



Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека

Черепушкин С.А.¹, Цибезов В.В.¹, Южаков А.Г.¹, Латышев О.Е.¹, Алексеев К.П.¹, Алтаева Э.Г.², Хаметова К.М.¹, Воркунова Г.К.¹, Южакова К.А.¹, Гребенникова Т.В.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

²ООО «Ветбиохим», 105120, Москва, Россия

Введение. Ротавирусная инфекция (РВИ) является основной причиной острого гастроэнтерита у детей до 5 лет. Проблема разработки новых вакцин против ротавируса (РВ) А до настоящего времени актуальна, так как возбудитель имеет множество генотипов, часть из которых представлена только в определённых регионах. Один из перспективных путей создания эффективных и безопасных вакцинных препаратов в настоящее время – использование вирусоподобных частиц (ВпЧ).

Цель данного исследования – разработать технологию получения ВпЧ на основе белков РВ VP4, VP7, генотипы которых наиболее представлены на территории Российской Федерации, а также VP2 и VP6; дать их молекулярно-генетическую и вирусологическую характеристику.

Материал и методы. В работе использовали вирулентный штамм Wa G1P[8] РВ А человека, адаптированный к клеточной культуре MARC-145, который культивировали и очищали по описанной авторами ранее методике. Применяли стандартные молекулярно-генетические и цитологические методы: синтез генов, клонирование в трансферные плазмиды, получение рекомбинантных бакуловирусов; производство ВпЧ с помощью бакуловирусной системы экспрессии Vac-to-Vac в клетках насекомых; центрифугирование в растворе сахарозы; иммуноферментный анализ (ИФА); электронная микроскопия (ЭМ); электрофорез (ЭФ) в полиакриламидном геле с додецилсульфатом (лаурилсульфатом) натрия (ПААГ-ДСН); иммуноблоттинг.

Результаты. Для включения в состав ВпЧ выбраны 6 наиболее распространённых в России генотипов РВ А по белкам VP4 и VP7 (G1, G2, G4, G9, P4, P8), а также VP2 и VP6. Получены рекомбинантные бакуловирусы, содержащие оптимизированные для экспрессии в клетках насекомых последовательности выбранных генов. Клетки совки (*Trichoplusia ni*) коинфицированы различными сочетаниями указанных вирусов с получением ВпЧ, состоящих из 2–4 белков. Эти частицы очищены центрифугированием в растворе сахарозы. По результатам ЭМ морфология и размер частиц соответствовали вириону РВ А. Присутствие в них белков данного патогена подтверждено методами ИФА, электрофореза в ПААГ-ДСН и последующего иммуноблоттинга.

Заключение. Разработана и оптимизирована технология синтеза 3-слойных ВпЧ, состоящих из белков РВ А VP2, VP4, VP6, VP7. Полученные частицы содержат белки VP4 и VP7 6 генотипов, наиболее представленных на территории России, и могут быть использованы для создания вакцинных препаратов против РВ А.

Ключевые слова: ротавирус А человека; вирусоподобные частицы; бакуловирусная система экспрессии; вакцина на основе ВпЧ

Для цитирования: Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Южаков А.Г., Латышев О.Е., Алексеев К.П., Алтаева Э.Г., Хаметова К.М., Воркунова Г.К., Южакова К.А., Гребенникова Т.В. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 55–64. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27>

Для корреспонденции: Черепушкин Станислав Андреевич, научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии и биотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: cherpushkin1@gmail.com

Участие авторов: Черепушкин С.А. – проведение экспериментальных исследований, написание текста; Цибезов В.В. – проведение экспериментальных исследований, написание текста; Южаков А.Г., Латышев О.Е., Алексеев К.П., Алтаева Э.Г. – проведение экспериментальных исследований; Хаметова К.М. – сбор и обработка материалов; Воркунова Г.К. – проведение экспериментальных исследований; Южакова К.А. – сбор и обработка материалов; Гребенникова Т.В. – написание резюме, заключения, общая редакция текста.

Финансирование. Работа финансирована Государственной тематикой Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка подходов для создания вакцины против инфекции, вызванной ротавирусом типа А» (регистрационный номер АААА-А18-118051490143-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.10.2020

Принята в печать 12.11.2020

Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles

Stanislav A. Cherepushkin¹, Valeriy V. Tsibezov¹, Anton G. Yuzhakov¹, Oleg E. Latyshev¹, Konstantin P. Alekseev¹, Erzhen G. Altayeva², Kizkhalum M. Khametova¹, Galina K. Vorkunova¹, Ksenia A. Yuzhakova¹, Tatyana V. Grebennikova¹

¹FSBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya», 123098, Moscow, Russia;

²LLC «Vetbiochem» 105120, Moscow, Russia

Introduction. Rotavirus infection is the leading cause of acute gastroenteritis among infants. The development of new vaccines against rotavirus A is urgent because the virus has many genotypes, some of which have regional prevalence. Virus-like particles (VLP) is a promising way to create effective and safe vaccine preparations.

The purpose of the study is to develop the technology for the production of VLP, containing VP2, VP4, VP6 and VP7 of viral genotypes prevalent on the territory of the Russian Federation, and to give its molecular genetic and virological characteristics.

Material and methods. The virulent strain Wa G1P[8] of human RV A adapted to MARC-145 cell culture has been used. It was cultured and purified according to the method described by the authors earlier. Standard molecular genetic and cytological methods were used: gene synthesis; cloning into transfer plasmids; recombinant baculoviruses production in Bac-to-Bac expression system; VLP production in the insect cells; centrifugation in sucrose solution; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); electron microscopy (EM); polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis.

Results. VP4 and VP7 of the six most represented in Russia genotypes: G1, G2, G4, G9, P4, P8, as well as VP2 and VP6 were selected for VLP production. Recombinant baculoviruses were obtained with codon frequencies optimized for insect cells. Cabbage looper (*Trichoplusia ni*) cell culture was coinfecting with different combinations of baculoviruses, and VLP consisting of 2–4 proteins were produced. VLP were purified by centrifugation. The size and morphology of the particles matched the rotavirus A virion (by EM). The presence of rotavirus A proteins in VLP was confirmed by the ELISA, SDS-PAGE and western blot analysis.

Conclusion. The technology for the synthesis of three-layer VLP consisting of VP2, VP4, VP6 and VP7 has been developed and optimized. The resulting VLP composition represents 6 serotypes of VP4 and VP7, which are most represented on the territory of Russia, and can be used for vaccine development.

