

*На правах рукописи*

**Воронова Ольга Сергеевна**

**РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАКЦИН-КАНДИДАТОВ  
ПРОТИВ ВЕСЕННЕЙ ВИРЕМИИ КАРПА И ИССЛЕДОВАНИЕ  
ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ**

03.00.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**290524**

Кольцово - 2005

**Работа выполнена в ФГУП Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», МЗ СР РФ**

**Научный руководитель:**

кандидат химических наук *Орешкова С.Ф.*

**Официальные оппоненты:**

доктор ветеринарных наук *Готов А.Г.*

кандидат биологических наук *Шишкина Л.Н.*

**Ведущая организация:**

**ФГУП Всероссийский институт пресноводного рыбного хозяйства  
Федерального Агентства по рыболовству Минсельхоза России  
(п. Рыбное Московской области)**

**Защита состоится «29» декабря 2005 г. в 13 часов  
на заседании специализированного совета при ФГУП Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: 630559, Кольцово Новосибирской области  
(тел.: (8-383) 336-74-28)**

**С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».**

**Автореферат разослан «28» ноября 2005 г.**

**Ученый секретарь  
диссертационного совета**



**Малыгин Э.Г.**

2006-4  
29967

2264095

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

В аквакультуре, как и в любой другой биоиндустрии, неизбежны проблемы, связанные с заболеваниями разводимых животных. Инфекционные болезни, которые в дикой природе возникают как спорадические случаи, могут вызвать высокую смертность в условиях рыбного хозяйства, поэтому для успешного развития отрасли необходимы эффективные средства их профилактики и лечения.

Весенняя вирусемия карпа – остро протекающее высококонтагиозное заболевание, вызываемое вирусом *Rhabdovirus carpio* (spring viremia of carp virus, SVCV). По классификации Международного эпизоотического бюро весенняя вирусемия карпа относится к категории особо опасных (декларируемых) болезней рыб. Она широко распространена в рыбоводческих хозяйствах Европы, в том числе в России и других государствах бывшего СССР. Кроме того, в последнее время вспышки заболевания были зарегистрированы в регионах, прежде считавшихся благополучными: в 2002 г. ВВК была обнаружена в США, а в 2004 г. – в Китае. В связи с этим, весенняя вирусемия карпа была внесена в список International Aquatic Animal Health Code of the OIE как заболевание, требующее контроля по причине его распространения.

Создание эффективной вакцины могло бы помочь в решении данной проблемы. В последнее время одним из приоритетных направлений в экспериментальной ветеринарии стала разработка рекомбинантных вакцин. По сравнению с традиционными, эти вакцины обладают рядом преимуществ, что делает их привлекательными для аквакультуры.

Главный иммунопротективный белок рабдовирусов – расположенный на поверхности вириона трансмембранный гликопротеин – стимулирует выработку в организме рыб вируснейтрализующих антител. Как и у теплокровных, эти антитела в значительной степени определяют природу иммунитета при рабдовирусной инфекции. Таким образом, G-белок рабдовирусов является подходящим кандидатом на роль иммуногенной основы для рекомбинантных вакцин.

В ихтиологии основные исследования в этой области проведены с двумя рабдовирусами рыб: вирусом инфекционного некроза гемопозитической ткани (вирусом ИНГТ) и возбудителем вирусной геморрагической септицемии (ВГС). Было показано, что рекомбинантные белки частично защищают рыб от рабдовирусной инфекции, тогда как



ДНК-вакцины на основе последовательностей, кодирующих гликопротеин этих вирусов, исключительно эффективны.

### **Цель работы и задачи исследования.**

Цель настоящей работы – разработка и создание экспериментальных плазмидных конструкций – кандидатных рекомбинантных вакцин против весенней виремии карпа, и исследование их иммуногенных и протективных свойств.

В соответствии поставленной целью решались следующие задачи:

- Получить штамм-продуцент фрагмента вирусного гликопротеина, как вариант субъединичной вакцины против весенней виремии карпа.
- Сконструировать ряд рекомбинантных плазмидных ДНК – кандидатных ДНК-вакцин, со вставкой последовательностей, кодирующих гликопротеин или нуклеопротеин вируса.
- Оценить иммуногенные и протективные свойства созданных кандидатных вакцин в эксперименте.
- Оценить влияние на эффективность вакцинации неспецифических иммуностимуляторов, повышения температуры воды в аквариумах и дозы вводимой рыбам плазмидной ДНК.

### **Научная новизна и практическая ценность работы.**

В результате проделанной работы впервые была установлена принципиальная возможность профилактики ВВК с помощью рекомбинантных конструкций на основе прокариотического (иммунизация рекомбинантным белком) или эукариотического (ДНК-вакцинация) векторов, экспрессирующих гликопротеин вируса. ДНК-вакцинация показала себя как наиболее перспективная технология при создании препаратов против этого заболевания.

Созданные кандидатные вакцины со вставкой гена вирусного гликопротеина могут представлять интерес для практической аквакультуры, поскольку являются эффективными при однократной иммунизации, экономически выгодными и простыми в обращении. Вирус ВВК стал, таким образом, четвертым рабдовирусом рыб (после вируса ИНГТ, ВГС и *Hirame rhabdovirus*), для которых такая возможность установлена.

### **Апробация работы и публикации.**

Полученные результаты представлены на восьми международных конференциях. По материалам диссертации была опубликована статья и

получено положительное решение о выдаче авторского свидетельства.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертационная работа состоит из семи разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Работа изложена на 129 страницах машинописного текста и включает рисунки, таблицы и список литературы, содержащий ссылки.

Экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены лично диссертантом, под руководством и в соавторстве с Орешковой С.Ф. Испытания кандидатных вакцин были проведены на базе Всероссийского научно-исследовательского института пресноводного рыбного хозяйства.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Плазмидные ДНК – кандидатные вакцины, кодирующие гликопротеин вируса весенней виремии карпа американского изолята вируса**

Первостепенной задачей работы являлась оценка возможности профилактики весенней виремии у карпа с использованием рекомбинантных вакцин-кандидатов.

