

## ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЕ

**Красочко П.П.**, д.б.н., доцент УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

**Бычкова Т.К.**, к.б.н., доцент ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, г. Смоленск, Россия

**Колесникович К.В.**, м.в.н., аспирант УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

***Аннотация.** Изучены основные принципы конструирования рекомбинантных противовирусных вакцин и их использование в ветеринарной медицине. Установлено, что по сравнению с обычными вакцинами рекомбинантные вакцины безопасны для введения, не реплицируются, просты в производстве, экономичны и не имеют вредного воздействия из-за нежелательных антигенных материалов.*

***Ключевые слова:** вакцина, рекомбинантный, белок, вирус, крупный рогатый скот.*

### Введение

В структуре заболеваний крупного рогатого скота инфекции молодняка вирусной этиологии занимают одно из ведущих мест. В этиологической структуре инфекционных заболеваний телят существенное значение играют такие возбудители, как инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3, респираторно-синцитиальный, рота- и коронавирусы [1].

Применение антибиотиков для лечения данной группы заболеваний слабоэффективно, так как, они не воздействуют на вирусы и уничтожают как патогенную, так и нормофлору кишечника, что приводит к дисбактериозам.

Наиболее эффективным направлением для профилактики инфекционных болезней является вакцинация [2].

Одним из наиболее важных и ответственных этапов при изготовлении вакцин является накопление вирусов. Однако не все вирусы накапливаются в высоких титрах в культуре клеток. Так, если вирусы инфекционного ринотрахеита, диареи и ротавирусы могут накапливаться до титра 7,5-8,5 lg ТЦД 50/мл, что достаточно для изготовления вакцин, то репродукция таких вирусов, как вирус парагриппа-3, респираторно-синцитиальный и коронавирус не всегда высокая и после культивирования их титр часто не достигает и 4,5 lg ТЦД 50/мл, что требует концентрирования вирусосодержащего материала для получения высокоактивной вакцины.

В этой связи для повышения накопления вирусов в последние годы используются генно-инженерные технологии [7]. Генно-инженерные (рекомбинантные) вакцины получают путем введения генов, кодирующих основные антигены патогенов вирусов в геном микроорганизмов-реципиентов. В качестве реципиентов при создании рекомбинантных штаммов чаще всего используют кишечную палочку, дрожжевые клетки, вирусы осповакцины и вирусы насекомых.

Создание подобных вакцин началось в 70-е годы прошлого века. Ярким представителем генно-инженерной (рекомбинантной) вакцины является антирабическая рекомбинантная вирус-вакцина для пероральной иммунизации диких плотоядных животных «Raboral» разработанная французскими учеными [8]. В качестве вектора-носителя для внедрения чужеродного гена был выбран вирус оспы коров (штамм «Копенгаген»), в который внедрили копию ДНК, кодирующую гликопротеин вирусной оболочки (gpG) вируса бешенства ERA. В результате была получена антирабическая живая рекомбинантная вакцина с названием VRG (The vaccinia-rabies glycoprotein).

По сравнению с обычными вакцинами рекомбинантные вакцины безопасны для введения, не реплицируются, просты в производстве, экономичны и не имеют вредного воздействия из-за нежелательных антигенных материалов [4]. Их можно получить путем выделения антигенного белка (белков) из любого инфекционного организма после его разрушения. Этот тип стратегии широко распространен в вакцинах против вирусных субъединиц, называемых сплит-вакцинами. Поскольку субъединичные вакцины вызывают меньший иммунитет по сравнению с цельными бактериями или вирусной вакциной, их используют с подходящим адьювантом. Примеры таких включают субъединичную вакцину против вируса ньюкаслской болезни (NDV) с использованием гена гемагглютинин-нейраминидазы (HN), субъединичную вакцину против вируса ящура с использованием гена VP-1, субъединичную вакцину против цирковируса свиней типа 2 (PCV-2) на основе открытой рамки считывания-2 (коммерциализирована) и субъединичная вакцина против японского энцефалита на основе белка оболочки rгM и E.

Применение рекомбинантных вакцин позволяет повысить эффективность вакцинации за счет снижения заболеваемости, падежа и выбраковки молодняка, затрат на антибиотики (на 20-25%) и на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий (на 15-20%) и получать значительный экономический эффект [5].

Целью исследования явилось изучение основных принципов конструирования рекомбинантных противовирусных вакцин и их использование в ветеринарной медицине.

#### Материалы и методы

Исследования проводились в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО ВГАВМ.

При анализе принципов конструирования рекомбинантных противовирусных вакцин использовали отечественные и зарубежные литературные источники.

#### Результаты исследований

Важным условием получения эффективного вакцинного препарата является соблюдение основных принципов его производства. Конструирование рекомбинантных противовирусных вакцин предполагает: 1) получение соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты; 2) выбор высокоактивной и хорошо изученной в иммунологическом отношении модели вектора-носителя и клонирование соответствующего гена; 3) выбор системы экспрессии клонированного гена, способной обеспечить максимальный выход и функциональную полноценность продукта; 4) создание достаточно удобных и по возможности универсальных векторов для целевой доставки генов в клетки и ткани организма.

Фрагменты ДНК для встраивания в вектор можно получить непосредственно из хромосомной ДНК, расщепив ее рестриктазами или разрушив с помощью ультразвука на сегменты с примерно одинаковой длиной. Выделение генов с помощью "вырезания" из генома, как правило, состоит из четырех этапов: 1) получение клонотеки фрагментов генома; 2) выявление фрагментов генома, содержащих необходимый ген, и точная локализация гена в данном фрагменте; 3) вырезание гена из фрагмента(ов) с помощью рестриктаз и сшивка участков гена с помощью ДНК-лигазы фага Т4, если эти участки получены из различных фрагментов; 4) амплификация гена в составе векторной молекулы.

