

**Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр вирусологии и
микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ)**



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ
И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

«Рекомбинантные векторные вакцины»

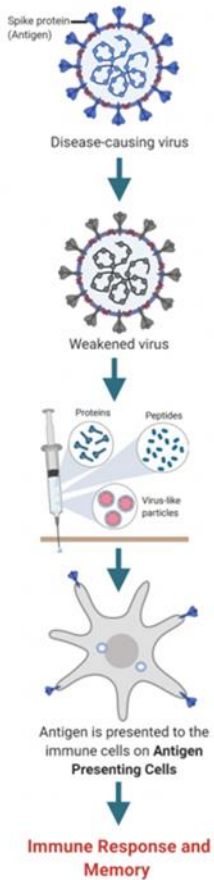
**Заместитель директора,
Заведующий лабораторией Геномики вирусов
Кольцова Г.С.**

Новосибирск 2024

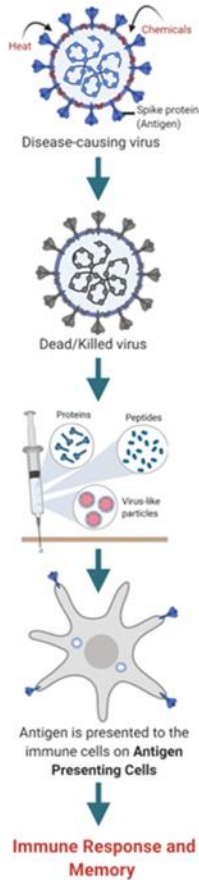
www.ficvim.ru

ТИПЫ ВАКЦИН

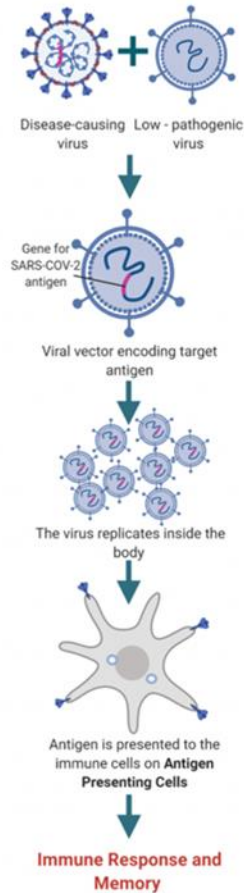
Живые аттенуированные



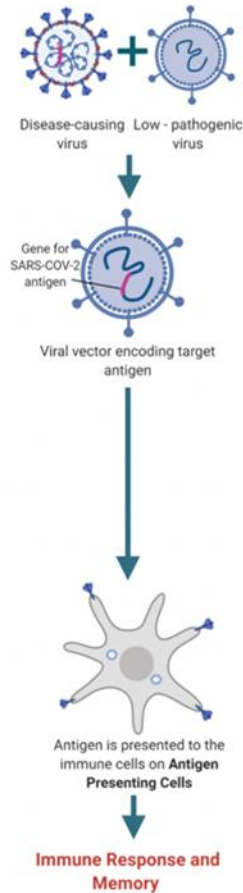
Инактивированные



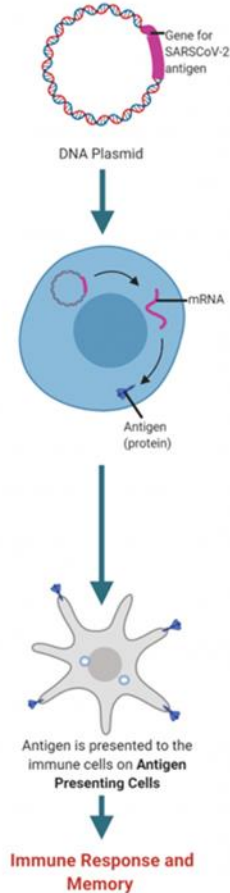
На основе реплицируемых вирусных векторов



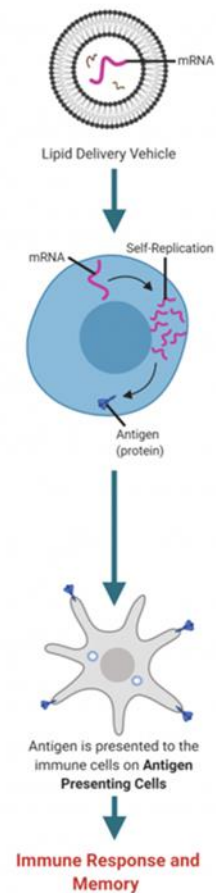
На основе нереплицируемых вирусных векторов



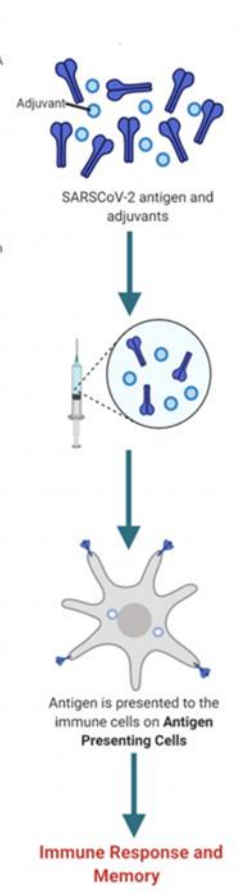
ДНК-вакцины



РНК-вакцины

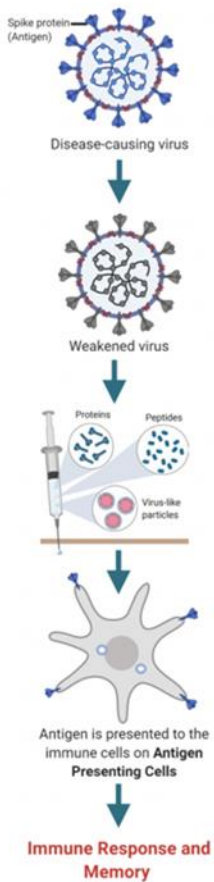


Субъединичные

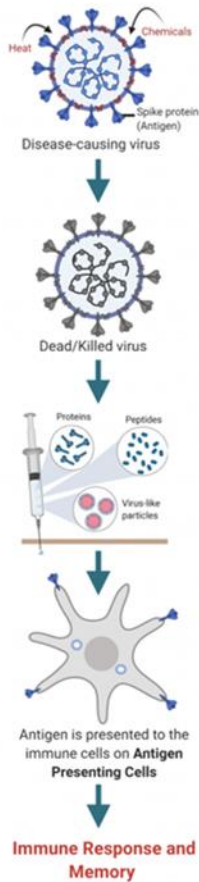


ТИПЫ ВАКЦИН

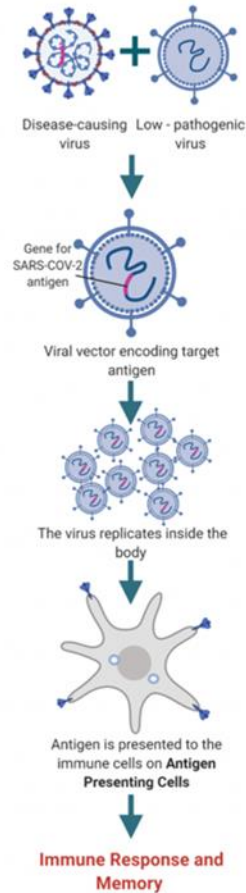
Живые аттенуированные



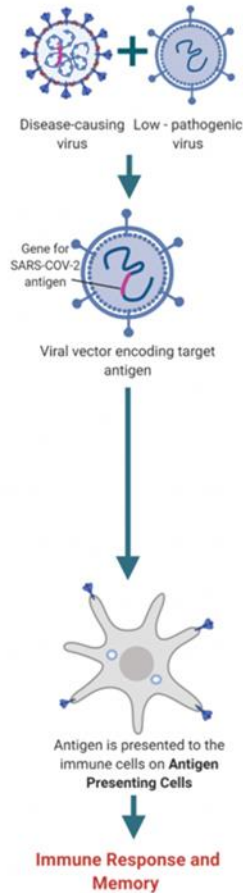
Инактивированные



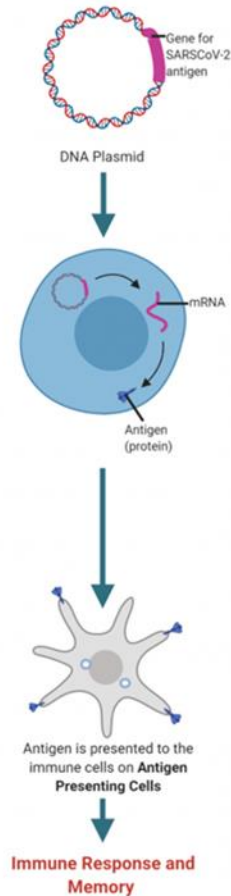
На основе реплицируемых вирусных векторов



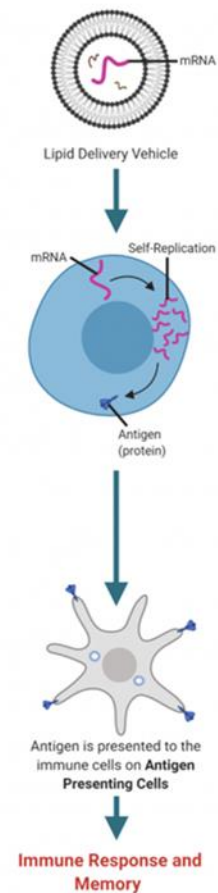
На основе нереплицируемых вирусных векторов