В нашем распоряжении имелась плаزمида **pcDNA3-G-a**, которая была любезно предоставлена профессором J.C. Leong (Oregon State University, USA). Данная рекомбинантная ДНК кодирует полноразмерный гликопротеин американского изолята вируса ВВК, экспрессия которого проходит под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора (рис.1).

Фрагмент нуклеотидной последовательности гена гликопротеина из данной конструкции, кодирующий основные антигенные эпитопы этого белка, был встроен нами в экспрессирующий прокариотический вектор pQE31. В полученной конструкции **pQE-G** последовательность неполного G-гена находилась под контролем промотора фага T5, содержащего две lac-операторные последовательности для прокариотической наработки фрагмента этого белка вируса, как основы экспериментальной субъединичной вакцины против ВВК (рис.1).

При электрофоретическом анализе лизатов клеток, *E. coli* трансформированных плазмидой pQE-G, было выявлено наличие в индуциро-

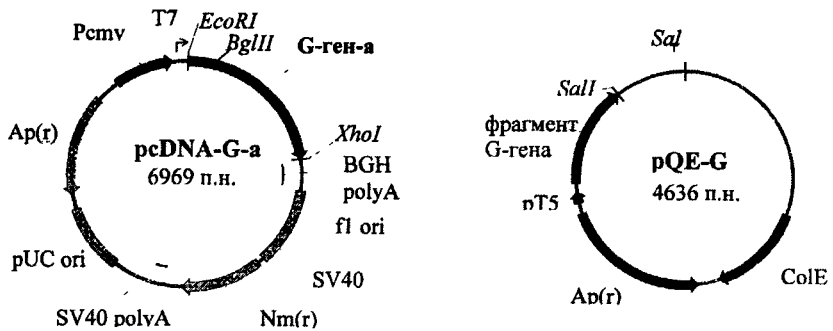


Рис. 1. Схема конструкций со вставкой нуклеотидной последовательности, кодирующей гликопротеин вируса ВВК американского изолята.

ванных ИПТГ культурах дополнительного белка с молекулярной массой около 48 кДа, что соответствует расчетной массе фрагмента вирусного гликопротеина (рис. 2).

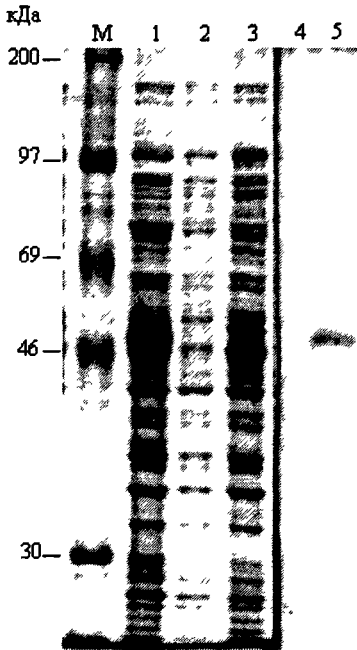


Рис. 2. (1-3) Электрофореграмма (10 % ДСН ПААГ) и (4-5) иммуноблот-анализ лизатов клеток *E. coli* с анти-вирус ВВК кроличьей сывороткой в разведении 1:500 М – маркер молекулярного веса 1. индуцированная культура клеток *E. coli* JM103/pQE-G 2. неиндуцированная культура клеток *E. coli* JM103/pQE-G 3. индуцированная культура клеток *E. coli* JM103/pQE31 4. индуцированная культура клеток *E. coli* JM103/pQE31 5. индуцированная культура клеток *E. coli* JM103/pQE-G.

Уровень продукции этого полипептида по данным денситометрии составлял более 3,5 % от суммарного клеточного белка. В ТИФА и иммуноблот-анализе была показана специфичность взаимодействия полученного рекомбинантного белка (фрагмента гликопротеина) с анти-вирус ВВК кроличьей сывороткой (рис. 3).

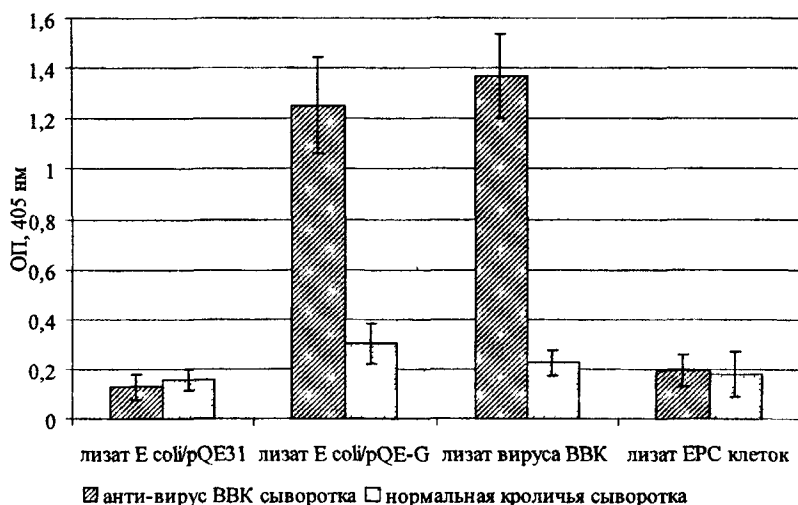


Рис. 3. Связывание фрагмента рекомбинантного гликопротеина в составе клеточных лизатов *E. coli*, трансформированных плазмидами pQE-G или pQE31, с анти-вирус ВВК кроличьей сывороткой в разведении 1:500.

