

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ ГОРНОЙ ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**

Диссертационный совет Д 03.23.680

На правах рукописи
УДК 619:615.375:578.821.21:577.112.6-083

Тайлакова Эльмира Талгатовна

**РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОСПЫ ОВЕЦ НА ОСНОВЕ
ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК**

03.01.06 – биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

БИШКЕК – 2024

Диссертационная работа выполнена в Институте биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики и в Республиканском государственном предприятии «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

Научный руководитель: **Жунушов Асанкадыр Темирбекович**
доктор ветеринарных наук, профессор, академик Национальной академии наук Кыргызской Республики, директор Института биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики

Официальные оппоненты: **Серда Алексей Дмитриевич**
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории Геномики вирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», Российская Федерация, Владимирская обл., пос. Вольгинский.

Ведущая организация: **Чекиров Кадырбай Бекбалаевич**
кандидат биологических наук, заведующий биологического отдела, факультета естественных наук Кыргызско-Турецкого университета «Манас», Кыргызская Республика
Некоммерческое акционерное общество «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина», факультет ветеринарии и технологии животноводства, кафедра микробиологии и биотехнологии (Республика Казахстан, г. Астана, пр. Женис, 62).

Защита диссертации состоится «19» апреля 2024 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 03.23.680 по защите диссертаций на соискание ученой степени (доктора) кандидата биологических наук при Институте биотехнологии и Институте горной физиологии и медицины Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: 720071, г. Бишкек, пр. Чуй, 265, 303 ауд. Ссылка онлайн видеоконференции защиты диссертации: <https://vc.vak.kg/b/032-kpg-yve-qhh>.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национальной академии наук Кыргызской Республики, по адресу: 720071, г. Бишкек, пр. Чуй, 265а и на сайте https://vak.kg/d_03_23_680/111151/

Автореферат разослан «12» марта 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А. А. Казыбекова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Оспа овец, возбудителем которой является *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae*, имеет довольно широкий географический ареал распространения и является постоянной угрозой овцеводству многих стран, нанося ощутимый экономический ущерб этому сектору национальной экономики во время эпизоотий. Заболевание распространено по всей Юго-Восточной и Центральной Азии, на Индийском полуострове, а также в северной и центральной Африке. Несмотря на относительную стабилизацию эпизоотической ситуации в последние годы, существует высокий риск заноса и распространения инфекции на территорию Республики Казахстан со стороны приграничных республик [Weekly Disease Information, 2016, <https://wahis.woah.org/#/event-management>]. По данным Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ) оспа овец внесена в список особо опасных болезней животных [В. Н. Сюрин, 2001]. Для профилактики оспы овец разработаны как инактивированные, так и живые вакцины. Как показывают исследования ученых разных стран, инактивированные вакцины дают непродолжительный иммунитет, имеют высокую себестоимость и ряд других существенных недостатков [I. J. Prasad, 1973; M. P. Yadav, 1986]. Живые вакцины, разработанные на основе аттенуированных штаммов вируса оспы овец, создают у овец иммунитет продолжительностью не менее одного года [В. В. Гуненков, 1993; Ф. П. Курченко, 1991]. Живые вакцины сохраняют риск остаточной вирулентности и реверсии патогенности дикого типа, а также являются источником контаминации окружающей среды. Рекомбинантные вакцины лишены ряда существенных недостатков классической инактивированной вакцины и могут быть использованы без ограничений в отличие от живых аттенуированных вакцин. Главным преимуществом данного типа вакцин является их низкая реактогенность и отсутствие живого вируса. В ранних исследованиях для представителей рода *Capripoxvirus* в серологических реакциях было выявлено как минимум 12 иммуногенных белков [Y. P. S. Malik, 2010; D. S. Sambyal, 1978]. Экспериментально была доказана иммуногенность и протективность растворимых антигенов [H. G. Hein, 1999]. Однако на сегодняшний день из них идентифицированы лишь некоторые [V. Bhanot, 2009]. Также показана возможность использования рекомбинантных белков каприпоксвирусов A4 (P17), A12, A27 (P18) в диагностических тестах [Е. С. Орлова, 2006].

Сложная структура и большое количество белков в вирионе затрудняют идентификацию иммуногенных белков поксвирусов. Иммуногенные и протективные свойства белков поксвирусов наиболее изучены для представителей рода *Orthopoxvirus*: вирусы коровьей и

натуральной оспы, на основе которых проводятся исследования по разработке рекомбинантных вакцин [J. W. Hooper, 2003; C. Fogg, 2006; A. Verhanu, 2008]. В Республиканском государственном предприятии «Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности» Республики Казахстан (НИИПББ РК) были проведены исследования по изучению вируса оспы овец. В результате чего определена первичная структура генома вакцинных и вирулентных штаммов вируса оспы овец [E. R. Tulman, 2002]; отработан метод рестрикционного анализа для дифференциации штаммов этого возбудителя, подобраны оптимальные условия постановки ПЦР при идентификации оспы овец из различных вирусосодержащих материалов [N. T. Sandybayev, 2003]. В рамках программы Ц.0382 «Разработка современных технологий для формирования кластера по биотехнологии в Республике Казахстан на 2006-2008 годы» сотрудниками НИИПББ были проведены работы по получению рекомбинантных ДНК, экспрессирующих белок А33 вируса оспы овец.

В настоящее время исследования по созданию вакцин нового поколения против поксвирусов являются весьма актуальной задачей для сельского хозяйства Казахстана и сопредельных государств, где основу животноводства составляет овцеводство. На фоне воздействия различных экологических и техногенных факторов не исключено появление новых вариантов возбудителей опасных инфекционных заболеваний и особенно вирусной этиологии. Признаки такого воздействия уже проявляются в изменении антигенных свойств и патогенности ряда вирусов, а также формы течения самого заболевания. Использование в подобных случаях молекулярно-биологических и генно-инженерных методов диагностики и профилактики возбудителей позволяет избежать стратегических ошибок в выявлении инфекции и устранении ее тяжелых последствий.

Связь темы диссертации с научными программами (проектами) и основными научно-исследовательскими работами. Диссертационная работа выполнена в Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности Республики Казахстан в рамках республиканского научного гранта № государственной регистрации 0115РК01983 «Рекомбинантная вакцина для профилактики оспы овец» на 2015-2017 гг.

Цель исследования. Разработка рекомбинантной вакцины для профилактики оспы овец на основе бактериально-экспрессированных вирусных белков.

Задачи исследования:

1. Конструирование рекомбинантных плазмид, экспрессия генов и очистка рекомбинантных белков вируса оспы овец.