Key words: human rotavirus A; virus-like particles; baculovirus expression system; VLP-based vaccine

For citation: Cherepushkin S.A., Tsibezov V.V., Yuzhakov A.G., Latyshev O.E., Alekseev K.P., Altayeva E.G., Khametova K.M., Vorkunova G.K., Yuzhakova K.A., Grebennikova T.V. Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 55-64 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27>

For correspondence: Stanislav A. Cherepushkin, Researcher, Laboratory of Applied Virology and Biotechnology, FSBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: cherepushkin1@gmail.com

Information about the authors:

Cherepushkin S.A., <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Tsibezov V.V., <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Latyshev O.E., <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Alekseev K.P., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>

Altayeva E.G., <https://orcid.org/0000-0001-7188-1704>

Khametova K.M., <https://orcid.org/0000-0002-8461-600X>

Vorkunova G. K., <https://orcid.org/0000-0003-1346-3744>

Yuzhakova K.A., <https://orcid.org/0000-0003-3130-5029>

Grebennikova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Contribution: Cherepushkin S.A. – performing the experiments, writing of the text; Tsibezov V.V. – performing the experiments, writing of the text; Yuzhakov A.G., Latyshev O.E., Alekseev K.P., Altayeva E.G. – performing the experiments; Khametova K.M. – material collection and processing; Vorkunova G.K. – performing the experiments; Yuzhakova K.A. – material collection and processing; Grebennikova T.V. – writing of the summary, conclusion, editing of the text.

Acknowledgments. The study was supported by state task of the Ministry of Health of Russia «Development of approaches to create a vaccine against rotavirus type A infection» No. AAAA-A18-118051490143-3.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 24 October 2020
Accepted 12 November 2020

Введение

Ротавирусный гастроэнтерит – высококонтагиозное острое кишечное заболевание, особенно тяжело про-

текающее у детей младше 5 лет. Возбудителем инфекции является ротавирус (РВ) (род *Rotavirus* семейства *Reoviridae*). Ежегодно ротавирусная инфекция (РВИ)

приводит к смерти более 200 тыс. детей во всём мире [1]. В России заболеваемость ей в 2019 г. составила 70,26 на 100 тыс. населения (в 2018 г. – 81,3) [2, 3].

Основным и наиболее эффективным методом специфической профилактики РВИ считается вакцинация [1]. Более чем в 100 странах мира для иммунизации детей используются 2 живые ослабленные вакцины: моновалентная Rotarix® («GlaxoSmithKline», Бельгия) и пентавалентная RotaTeq® («Merck & Co», США). Первый препарат разработан на основе аттенуированного штамма человеческого возбудителя, циркулировавшего в США с 1988 по 1998 г., который был клонирован и ослаблен путём многократных пассажей в культуре [4]. 5-валентная вакцина RotaTeq® создана из штамма РВ крупного рогатого скота (КРС), модифицированного посредством реассортации (смешения генетического материала) с несколькими возбудителями РВИ человека; в результате получена комбинация из 5 вирусных штаммов с полным набором основных антигенов (АГ) человеческого инфекционного агента. С 2012 г. эта вакцина зарегистрирована в Российской Федерации. Помимо этого на международном уровне доступны преквалифицированные ВОЗ моновалентная вакцина Rotavac® («Bharat Biotech», Индия) и 5-валентная RotaSiil® (Serum Institute of India, Индия) [4, 5].

Однако, несмотря на высокую протективную эффективность живых вакцинных препаратов, при их применении возможно возникновение серьёзных осложнений, включая инвагинацию кишечника [6]. Кроме того, всегда сохраняется риск восстановления вирулентности штаммов вакцин вследствие реассортации с вирулентными полевыми штаммами РВ [7]. В связи с этим продолжают исследования в области поиска и апробации новых подходов к вакцинации, исключающих или ограничивающих использование живого инфекционного агента. Подобные методики предполагают, в частности, применение в качестве АГ рекомбинантных вирусных белков [4] и вирусоподобных частиц (ВпЧ) на их основе [8–10].

Вирион РВ состоит из 6 структурных белков: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7. Из них первые 3 формируют внутренний слой оболочки вируса. Белок VP6, на долю которого приходится около 80% всей белковой массы вириона, является основной группоспецифичной антигенной детерминантой РВ. Наибольший интерес в качестве возможных АГ для включения в состав вакцин представляют белки VP4 и VP7, образующие внешнюю часть оболочки, поскольку именно они индуцируют образование вируснейтрализующих антител (АТ) и обуславливают серотипические отличия вируса [1]. На сегодняшний день известно 36 серотипов гликозилированного белка VP7 (G-протеина), из которых 13 обнаружены в человеческих образцах. Наиболее распространены в мире 6 серотипов (G1, G2, G3, G4, G9 и G12) [11]. Для чувствительного к протеиназе белка VP4 (P-протеин) к настоящему времени выявлен 51 P-серотип (16 встречаются в образцах тканей человека) [12]. Всего из клинических образцов выделены 73 G/P-комбинации, однако ва-

рианты генотипов G4[P8], G1[P8], G3[P8], G2[P4], G9[P8] составляют свыше 90% от всех известных [13]. Таким образом, именно они должны использоваться в качестве потенциальных кандидатов при создании эффективной вакцины на основе рекомбинантных белковых элементов.

Рекомбинантные белки РВ VP2, VP4, VP6 и VP7 в различных сочетаниях, полученные с использованием бакуловирусной системы экспрессии, обладают способностью к спонтанной самосборке с образованием ВпЧ. При этом VP2 и VP6 формируют «базовые» структуры, на основе которых возможно образование более сложных 3- и 4-компонентных частиц с участием VP4 и VP7. Конформация рекомбинантных белков в таких структурах близка к нативной, что обуславливает их специфическую иммуногенность, а отсутствие генетического материала исключает инфекционность ВпЧ. Таким образом, подобные частицы могут быть использованы в качестве альтернативных АГ при вакцинации [8, 10].

Цель настоящего исследования – разработать технологию производства ВпЧ на основе белков РВ А VP2, VP6, а также VP4 и VP7 – наиболее представленных на территории Российской Федерации генотипов; дать их молекулярно-генетическую и вирусологическую характеристику.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирулентный штамм РВ А человека Wa G1P[8], адаптированный к культуре клеток MARC-145, который культивировали и очищали по ранее описанной авторами методике [14, 15].

Генно-инженерные конструкции. Синтетический ген, кодирующий кодон-оптимизированную последовательность гена VP6 актуального эпидемического изолята РВ А человека RVA/Human-wt/GR/Ath146/2010/G4P[8] (KC890881 в базе данных GenBank), изготовлен по нашему заказу (ЗАО «Евроген», Россия) и клонирован в трансферную плазмиду для бакуловирусной системы экспрессии pFastBacDual (под промотором полиэдрина) из набора Bac-to-Bac («Invitrogen», США). В ту же плазмиду под промотором p10 клонирован ген белка VP2, слитый с зелёным флуоресцентным белком (eGFP): на основе гена VP2 [16] создана конструкция, представляющая собой его делеционный вариант, в котором вместо удалённых первых 276 нуклеотидов на N-конце вставлена последовательность, кодирующая eGFP [17] и соединённая с VP2 нейтральным спейсером Ser-Arg-Gly-Ser (eGFP-Delta92-VP2). Ген eGFP-Delta92-VP2 был синтезирован по нашему заказу (ЗАО «Евроген»).