### Иммуногенность экспериментальных вакцин

В эксперименте годовики карпа были однократно иммунизированы рекомбинантным белком (внутрибрюшинная инъекция) или плазмидной ДНК pcDNA-G-а (внутримышечная инъекция). Инактивированный формалином вирус ВВК российского изолята ЗЛ4 использовали в качестве положительного контроля вакцинации (внутрибрюшинная инъекция).

Вируснейтрализующая активность была зарегистрирована только в группе рыб, получивших ДНК-вакцину, причем в среднем только у половины вакцинированных карпов. Титры вируснейтрализующих АТ

были невысокими (максимум 256), что согласуется с аналогичными данными, полученными на моделях с другими рибовирусами рыб, которые свидетельствуют о слабых антигенных свойствах их белков.

Продукция вируснейтрализующих АТ в организме карпов, иммунизированных ДНК-вакциной, доказывает, что молекула G-белка, синтезируемого непосредственно в организме рыб, очевидно, имеет более близкие к нативным антигенные свойства по сравнению с гликопротеином, полученным в прокариотической системе *E. coli*.

Только в одном эксперименте из трех была обнаружена статистическая взаимосвязь между уровнем антител в поствакцинальных сыворотках рыб и величиной создаваемой защиты, несмотря на то, что защитный эффект ДНК-вакцины проявился в каждом из них. Это подтверждает мнение о том, что большой вклад в формирование защиты против рибовирусов у рыб вносят также факторы неспецифической резистентности и клеточное звено специфического иммунного ответа.

### **Защитные свойства экспериментальных вакцин**

#### Эффективность экспериментальной ДНК-вакцины pcDNA-G-a

Используемая в нашей работе экспериментальная модель ВВК идентична патогенезу острой формы заболевания, развивающегося в естественных условиях. В контрольных группах с 3 по 6 день после заражения наблюдался экспоненциальный рост смертности рыб, который достигал 100 %.

Для того, чтобы с большей вероятностью «попасть» при последующем заражении в пик продукции антител, было решено внутрибрюшинно ввести выбранный наиболее вирулентный штамм вируса ВВК М2 в одной группе рыб на 8-ой неделе после вакцинации, а в другой – на 10-ой неделе.

В качестве положительного контроля был использован инактивированный формалином вирус ВВК. Введение заведомо эффективной дозы этого препарата обеспечило в этой группе рыб стопроцентную выживаемость, однако, по расчетам, такая вакцина была бы очень дорогой для массового применения в аквакультуре. Снижение дозы до экономически оправданной (в 6,8 раза, эксперимент 2) привело к полной утрате защитного действия введенного инактивированного вируса (табл. 1).

В задачи первого эксперимента (заражение на 8-ой неделе после вакцинации) дополнительно входил подбор оптимального способа выделения плазмидной ДНК для иммунизации рыб. Было проведено сравнение



трех способов ее очистки: метода ультрацентрифугирования в градиенте CsCl, щелочного метода, включающего дополнительную стадию с рядом осадений ацетатом аммония, и с помощью набора Endotoxin-free фирмы Sigma.

Показатели эффективности ДНК-иммунизации конструкцией pcDNA-G-a в трех группах рыб, получивших препараты, выделенные этими тремя способами, между собой достоверно не различались (рис. 4). Полученные результаты позволили выбрать для дальнейшей работы менее дорогостоящий и менее трудоемкий щелочной метод, включающий дополнительную стадию с рядом осадений ацетатом аммония.

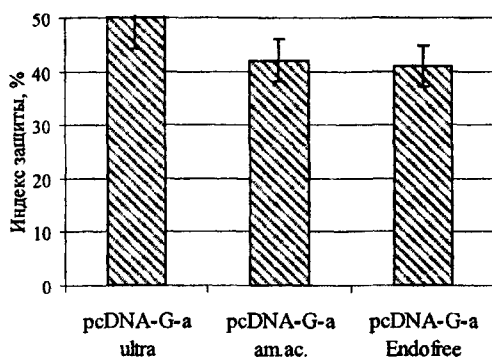


Рис 4 Выживаемость карпов, вакцинированных препаратами pcDNA-G-a, выделенными разными методами: ultra – ультрацентрифугирование в градиенте CsCl, am.ac. – щелочной метод, включающий дополнительную стадию с рядом осадений ацетатом аммония, Endofree - Endotoxin-free Maxiprep Plasmid Purification Kit

Индекс защиты (ИЗ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИЗ} = \frac{\% \text{ гибели в контрольной группе} - \% \text{ гибели в опытной группе}}{\% \text{ гибели в контрольной группе}} \times 100 \%$$

Таким образом, в первом эксперименте среднее значение ИЗ для ДНК-вакцины в случае заражения рыб через 8 недель после инъекции созданной рекомбинантной конструкцией составило 44,8 %. Причем протективный эффект кандидатной ДНК-вакцины достоверно отличался от соответствующего контроля (исходный плазмидный вектор pcDNA3)

Таблица 1. Результаты количественной оценки протективного действия испытанных вакцинных препаратов.

10

Препарат	Заболеваемость, %	Выживаемость		Индекс защиты, %	Средняя продолжительность выживания		Дисперсия средней продолжительности выживания	
		%	P*		сутки	P**	$s_x^2$	P***
Эксперимент 1								
pcDNA-G-a	80,0	46,7	<0,001	44,8	13,6	<0,05	130,9	<0,01
pcDNA3	100,0	3,4	-	-	5,9	-	16,2	-
JM103/pQE-G	93,4	42,0	>0,05	38,0	10,2	>0,05	71,6	<0,05
JM103/pUC19	93,4	16,7	-	13,9	7,6	-	26,6	-
Вирус инакт.(эф.)	13,2	100,0	<0,001	100,0	-	-	-	-
буфер	100,0	3,3	-	-	6,2	-	10,7	-
Эксперимент 2								
pcDNA-G-a	66,7	80	<0,001	78,6	8,3	>0,05	19,9	<0,05
pcDNA3	100,0	6,7	-	-	5,0	-	7,7	-
JM103/pQE-G	100,0	0	>0,05	0	5,6	>0,05	12,2	<0,01
JM103/pQE31	100,0	0	-	-	4,8	-	0,9	-
Вирус инакт.(эк.)	96,7	6,7	>0,05	3,3	5,3	>0,05	7,2	>0,05
буфер	100,0	3,4	-	-	5,4	-	13,2	-

Примечание: \*t-критерий Стьюдента и  $\chi^2$ -критерий Пирсона; \*\* t-критерий Стьюдента; \*\*\*F-критерий Фишера. Достоверности различий и индексы защиты рассчитаны по отношению к соответствующим гомологичным контролям.