2. Изучить иммуногенные и антигенные свойства рекомбинантных белков вируса оспы овец.

3. Разработать технологию изготовления вакцины на основе рекомбинантных вирусных белков.

4. Изучить безвредность, иммуногенность, протективность и сохраняемость образцов рекомбинантной вакцины против оспы овец.

Научная новизна работы

Используя современные методы молекулярной биологии и геной инженерии, были получены бактериально-экспрессированные рекомбинантные белки вируса оспы овец SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122(A33) и SPPV141 (B5). Установлено, что SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33) и SPPV141 (B5) индуцируют выработку вируснейтрализующих антител в организме животных. Разработана технология получения рекомбинантной вакцины. Получена рекомбинантная гидроокисьалюминиевая вакцина на основе вирусных белков SPPV060 (L1), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33). Изучены безвредность и сохраняемость рекомбинантной вакцины. Изучены иммуногенная эффективность и протективность рекомбинантной вакцины.

В результате исследований получен патент на изобретение под номером № 32951, выданное Республиканским государственным предприятием «Национальный институт интеллектуальной собственности» Министерство юстиции Республики Казахстан.

Практическая значимость полученных результатов

В результате проведенных исследований с использованием технологии рекомбинантных ДНК разработана безопасная, иммуногенная и эффективная вакцина против вируса оспы овец.

На основании проведенных исследований для ветеринарной биопромышленности разработаны следующие нормативно-технические документы (НТД) на технологию изготовления рекомбинантной вакцины: стандарт организации на рекомбинантную вакцину для профилактики оспы овец [СТ 405-1919-04 ГП-099–2017], инструкция по изготовлению и контролю рекомбинантной вакцины для профилактики оспы овец, наставление по применению рекомбинантной вакцины против оспы овец.

Представляющаяся для практического применения НТД одобрена ученым советом НИИПББ и утвержден 23 октября 2017 года генеральным директором института.

Также получены акты комиссионных испытаний 65/09-06 от 24.07.17 и 66/09-06 от 01.08.17 и внедрения результатов научно-исследовательской (диссертационной) работы в производственную деятельность.

Разработанная рекомбинантная вакцина может быть использована в ветеринарии как безопасное средство профилактики оспы овец. Также полученные в результате исследований бактериально-экспрессированные рекомбинантные белки оспы овец могут быть использованы в производстве диагностических средств.

Экономическая значимость полученных результатов. Работа значима и направлена на сохранение здоровья домашних и диких животных. Вакцинация животных защитит животноводческие хозяйства от убытков, исключит передачи возбудителя инфекции от домашних животных в популяции диких животных, что благоприятно скажется на сохранении биологического разнообразия и жизнестойкость экологических систем. Также на предупреждение вспышек заболевания животных оспой, которые влияют на развитие животноводства, биологическое разнообразие, на обеспечение продовольственной безопасности и питания.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Рекомбинантные плазмидные ДНК обеспечивают экспрессию генов в результате которого образуются рекомбинантные белки вируса оспы овец, обладающие иммуногенными и антигенными свойствами.

2. Разработанная технология производства рекомбинантной вакцины, включающая контрольные точки при производстве и готового препарата, позволяет изготавливать стандартизированный иммунобиологический препарат.

3. Рекомбинантная вакцина обеспечивает выработку иммунного ответа и эффективна после четырехкратного введения.

Личный вклад соискателя. Все разделы работы выполнены при личном участии автора.

Апробация результатов исследований. Основные результаты работы доложены и обсуждены на: международной научно-практической конференции посвященной 80-летию Заслуженного ученого, профессора В. Л. Зайцева “Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности”, (Алматы, 2015); II международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2015); XXI International Poxvirus Asfarvirus and Iridovirus Conference, (Strasbourg, 2016), международном симпозиуме “Астана Биотех” (Астана, 2018), XXII International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference (Taiwan, 2018), международной научно-практической конференции «Биотехнология и биологическая безопасность: достижения и перспективы развития», посвященной 65-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (Алматы, 2023).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. Основные положения диссертации отражены в 5 научных работах, из них 1 статья в рецензируемом издании, индексируемом в базе данных “Web of science” 1 статья в журнале индексируемом в РИНЦ с импакт-фактором не менее 0,1, 2 статьи 2 статьи опубликованы в научных периодических изданиях которые входят в перечень рецензируемых научных изданий, утвержденных Президиумом Национальной аттестационной комиссии при Президенте Кыргызской Республики (НАК ПКР), а также получено авторское свидетельство на изобретение №32951 Республики Казахстан.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 159 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов экспериментальных исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических предложений, списка использованной литературы из 218 наименования и 4 приложений. Работа иллюстрирована 11 таблицами, 22 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении представлены актуальность проведенной работы, цель и задачи исследований, научная новизна, ее экономическая и практическая значимость, основные положения защищаемой диссертации, апробация результатов исследований.

В главе 1 «Обзор литературы» представлены результаты анализа литературных данных по тематике диссертационной работы. Дано описание исторических данных, общая характеристика оспы овец, эпизоотическая ситуация в мире по оспе овец, данные по профилактике и диагностике при оспе овец, сведения об антигенных белках оспы овец и систем экспрессии генов образующих рекомбинантные белки.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» представлены данные описывающие объект исследования и основные методы, использованные в ходе выполнения данной работы.

Объектами исследования являлись вирус оспы овец штамм «НИСХИ», рекомбинантные белки вируса оспы овец. При проведении отдельных этапов исследований использовались вирус экстремелии штамм EVC_02, эпизоотический вирус оспы овец, штамм «А», полученные из коллекции микроорганизмов Республиканского Государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Республики Казахстан (РГП НИИПББ РК), вирус оспы овец rSPPV(ТК-)EGFP полученный в лаборатории молекулярной биологии и геномной инженерии РГП НИИПББ РК.

Предмет исследования. Разработка вакцины против оспы овец с использованием рекомбинантных технологий.

Методы исследования. При выполнении диссертационной работы были использованы следующие методы: молекулярно-генетические, вирусологические, иммунологические и биотехнологические.

Конструирование плазмид для экспрессии генов образующих рекомбинантные белки проводили, анализируя аминокислотные последовательности целевых белков вируса оспы овец, с последующим конструированием и синтезом специфических праймеров с использованием программы Vector NTI 10.0.1. Проводили амплификацию нуклеотидных последовательностей генов с геномной ДНК вируса оспы овец, штамм НИСХИ. Продукты амплификации клонировали в pGEM-T-vector согласно инструкции производителя. Наличие вставки в плазидах подтверждали рестрикционным анализом, путем обработки *EagI*. После секвенирования корректные последовательности клонировали в pET26b(+). Рекомбинантными плазмидными ДНК трансформировали компетентные клетки *E.coli*.