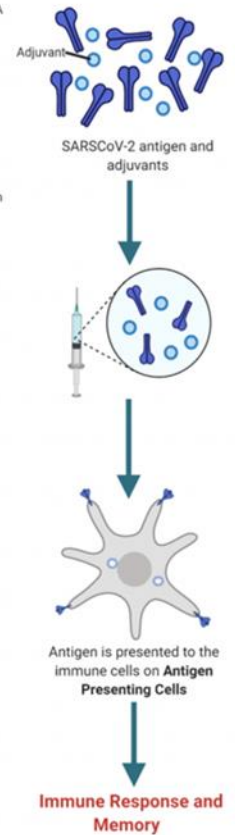
ДНК-вакцины



РНК-вакцины

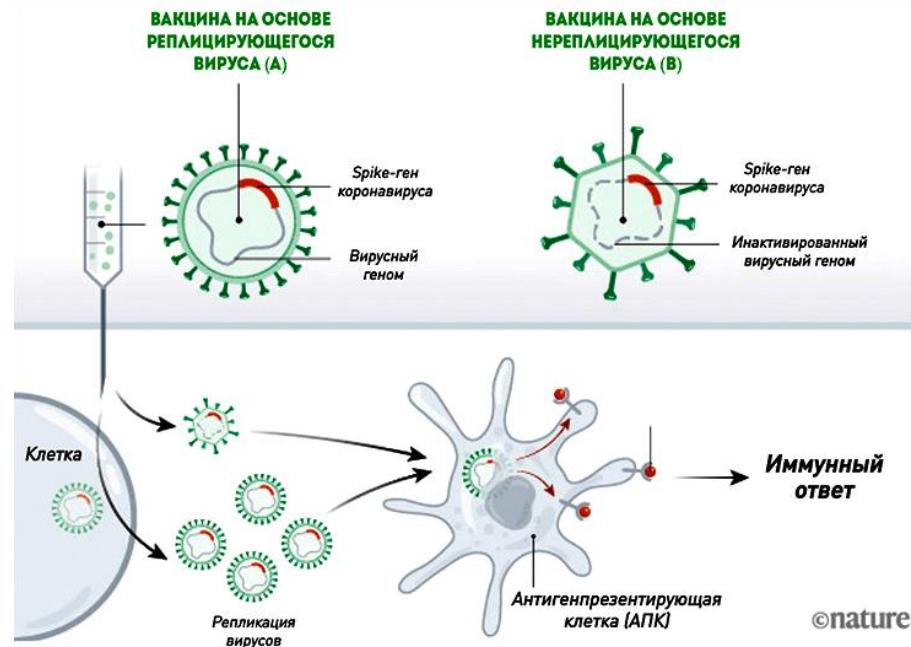


Субъединичные



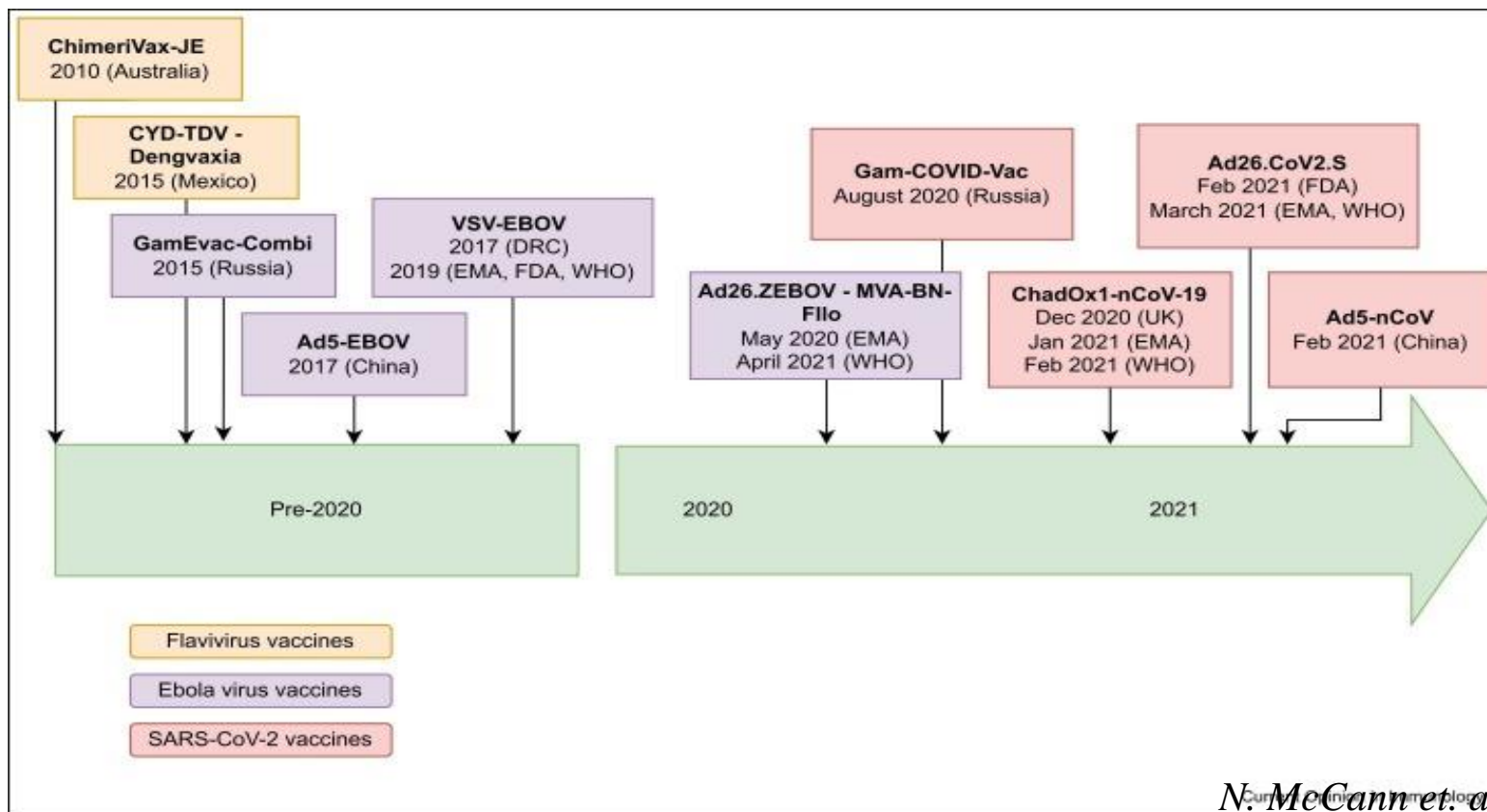
ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ

- Векторные вакцины (или вакцины на основе вирусных векторов) — вакцины, в которых безопасные вирусы (вирусные векторы) используются для доставки генетического материала, кодирующего защитные антигены, для стимуляции иммунного ответа.
- Вектор – это вирус, который сам по себе не вызывает заболевания, но используется для транспортировки генетического материала в клетку/организм. Вектор генетически изменен с использованием биотехнологических методов, чтобы быть безопасным и служить эффективной системой доставки.