по всем трем количественным показателям: % заболеваемости, % выживаемости, значениям индекса защиты (табл. 1).

Выживаемость и индекс защиты во втором эксперименте (заражение на 10-ой неделе после введения ДНК) почти удвоились по сравнению с первым: 80 % рыб оказались устойчивы к используемому в наших экспериментах вирусу, значение ИЗ составило 78,6 % (табл. 1). Остальные учитываемые показатели также демонстрировали большую эффективность ДНК-вакцинации (табл. 1).

Вероятно, большая эффективность ДНК-вакцины во втором эксперименте свидетельствует о большей напряженности иммунного ответа у рыб в последнем случае. Возможно, в условиях более низких «весенних» температур (8-15°C), используемых при постановке наших экспериментов, развитие иммунных реакций замедляется, что и стало причиной различий в эффективности вакцинации плазмидной ДНК в двух описанных экспериментах.

#### Эффективность субъединичной вакцины

Лизат клеток *E. coli*, трансформированных плазмидной конструкцией pQE-G, кодирующей фрагмент G-белка, и индуцированных ИПТГ, обеспечивал развитие устойчивости с максимальными значениями ИЗ 38 % (табл. 1), что более чем в два раза ниже по сравнению с результатами для ДНК-вакцины. Это значение включает в себя вклад двух составляющих. Иммуногенная основа вакцины-кандидата – фрагмент гена гликопротеина вируса ВВК - индуцирует развитие специфического ответа, тогда как неспецифическая резистентность обеспечивается компонентами разрушенных клеток *E. coli*, выступающих в качестве адьюванта. Именно этой неспецифической резистентностью, по-видимому, объясняется выживание 16,7 % карпов и значение ИЗ 13,9 % в группе рыб, иммунизированных лизатом клеток *E. coli* JM103 с исходным плазмидным вектором pQE31 (табл. 1).

Выживаемость у рыб в ответ на введение кандидатной субъединичной вакцины достоверно превышала таковую в группе, получившей буферный раствор, но недостоверно отличалась от выживаемости в группе собственного контроля (лизата клеток, трансформированных pQE31) (табл. 1).

Во втором эксперименте этот препарат субъединичной вакцины проявил лишь слабые признаки защиты, выразившиеся в достоверном увеличении дисперсии средней продолжительности выживания по сравне-

нию с таковой в группе гомологичного контроля (табл. 1) Тем не менее, в условиях естественной (весенней) динамики температуры воды такое увеличение могло бы позитивным образом сказаться на выживаемости рыб.

По-видимому, несовершенная, отличная от нативной конформация рекомбинантного гликопротеина в составе испытанной субъединичной вакцины негативно сказалась на ее протективных свойствах. На основании полученных данных было решено в дальнейшем сосредоточить основное внимание на разработке ДНК-вакцины и отказаться от использования рекомбинантного вирусного белка.

#### Подбор оптимальной дозы плазмидной ДНК для генетической иммунизации против весенней виремии карпа

Для подбора наиболее оптимальной дозы ДНК-вакцины против ВБК был проведен эксперимент на трех группах рыб, получивших разное количество плазмидной ДНК рсDNA-G-a. Годовики карпа были однократно иммунизированы 0,3 мкг, 1 мкг или 3 мкг плазмидной ДНК на грамм массы тела рыбы. Во всех группах отмечено протективное действие кандидатной вакцины у зараженных вирусом ВБК рыб. При этом достоверных различий в защитном действии между разными группами вакцинированных рыб выявлено не было. Тем не менее, в группе рыб, получивших наименьшую дозу плазмидной ДНК рсDNA-G-a, вывleчается некоторая тенденция к снижению уровня развивающейся резистентности (рис. 5).

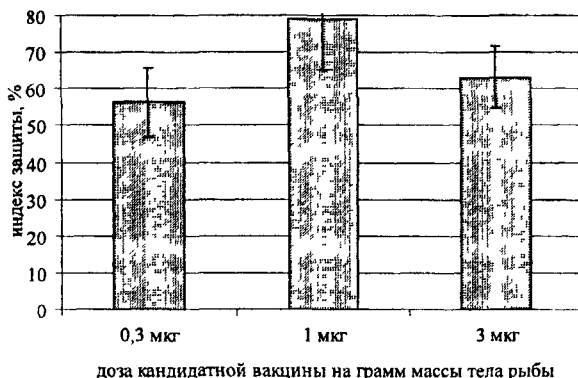


Рис. 5. Эффективность ДНК-иммунизации в зависимости от дозы кандидатной вакцины.

Для дальнейшей работы была выбрана доза 1 мкг на грамм массы тела рыбы. Вероятно, в случае внутримышечного введения препарата плазмидной ДНК она является наиболее оптимальной.

**Генно-инженерные плазмидные ДНК – кандидатные вакцины, кодирующие гликопротеин референсного для России изолята вируса весенней виiremии карпа.**

#### Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК pcDNA-G-ЗЛ4

Иммуногенной основой вышеописанных рекомбинантных ДНК (кандидатных вакцин) был ген гликопротеина американского изолята, но для отечественной аквакультуры перспективнее было бы создать вакцину на основе референсного российского штамма вируса ВВК, которым является штамм ЗЛ4.