Кодирующие белки VP4 и VP7 гены также синтезированы по нашему заказу («Synbio Technologies», США) и клонированы в трансферные плазмиды pFastBacHTa для бакуловирусной системы экспрессии Bac-to-Bac («Invitrogen»). Использованы генотипы (P4, P8, G1, G2, G4, G9) актуальных для России эпидемических изолятов: RVA/Hu-wt/RUS/Novosibirsk/Nov10-N404/P[4]/2010/G2G4P[4]P[8] (KF648975.2

в базе данных GenBank); RVA/Hu-wt/RUS/Novosibirsk/Nov10-N344/2010/G2G4P[8] (JQ613159.2 в GenBank); Human rotavirus A isolate Nov10-N327 (HQ537514.2 в GenBank); Human rotavirus A isolate Hu/RUS/Nov10-N539/2010/G2P[4] (JX110838); RVA/Hu-wt/RUS/Novosibirsk/Nov11-N2735/2011/G4P[8]b (MK060169.1); Hu/RUS/Nov04-H672/2007/G9P[8] (FJ529386.2 в базе данных GenBank). Рекомбинантные бакуловирусы (VP2-GFP/VP6, VP4(P4), VP4(P8), VP7(G1), VP7(G2), VP7(G4), VP7(G9)) получены с помощью системы экспрессии Vac-to-Vac («Invitrogen») по методике производителя с использованием компетентных клеток DH10Vac^o.

Получение и очистка вируса и ВпЧ. Трансфекцию перевиваемой линии клеток кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) Sf-21 осуществляли очищенными препаратами бакмидной ДНК (бак-RVA) с применением катионного липосомного агента Cellfectin («Invitrogen»); для каждой конструкции использовали по 2 клон (посевная концентрация клеток 5×10^5 /мл, 10 мкл бакмиды). После трансфекции проводили ещё 2 пассажа на клетках Sf-21, после чего выполняли коинфекцию перевиваемой клеточной культуры совки (*Trichoplusia ni*), культивируемой на протяжении 7 сут после заражения.

Культуральную жидкость, содержащую вирус или ВпЧ, подвергали низкоскоростному центрифугированию, освобождая от клеток и клеточного дебриса при 1000 об/мин на протяжении 5 мин и при 6000 об/мин 20 мин соответственно (4 °С, ротор Sorval® SS34, «Thermo Scientific»). Полученные осветлённые суспензии наслаивали на 6 мл 25 или 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 °С; центрифуга Optima XE-100, ротор SW 32Ti, «Beckman Coulter», США). Полученные осадки ресуспендировали в буфере TNC и хранили при той же температуре.

Непрямой иммуноферментный анализ (ИФА). Для оценки иммунохимической активности рекомбинантных белков в лунки иммунологического планшета («Greiner», Германия) вносили 0,1 мл клеточного лизата или очищенного препарата в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH = 9,5. Планшет инкубировали 18 ч при 4 °С, после этого удаляли избыток АГ 5-кратной отмывкой ФСБТ (0,01 М фосфатный буфер, 170 mM NaCl, 0,1% твин-20; pH 7,4). Свободные участки пластика блокировали 1% желатином («Gerbu», Германия) в ФСБТ (1 ч при 37 °С), удаляли блокирующий раствор и вносили в лунки 0,1 мл моноклональных антител (МКАТ) к белку VP6 («Ingenasa», Испания) или полигистидиновому фрагменту («Sigma», США) в ФСБТ с добавлением 0,5% бычьего сывороточного альбумина. Далее повторно инкубировали планшет в течение 1 ч при 37 °С, промывали ФСБТ и добавляли в лунки по 0,1 мл раствора меченных пероксидазой АТ к иммуноглобулину IgG мыши («Sigma»). Через 1 ч инкубации при 37 °С планшет отмывали ФСБТ и вносили в лунки 100 мкл суб-

стратного раствора с тетраметилбензидином (ООО «Хема», Россия), после чего инкубировали 15 мин при комнатной температуре (20–25 °С) и останавливали реакцию добавлением 0,1 мл 1 М H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре с вертикальным лучом («Multiskan EX», Thermo, США) при длине волны 450 нм.

Электрофорез. Степень чистоты препаратов оценивали методом электрофореза (ЭФ) белков в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат (лаурилсульфат) натрия (ПААГ-ДСН). Процедуру проводили в пластинах полиакриламидного геля размером 70 × 100 × 0,75 на приборе Mini-PROTEAN II («Bio-Rad», США) в восстанавливающих условиях при постоянном напряжении 200 В.

Иммуноблоттинг. После электрофоретического разделения белки из геля переносили на мембрану Immobilon-P («Millipore», США) на приборе Trans-Blot SD («Bio-Rad») при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 ч при комнатной температуре (20–25 °С). После электропереноса не связавшиеся с белками участки мембраны блокировали 1% желатином («Gerbu») в ФСБТ 1 ч при 37 °С. Далее мембрану отмывали 4 раза ФСБТ и 4 раза – ФСБ (0,01 М фосфатный буфер, 170 mM NaCl; pH 7,4) и инкубировали с МКАТ к белку VP6 («Ingenasa»), АТ к eGFP или полигистидиновому фрагменту («Sigma») на протяжении 1 ч при 37 °С, после чего повторно промывали ФСБТ и инкубировали в таких же условиях. Затем добавляли меченные пероксидазой АТ к иммуноглобулину IgG мыши («Sigma»); мембрану повторно отмывали (по 4 раза последовательно ФСБТ и ФСБ) и окрашивали смесью 3,3'-диаминобензидина и 4-хлоронафта с 0,01% H₂O₂. Окрашивание останавливали промыванием мембраны в воде.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка в растворах определяли с использованием коммерческого набора Micro BCA Protein Assay Kit («Thermo», США).

Электронная микроскопия (ЭМ). 3 мкл препарата с концентрацией 12–30 мг/мл наносили на медную сетку, покрытую углеродной подложкой («Ted Pella») и обработанную в атмосфере тлеющего разряда, инкубировали 30 с при комнатной температуре (20–25 °С). Затем на сетку наносили 1 каплю (50 мкл) 2% раствора ацетата урана, после чего выдерживали 30 с; излишки раствора удаляли с сетки фильтровальной бумагой. Окрашенные сетки хранили в пластиковых контейнерах до использования. Исследование образцов производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 («JEOL», Япония), снабжённом катодом из гексаборида лантана (LaB₆), при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением ×25 000 при помощи ПЗС-камеры Gatan X100 («Gatan», США) с размером матрицы 2000 × 2000 пикселей.

