)