С этой целью была сконструирована плазмидная ДНК, содержащая полноразмерный ген гликопротеина российского изолята ЗЛ4. Выбор праймеров для ПЦР осуществлялся на основе анализа нуклеотидной последовательности G-гена и межгенных районов вируса ВВК референсного европейского штамма Fijap.

Секвенирование полученной нами последовательности ДНК подтвердило то, что она действительно кодирует гликопротеин вируса ВВК. Было обнаружено 9 нуклеотидных замен в отношении референсного европейского штамма Fijap, три из которых значимые, приводят к заменам аминокислотных остатков: изолейцина в 61 положении на триптофан, лизина в 350 положении на глутамин и лейцина на аргенин в 497 положении.

Конечная конструкция pcDNA-G-ЗЛ4 - кандидатная ДНК-вакцина – содержит, таким образом, вставку полноразмерного гена гликопротеина штамма ЗЛ4 вируса ВВК под контролем цитомегаловирусного промотора (рис. 6).

#### Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК pVACpVax-G-ЗЛ4 – кандидатной ДНК-вакцины

Для создания почти всех существующих к настоящему времени экспериментальных ДНК-вакцин против самых разных патогенов человека и животных были использованы плазмидные вектора с CMV промотором, который обеспечивает высокий уровень продукции целевого рекомбинантного белка во многих типах эукариотических клеток. Однако

существует мнение, что цитомегаловирус человека является этиологическим агентом при развитии некоторых злокачественных опухолей. Поэтому, введение в организм человека и употребление в пищу продуктов (в нашем случае рыбы), содержащих ДНК этого вируса, может вызывать опасения. Это стало причиной для поиска замены CMV промотору в составе ДНК-вакцины.

Известно, что  $\beta$ -актиновый промотор карпа в составе плазмидного вектора способен обеспечить высокий уровень продукции рекомбинантного белка, хотя и немного ниже, чем CMV промотор.

Для создания такой конструкции последовательность гена гликопротеина из pcDNA-G-ЗЛ4 была клонирована в плазмиду pBACarpVax. Данный плазмидный вектор содержит  $\beta$ -актиновый промотор карпа, он был любезно предоставлен нам коллегами из Датской ветеринарной лаборатории (г. Орхус). Конечная конструкция pBACarpVax-G-ЗЛ4 - кандидатная ДНК-вакцина – содержит, таким образом, вставку полноразмерного гена гликопротеина российского референсного штамма ЗЛ4 вируса ВВК под контролем промотора  $\beta$ -актина карпа (рис. 6).

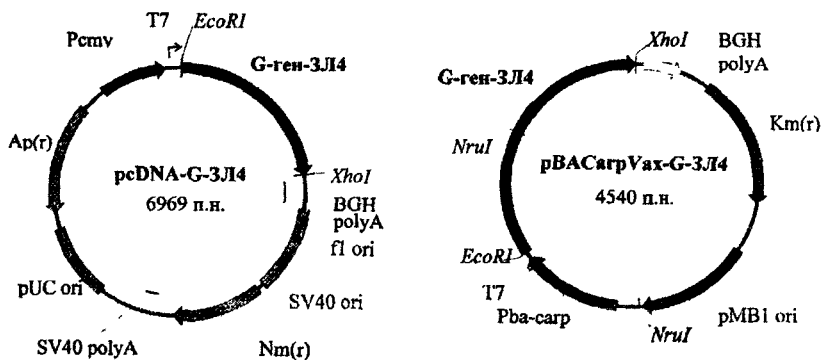


Рис. 6 Схема конструкций со вставкой нуклеотидной последовательности, кодирующей гликопротеин вируса ВВК российского изолята ЗЛ4.

### Защитные свойства вакцин-кандидатов

Эффективность полученных конструкций тестировали по схеме, аналогичной для экспериментальных вакцин со вставкой гена гликопротеина американского изолята вируса ВВК, описанной ранее.

Проведенные испытания показали, что в/м инъекция 1 мкг кандидатной ДНК-вакцины pcDNA-G-ЗЛ4 на грамм массы тела рыбы обеспечи-

вает выживаемость 82% опытных животных, значение индекса защиты – 72%. Кандидатная ДНК-вакцина pcDNA-G-a в этом эксперименте продемонстрировала самую высокую протективность: выживаемость – 92,9% рыб, индекс защиты – 89% (рис. 7).

Незначительно более низкий защитный эффект конструкции pcDNA-G-ЗЛ4, вероятнее всего, обусловлен большей гетерологичностью между изолятами вируса ВВК, используемыми при создании этого варианта ДНК-вакцины (ЗЛ4) и для заражения (М2). Молдавский изолят М2 входит в одну гено-группу с американским, тогда как ЗЛ4 относят к 5 группе. Известно, что эти две группы отличаются между собой серологически. К сожалению, наш референсный изолят (ЗЛ4) не может использоваться для создания модели заболевания, поскольку даже при в/б заражении он не обеспечивает высокой смертности рыб.

Тем не менее, перспективность гена гликопротеина изолята ЗЛ4 как иммуногенной основы для ДНК-вакцины несомненна, поскольку данный штамм вируса принадлежит к главной генетической группе на территории бывшего СССР и, следовательно, такая вакцина должна быть весьма востребована в отечественной акваиндустрии.

Уровень резистентности, развивающийся в ответ на введение кандидатной ДНК-вакцины, в которой экспрессия рекомбинантного вирусного белка проходит под контролем промотора  $\beta$ -актина карпа, был незначительно ниже по сравнению с конструкцией с CMV промотором (рис. 7). Значение ИЗ составило 58 %, при выживаемости 74% рыб.