Результаты

Ранее нами изучено генетическое разнообразие РВ А на территории г. Москвы [18] и на основании по-

лученных, а также литературных данных [19] определены наиболее представленные в Центральной части России генотипические варианты с учётом первичной последовательности генов, кодирующих белки VP4 и VP7. Более 90% образцов принадлежали к генотипам G9P[8], G4P[8], G2P[4], G1P[8]. Таким образом, для включения в состав ВпЧ выбраны белки внешнего слоя 6 генотипов (G1, G2, G4, G9, P4, P8), а также VP2 и VP6, необходимые для сборки этих частиц.

В целях создания белковой конструкции VP2/VP6 последовательность соответствующих генов оптимизирована для экспрессии в клетках насекомых, получена синтетическим путём, затем клонирована в соответствующие участки вектора rFastBacDual. Этот вектор, в свою очередь, предназначен для создания рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего одновременно 2 разных клонированных гена. Согласно литературным данным [17] добавление eGFP к VP2 не влияет на способность химерного белка участвовать в формировании ВпЧ; при этом контроль за наращиванием рекомбинантного белка в клеточной культуре значительно облегчается возможностью визуального наблюдения за процессом с помощью флуоресцентного микроскопа в режиме реального времени.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие выбранные генотипы белков VP4 и VP7, также оптимизированы для наработки в клетках насекомых и получены синтетически, затем клонированы в трансферный вектор rFastBacHTa. Особенностью последнего является наличие последовательности полигистидинового фрагмента на участке, кодирующем N-конец белка, с целью возможности очистки продукта методом металлоаффинной хроматографии и детекции с применением специфических антигистидиновых МКАТ. Каждая последовательность клонирована в отдельный трансферный вектор, при помощи которых гены белков РВ А перенесены в бакуловирусный геном. После трансфекции клеток Sf-21 бакмидами, содержащими гены белков VP6 и eGFP-Delta92-VP2, последующий пассаж вируса проводили на клеточной культуре *T. ni* и наблюдали за появлением флуоресценции, сравнивая заражённые бакуловирусом дикого типа и инфицированные eGFP-Delta92-VP2/VP6 клетки. Результаты представлены на рис. 1, а–в.

Кинетику накопления базовых ВпЧ eGFP-Delta92-VP2/VP6 оценивали по характеру флуоресценции на инвертированном микроскопе Olympus («Olympus», Япония) и методом непрямого ИФА с МКАТ к полигистидину. В результате установлено, что максимальное накопление АГ наблюдалось на 2-е сут после заражения. Однако в случаях коинфицирования рекомбинантным бакуловирусом со вставкой VP2/VP6 и 1 или 2 другими (VP4, VP7) происходило значительное снижение количества инфицированных клеток, что могло быть связано с межвирусной интерференцией. Снижение дозы рекомбинантных продуктов со вставкой VP4 и VP7 позволило решить эту проблему и добиться необходимого уровня экспрессии генов, кодирующих VP2/VP6 при коинфицировании, сопоставимого с таковым при моноинфекции (рис. 1, г–и).

В результате оптимизированы следующие варианты коинфекции:

1. VP2/VP6;
2. VP2/VP6 + VP4(P4);
3. VP2/VP6 + VP4(P8);
4. VP2/VP6 + VP7(G1);
5. VP2/VP6 + VP7(G2);
6. VP2/VP6 + VP7(G4);
7. VP2/VP6 + VP7(G9);
8. VP2/VP6 + VP4(P8) + VP7(G1).

После очистки центрифугированием полученных сочетаний рекомбинантных продуктов методом ЭМ показано, что во всех исследованных вариантах формируются ВпЧ: из 2 белков VP2/VP6 (рис. 2, а), из 3 – VP2/VP6 + разные генотипы VP4 или VP7 (рис. 2, б–ж) и из всех 4 белков (рис. 2, з). Все частицы по морфологии и размеру соответствовали вириону РВ А (рис. 2, и). Получены как 2-слойные (рис. 2, а), так и 3-слойные ВпЧ (рис. 2, б–з).

Белковый состав полученных частиц подтверждали методами ИФА и ЭФ в ПААГ-ДСН с последующим иммуноблоттингом. Блот окрашивали АТ к полигистидиновой метке (детекция VP4, VP6, VP7) и к eGFP (детекция VP2) (рис. 3). Молекулярные массы белков соответствовали приведённым в литературе данным [20]. Генотип белков VP4 и VP7 не оказывал существенного влияния на соотношение разных белковых составляющих в соответствующих вирусоподобных структурах.

Содержание ВпЧ в полученных после очистки субстанциях оценивалось по общей концентрации белка. Поскольку по результатам ЭМ более 90% частиц были собраны правильно и не разрушены, общую концентрацию белка можно принять за концентрацию белка в данных структурах. Количества синтезированных ВпЧ, полученных из 1 л культуральной жидкости (при расчёте на 1 мг белка), представлены в таблице (из 1 л культуральной жидкости получено от 24 до 64 мг частиц).

Обсуждение

Проблема разработки новых вакцинных препаратов против РВИ остаётся актуальной, несмотря на наличие на рынке давно используемых вакцин

Количество полученных ВпЧ

Amount of obtained VLP

Состав ВпЧ Composition of VLP	Количество ВпЧ, полученное из 1 л культуральной жидкости, мг белка Amount of VLP obtained from 1 liter of culture media, mg of total protein
VP2/6	53,0
VP2/6 + VP7(G1)	24,9
VP2/6 + VP7(G2)	24,1
VP2/6 + VP7(G4)	32,3
VP2/6 + VP7(G9)	64,4
VP2/6 + VP4(P4)	37,2
VP2/6 + VP4(P8)	58,7
VP2/6 + VP7(G1) + VP4(P8)	58,0