Экспрессию генов для получения рекомбинантных белков вируса оспы овец осуществляли в бактериальных клетках *E.coli*, в качестве индуктора использовали изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ).

Очистку рекомбинантных белков вируса оспы овец выполняли методом аффинной хроматографии с использованием HisPur Cobalt Superflow агарозы как в денатурирующих, так и в гибридных условиях.

Иммунизацию мышей проводили для оценки иммуномоделирующих свойств белков вируса оспы овец исследуя сыворотки крови иммунизированных белковыми препаратами мышей в вестрн блоте и реакции нейтрализации вируса с использованием вируса экстремелии штамм EVC_02.

ДСН-ПААГ-электрофорез и вестерн блот вели для оценки степени чистоты и подлинности полученных рекомбинантных белков вируса оспы овец по Laemmli [U. K. Laemmli, 1970] или иммунодетекцией с использованием антител против His (C-term)-AP, либо антисывороткой, полученной от овец, экспериментально инфицированных вирусом оспы овец.

Определение концентрации белка проводили по методу Lowry [O. H. Lowry, 1951]. **Определение стерильности** по ГОСТ 28085-2013.

Определение количества белка в сорбированных препаратах проводили, используя десорбцию с последующим определением количества белка.

Иммуноферментный анализ использовался для определения уровня гуморального иммунного ответа с применением вируса оспы овец 6 Ig ТЦД₅₀/мл.

Реакцию вируснейтрализации проводили с использованием вируса оспы овец rSPPV(ТК-)EGFP с активностью не ниже 5,5 lg ТЦД₅₀/мл.

Определение безвредности рекомбинантной вакцины проводили иммунизацию внутримышечно по 0,2 мл трехкратно с интервалом в 1 неделю мышей (n=10) в возрасте 6-8 недель и целевых животных овец (n=4) внутримышечно по 1 мл три раза с интервалом в 21 день. Контрольной группе животных вводили плацебо (ФБР/ГОА).

Определение иммуногенности и протективности рекомбинантной вакцины осуществляли, иммунизируя овец (n=4) в возрасте 8-9 месяцев, вводили рекомбинантную вакцину внутримышечно (предлагаемый путь введения для практики) по 1 мл три раза с интервалом в 21 день. Овцам из группы негативного контроля (n=2) аналогичным образом вводили стерильный физиологический раствор. В неделю один раз в течение 9 недель после первой вакцинации проводили отбор проб крови для определения уровня накопления сывороточных антител в ИФА. Для определения протективности вакцины проводили контрольное заражение согласно OIE Terrestrial Manual.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel и GraphPad Prism версии 6.0 с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественных сравнений Даннета и метода Тьюки. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Автор выражает свою искреннюю признательность профессору Червяковой О. В. и сотрудникам лаборатории молекулярной биологии и геной инженерии, лаборатории контроля технологии и биопрепаратов НИИПББ за оказанную помощь при проведении данного исследования.

В главе 3 представлены результаты собственных исследований.

3.1 Конструирование рекомбинантных плазмид, экспрессия генов и очистка рекомбинантных белков вируса оспы овец. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов целевых белков вируса оспы овец показал наличие трансмембранных доменов на N- или C-конце у четырех белков вируса оспы овец SPPV060 (ортолог L1), SPPV074 (ортолог H3), SPPV122 (ортолог A33) и SPPV141 (ортолог B5) Тогда как в аминокислотных последовательностях белков SPPV095 (ортолог A4) и SPPV117 (ортолог A27) эти домены отсутствовали.

Учитывая данные участки с доменами, были сконструированы специфические праймеры (таблица 3.1)

Таблица 3.1. – Праймеры, используемые для амплификации генов вируса оспы овец

Ген	Праймер	Последовательность
sppv060	L1R-f	5'- <u>tccatggg</u> agcagccgca-3'
	L1R-r	5'- <u>tggttaagc</u> tttctgccatttt-3'
sppv074	H3L-f	5'- <u>ctccatgg</u> ttataccaatcggtggtcgcaaatcaga-3'
	H3L-r	5'- <u>cgctc</u> gagtcactagtgatgggtgatgggtgatgaaatgaaccaatggatg-3'
sppv095	A4L-f	5'- <u>cccatatg</u> gacttatgaaaaatatac-3'
	A4L-r	5'- <u>gcggccg</u> ctttgctgttattatcatcc-3'
sppv117	A27L-f	5'- <u>gcatctc</u> gagtcactttagtggttaattcttcctgttt-3'
	A27L-r	5'- <u>gcatcatatg</u> gacagagcgttatcaatcttccaggcga-3'
sppv122	A33R-f	5'- <u>cccatatg</u> catcatcatcatcatcatgcatttttaaat-3'
	A33R-r	5'- <u>ccctc</u> gagttattaaagttcatcatgaaaaaagatcttacacagtaata-3'
sppv141	B5R-f	5'- <u>cccatatg</u> atgattgattttattatgt-3'
	B5R-r	5'- <u>gcggccg</u> ctaattttatcaaga-3'

Примечание: сайты рестрикции подчеркнуты, старт-кодон выделен курсивом.

С использованием праймеров указанных в данной таблице были амплифицированы целевые гены вируса оспы овец (рисунок 3.3).

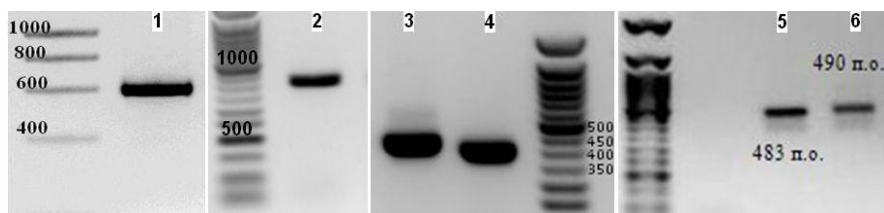


Рисунок 3.3 – Электрофоретический профиль ПЦР продуктов генов вируса оспы овец

1 – sppv060, 2 – sppv074, 3 – sppv117, 4 – sppv122, 5 – sppv095, 6 – sppv141.

Размер продуктов амплификации генов sppv060, sppv074, sppv095, sppv117, sppv122, sppv141 составил 570, 850, 483, 460, 435, 490 п.о., соответственно.