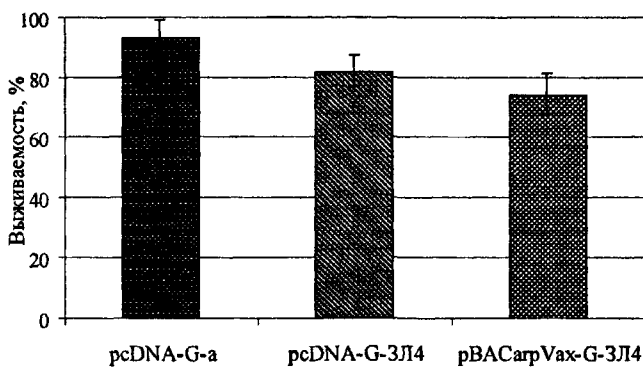


Рис. 7 Эффективность кандидатных ДНК-вакцин со вставкой гена, кодирующего гликопротеин вируса ВВК.

Использование для создания ДНК-вакцины промотора  $\beta$ -актина карпа лишь незначительно снизило защитный эффект от иммунизации по сравнению с конструкцией с CMV промотором. Тем не менее, применение конструкции pVACarpVax-G-3L4 в качестве вакцины против ВВК будет более безопасным для человека как потребителя рыбы.

### Генно-инженерные плазмидные ДНК – кандидатные вакцины, кодирующие нуклеопротеин российского изолята вируса весенней виремии карпа

Наиболее подходящим кандидатом на роль иммуногенной основы для рекомбинантной вакцины против ВВК, несомненно, является, расположенный на поверхности вириона трансмембранный гликопротеин. Однако в литературе описаны работы по ДНК-иммунизации смесью плазмид, содержащих последовательности, кодирующие два разных вирусных белка. Протективные свойства подобных комбинированных препаратов зачастую выше, чем у вакцин, содержащих только один вирусный ген. В связи с этим, одной из задач работы являлось создание генетической конструкции, кодирующей нуклеопротеин вируса ВВК изолята 3L4, и ее тестирование на рыбах в качестве самостоятельной ДНК-вакцины, и для иммунизации смесью плазмид, несущих гены гликопротеина и нуклеопротеина данного патогена.

Секвенирование последовательности ДНК наших клонированных фрагментов подтвердило то, что они действительно кодируют нуклеопротеин вируса ВВК. Было выявлено 55 нуклеотидных замен в отношении референсного европейского штамма Fijap, 8 из которых значимые, приводят к заменам аминокислотных остатков. Конечная конструкция pVACarpVax-N-3L4 - содержит таким образом вставку полноразмерного гена нуклеопротеина вируса ВВК российского изолята 3L4 под контролем промотора  $\beta$ -актина карпа (рис. 8).

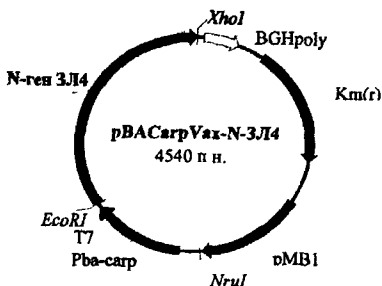


Рис. 8. Схема конструкций со вставкой нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеопротеин вируса ВВК российского изолята 3L4.



Введение полученной конструкции со вставкой гена нуклеопротеина практически не защищало иммунизированных рыб при экспериментальном в/б заражении вирусом ВВК. Инъекция рVACarpVax-N-ЗЛ4 обеспечивала только достоверное увеличение среднего времени выживания в этой группе рыб, свидетельствующее о том, что процесс гибели растянут во времени ( $0,01 < P < 0,05$ ). Это является выгодным признаком при развитии болезни на фоне весеннего подъема температуры воды.

В группе рыб, получивших обе плазмидные конструкции, защитный эффект не отличался от такового при введении одной кандидатной ДНК-вакцины рVACarpVax-G-ЗЛ4 ( $P > 0,05$ ).

#### **Исследование влияния иммуностимулятора ридостина и температуры воды на эффективность ДНК-вакцинации.**

С целью повышения эффективности «русской» кандидатной ДНК-вакцины процедура иммунизации была несколько модифицирована. В эксперименте две из четырех опытных групп рыб помещали в отдельный бассейн, температуру воды в котором через сутки поднимали до 17-19 °С и поддерживали в течение 10 дней, затем их возвращали в аквариум с температурой воды 13-15 °С. Для вакцинации двух групп рыб использовали совместное введение с плазмидной ДНК иммуностимулятора ридостина (R) (НИКТИБАВ, Бердск) в дозе 1 мкг/кг ихтиомассы. В одной группе рыб были проделаны обе эти дополнительные процедуры.

Две примечательные особенности четко проявились в этом эксперименте. Первая – неожиданное отсутствие защитного эффекта при введении ДНК-вакцины в комплексе с ридостином, поскольку ранее Щелкуновым И.С. при исследовании неспецифической резистентности было показано эффективное его действие против вируса ВВК, продолжавшееся не менее месяца.

По-видимому, одновременное введение ридостина с ДНК-вакциной значительно ускорило элиминацию плазмиды из тканей карпа и заблокировало экспрессию G-гена, что негативно отразилось на развитии эффективного иммунного ответа к вирусному гликопротеину. Действие самого ридостина к моменту заражения (через 10 недель) почти закончилось и выражалось только достоверном увеличении средней продолжительности выживания в группе, получившей вместе с этим препаратом пустой плазмидный вектор рсDNA3.