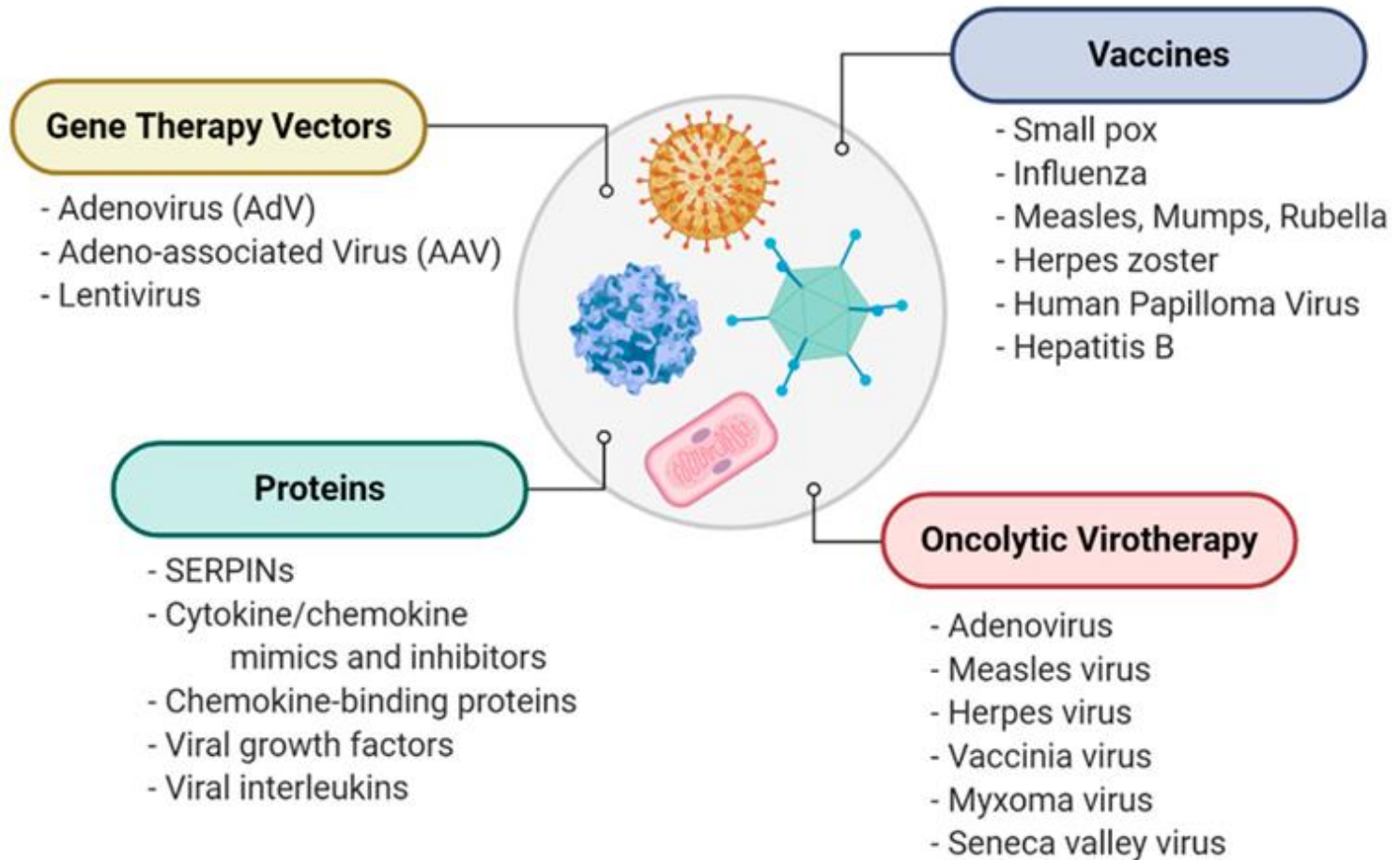


ХРОНОЛОГИЯ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН

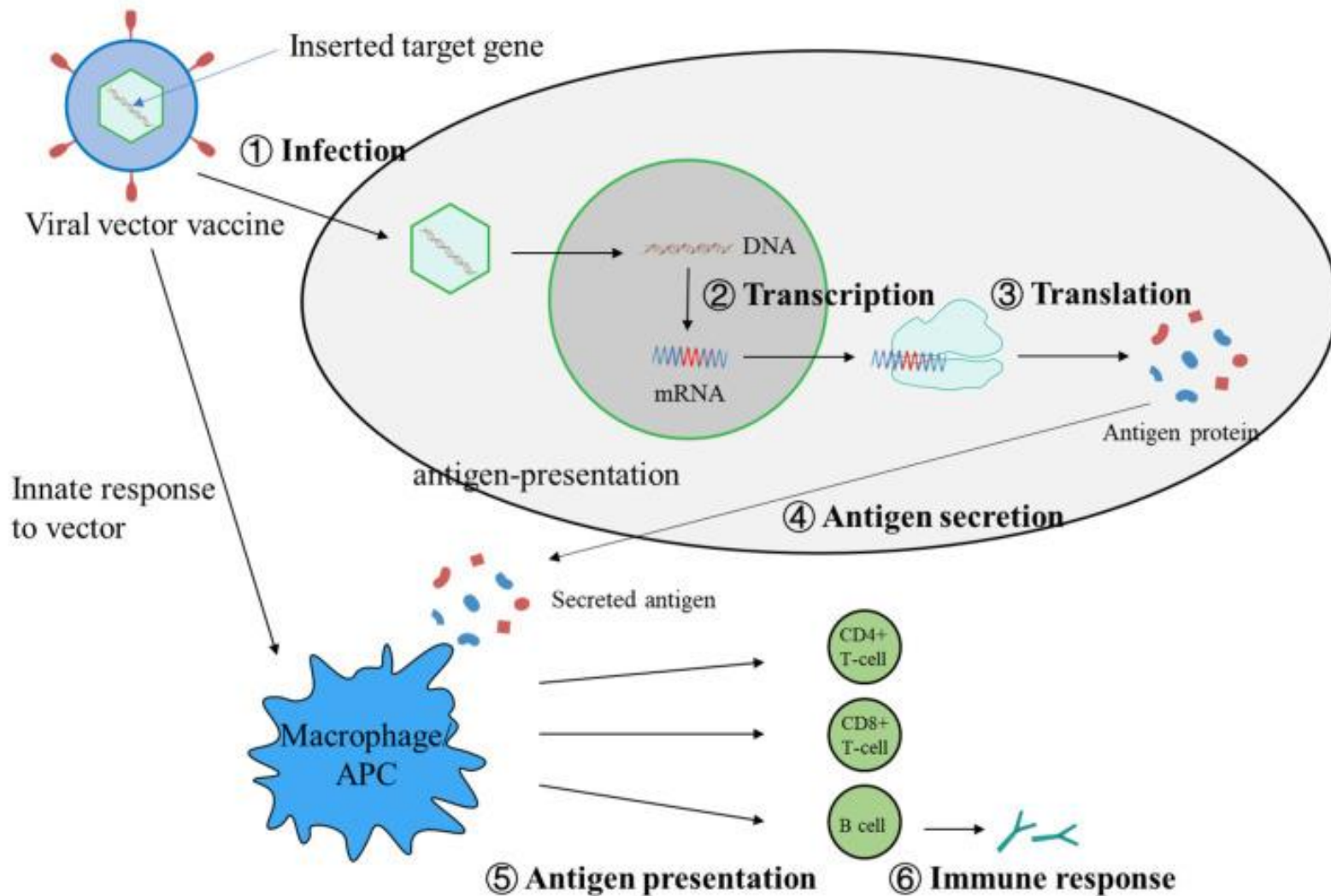
- 1970е** Открытие технологии рекомбинантной ДНК
- 1980е-90е** Первые исследования вирусных векторов для генной терапии
- 2000е** Первое экспериментальное применение вирусных векторных вакцин
- 2020е** Широкое применение вирусных векторных вакцин (преимущественно против COVID-19)



ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ И НЕРЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

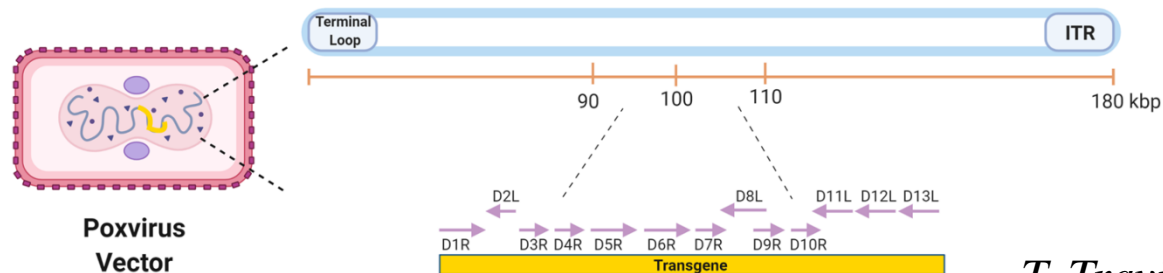
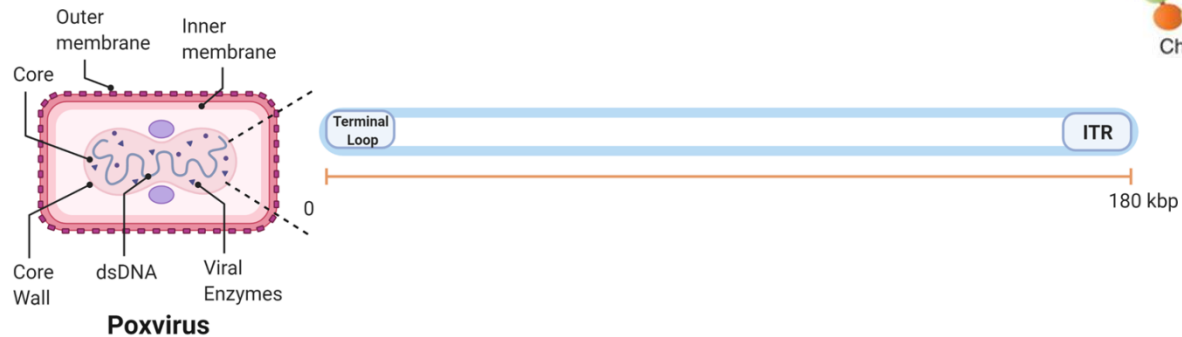
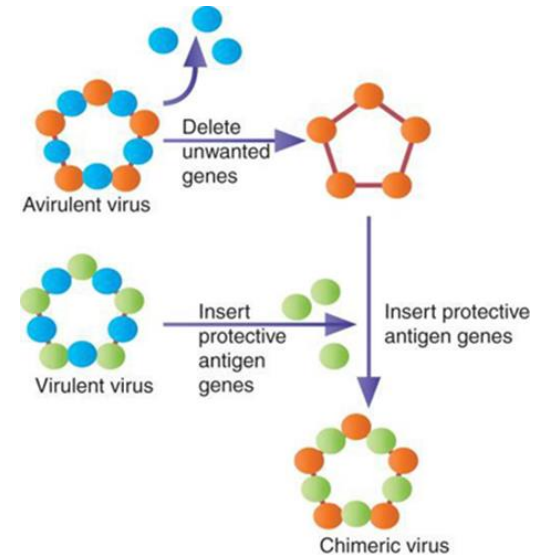


ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ И НЕРЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ



ПОЛУЧЕНИЕ ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН

1. Удаление генов-вирулентности.
2. Включение в геном целевых чужеродных генов.
3. Включение в геном репортерных генов для селекции.



ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

Преимущества:

- Данные типы вакцин безопасны.
- Вызывают развитие как гуморального, так и клеточного иммунного ответа.
- Некоторые вирусные векторы имеют большую емкость генома и могут использоваться для доставки генов нескольких патогенов с целью создания поливалентных вакцин.
- Возможность использовать DIVA-стратегию.

Ограничения:

- Иммуногенность белков самого вектора.
- Менее продолжительный и сильный иммунный ответ по сравнению с живыми аттенуированными вакцинами.
- В некоторых случаях низкий уровень экспрессии целевого белка.

ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

Наиболее часто используемые вирусные векторы:

- Аденовирусы.
- Аденоассоциированный вирус.
- Lentивирусы.
- Вируса везикулярного стоматита.
- Осповирусы.
- Герпесвирусы.
- Бакуловирусы.
- Вирусы гриппа и др.

Вирусный вектор	Цель	
	Ветеринария	Медицина
Adenovirus	Avian influenza virus, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and foot-and-mouth disease virus	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>M. tuberculosis</i> , influenza virus, HIV-1 and hepatitis C virus
Bacteriophage in <i>Shigella</i>	None	<i>M. tuberculosis</i>
Attenuated canarypox virus	Equine influenza virus, West Nile virus (WNV), rabies virus, feline leukaemia virus and canine distemper virus	HIV-1 and cancer
Fowlpox virus (FPV)	Avian influenza virus, FPV and Newcastle disease virus (NDV)	Cancer
NDV	Avian influenza virus and NDV	None
Turkey herpesvirus	Infectious bursal disease virus and Marek's disease virus	None
Flavivirus YFV-17D	WNV	WNV, dengue virus and Japanese encephalitis virus
Lentivirus	None	Melanoma and HIV-1
Measles virus	None	<i>P. falciparum</i> and human papilloma virus
Modified vaccinia virus Ankara	<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>P. falciparum</i> , <i>M. tuberculosis</i> , influenza A virus, HIV-1 and colorectal, renal, lung and prostate cancer
New York attenuated vaccinia virus	None	<i>P. falciparum</i> and HIV-1
Sendai virus	None	HIV-1
Vaccinia virus	Rabies virus	Cancer

КОММЕРЧЕСКИЕ ВЕТЕРИНАРНЫЕ ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ

Species	Vaccine	Manufacturer	Pathogen	Technology (viral-vector)
Canine	Recombitek [®] CDV	Boehringer Ingelheim	Canine Distemper Virus	Viral-Vector (canarypox)
Feline	PureVAX [®] Recombinant FeLV	Boehringer Ingelheim	Feline Leukemia Virus	Viral-Vector (canarypox)
	PureVAX [®] Feline Rabies	Boehringer Ingelheim	Rabies	Viral-Vector (canarypox)
Equine	ProteqFlu	Boehringer Ingelheim	Equine Influenza	Viral-Vector (canarypox)
	ALVAC [®] -WNV	Pfizer	West Nile Virus	Viral-Vector (canarypox)
Swine	Fostera TM PCV	Zoetis	Porcine Circovirus Type 2	Chimeric Viral-vector (PCV-1)
	Suvaxyn [®] CSF Marker	Zoetis	Classical Swine Fever virus	Chimeric Viral-vector (BVDV)
	iPED+	Merck Animal Health	Porcine Endemic Diarrhea virus	RNA Replicon (VEEV)
	Sequivity [®]	Merck Animal Health	Swine influenza A virus	RNA Replicon (VEEV)
Bovine	Adt.A24 FMD	GenVec	Foot and Mouth Disease	Viral-vector (adenovirus)
Avian	Trovac [®] -AIV H5	Boehringer Ingelheim	Avian Influenza	Viral-vector (fowlpox)
	Vectormune [®] AI	CEVA Biomune	Avian Influenza	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
	Vectormune [®] ND	CEVA Biomune	Newcastle Disease	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
	Vectormune [®] FP LT	CEVA Biomune	Infectious Laryngotracheitis virus	Chimeric Viral-vector (fowlpox)
	Vectormune [®] FP MG	CEVA Biomune	Mycoplasma Gallisepticum	Chimeric Viral-vector (fowlpox)
	Vectormune [®] FP-N	CEVA Biomune	Newcastle Disease	Chimeric Viral-vector (fowlpox)
	Innovax [®] -ND	Merck Animal Health	Newcastle Disease	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
	Innovax [®] -ND-IBD	Merck Animal Health	Newcastle disease and Infectious bursal disease	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
	Innovax [®] -ND-ILT	Merck Animal Health	Newcastle disease and infectious laryngotracheitis	Chimeric Viral-vector (HVT/MD)
Wildlife	ORNAB [®]	Artemis Technologies, Inc.,	Rabies	Viral-vector (human adenovirus type 5)
	Raboral V-RG [®]	Boehringer Ingelheim	Rabies	Viral-vector (vaccinia virus)
Rabbits	Novibac [®] Myxo-RHD	Merck Animal Health	Rabbit Hemorrhagic Disease	Chimeric Viral-vector (myxoma virus)
	Novibac [®] Myxo-RHD Plus	Merck Animal Health	Rabbit Hemorrhagic Disease	Chimeric Viral-vector (myxoma virus)

ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

Вирусные векторы для профилактики болезней свиней:

- Swinepox Virus Vector
- Pseudorabies Virus Vector и Porcine Cytomegalovirus
- Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vector
- Adenovirus Vector
- Influenza A virus of the swine
- Baculoviruses
- Newcastle disease virus.

ВИРУС РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ (PRSS, PRRSV)

- **Вирус болезни Ауеки (Pseudorabies virus (PRV))** – делеция гена gE, вставка гена PRRSV GP5 или комбинации GP5m и M. Эффективность выше или аналогична эффективности коммерческих вакцин.
- **Аденовирусы** - вставка генов единичных или фьюжированных структурных белков PRRSV, таких как GP3, GP4, GP5, M. Несколько независимых исследований, некоторые из которых не включали контрольного заражения. Чаще всего наблюдали частичную защиту.
- **Осповирусы (Poxviridae) вирус оспы птиц, вирус оспы свиней, вирус осповакцины** - вставка генов единичных или фьюжированных структурных белков PRRSV, таких как GP3, GP5. Несколько независимых исследований, большинство из которых не включали контрольного заражения. Чаще всего наблюдали частичную защиту.
- **Короновирусы (Porcine respiratory coronavirus (PRCV))** – вставка генов GP5, M. Средняя эффективность, частичная защита.

ВИРУС КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ (КЧС, CSFV)

- **Вирус болезни Ауеки (Pseudorabies virus (PRV))** – делеция генов gE, gI, thymidine kinase (ТК), protein kinase (PK) для аттенуации вектора, вставка гена E2. Эффективность высокая. Может также включать ген Cap белка PCV2. Могут использоваться как DIVA-вакцины.
- **Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus** - вставка гена E2. Эффективность высокая, длительный иммунитет. Может использоваться как DIVA-вакцина.
- **Аденовирусы** - вставка гена E2. Эффективность высокая.
- **Осповирусы (Poxviridae) Newcastle disease virus (NDV), вирус оспы свиней** - вставка гена E2. Эффективный иммунный ответ.
- **Бакуловирусы** – вставка гена E2. Эффективный иммунный ответ.

ВИРУС ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ ДИАРЕИ СВИНЕЙ (ЭДС, PED)

- **Осповирусы (Poxviridae) swinepox virus и Orf virus (ORFV)** – вставка гена S белка. Эффективность высокая.
- **Vesicular stomatitis virus** - вставка гена S белка. Эффективность высокая.
- **Аденовирусы** - вставка гена S белка. Эффективность высокая.

Table 1. Vaccine strategies for PEDV.

Vaccine Platform	Antigen	Development	Advantages	Limitations
Live-attenuated virus	Whole virus	Multiple passages in cell culture Reverse genetics	High immunogenicity (strong cellular and humoral immune responses); can be given orally and in a single dose	Low safety (reversion to virulence, recombination with a field strain)
Inactivated virus	Whole virus	Inactivation with chemicals	Easy to prepare; high safety	Needs adjuvant; multiple injections; low immunogenicity (Th-2 skewed immune response)
Subunit	Spike protein	Antigen expressed in mammalian, baculovirus, yeast, or plant cells	Enhanced safety; rapidly produced	Expensive; needs adjuvant; limited immunogenicity
Viral vector	Spike protein	Adenovirus, vesicular stomatitis virus, poxvirus engineered to express spike protein	Strong cellular and humoral immune responses; intrinsic adjuvant properties; can be given orally	Pre-existing immunity against viral vector
Nucleic acid	Spike protein	Genes (mRNA or DNA) encoding spike proteins	Cost-effective; high safety; rapidly produced; easy to prepare	Limited immunogenicity (Th-1 skewed immune response)
Virus-like particle	Spike and other structural (envelope, membrane, or nucleocapsid) proteins		Strong immune responses; activates both B cell and T cells; high safety	High cost; low yield

MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE (M. HYOPNEUMONIAE)

Table 4 Efficacy and immune responses of experimental vector vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* tested in pigs.