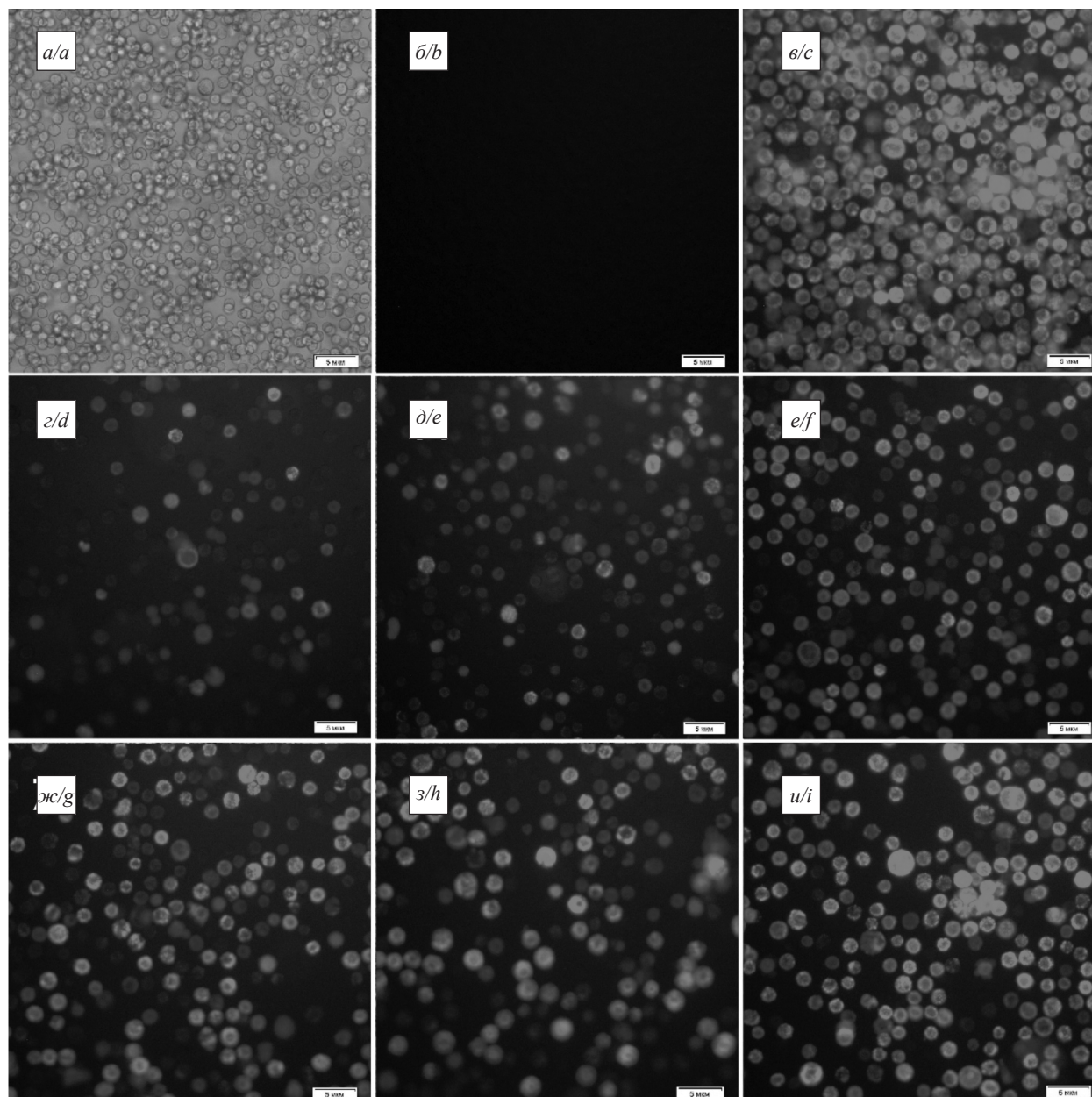


Рис. 1. Заражение бакуловирусом eGFP-Delta92-VP2 суспензионной культуры клеток совки (*T. ni*).

a – культура клеток *T. ni* в проходящем свете; *b* – культура клеток *T. ni*, заражённых бакуловирусом дикого типа, в флуоресцентном поле; *c* – культура клеток *T. ni*, инфицированных бакуловирусом eGFP-Delta92-VP2/VP6, в флуоресцентном поле. Результаты коинфекции культуры клеток насекомых *T. ni* рекомбинантными бакуловирусами с различными вставками в одинаковых (*d–e*) и оптимизированных дозах (*ж–и*): *d, ж* – VP2/VP6+VP7(G1)+VP4(P8); *д, з* – VP2/VP6+VP7; *e, u* – VP2/VP6+VP4. Микрофотографии, увеличение $\times 100$. Длина линии 5 мкм.

Fig. 1. Transfection of Cabbage looper (*T. ni*) cell suspension culture with eGFP-Delta92-VP2 baculovirus.

a – *T. ni* cells, transmitted light microscopy; *b* – *T. ni* cells transfected with wild-type baculovirus, fluorescence microscopy; *c* – *T. ni* cells transfected with eGFP-Delta92-VP2 baculovirus, fluorescence microscopy. Results of *T. ni* cell culture coinfection with different recombinant baculoviruses with the same (*d–f*) and with optimized doses (*g–i*): *d, g* – VP2/VP6+VP7(G1)+VP4(P8); *e, h* – VP2/VP6+VP7; *f, i* – VP2/VP6+VP4. Microphotographs, magnification $\times 100$. The line length is 5 μm .

RotaTeq® и Rotarix®, преквалифицированных ВОЗ 2 вакцин производства Индии, а также ещё 2 препаратов, зарегистрированных на национальном уровне. Все они являются живыми, и по сравнению с ними потенциальная ВпЧ-вакцина обладает рядом преимуществ. РВ А относится к быстро эволюционирующим вирусам, и исполь-

зование подобных вакцинных препаратов позволит более гибко и точно адаптироваться к текущей эпидемиологической ситуации, зависящей от региона и сезона. Кроме того, исключается возможность реассортации с вирулентными полевыми штаммами [10]. В настоящей работе получены вирусоподобные структуры, содержащие белки внешнего слоя вири-