Таблица 2. Фактические данные эксперимента по испытанию способов модификации ДНК-вакцинации

Группа рыб	Выживаемость, %	Индекс защиты, %	Средняя продолжительность выживания, сутки
pcDNA-G-ЗЛ4	43,3	37	5,5±1,7 (n=15)
pcDNA-G-ЗЛ4,R	20,7	11,9	5,7±2,3 (n=20)
pcDNA3,R	10,0	-	10,9±6,4 (n=27)
pcDNA-G-ЗЛ4,t <sup>o</sup>	69,0	64,2	20,8±20,3 (n=9)
pcDNA3,t <sup>o</sup>	13,3	-	7,4±4,1 (n=26)
pcDNA-G-ЗЛ4,R+t <sup>o</sup>	30,0	27,6	7,2±4,0 (n=20)
pcDNA3,R+t <sup>o</sup>	3,3	-	8,1±5,0 (n=28)

Вторая особенность, выявленная в эксперименте – усиление защитного эффекта от вакцинации в группе рыб, которых содержали в течение 10 дней после введения плазмидной конструкции при повышенной до 17-19°C температуре воды. Известно, что у карпа не все иммунные механизмы включаются в работу при температуре ниже 15°C, тогда как кратковременное содержание рыбы при температуре выше этого значения ведет к их запуску и дальнейшему функционированию даже при последующем понижении температуры воды. Очевидно, именно этот феномен проявился в данном случае.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые выявлена способность генно-инженерной конструкции рсDNA-G-а со вставкой полноразмерного гена гликопротеина вируса весенней виремии карпа индуцировать синтез вируснейтрализующих антител в сыворотке крови внутримышечно иммунизированных рыб и эффективно защищать их при экспериментальном заражении вирусом ВВК (выживаемость 93 %).

2. Получен штамм-продуцент *E. coli* фрагмента гликопротеина вируса ВВК. Показана его умеренная способность защищать карпа от последующего заражения вирулентным вирусом (выживаемость 42 %).

3. Определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих гликопротеин и нуклеопротеин вируса весенней виремии карпа российского изолята ЗЛ4.

4. Впервые создана генно-инженерная конструкция рсDNA-G-ЗЛ4, кодирующая полноразмерный гликопротеин вируса референсного для России изолята. Данная кандидатная ДНК-вакцина обеспечивает высокий и воспроизводимый уровень защиты в эксперименте при введении карпу (выживаемость 82 %).

5. Создана генно-инженерная конструкция рВАСарpVax-G-ЗЛ4, в которой экспрессия гена гликопротеина вируса весенней виремии карпа проходит под контролем более безопасного для человека промотора  $\beta$ -актина карпа. Иммунизация карпов данной кандидатной ДНК-вакциной обеспечивает высокий и воспроизводимый уровень защиты (выживаемость 74 %).

6. Создана генно-инженерная конструкция рВАСарpVax-N-ЗЛ4 со вставкой полноразмерного гена нуклеопротеина вируса. Иммунизация этой плазмидной ДНК обеспечивала увеличение среднего времени выживания рыб, что является выгодным признаком при развитии болезни на фоне весеннего подъема температуры воды.

7. Показано, что наиболее оптимальной дозой плазмидной ДНК для иммунизации является 1 мкг/г массы тела рыбы. Показано также повышение эффективности ДНК-вакцинации на 26 % при содержании рыбы при повышенной температуре воды.

### **Список публикаций:**

1. О.С. Воронова, Г.Н. Николенко, И.С. Щелкунов, С.Ф. Орешкова, Т.И. Щелкунова, А.А. Ильичев. Ген гликопротеина (G-ген) российского референсного штамма ЗЛ-4 вируса весенней виремии карпа и рекомбинантные плазмидные ДНК pcDNA-G и pBACarpVax-G, экспрессирующие ген гликопротеина и обеспечивающие развитие у рыб защитного иммунитета против заражения вирусом весенней виремии карпа. Заявка № 2004108191 от 23.03.04. публикация 27.09.2005., № 27.

2. Щелкунов И.С., Воронова О.С., Орешкова С.Ф., Щелкунова Т.И., Николенко Г.Н., Ильичев А.А. «Имунопротективные свойства экспериментальных рекомбинантных вакцин против весенней виремии карпа». – Биотехнология. – 2005. – № 6. стр. 23–31.

### **Доклады и тезисы конференций:**

1. Shchelkunov I.S., Oreshkova S.F., Shchelkunova T.I., Nikolenko G.N., Kupinskaya O.A., Voronova O.S., Johnson M., and Leong J.C. Comparative testing of experimental SVC-vaccines developed with the use of recombinant DNA technology. Abstr of 10th Intern. Confer. of the EAFF “Diseases of Fish and Shellfish”. – September 9–14. – 2001. - Dublin, Ireland. - Abstract book – P. 173.

2. Nikolenko G.N., Shchelkunov I.S., Voronova O.S., Oreshkova S.F., Shchelkunova T.I., Ilyichev A.A. Development of vaccine against fish rhabdovirus – spring viremia of carp virus. Abstr. of IVth ISTC scientific advisory committee seminar on “Basic science in ISTC activities”. – 23–27 April. – 2001. - Akademgorodok, Novosibirsk. – P.94.

3. Воронова О.С., Николенко Г.Н. Изучение протективных свойств рекомбинантных вакцинных препаратов против весенней виремии карпа. Доклад на конф. Молодых ученых ГНЦ ВБ Вектор. 2001.

4. Nikolenko G.N., Shchelkunov I.S., Voronova O.S., Oreshkova S.F., Shchelkunova T.I., Ilyichev A A Development of recombinant vaccine against spring viremia of carp virus. Abstr. of Intern. Simp. “Molecular Mechanisms of Genetic Processes and Biotechnology”. – November 22-24. – 2001. - Minsk, Belarus. – P. 296.

5. Voronova O.S., Shchelkunov I.S., Nikolenko G.N., Oreshkova S.F., Shchelkunova T.I., Ilyichev A.A. Development of vaccine against fish Rhabdovirus – spring viremia of carp virus. Abstr. of Sixth John Humphrey advanced summer program in immunology molecular basis of the immune response. - September 15–22. – 2002. – Pushchino, Russia. – P. 105.