Antigen	Vector	Route	Number of vaccinations	Significant decrease of			Humoral response		CMI response ^a	Other/comments
				Lung lesions	Clinical signs	<i>M. hyopneumoniae</i> numbers	Serum	BALF ^b		
NrdF (R2)	<i>S. Typhimurium</i> aroA SL3261 ^c	Oral	2	Yes			No	IgA	Yes	Higher ADG ^b ; IgA only after challenge
P97 (R1R2)	<i>E. rhusiopathiae</i> strain YS-19 ^c	Intranasal	2	Yes		Yes	No		Yes	
P97 (R1R2)	<i>E. rhusiopathiae</i> strain Koganei 65-0.15	Oral	3	Yes		No	IgG	IgA	Yes	IgG and IgA only after challenge
P97 (R1R2)	Adenovirus	Intranasal	2	Yes		Yes	IgG, IgA	IgA, IgG (saliva)	Yes	higher ADG; serum inhibited <i>M. hyopneumoniae</i> growth; minor decrease of lung inflammation Commercial vaccine: no anti-P97 antibodies, better protection

^a CMI responses were tested by stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and calculating stimulation indexes.

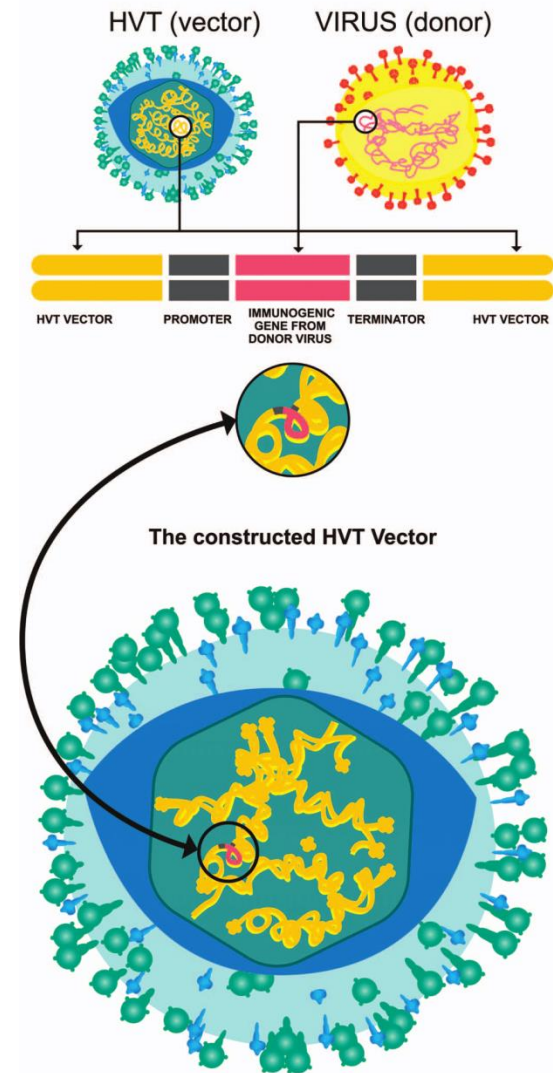
^b BALF, bronchoalveolar lavage fluid; ADG, average daily gain.

^c *S. Typhimurium*: *Salmonella Typhimurium*; *E. rhusiopathiae*: *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Maes et al., 2021

ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ В ПТИЦЕВОДСТВЕ

- Более 15 рекомбинантных вирусных векторных вакцин зарегистрировано против болезни Ньюкасла, инфекционного ларинготрахеита, инфекционной бурсальной болезни, болезни Марека, птичьего гриппа и *Mycoplasma gallisepticum*.
- Первая векторная вакцина лицензирована в 2007 году.
- **Вирус оспы птиц (Fowlpox virus) и герпесвирус индеек (turkeyherpesvirus) – основные векторы.**
- Преимущества: не вызывают поствакцинальных реакций, фенотипически стабильны, нет реверсии к вирулентности и редко передаются горизонтально.
- Можно удобно вводить в инкубатории путем подкожной инъекции в возрасте 1 дня или *in ovo*.
- Иммунитет развивается медленнее, чем при использовании живых и инактивированных вакцин.



ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА И ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА (ИЛТ)

Table 1. Commercially available poultry recombinant vaccines for ND.

Generation	Vector	Gene inserts	Strain insert	Product	Year licensed	Administration	
First	FPV	HN, F	Texas strain genotype IV	TROVAC [®] -NDV ^A	1996	s.c. ^B	
			D26 genotype I	Vectormune [®] FP ND ^F	2002	s.c. w.w. ^D	
Second	HVT	F	D26	Vectormune HVT ND ^C	2007	<i>In ovo</i> , s.c.	
			Clone 30 genotype II	Vectormune ND+Rispens ^C			
				Innovax [®] ND ^F	2007	<i>In ovo</i> , s.c.	
				Innovax ND-SB ^E	2009	<i>In ovo</i> , s.c.	
Third	HVT	F, gI-gD	Texas strain genotype IV	Newxxitek [®] HVT+ND ^A	2018	<i>In ovo</i> , s.c.	
			NDV type not available	Procerta [®] HVT-ND ^F	2019	<i>In ovo</i> , s.c.	
			Clone 30/ILT 83-2	Innovax ND-ILT ^E	2019	<i>In ovo</i> , s.c.	
			Clone 30/Faragher 52/70	Innovax ND-IBD ^E	2017	<i>In ovo</i> , s.c.	
			VP2/F	Vaxxitek [®] HVT+IBD+ND ^A	2019	<i>In ovo</i> , s.c.	
			VP2/F	Standard IBDV/D26 ^F	Ultifend [®] IBD ND ^F	2018	<i>In ovo</i> , s.c.
					Ultifend IBD ND +SB1 ^C	2019	<i>In ovo</i> , s.c.

^ABoehringer Ingelheim Animal Health.

^BSubcutaneously at 1 day of age.

^CCeva Animal Health.

^DWing web at 9 wk of age or older.

^EMerck Animal Health.

^FZoetis Inc.

Table 2. Commercially available poultry recombinant vaccines for ILT.

Generation	Vector	Gene inserts	Strain donor	Product	Year licensed	Administration
First	FPV	gB, UL32	Not available	Vectormune FP-LT ^A	2002	s.c., ^B w.w. ^C
Second	HVT	gB, gD, gI	Not available	Vectormune HVT-LT ^A	2009	<i>In ovo</i> , s.c.
			USDA ILT 83-2	Innovax ILT ^D	2007	<i>In ovo</i> , s.c.
				Innovax ILT-SB ^D	2009	<i>In ovo</i> , s.c.
Third	HVT	F/gD, gI, VP/gD	Clone30 ^E /USDA ILT 83-2	Innovax-ND-ILT ^D	2019	<i>In ovo</i> , s.c.
			Faragher52/70/ILTV USDA challenge strain	Vaxxitek HVT+IBD+ILT ^F	2020	<i>In ovo</i> , s.c.

^ACeva Animal Health.

^BSubcutaneously at 1 day of age.

^CWing web at 19 wk of age or older.

^DMerck Animal Health.

^ENDV genotype; see Table 1.

^FBoehringer Ingelheim Animal Health.

ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ И ГРИППА ПТИЦ

Table 3. Commercially available poultry recombinant vaccines for IBD.

Generation	Vector	Gene inserts	Strain donor	Product	Year licensed	Administration
Second	HVT	VP2	Faragher 52/70	Vaxxitek HVT+IBD ^A	2007	<i>In ovo</i> , s.c. ^B
			Variant Delaware E	Vectormune IBD ^C	2015	<i>In ovo</i> , s.c.
Third	HVT	F/VP2 VP2/F	Clone 30 ^D /Faragher 52/70	Innovax IBD-ND ^E	2017	<i>In ovo</i> , s.c.
			Standard IBDV/D26 ^D	Ultifend IBD ND ^F	2018	<i>In ovo</i> , s.c.
				Ultifend IBD ND+SB1 ^C	2019	<i>In ovo</i> , s.c.
			Faragher 52/70/NDV ^D	Vaxxitek HVT+IBD+ND ^A	2019	<i>In ovo</i> , s.c.
			Faragher52/70/ILTV USDA challenge strain	Vaxxitek HVT+IBD+ILT ^A	2020	<i>In ovo</i> , s.c.

^ABoehringer Ingelheim Animal Health.

^BSubcutaneously at 1 day of age.

^CCeva Animal Health.

^DNDV genotypes; see Table 1.

^EMerck Animal Health.

Table 4. Commercially available poultry recombinant vaccines for AI.

Generation	Vector	Gene insert	Strain	Product name	Country (year licensed)	Country used	Administration
First	FPV	H5	A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8)	Trovac AI H5 ^A	U.S. ^B (1998)	Mexico Guatemala El Salvador	s.c. ^C
			A/chicken/Guanajuato/15 (H7N3)	Trovac Prime H7 ^A	Mexico (2018)	Mexico	s.c.
Second	HVT	H5	A/Swan/Hungary/06 (H5N1 clade 2.2)	Vectormune AI H5 ^D	U.S. ^B (2012)	Asia Middle East	s.c.
			A/chicken/Guanajuato/15 (H7N3)	Vectormune AI H7 ^D	U.S. ^B (2017)	Mexico	s.c.
Third	Alphavirus	H5	H5N8 (RP-H5)	Harrisvax ^F	U.S. ^{B,E} (2015)	—	s.c.

^ABoehringer Ingelheim Animal Health.

^BVaccines with conditional APHIS license for use in the United States in an emergency, in a limited market, and for regional use only.

^CSubcutaneously at 1 day of age.

^DCeva Animal Health.