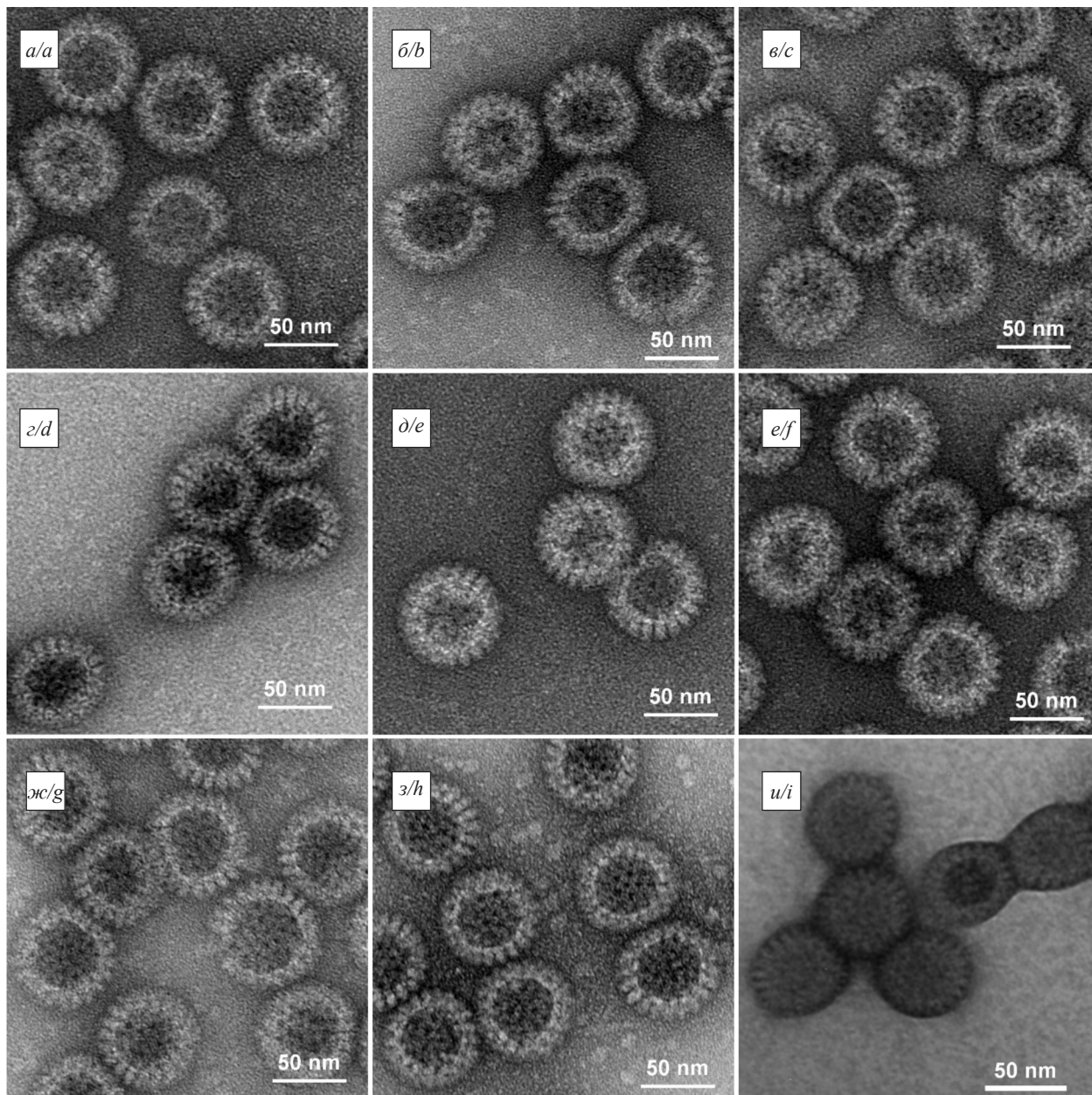


Рис. 2. Вирусоподобные (*a–h*) и вирусные (*i*) частицы ротавируса А (указаны бакуловирусы, которыми были коинфицированы клетки *T. ni*. *a* – VP2/VP6; *b* – VP2/VP6+VP4(P8); *c* – VP2/VP6+VP4(P8); *d* – VP2/VP6+VP7(G1); *e* – VP2/VP6+VP7(G2); *f* – VP2/VP6+VP7(G4); *g* – VP2/VP6+VP7(G9); *h* – VP2/VP6+VP4(P8)+VP7(G1); *i* – ротавирус А. Электронные микрофотографии, увеличение $\times 25\,000$.

Fig 2. Rotavirus A virus-like (*a–h*) and viral (*i*) particles produced in insect cells, coinfecting with 1, 2 or 3 baculoviruses (electron microscopy). *a* – VP2/VP6; *b* – VP2/VP6+VP4(P8); *c* – VP2/VP6+VP4(P8); *d* – VP2/VP6+VP7(G1); *e* – VP2/VP6+VP7(G2); *f* – VP2/VP6+VP7(G4); *g* – VP2/VP6+VP7(G9); *h* – VP2/VP6+VP4(P8)+VP7(G1); *i* – rotavirus A. Electronic microphotographs, magnification $\times 25\,000$.

она наиболее представленная на территории России генотипов: G1, G2, G4, G9, P4, P8.

Производство нереплицирующихся ВпЧ – достаточно известная и разработанная технология. На рынке представлены несколько зарегистрированных вакцин на их основе, ещё несколько препаратов находятся на разных стадиях клинических испытаний [21]. Впервые ВпЧ РВ А получены в конце 1980-х гг. [22]. Для этого использовались различные системы экспрессии: бакуловирусы в клетках и личинках

насекомых; экспрессия в клетках млекопитающих, растений, дрожжей и бактерий [10]. Показано, что для сборки 1-слойных частиц достаточно только белка VP2 [23]. Совместная экспрессия (коэкспрессия) VP2 и VP6 приводит к сборке 2-слойных частиц, полученных и в настоящем исследовании. Белок VP6 обладает высокой иммуногенностью, благодаря чему 2-слойные структуры могут быть использованы для производства вакцин. Тем не менее для лучшей иммуногенности против конкретных вирусных

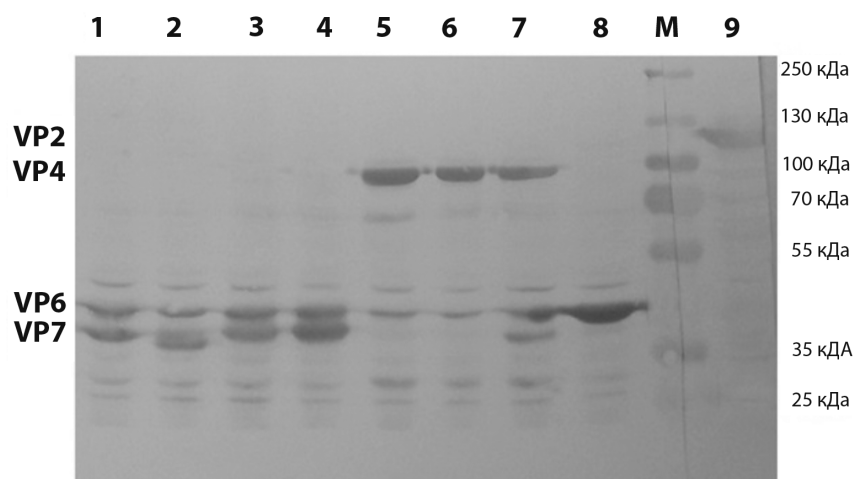


Рис. 3. Контроль наработки рекомбинантных белков при получении ВпЧ методом коинфекции в иммуноблоттинге с антигистидиновыми антителами (1–8) или антителами к eGFP (9).

1–4 – коинфекция культуры клеток *T. ni* бакуловирусами VP2/VP6 и VP7 генотипов G1, G2, G4, G9 соответственно; 5–6 – коинфекция клеток *T. ni* бакуловирусами VP2/VP6 и VP4 генотипов P1, P8 соответственно; 7 – коинфекция клеточной культуры *T. ni* бакуловирусами VP2/VP6, а также VP7(G1) и VP4(P8); 8 – коинфекция культуры клеток *T. ni* бакуловирусом VP2/VP6; M – маркер молекулярной массы Thermo Scientific #26620; 9 – заражение той же культуры бакуловирусом VP2/VP6.