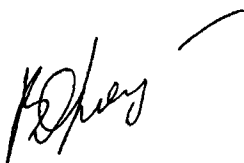
6. Voronova O.S., Nikolenko G.N., Shchelkunov I.S., Oreshkova S.F., Shchelkunova T.I., Ilyichev A.A. A fish DNA vaccine against spring viremia of carp virus. Abstr. of the 3rd Fish Vaccinology Symposium. - Bergen, Norway, April 9–11. – 2003. – P. 103.

7. Voronova O.S., Nikolenko G.N., Shchelkunov I.S., Oreshkova S.F., Shchelkunova T.I., Ilyichev A.A. A fish DNA vaccine against spring viremia of

carp virus. Abstr. of Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics. Kiev, Ukraine. – September 25–28. - 2003. – P. 40.

8. Oreshkova S.F., Shchelkunov I.S., Voronova O.S., Popova A.G., Nikolenko G.N., Shchelkunova T.I., Ilyichev A.A. Development of Methods for Diagnosis and Specific Prevention of Spring Viraemia of Carp // Second Bilateral Conference USA/ Russia “Aquatic and marine animal health”, Shepherdstown, West Virginia. – 21–28 September. – 2003. - P. 19.

9. Voronova O.S., Shchelkunov I.S., Nikolenko G.N., Shchelkunova T.I., Oreshkova S.F. Immunoprotective properties of experimental recombinant vaccines against spring viremia of carp. DAAD Summer School on “Current trends in comparative immunology”. – St. Petersburg, May 22 – June 5. – 2005.



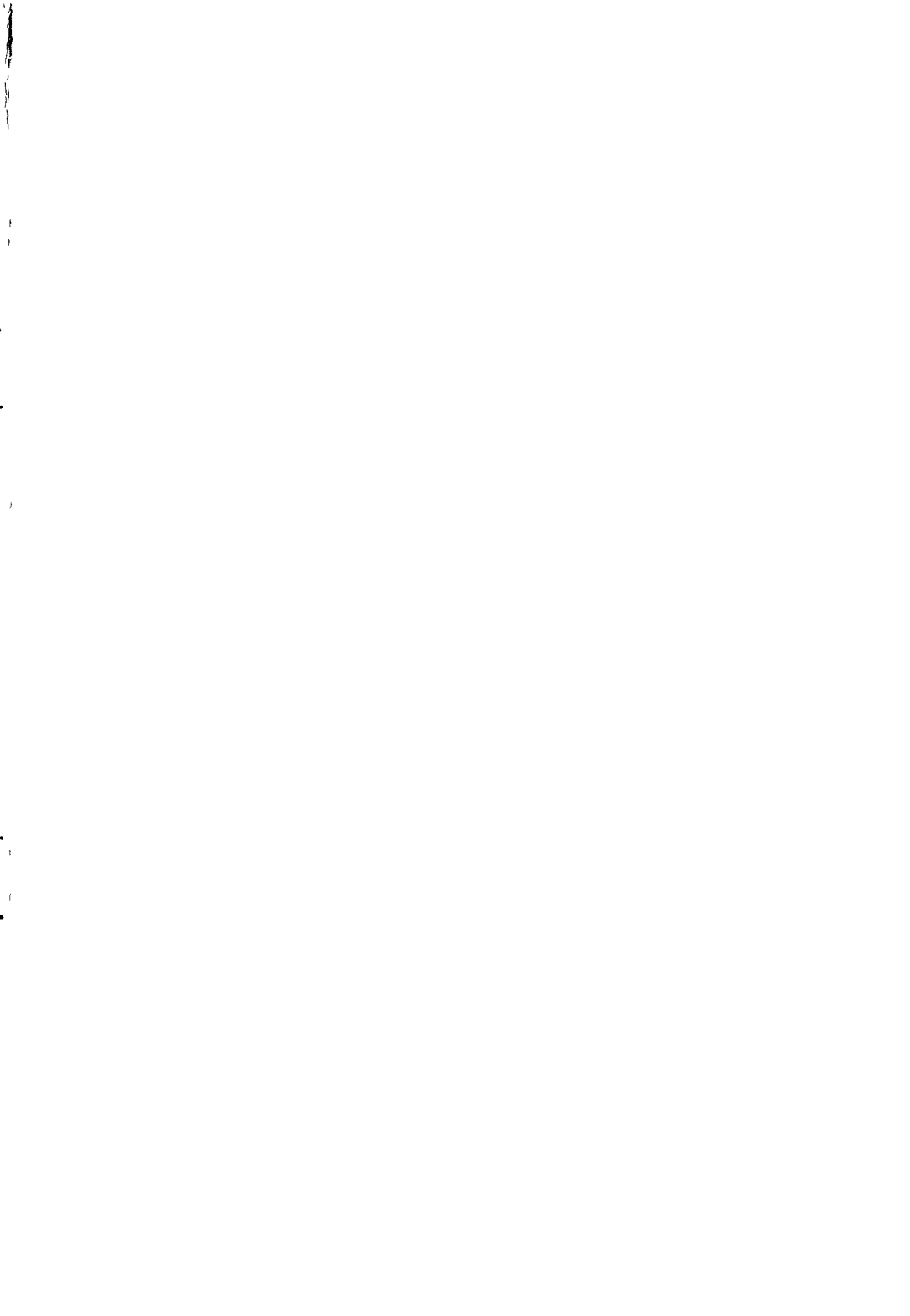
О.С. Воронова

---

Подписано в печать 21.11.05 Бумага офсетная Формат 60×84/16

Усл. печ. л. 1,5 Уч-изд. л. 1,5. Тираж 100.

Отдел оперативной печати ЗАО «Вектор-Бест».  
630559 Новосибирская обл., пгт. Кольцово, а/я 125.



**№25062**

РНБ Русский фонд

2006-4

29967