Далее ПЦР продукты генов вируса оспы овец были клонированы в рGEM-T вектор для последующего секвенирования и выбора корректных конструкций. Корректные последовательности целевых генов были субклонированы в экспрессирующий вектор рЕТ26 b(+), под контроль

промотора фага T7. Гены, *sppv074*, *sppv117*, *sppv122*, *sppv095* и *sppv141* были клонированы по сайтам NdeI и NotI, ген *sppv060* был клонирован по сайтам NdeI и XhoI. В результате проведенных исследований было получено 6 конструкций (pSPPV060Δ, pSPPV074Δ, pSPPV095, pSPPV117, pSPPV122Δ и pSPPV141Δ) для экспрессии генов вируса оспы овец в бактериальной системе *E.coli* под контролем промотора T7 (рисунок 3.4).

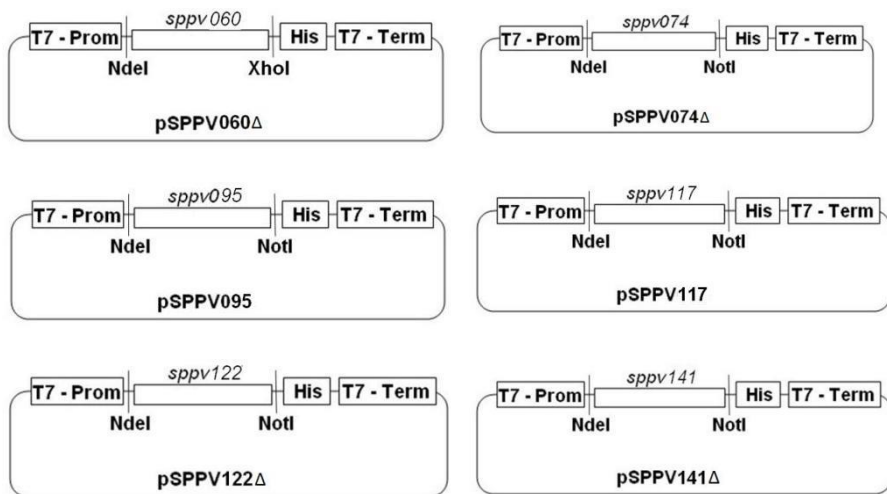


Рисунок 3.4 – Схематическое изображение рекомбинантных плазмид для экспрессии белков вируса оспы овец

T7-prom – промотор фага T7, T7-term – терминатор фага, His – последовательность из шести гистидинов.

Для очистки и детекции рекомбинантных белков аминокислотные последовательности были модифицированы путем добавления на С- или N-конце шести молекул гистидина HIS-Tag₆. В результате индукции бактериальных клеток T7 *E.coli.*, содержащих рекомбинантные плазмиды pSPPV060Δ, pSPPV074Δ, pSPPV095, pSPPV117, pSPPV122Δ и pSPPV141Δ, установлена экспрессия белков, молекулярный вес которых составил SPPV060 – 22 кДа, SPPV074 – 33кДа, SPPV095 – 20 кДа, SPPV117 – 19 кДа, SPPV122 – 17 кДа и SPPV141 – 22 кДа.

Анализ клеточных лизатов методом вестерн блота с использованием мышинных анти-HIS иммуноглобулинов подтвердил наличие экспрессии белков SPPV060, SPPV074, SPPV095, SPPV117, SPPV122 и SPPV141 (рисунок 3.7).

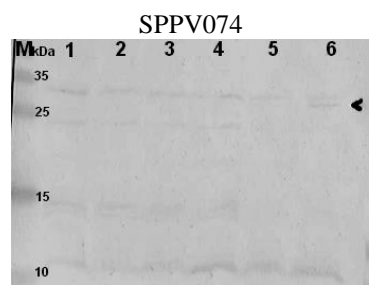
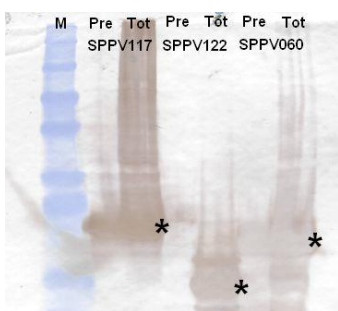
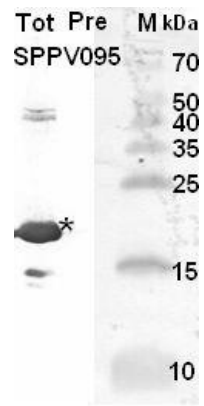
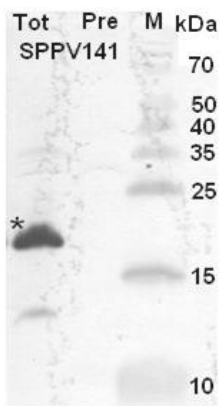


Рисунок 3.7 – Иммуноблот белков клеточного лизата штамма T7 *E.coli*, трансформированного рекомбинантными плазмидами рЕТ, с использованием сыворотки к полигистидину
 М – маркер молекулярного веса (Thermo Scientific); Pre – клеточный лизат до индукции; Tot – после индукции IPTG, * – локализация целевого белка.

Как видно из рисунка антитела к полигистидину связывались с белками соответствующими размерами целевых белков, что подтверждает наличие His-Tag в молекуле белка. Это позволило нам в дальнейшем провести очистку рекомбинантных белков с использованием иммобилизованной металл-аффинной хроматографии, в результате которого были получены очищенные фракции данных белков.

Также иммунодетекцию рекомбинантных белков проводили с использованием анти-ВОО овечьих иммуноглобулинов (рисунок 3.8).