^EVaccine approved under the Food and Drug Administration (FDA) following 9CFR regulations under the Export Reform and Enhancement Act (FDA-EREA) for distribution and sale of animal biologics to any country, as long as they are not licensed in the United States.

^FMerck Animal Health.

ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ КРС

Вирусные векторы:

Аденовирусы,

Вирус бешенства (rabies virus),

Вирус болезни Ньюкасла (Newcastle disease virus),

Герпесвирус (bovine herpesvirus 4 (BoHV-4)),

Вирус гриппа (novel influenza virus),

Осповирусы (Modified vaccinia Ankara virus (MVA), Bovine papular stomatitis virus (BPSV), Вирус ЗУД (Lumpy skin disease virus (LSDV)),

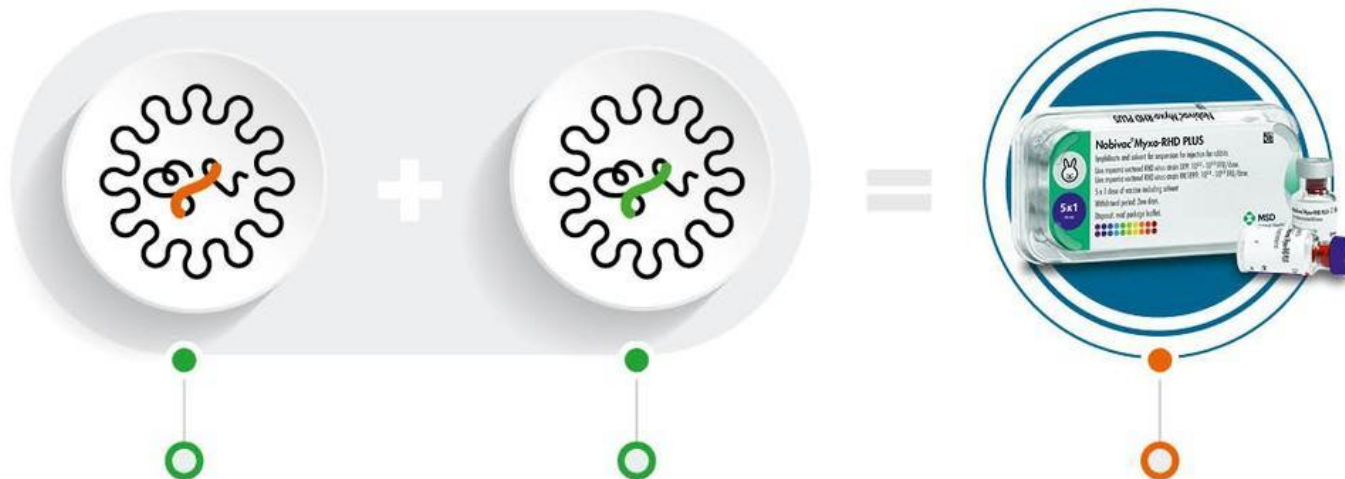
Semliki Forest virus (SFV).

Болезни/Возбудители:

Ящур, Респираторно-синцитиальная инфекция КРС (Bovine respiratory syncytial virus (BRSV)), Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)), Bovine ephemeral fever virus (BEFV), Bovine papillomaviruses (BPVs), parainfluenza-3 virus (PI3V), bovine viral diarrhea virus (BVDV).

ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ КРОЛИКОВ

Nobivac® Мухо-RHD PLUS



Myxoma virus and classic RHDV-1

The capsid gene of RHDV-1 is inserted into the myxoma virus vaccine strain to create a vector myxoma virus vaccine strain (strain 009). This is the identical strain used for the original Мухо-RHD vaccine.

Myxoma virus and variant RHDV-2

Using the same vector approach the capsid gene of RHDV-2 is inserted into the myxoma virus vaccine strain to create a vector myxoma virus vaccine strain (strain MK1899).

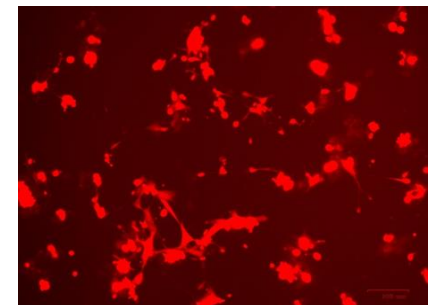
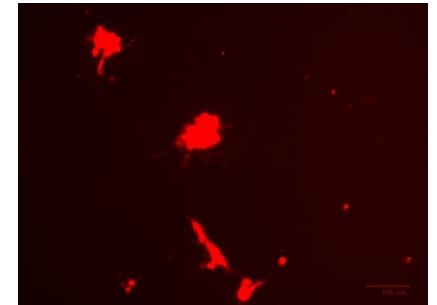
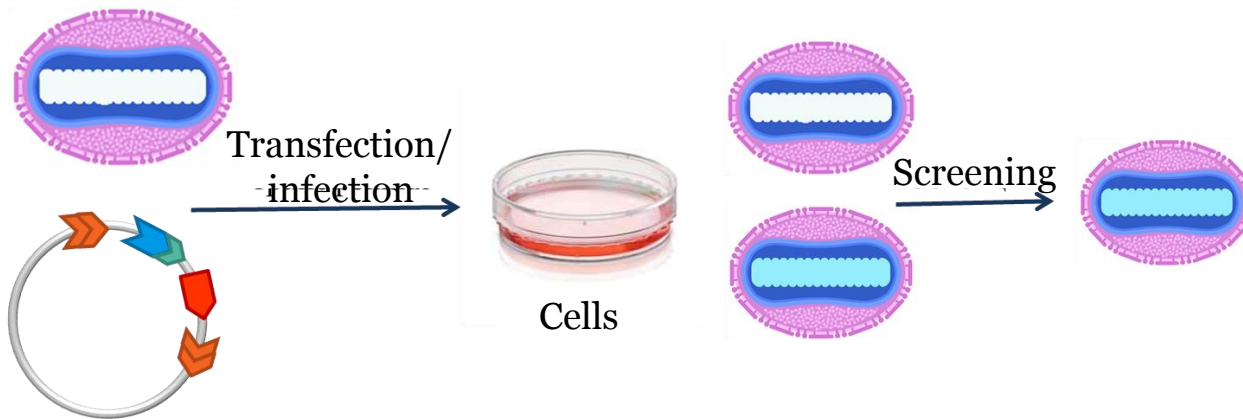
The two vector strains are physically combined to produce the final vaccine

The result: a new vector vaccine that will stimulate immunity against myxomatosis, classic RHD-1 and variant RHD-2.

ВАКЦИНЫ ОСНОВАННЫЕ НА ВИРУСНЫХ ВЕКТОРАХ

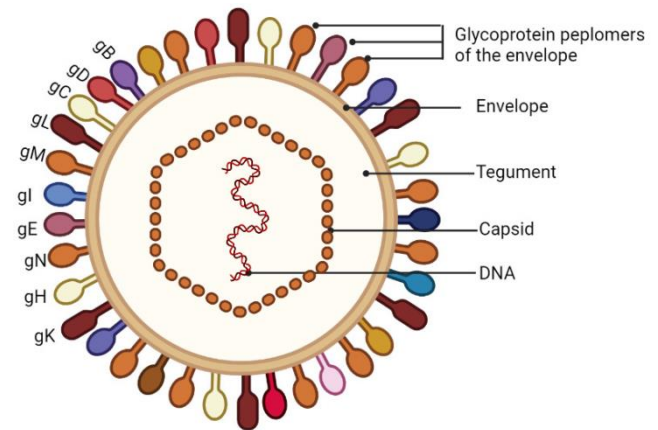
Кандидатные вирусные векторы:

- Вирусы семейства *Poxviridae*.
- Вирусы семейства *Herpesviridae*.

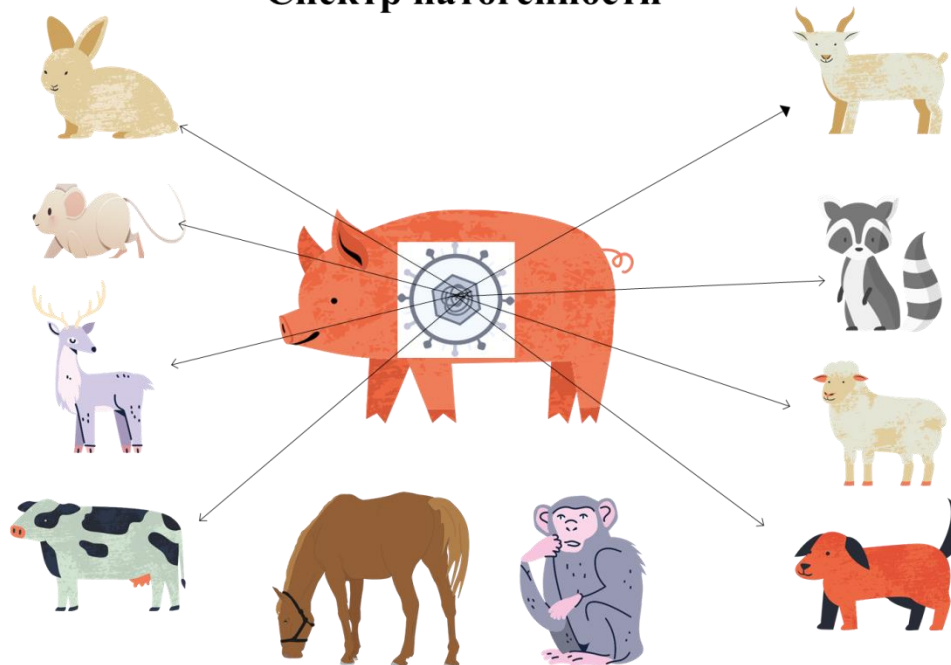


ВИРУС БОЛЕЗНИ АУЕСКИ (ВИРУС ПСЕВДОБЕШЕЕНСТВА)