Figure 3. Control of the production of recombinant proteins during VLP synthesis by western blot analysis with anti-histidine antibodies (1–8) and anti-eGFP antibodies (9).

1–4 – coinfection of *T. ni* cell culture with VP2/VP6 and VP7 baculoviruses (genotypes G1, G2, G4, G9 respectively); 5–6 – coinfection of *T. ni* cells with VP2/VP6 and VP4 baculoviruses (genotypes P1, P8 respectively); 7 – coinfection of *T. ni* cell culture with VP2/VP6, VP7(G1) and VP4(P8) baculoviruses; 8 – coinfection of *T. ni* cells with VP2/VP6 baculoviruses; M – Thermo Scientific #26620 molecular weight markers; 9 – transfection of the same cell culture with VP2/VP6 baculovirus.

штаммов ВпЧ должны включать переменные белки внешнего слоя VP4 и VP7. 3-слойные частицы могут быть получены как из 3 (VP2/6 + VP4, VP2/6 + VP7), так и из всех 4 белков [8, 10].

В настоящей работе применялась бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых как наиболее изученная и эффективная для производства ротавирусных ВпЧ. Экспрессия в клетках *T. ni* показала хорошие результаты, сравнимые с таковыми в чаще используемых клеточных культурах Sf9 и H5 [10]. Для сборки «базовых» 2-слойных частиц клетки трансфицировали рекомбинантным бакуловирусом, содержащим оба гена, причём белок VP6, необходимый для сборки в большем количестве [24], клонирован под более сильным полиэдриновым промотором, а белок VP2 – под промотором p10. Белки внешнего слоя клонированы каждый в отдельную бакмиду; помещение VP4 и VP7 в одну конструкцию, подобно тому как было выполнено в некоторых работах [20], не использовали. 3-слойные ВпЧ получены как из 3 белков (коинфекция 2 бакуловирусами), так и из 4 (заражение 3 бакуловирусами). В обеих схемах они обладали правильной морфологией и содержали все необходимые белки. Был выбран вариант с использованием ВпЧ из 3 белков, поскольку в этом случае проще оптимизировать стадию коинфекции 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 со-

отношении. Смесь 6 различных ВпЧ может быть использована для определения иммуногенности в опыте *in vivo*, а при положительном его результате – для производства вакцины.

Рассмотренный метод очистки ВпЧ (центрифугирование в растворе сахарозы) часто используется для этой цели; чистоты препарата, полученного этим способом, достаточно для проверки иммуногенности на животных моделях. При необходимости более тщательной очистки данных структур от белков клеток насекомых и других неродственных примесей возможно применение хроматографических методик, разработанных для очистки ВпЧ, в том числе ротавирусных [25]. Основные методы контроля полученных частиц – электронная микроскопия, ИФА, электрофорез в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг – также использованы в большинстве работ [10, 26].

Иммуногенные свойства ротавирусных ВпЧ показаны ранее в ряде исследований при разных способах их введения (внутримышечный, ректальный, назальный, внутрибрюшинный, оральный) как с адъювантами, так и без них. Несмотря на то что ни одна потенциальная ВпЧ-вакцина против РВИ не была тестирована на людях, иммуногенность, эффективность и безопасность этих препаратов продемонстрированы на животных моделях с использованием мышей, кроликов и поросят-гнотобионтов [9, 27–29].

Заключение

В результате выполненной работы получены 7 рекомбинантных бакуловирусов, содержащих оптими-

зированные для экспрессии в клетках насекомых последовательности генов РВ А VP2, VP6 а также 6 генотипов VP4 и VP7 (G1, G2, G4, G9, P4, P8), наиболее представленных на территории России. Разработана и оптимизирована технология получения 3-слойных ВпЧ, состоящих из 3 белков, в клетках *T. ni* с последующей очисткой путём центрифугирования в растворе сахарозы. Полученные частицы по размеру и морфологии соответствуют вириону РВ А, по результатам ИФА и иммуноблоттинга содержат все экспрессированные белковые структуры. Комбинация из 6 субстанций ВпЧ, содержащая вариабельные белки внешнего слоя 6 различных генотипов данного вируса, может быть использована для изучения иммуногенности *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

- Crawford S.E., Ramani S., Tate J.E., Parashar U.D., Svensson L., Hagbom M., et al. Rotavirus infection HHS Public Access. *JAMA Pediatrics*. 2018; 172(Suppl. 3): 50–3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>. Rotavirus.
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». Москва; 2019. Available at: <https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf> (accessed January 28, 2021).
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». Москва; 2020. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf (accessed January 28, 2021).
- Burke R.M., Tate J.E., Kirkwood C.D., Steele A.D., Parashar U.D. Current and new rotavirus vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2019; 32(5): 435–44. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000572>.
- Wang Y., Li J., Liu P., Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 1–17. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>.
- Yen C., Healy K., Tate J.E., Parashar U.D., Bines J., Neuzil K., et al. Rotavirus vaccination and intussusception – Science, surveillance, and safety: A review of evidence and recommendations for future research priorities in low- and middle-income countries. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(10): 2580–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1197452>.
- Perez N. Rotavirus gastroenteritis: why to back up the development of new vaccines? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 31(2-3): 253–69. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.07.005>.
- Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Burroughs M.H., Zhou Y.J., Estes M.K. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 1994; 68(9): 5945–52. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.9.5945-5952.1994>.
- Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev. Vaccines*. 2013; 12(2): 169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>.
- Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>.
- Doro R., Laszlo B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 446–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>.
- Matthijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Estes M.K., Gentsch J.R., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>.
- Matthijnsens J., Bilcke J., Ciarlet M., Martella V., Banyai K., Rahman M., et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4(10): 1303–16. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.96>.
- Хаметова К.М., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Костина Л.В., Раев С.А., Мусиенко М.И., и др. Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(1): 16–22. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22>.
- Латышев О.Е., Елисеева О.В., Костина Л.В., Алексеев К.П., Хаметова К.М., Алтаева Е.Г., и др. Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(4): 156–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164>.
- Kumar A., Charpilienne A., Cohen J. Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(5): 2126. <https://doi.org/10.1093/nar/17.5.2126>.
- Charpilienne A., Nejmeddine M., Berois M., Perez N., Neumann E., Hewat E., et al. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(31): 29361–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101935200>.
- Ivashechkin A.A., Yuzhakov A.G., Grebennikova T.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Y., Kisteneva L.B., et al. Genetic diversity of group A rotaviruses in Moscow in 2018–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(3): 691–702. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04534-5>.
- Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus A strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>.
- Jere K.C., O'Neill H.G., Potgieter A.C., Van Dijk A.A. Chimaeric virus-like particles derived from consensus genome sequences of human rotavirus strains co-circulating in Africa. *PLoS One*. 2014; 9(9): e105167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105167>.
- Donaldson B., Lateef Z., Walker G.F., Young S.L., Ward V.K. Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Rev. Vaccines*. 2018; 17(9): 833–49. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1516552>.
- Estes M.K., Crawford S.E., Penaranda M.E., Petrie B.L., Burns J.W., Chan W.K., et al. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J. Virol.* 1987; 61(5): 1488–94. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.5.1488-1494.1987>.
- Labbe M., Charpilienne A., Crawford S.E., Estes M.K., Cohen J. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 1991; 65(6): 2946–52. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.2946-2952.1991>.
- Vieira H.L.A., Estevo C., Roldao A., Peixoto C.C., Sousa M.F.Q., Cruz P.E., et al. Triple layered rotavirus VLP production: Kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J. Biotechnol.* 2005; 120(1): 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.026>.
- Vicente T., Sousa M.F.Q., Peixoto C., Alves P.M., Mota J.P., Carondo M.J.T. Anion-exchange membrane chromatography for purification of rotavirus-like particles. *J. Memb. Sci.* 2008; 311(1–2): 270–83. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.12.021>.
- Kim Y., Chang K., Kim W., Saif L.J. Production of hybrid double- or triple-layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system. *Virology*. 2002; 302(1): 1–8. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1610>.
- O'Neal C.M., Crawford S.E., Estes M.K., Conner M.E. Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J. Virol.* 1997; 71(11): 8707–17. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8707-8717.1997>.
- Ciarlet M., Crawford S.E., Barone C., Bertolotti-Ciarlet A., Ramig R.F., Estes M.K., et al. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *J. Virol.* 1998; 72(11): 9233–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.9233-9246.1998>.
- Gonzalez A.M., Azevedo M.S.P., Jung K., Vlasova A., Zhang W., Saif L.J. Innate immune responses to human rotavirus in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *Immunology*. 2010; 131(2): 242–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03298.x>.