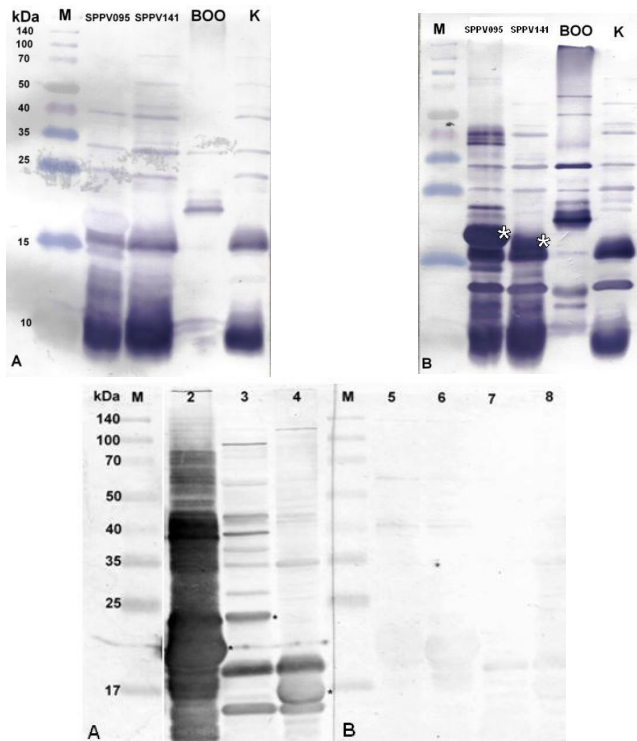


Рисунок 3.8 – Иммуноблотинг белков клеточного лизата *E.coli*, трансформированного рекомбинантными плазмидами рЕТ, с использованием сыворотки полученной от экспериментально инфицированных вирусом оспы овец
 А – контроль с использованием нормальной сыворотки, В – с использованием специфической сыворотки, М – маркер молекулярного веса (ThermoScientific, США), BOO – вирус оспы овец, К – контроль, клеточный лизат *E.coli* штамма Т7, трансформированного чистой плазмидой рЕТ26, 2 – SPPV117, 3 – SPPV060, 4 – SPPV122, * – локализация целевого белка.

Таким образом, полученные рекомбинантные плазмиды обеспечивают экспрессию генов образующих целевые вирусные белки, которые специфически взаимодействуют с сывороткой, полученной от овец, экспериментально инфицированных вирусом оспы овец. Штаммы *E.coli*, экспрессирующие целевые гены рекомбинантных белков вируса оспы овец депонированы в коллекцию микроорганизмов НИИПББ.

С целью оптимизации условия экспрессии генов было исследовано влияние посевной концентрации ночной культуры и продолжительности инкубирования до индукции, температуры проведения индукции и концентрации индуктора на уровень экспрессии. В результате проведенных исследований установлено, что при посевной концентрации ночной культуры в соотношении 1:50 и время выращивания до добавления индуктора 60 минут было выявлено наибольшее количество целевого белка.

Далее был подобран оптимальный протокол индукции экспрессии всех целевых генов ВОО, обеспечивающий высокий выход рекомбинантного белка. Установленные оптимальные параметры экспрессии целевых генов в результате проведенных исследований приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. – Параметры экспрессии целевых генов вируса оспы овец в бактериальных клетках

Ген	Параметры		
	Температура, °С	ИПТГ, мМ	Продолжительность, ч
<i>sppv060</i>	30	0,500	4
<i>sppv074</i>	18	1,000	18
<i>sppv095</i>	37	0,500	4
<i>sppv117</i>	25	0,125	3
<i>sppv122</i>	30	0,250	4
<i>sppv141</i>	25	0,250	4

Далее для каждого рекомбинантного белка были подобраны условия очистки, обеспечивающие максимальный выход белка со степенью чистоты не ниже 90 %.

Таблица 3.3. – Условия очистки рекомбинантных белков

Белок	Растворимость	Условия очистки	Выход белка с 1 л, мг (n=3)
SPPV060	Включения	денатурирующие	56,0±5,2
SPPV074	Включения	денатурирующие	2,0±0,5
SPPV095	Включения	гибридные	50,3±3,6
SPPV117	Растворимый	нативные	35,7±4,1
SPPV122	Включения	денатурирующие	32,5±2,7
SPPV141	Включения	денатурирующие	2,8±0,4

Анализ очищенных белковых препаратов в ДСН-ПААГ-электрофорезе показал высокую степень очистки рекомбинантных белков (рисунок 3.15).

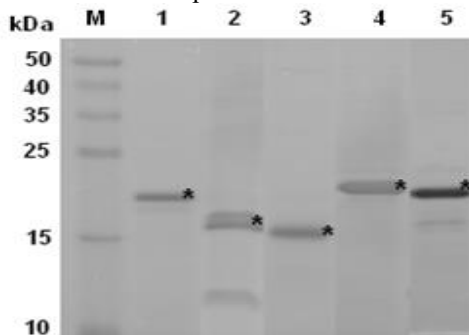


Рисунок 3.15 – Электрофоретический анализ очищенных белковых препаратов М – маркер молекулярного веса, 1 – SPPV095, 2 – SPPV117, 3 – SPPV122, 4 – SPPV141, 5 – SPPV060, * – локализация целевого белка.

3.2. Изучение иммуногенных и антигенных свойств рекомбинантных белков вируса оспы овец. Для каждого варианта белка было наработано по 5 л индуцированной культуры. Очистку проводили в соответствующих для каждого белка условиях. В результате было получено по 250 мг белков SPPV060 и SPPV095, 180 мг белка SPPV117, 160 мг белка SPPV122 и по 10 мг SPPV141. Средняя концентрация белка в препаратах составила 1,0 мг/мл. Полученные белковые препараты использовали при составлении экспериментальных и лабораторных серий вакцины.

Для оценки иммуномодулирующей активности рекомбинантных белков сыворотки крови иммунизированных мышей тестировали в вестерн блот анализе. В результате было установлено, что лизаты клеток всех белков положительно реагировали с сывороткой, полученной от иммунизированного лабораторного животного рекомбинантными белками.

Далее исследуемые сыворотки были протестированы в реакции нейтрализации вируса оспы овец и вируса экстремелии.

В результате установлено, что все полученные белки индуцируют в организме мышей выработку антител. При этом антитела к белкам SPPV060, SPPV074, SPPV117, SPPV122 и SPPV141 проявляют вируснейтрализующую активность и могут быть использованы при разработке профилактических средств.

3.3. Разработка технологии приготовления субъединичной вакцины на основе рекомбинантных вирусных белков. Для иммунизации овец были испытаны три концентрации белков

адсорбированные на гидроокись алюминия: по 300 мкг белков в дозе, по 150 мкг и по 75 мкг. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом 28 сут. В качестве контроля использовали живую аттенуированную вакцину НИСХИ и фосфатно-солевой буферный раствор. В результате было установлено, что для защиты от заражения вирусом оптимальным является использование рекомбинантных белков в концентрации по 75 мкг в дозе каждого белка (SPPV060, SPPV095, SPPV117 и SPPV122).