Под понятием "вектор" понимается молекула нуклеиновой кислоты, способная после введения в клетку к автономному существованию за счет наличия в ней сигналов репликации и транскрипции.

Выбор высокоактивной и хорошо изученной в иммунологическом отношении модели вектора-носителя и клонирование соответствующего гена заключается во встраивании фрагментов ДНК в так называемые векторные молекулы ДНК - плазмидные или вирусные ДНК, которые могут быть перенесены в клетки про- или эукариот и автономно реплицироваться [3]. Получение рекомбинантных РНК обычно осуществляют методами ферментативного или химического лигирования РНК, встраивания сегмента РНК в заданное положение других молекул РНК с помощью рибозимов.

При выборе системы экспрессии клонированного гена, способной обеспечить максимальный выход и функциональную полноценность продукта используют бактериальные или дрожжевые культуры клеток, а также системы экспрессии на основе эукариотических клеток. Из бактериальных клеток наиболее изученной в молекулярно-генетическом отношении является грамотрицательная бактерия *Escherichia coli*, поэтому для нее можно с наибольшей определенностью планировать генно-инженерные конструкции. Также возможно конструирование методами генной инженерии штаммов-продуцентов на основе клеток *Bacillus subtilis*.

Данная почвенная бактерия безопасна для человека и животных и прекрасно освоена микробиологической промышленностью. Среди эукариотических микроорганизмов наиболее изученным является низший эукариот *Saccharomyces cerevisiae*. Одно из преимуществ *S. cerevisiae* как экспериментальной системы - простота и надежность ее генетического анализа. С появлением геной инженерии внимание многих исследователей также привлекла система культивируемых клеток животных.

При конструировании рекомбинантных противовирусных вакцин немаловажное значение имеет создание специального вектора-носителя, обеспечивающего адресную доставку генов и их защиту от действия нуклеаз крови [6]. В настоящее время создана векторная модель для доставки в клетки костного мозга гена, кодирующего гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (чГ-КСФ) и модель молекулярного вектора на основе гена, кодирующего гибридный белок: фактор некроза опухоли-альфа-интерферон-гамма [2].

Таким образом создание и использование рекомбинантных противовирусных вакцинных препаратов является новым и перспективным направлением ветеринарной медицины.

#### Заключение

Создание и использование рекомбинантных противовирусных вакцинных препаратов является новым и перспективным направлением ветеринарной медицины, т. к. позволяет повысить эффективность вакцинации за счет снижения заболеваемости, падежа и выбраковки молодняка, затрат на антибиотики (на 20-25%) и на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий (на 15-20%) и получать значительный экономический эффект [5].

#### Список литературы:

1. Ветеринарные и технологические мероприятия при содержании крупного рогатого скота: монография / П.А. Красочко [и др.]; под общ. ред. П. А. Красочко. Смоленск: «Универсум», 2016. 508 с.
2. Молекулярный вектор для доставки генов в клетки-мишени / Л.Р. Лебедев [и др.] // Биотехнология. 2001. №1. С. 3-12.
3. Юров Г.К., Народицкий Б.С., Юров К.П. Конструирование и использование ДНК-вакцин // Ветеринария. 1998. №12. С. 25-27.
4. Кугелев И.М., Комисарова В.С. Система ветеринарно-санитарной экспертизы на фермерском рынке в Г. Смоленске // Современные цифровые технологии в агропромышленном комплексе : Сборник материалов международной научной конференции. В трех томах. Смоленск: Смоленская государственная сельскохозяйственная академия, 2020. С. 87-91.
5. Машаров Ю.В. Практико-ориентированный подход в подготовке специалистов по образовательным программам высшего образования 36.00.00 ветеринария и зоотехния в современных условиях научно-технологического развития агропромышленного комплекса Смоленской области // Перспективы

научно-технологического развития агропромышленного комплекса России : сборник материалов международной научной конференции. Смоленск: Смоленская государственная сельскохозяйственная академия, 2019. С. 299-302.

6. Иммуный ответ у коров при иммунизации против инфекционного ринотрахеита в зависимости от серологического статуса животных в стадах / П. П. Красочко, Е. И. Ярыгина, Я. П. Яромчик [и др.] // Ветеринарна медицина. 2016. №102. С. 290-294.

7. Определение оптимальной иммунизирующей дозы поливалентной вирус-вакцины против вирусных пневмоэнтеритов "Большевак" / П.А. Красочко, М.А. Понаськов, Л.С. Кашко, И.М. Кугелев // Тенденции повышения конкурентоспособности и экспортного потенциала продукции агропромышленного комплекса. Смоленск: ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, 2021. С. 121-130.

8. Gay C.G. Genomics and vaccine development // Rev. Sci. Tech. 2007. Vol. 26. №1. P. 49-67.

9. Jorge S. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches // Biotechnol. Res. Innov. 2017. Vol. 1. P. 6-13.

10. McVey S. Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology // Vet. Clin. North. Am Small Anim. Pract. 2010. Vol. 40. №3. P. 81-92.

11. Van Kampen K.R. Recombinant vaccine technology in veterinary medicine // Vet. Clin. North. Am Small Anim. Pract. 2001. Vol. 31. №3. P. 5-8.

12. Yang D.K. The present and future of rabies vaccine in animals // Clin. Exp. Vaccine Res. 2013. Vol. 2. P. 19-25.