REFERENCES

- Crawford S.E., Ramani S., Tate J.E., Parashar U.D., Svensson L., Hagbom M., et al. Rotavirus infection HHS Public Access. *JAMA Pediatrics*. 2018; 172(Suppl. 3): 50–3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>. Rotavirus.

2. State report «On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2018». Moscow; 2019 (in Russian). Available at: <https://www.rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitar-no-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf> (accessed January 28, 2021).
3. State report «On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019». Moscow; 2020 (in Russian). Available at: https://www.rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf (accessed January 28, 2021).
4. Burke R.M., Tate J.E., Kirkwood C.D., Steele A.D., Parashar U.D. Current and new rotavirus vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2019; 32(5): 435–44. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000572>.
5. Wang Y., Li J., Liu P., Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 1–17. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>.
6. Yen C., Healy K., Tate J.E., Parashar U.D., Bines J., Neuzil K., et al. Rotavirus vaccination and intussusception – Science, surveillance, and safety: A review of evidence and recommendations for future research priorities in low- and middle-income countries. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(10): 2580–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1197452>.
7. Parez N. Rotavirus gastroenteritis: why to back up the development of new vaccines? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 31(2-3): 253–69. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.07.005>.
8. Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Burroughs M.H., Zhou Y.J., Estes M.K. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 1994; 68(9): 5945–52. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.9.5945-5952.1994>.
9. Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev. Vaccines.* 2013; 12(2): 169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>.
10. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>.
11. Doro R., Laszlo B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 446–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>.
12. Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Estes M.K., Gentsch J.R., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>.
13. Matthijnssens J., Bilcke J., Ciarlet M., Martella V., Banyai K., Rahman M., et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4(10): 1303–16. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.96>.
14. Khametova K.M., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Raev S.A., Musienko M.I., et al. Evaluation of the molecular-biological properties of human rotavirus A strain Wa [Molekulyarno-biologicheskiye svoystva klonirovannogo shtamma Wa rotavirusa A cheloveka]. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(1): 16–22. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22> (in Russian).
15. Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Kostina L.V., Alekseev K.P., Khametova K.M., Altaeva E.G., et al. Assessment of immunogenic activity of the cloned human rotavirus A Wa strain [Otsenka immunogennoy aktivnosti klonirovannogo shtamma WA rotavirusa A cheloveka]. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(4): 156–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164> (in Russian).
16. Kumar A., Charpilienne A., Cohen J. Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(5): 2126. <https://doi.org/10.1093/nar/17.5.2126>.
17. Charpilienne A., Nejmeddine M., Berois M., Parez N., Neumann E., Hewat E., et al. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(31): 29361–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101935200>.
18. Ivashchkin A.A., Yuzhakov A.G., Grebennikova T.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Y., Kisteneva L.B., et al. Genetic diversity of group A rotaviruses in Moscow in 2018–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(3): 691–702. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04534-5>.
19. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus A strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virolog. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>.
20. Jere K.C., O'Neill H.G., Potgieter A.C., Van Dijk A.A. Chimaeric virus-like particles derived from consensus genome sequences of human rotavirus strains co-circulating in Africa. *PLoS One.* 2014; 9(9): e105167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105167>.
21. Donaldson B., Lateef Z., Walker G.F., Young S.L., Ward V.K. Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Rev. Vaccines.* 2018; 17(9): 833–49. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1516552>.
22. Estes M.K., Crawford S.E., Penaranda M.E., Petrie B.L., Burns J.W., Chan W.K., et al. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J. Virol.* 1987; 61(5): 1488–94. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.5.1488-1494.1987>.
23. Labbe M., Charpilienne A., Crawford S.E., Estes M.K., Cohen J. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 1991; 65(6): 2946–52. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.2946-2952.1991>.
24. Vieira H.L.A., Estevas C., Roldao A., Peixoto C.C., Sousa M.F.Q., Cruz P.E., et al. Triple layered rotavirus VLP production: Kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J. Biotechnol.* 2005; 120(1): 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.026>.
25. Vicente T., Sousa M.F.Q., Peixoto C., Alves P.M., Mota J.P., Carondo M.J.T. Anion-exchange membrane chromatography for purification of rotavirus-like particles. *J. Memb. Sci.* 2008; 311(1–2): 270–83. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.12.021>.
26. Kim Y., Chang K., Kim W., Saif L.J. Production of hybrid double- or triple-layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system. *Virology.* 2002; 302(1): 1–8. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1610>.
27. O'Neal C.M., Crawford S.E., Estes M.K., Conner M.E. Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J. Virol.* 1997; 71(11): 8707–17. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8707-8717.1997>.
28. Ciarlet M., Crawford S.E., Barone C., Bertolotti-Ciarlet A., Ramig R.F., Estes M.K., et al. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *J. Virol.* 1998; 72(11): 9233–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.9233-9246.1998>.
29. Gonzalez A.M., Azevedo M.S.P., Jung K., Vlasova A., Zhang W., Saif L.J. Innate immune responses to human rotavirus in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *Immunology.* 2010; 131(2): 242–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03298.x>.