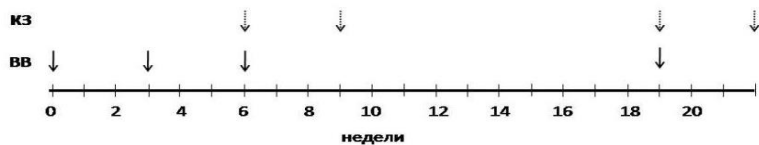
Было проведено исследование по подбору адьюванта. Испытывали два вида адьюванта это Montanide ISA-71 и гидроокись алюминия. В результате было установлено, что уровень гуморального ответа при использовании адьювантов значительно выше, чем при иммунизации чистыми белковыми препаратами. В качестве адьюванта для рекомбинантной вакцины выбрана гидроокись алюминия.

Была составлена технологическая схема изготовления рекомбинантной гидроокисьалюминиевой вакцины, отражающая требования к препарату на каждом этапе изготовления, а также методы контроля качества. Согласно разработанной технологии были изготовлены три лабораторные серии вакцины и проведен контроль качества готового препарата. Все лабораторные серии вакцины соответствовали предъявляемым требованиям и были использованы для изучения иммунобиологических свойств вакцинного препарата и его стабильности в процессе хранения при различных температурных режимах.

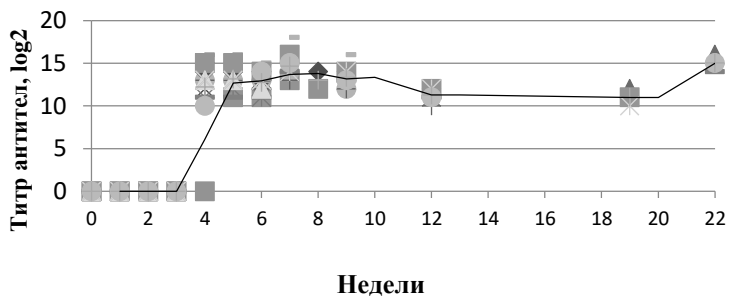
Безвредность вакцины определяли на мышах в сравнении с группой негативного контроля, проводя оценку на основе изучения выживаемости, общего состояния, поведения и динамики веса животных. В результате было установлено, что ни в одной из групп мышей не отмечалось гибели животных на протяжении всего срока наблюдения.

Иммуногенную эффективность и протективность рекомбинантной гидроокисьалюминиевой вакцины изучали на овцах. Животных (16 голов) иммунизировали трехкратно с интервалом 21 сут. в дозе 1 мл (75×4 мкг белка). Контрольной группе (8 голов) вводили PBS. Наблюдение за животными вели в течение 6 мес. Уровень гуморального иммунного ответа определяли в ИФА (рисунок 3.23), степень защиты от заражения эпизоотическим вирусом оспы овец оценивали методом контрольного заражения (рисунок 3.24).

Антитела к целевым вирусным белкам в организме животных появляются после второй иммунизации и достигают максимального накопления ($14 \log_2$) (рисунок 3.24 Б) через две недели после третьего введения вакцины. Через три месяца после третьего введения вакцины наблюдается значительное снижение титра антител ($11 \log_2$).



А



Б

Рисунок 3.23 – Определение иммуногенной эффективности и протективности рекомбинантной вакцины против оспы овец
 А – схема постановки эксперимента, КЗ – контрольное заражение, ВВ – введение вакцины, Б – уровень антител в крови иммунизированных овец, сплошной линией обозначены средние значения титров антител.

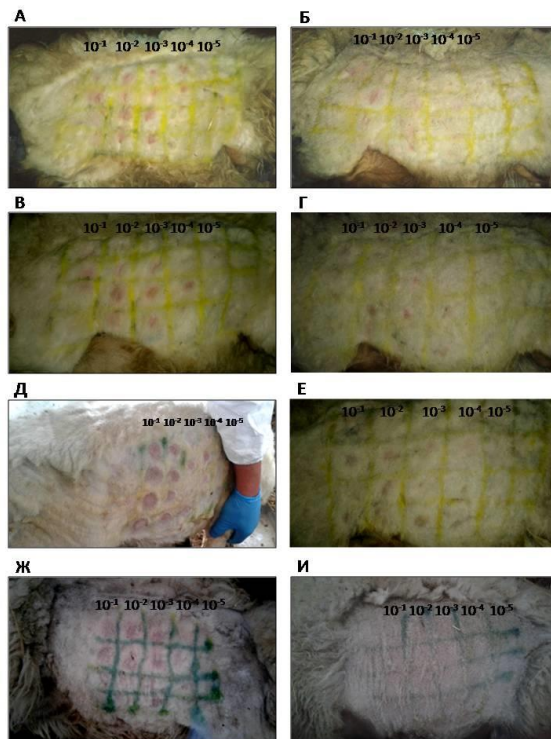


Рисунок 3.24 – Контрольное заражение овец, иммунизированных рекомбинантной гидроокисьалюминиевой вакциной против оспы овец А, В, Д, Ж – контрольные животные, Б, Г, Е, И – иммунные животные, А, Б – контрольное заражение через три недели после второй иммунизации, В, Г – контрольное заражение через три недели после третьей иммунизации, Д, Е – контрольное заражение через три месяца после третьей иммунизации, Ж, И – контрольное заражение через три недели после четвертой иммунизации.

Контрольное заражение иммунизированных животных в динамике показало, что после двукратной иммунизации снижение титра вируса составило $1,5 \lg$ (рисунок 3.7 А и Б), после трехкратной – $2,0 \lg$ (рисунок 3.7 В и Г). Через три месяца после третьей иммунизации на фоне снижения уровня гуморального иммунитета разница в титрах вируса у иммунных и контрольных животных вновь составила $1,5 \lg$ (рисунок 3.7 Д и Е). Согласно наставлениям МЭБ вакцина обеспечивает 100 % защиту от заражения при разнице в титрах вируса у иммунных и контрольных животных $2,5 \lg$. Было

принято решение о четвертом введении вакцины, которое привело к росту титра антител (рисунок 3.6 Б, 22 неделя). В результате контрольного заражения клинические признаки заболевания (покраснения, некроз, папулы) у вакцинированных животных обнаружены не были. На месте введения вируса отмечены незначительные припухлости (рисунок 3.7 Ж и И). В результате установлено, что после четырехкратного введения животные на 100 % защищены от инфицирования.

Для изучения сохраняемости образцы лабораторных серий вакцины были заложены на хранение (продолжительность опыта 12 мес) при различных температурных режимах 4 °С, 25 °С и 37 °С. В процессе хранения вакцинного препарата проводили контроль качества по показателям: подлинность, содержание белка, биологическая активность. В результате было установлено, что вакцина против оспы овец сохраняет свои свойства в течение 12 месяцев (срок наблюдения) при 4 °С.