- Впервые был описан в 1813 году
- В 1902 году был дифференцирован от бешенства
- Двухцепочечный ДНК-содержащий вирус *Suid Alphaherpesvirus 1*
- Размер вириона – 190-220 нм



Спектр патогенности



ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ ВИРУСА АЧС

План работ:

1. Получение «рекомбинационных кассет», содержащих плечи рекомбинации (фрагменты генома вируса болезни Ауески), гены вируса АЧС, ген репортерного белка RFP и промоторы EF1a и CMV.
2. Получение рекомбинантных клонов вируса болезни Ауески методом гомологичной рекомбинации.
3. Селекция рекомбинантных клонов на основе анализа репортерной флюоресценции в культуре клеток РК-15.
4. Накопление вирусных материалов, содержащих рекомбинантные штаммы вируса болезни Ауески.
5. Анализ чистоты рекомбинантных клонов методом ПЦР-РВ (подтверждение отсутствия «дикого типа»).
6. Анализ отсутствия нуклеотидных изменений в сайте рекомбинации.
7. Анализ экспрессии белков вируса АЧС.

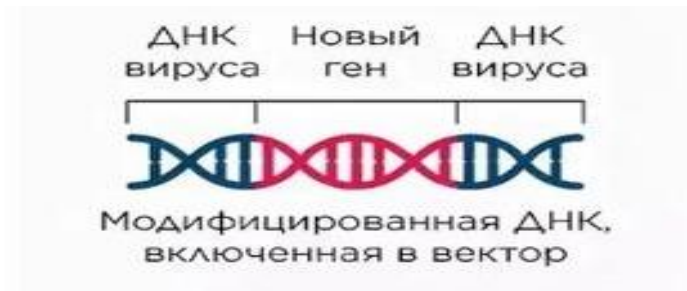


СХЕМА МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ «РЕКОМБИНАЦИОННОЙ КАССЕТЫ»

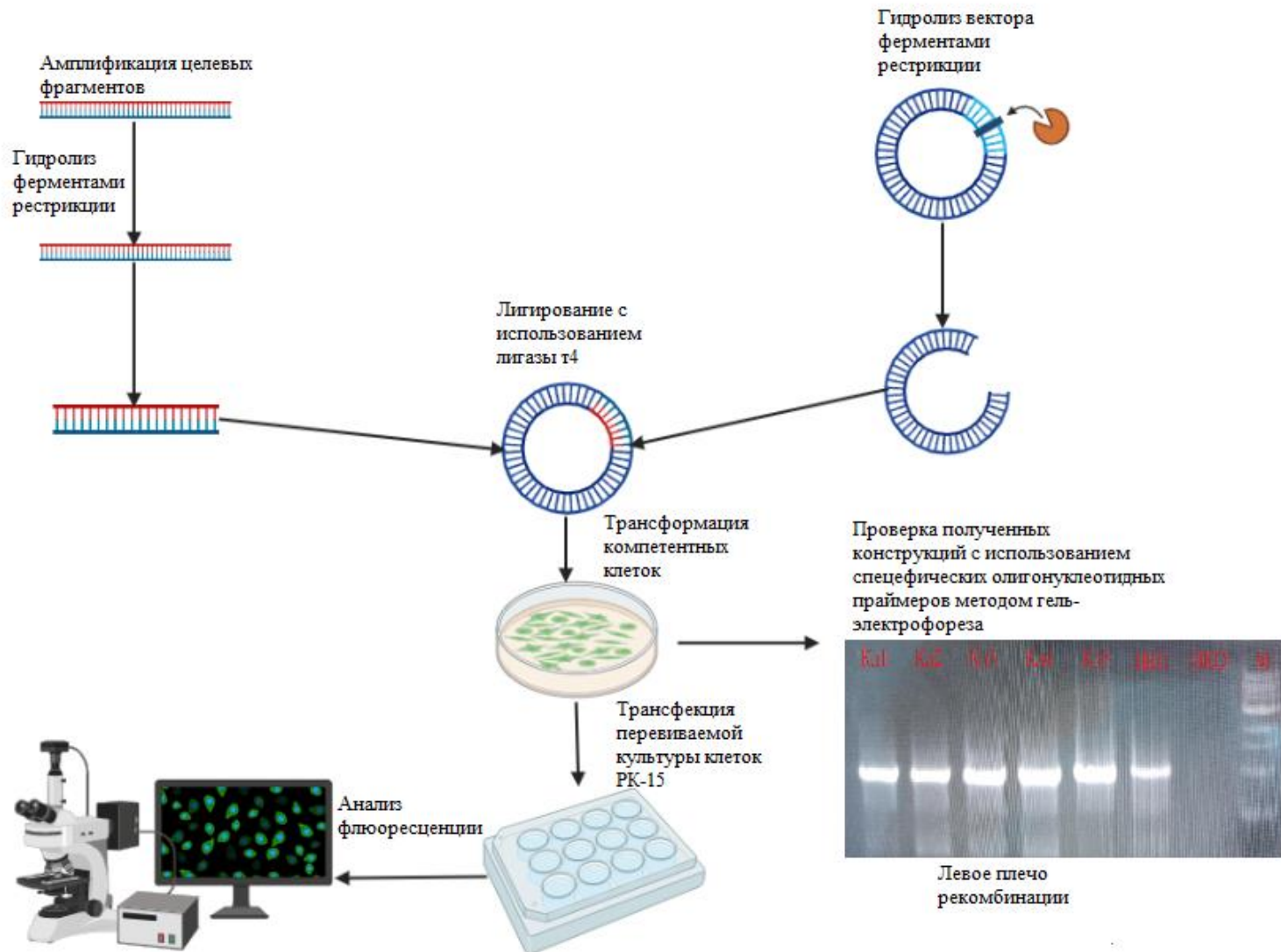
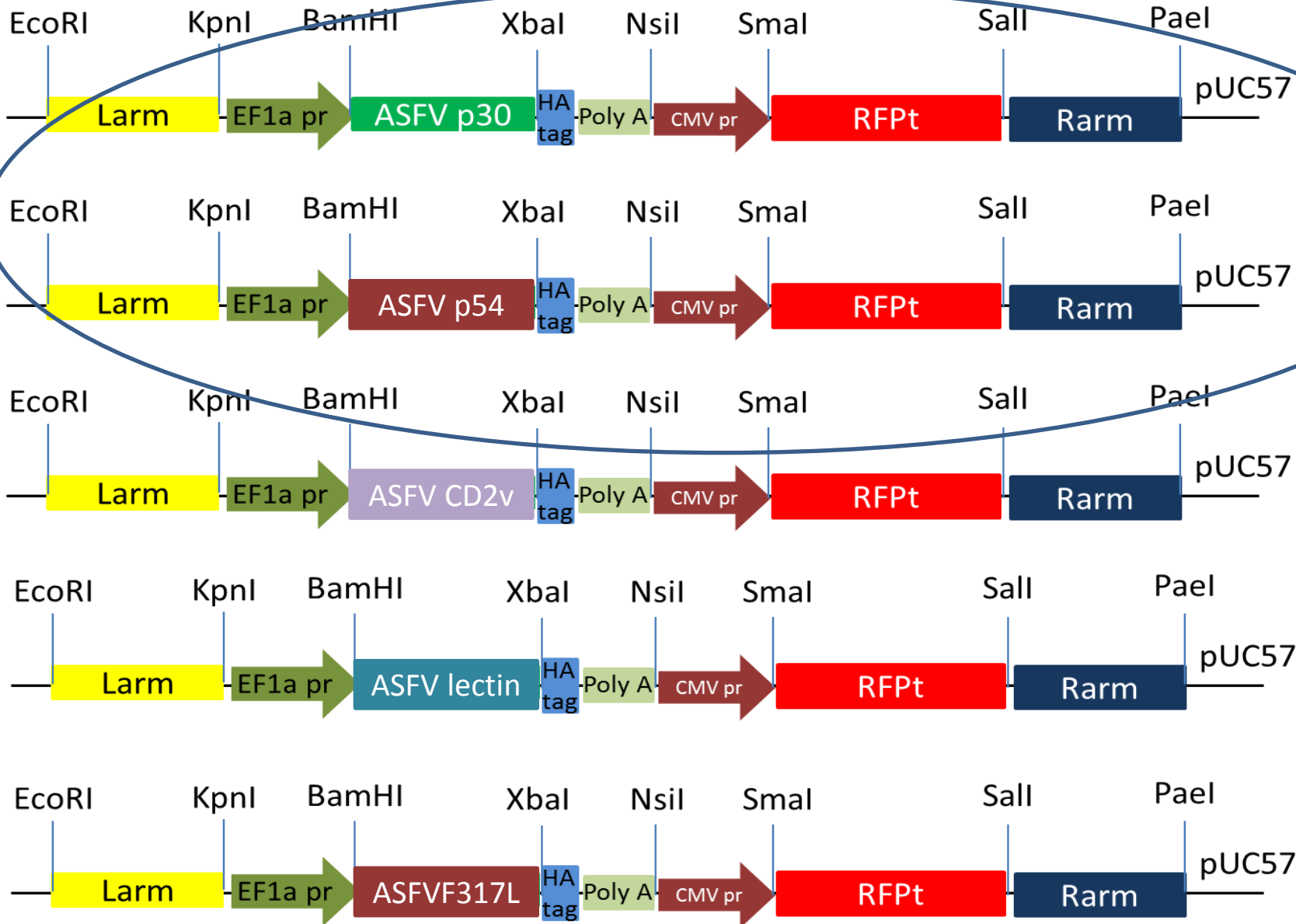
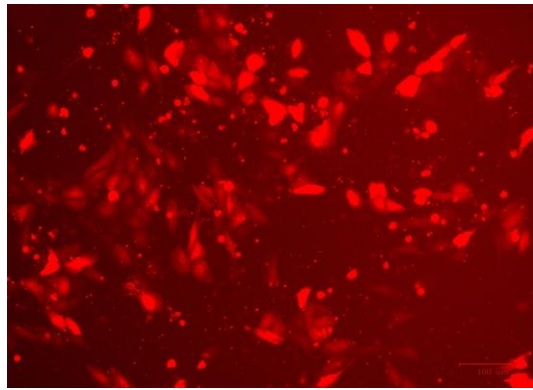