3.4. Комиссионные испытания вакцины. Для проведения комиссионных испытаний было приготовлено 3 серии вакцины соответствующие всем предъявляемым требованиям технологического процесса. Были проведены комиссионные испытания технологии изготовления, безопасности и иммуногенности рекомбинантной гидроокисьалюминиевой вакцины против оспы овец согласно утвержденной программе испытаний, приказ № 54П от 14.04.17. По результатам проведенных исследований составлены соответствующие акты 65/09-06 от 24.07.17 и 66/09-06 от 01.08.17. На основании проведенных исследований составлены Стандарт организации СТ 405-1919-04 ГП-099–2017 «Рекомбинантная гидроокисьалюминиевая вакцина против оспы овец», Инструкция по изготовлению и временное наставление. Нормативно-техническая документация утверждена генеральным директором НИИПББ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Сконструированы рекомбинантные плазмиды pSPPV060Δ, pSPPV074Δ, pSPPV095, pSPPV117, pSPPV122Δ и pSPPV141Δ для экспрессии генов образующих иммуногенные белки вируса оспы овец. Получены бактериальные штаммы – продуценты вирусных белков. Определены оптимальные условия экспрессии генов и очистки рекомбинантных вирусных белков. Выход целевого продукта с 1 л суспензии клеток со степенью чистоты не менее 90 % составил для SPPV060 56±5,2 мг, SPPV074 – 2,0±0,5 мг, SPPV095 – 50,3±3,6 мг, SPPV117 – 35,7±4,1 мг, SPPV122 – 32,5±2,7 мг и SPPV141 – 2,8±0,4 мг.

2. Специфичность рекомбинантных белков подтверждена методом вестерн блоттинга с использованием сывороток овец, экспериментально

зараженных вирусом оспы. Белки SPPV060, SPPV074, SPPV117, SPPV122 и SPPV141 индуцируют выработку вируснейтрализующих антител.

3. Разработана технология изготовления рекомбинантной гидроокисьалюминиевой вакцины против оспы овец. В состав препарата вошли 4 рекомбинантных белка SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122 с концентрацией каждого 75 мкг/доза и 0,5 % гидроокись алюминия. Определены оптимальные параметры сорбции рекомбинантных белков на гидроокись алюминия.

4. Рекомбинантная гидроокисьалюминиевая вакцина безвредна для лабораторных и целевых животных, иммуногенна и обеспечивает защиту животных от заражения вирусом после четырёхкратной иммунизации. Вакцина сохраняет свои свойства в течение 12 мес при 4 °С.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании проведенных исследований для ветеринарной биопромышленности разработаны нормативно-технические документы на технологию изготовления рекомбинантной вакцины, которые состоят из: инструкции по изготовлению и контролю рекомбинантной вакцины для профилактики оспы овец, стандарта организации на рекомбинантную вакцину для профилактики оспы овец [СТ 405-1919-04 ГП-099–2017], наставление по применению рекомбинантной вакцины против оспы овец. НТД на изготовление вакцины против оспы овец на основе технологии рекомбинантных ДНК одобрена ученым советом НИИПББ и утверждена генеральным директором института. Разработанная рекомбинантная вакцина может быть использована в ветеринарии как безопасное средство профилактики оспы овец. Также полученные в результате исследований бактериально-экспрессированные рекомбинантные белки вируса оспы овец могут быть использованы в производстве диагностических средств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Тайлакова, Э. Т.** Бактериальная экспрессия генов вируса оспы овец, кодирующих антигенные белки SPPV095 и SPPV141, для разработки средств специфической профилактики нового поколения [Текст] / Э. Т. Тайлакова, О. В. Червякова // Биотехнология. Теория и практика. – 2016. – № 2. – С. 81-87; То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=26555349>.

2. Recombinant Sheep Pox Virus Proteins Elicit Neutralizing Antibodies [Text] / [O. V. Chervyakova, V. L. Zaitsev, B. K. Isakov, E. T. Tailakova et al.] // Viruses. – 2016, Basel. – Vol. 8, № 6 – P. 159-171; То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: https://www.mdpi.com/1999-4915/8/6?listby=date&view=default§ion_id=50.

3. Разработка стратегии контроля качества и стандартизации вакцины на основе рекомбинантных белков вируса оспы овец [Текст] / [Э. Т. Тайлакова, М. М. Касенов, К. Т. Султанкулова, А. Т. Жунушов и др.] // Известия Национальной академии наук Кыргызской Республики. – 2019. – № 5. – С. 40-47; То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL:<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44096504>.

4. Рекомбинантные плазмидные ДНК рЕТ/SPPV060ΔТМ, рЕТ/SPPV095, рЕТ/SPPV117, рЕТ/SPPV122ΔТМ, рЕТ/SPPV141ΔТМ, обеспечивающие синтез рекомбинантных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 вируса оспы овец, штаммы бактерий E. coli T7 – продуценты рекомбинантных вирусных белков SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141, и рекомбинантные белки вируса оспы овец SPPV060, SPPV095, SPPV117, SPPV122, SPPV141 для создания диагностических тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против оспы овец [Текст] / [О. В. Червякова, Э. Тайлакова, В. М. Строчков, В. Л. Зайцев и др.] // Пат. №32951 Республика Казахстан, МПК:А61К 39/12 (2006.01), С12N 15/09 (2006.01), С12N 15/11 (2006.01), С12N 15/33 (2006.01), С12N 15/70 (2006.01), С12Q 1/02 (2006.01), С12Q 1/68 (2006.01). Гвардейский. НИИПББ. – № 2 017/0127.1; заявл.16.02.2017; опубл. 23.07.2018, Бюл. № 27. – 16 с.: ил. То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа:URL:<https://gosreestr.kazpatent.kz/Invention/DownloadFilePdf?patentId=276448&lang=ru>.

5. Определение оптимальной иммунизирующей дозы рекомбинантной вакцины против оспы овец [Текст] / [Э. Т. Тайлакова, К. Т. Султанкулова, А. Т. Жунушов, О. В. Червякова] // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. – 2023. – № 6. – С. 30-33; То же: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL:<https://elibrary.ru/item.asp?id=54898929>.

Тайлакова Эльмира Талгатовнанын «Рекомбинанттык ДНК технологиясынын негизинде кой чечегине каршы вакцинаны иштеп чыгуу» деген темада 03.01.06 – биотехнология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты окумуштуулук даражасын изденип алуу үчүн жазылган диссертациясынын

РЕЗЮМЕСИ

Негизги сөздөр: кой чечек, рекомбинанттык белок, рекомбинанттык вакцина, иммуногендүүлүк, протективдүүлүк.

Изилдөө объектиси: кой чечек вирусунун «НИСХИ» штаммы, кой чечек вирусунун рекомбинанттык белоктору.

Изилдөө предмети: рекомбинанттык технологияны колдонуу менен кой чечегине каршы вакцинаны иштеп чыгуу.

Иштин максаты: бактериялык экспрессияланган вирустук белоктордун негизинде кой чечектин алдын алуу үчүн рекомбинанттык вакцинаны иштеп чыгуу.

Изилдөө ыкмалары: молекулярдык-генетикалык, вирусологиялык, иммунологиялык жана биотехнологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын жаңылыгы. Молекулярдык биологиянын жана гендик инженериянын заманбап ыкмаларын колдонуу менен кой чечек вирусунун бактериялык экспрессияланган рекомбинанттык белоктору алынды SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122(A33) и SPPV141 (B5). SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33) жана SPPV141 (B5) - жаныбарлардагы вирусту нейтралдаштыруучу антителолорду өндүрүүнү шарттай тургандыгы аныкталган. Рекомбинанттык вакцинаны чыгаруунун технологиясы иштелип чыккан. Вирустук белоктордун негизинде рекомбинанттык гидроокисьалюминдик вакцина алынган SPPV060 (L1), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33). Рекомбинанттык вакцинанын коопсуздугу жана туруктуулугу, иммуногендик натыйжалуулугу жана протективдүүгү изилденген. Изилдөөнүн натыйжасында ойлоп табууга патент алынган.

Колдонуу боюнча сунуштар: иштелип чыккан рекомбинанттык вакцина «Кой чечекти алдын алуу үчүн рекомбинанттык алюминий гидроксиддик вакцина» койлорду эмдөө үчүн сунушталды. Бул изилдөөлөрдүн натыйжалары, кой чечегине каршы коопсуз рекомбинанттык вакцинаны, ошондой эле диагностикалык тест-системаларды иштеп чыгууда колдонуу үчүн сунушталат.

Колдонуу жааты: биотехнология, вирусология, вакцинология, ветеринария, майда мүйүздүү малдардын ылаңдарын алдын алуу. Ошондой эле, рекомбинанттык белоктор боюнча алынган маалыматтар диагностикалык каражаттарды иштеп чыгуу үчүн колдонулушу мүмкүн.

РЕЗЮМЕ

диссертации Тайлаковой Эльмиры Талгатовны на тему: «Разработка вакцины против оспы овец на основе технологии рекомбинантных ДНК» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология

Ключевые слова: оспа овец, рекомбинантный белок, рекомбинантная вакцина, иммуногенность, протективность.

Объект исследования: вирус оспы овец штамм «НИСХИ», рекомбинантные белки вируса оспы овец.

Предмет исследования: Разработка вакцины против оспы овец с использованием рекомбинантных технологий.

Цель исследования: Разработка рекомбинантной вакцины для профилактики оспы овец на основе бактериально-экспрессированных вирусных белков.

Методы исследования: молекулярно-генетические, вирусологические, иммунологические и биотехнологические.

Полученные результаты и их новизна: Используя современные методы молекулярной биологии и геной инженерии были получены бактериально-экспрессированные рекомбинантные белки вируса оспы овец SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122(A33) и SPPV141 (B5). Установлено, что SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33) и SPPV141 (B5) индуцируют выработку вируснейтрализующих антител в организме животных. Разработана технология получения рекомбинантной вакцины. Получена рекомбинантная гидроокисьалюминиевая вакцина на основе вирусных белков SPPV060 (L1), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33). Изучены безвредность и сохраняемость рекомбинантной вакцины. Изучены иммуногенная эффективность и протективность рекомбинантной вакцины. В результате исследований получен патент на изобретение.

Рекомендации по использованию: Разработанная рекомбинантная вакцина «Рекомбинантная гидроокисьалюминиевая вакцина для профилактики оспы овец» предложена для вакцинации овец. Результаты данных исследований рекомендуется использовать при разработке безопасной рекомбинантной вакцины против оспы овец, а также диагностических тест-систем.

Область применения: биотехнология, вирусология, вакцинология, ветеринария, профилактика заболевания мелкого рогатого скота. Также данные полученные по рекомбинантным белкам могут быть использованы для разработки средств диагностики.

SUMMARY

dissertation of Tailakova Elmira on the title: "Development of a vaccine against sheep pox based on recombinant DNA technology" for the competition of a candidate of biological sciences in the specialty 03.01.06 – Biotechnology.

Key words: sheeppox, recombinant protein, recombinant vaccine, immunogenicity, protection.

Objects of research: sheeppox virus strain "NISHI", recombinant proteins of the sheeppox virus.

Subject of research: Development of a vaccine against sheeppox using recombinant technology.

Purpose of the work: Development of a recombinant vaccine for the prevention of sheeppox based on bacterially expressed viral proteins.

Research methods: molecular genetics, virological, immunological, biotechnological.

The results obtained and their novelty: Using modern methods of molecular biology and genetic engineering, bacterially expressed recombinant proteins of the sheeppox virus SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122(A33) and SPPV141 (B5) were obtained. It has been established that SPPV060 (L1), SPPV074 (H3), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33) and SPPV141 (B5) induce the production of virus-neutralizing antibodies in animals. A technology for producing a recombinant vaccine has been developed. A recombinant aluminum hydroxide vaccine was obtained based on the viral proteins SPPV060 (L1), SPPV095 (A4), SPPV117 (A27), SPPV122 (A33). The safety and persistence of the recombinant vaccine have been studied. The immunogenic efficacy and protectiveness of the recombinant vaccine were studied.

As a result, a patent for the invention was obtained, issued by the RSE “National Institute of Intellectual Property” of the Ministry of Justice of the Republic of Kazakhstan No. 32951.

Recommendations for use: The developed recombinant vaccine “Recombinant aluminum hydroxide vaccine for the prevention of sheeppox” is proposed for vaccination of sheep. The results of these studies are recommended for use in the development of a recombinant vaccine against sheeppox and diagnostic test systems.

Application area. biotechnology, virology, veterinary, vaccinology, Also, data obtained on recombinant proteins can be used to develop diagnostic tools.

Формат 60x84/16. Печать офсетная.
Объем 1,75 п.л. Тираж 20 экз.