СХЕМА «РЕКОМБИНАЦИОННЫХ КАССЕТ» ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

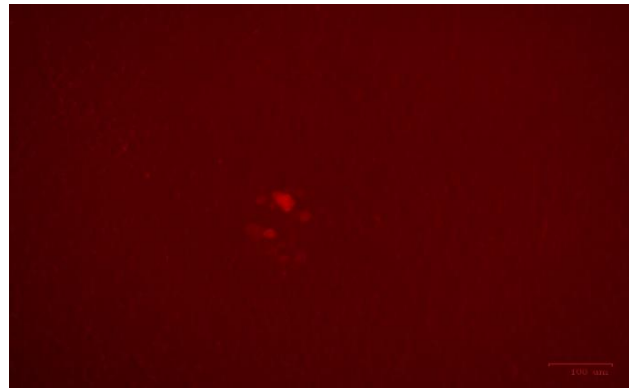


СЕЛЕКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ Р30 И Р54 ВИРУСА АЧС

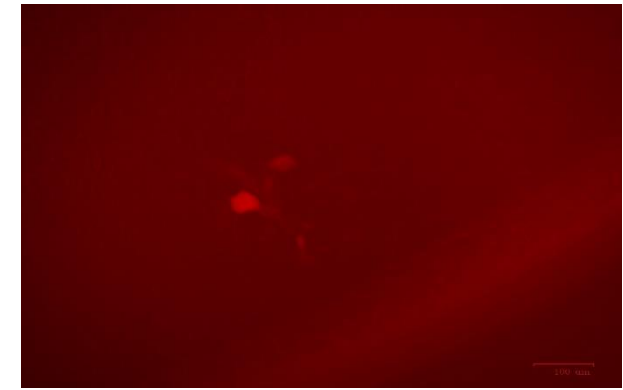
Селекцию рекомбинантных клонов проводили на основе анализа репортерной флюоресценции белка RFP в культуре клеток РК-15 методом предельных разведений.



Трансфекция+инфекция
rPRV



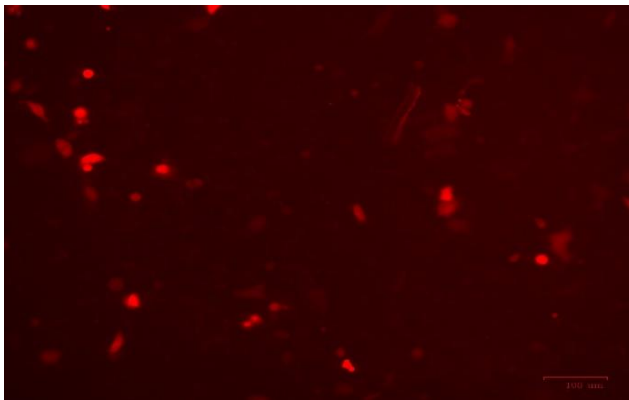
1 пассаж



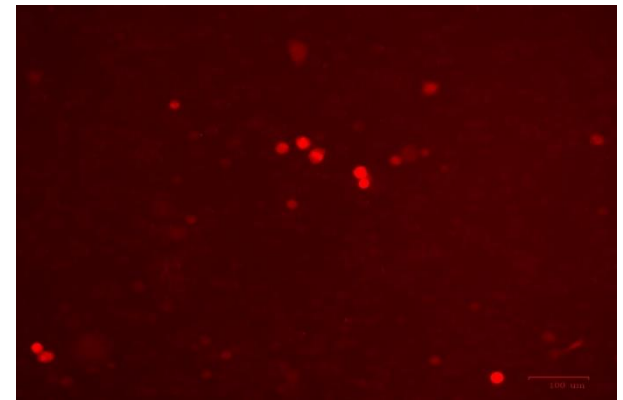
2 пассаж



3 пассаж

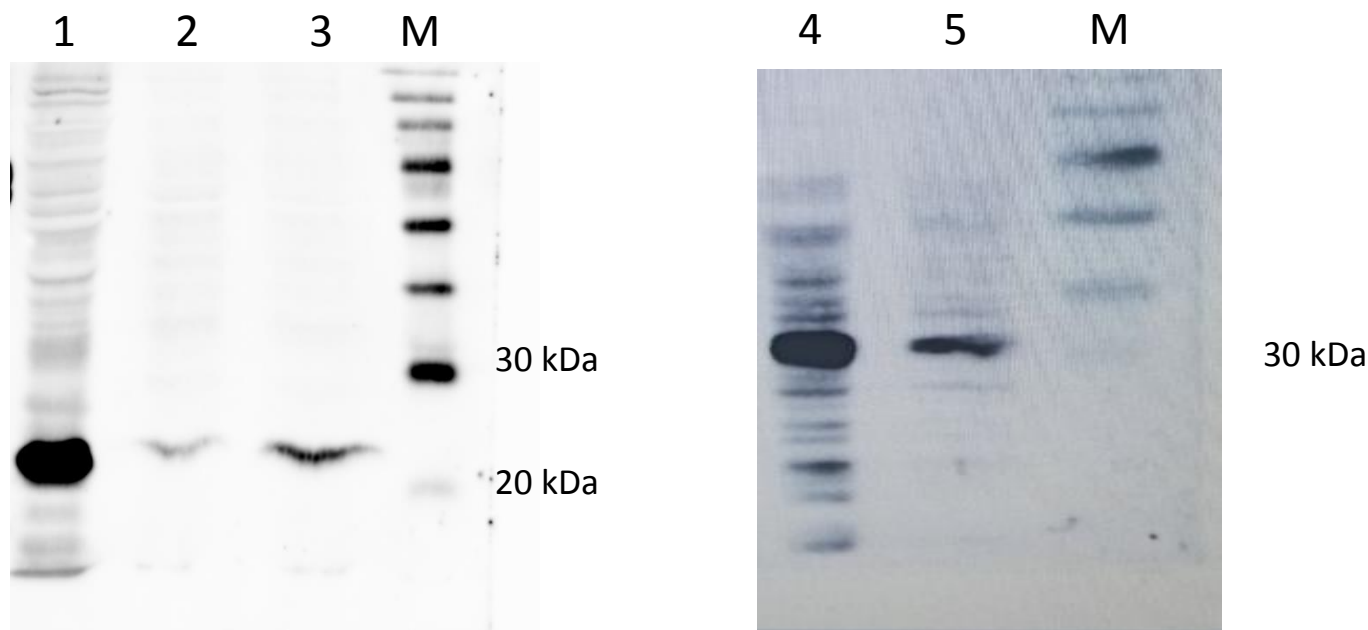
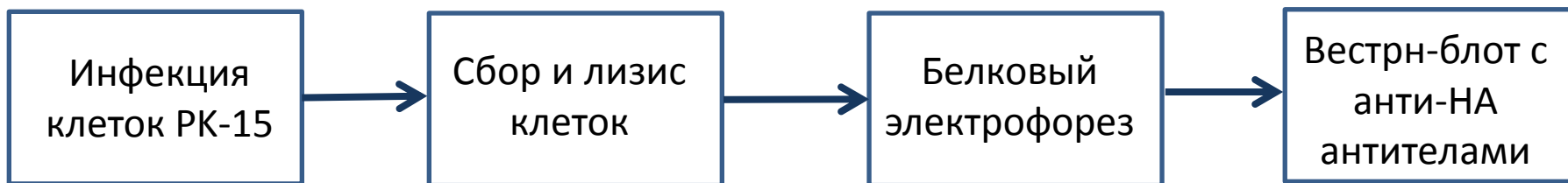


4 пассаж



5 пассаж

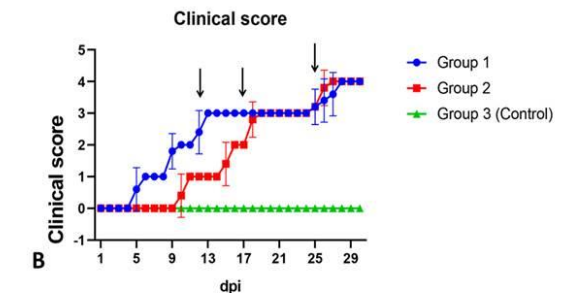
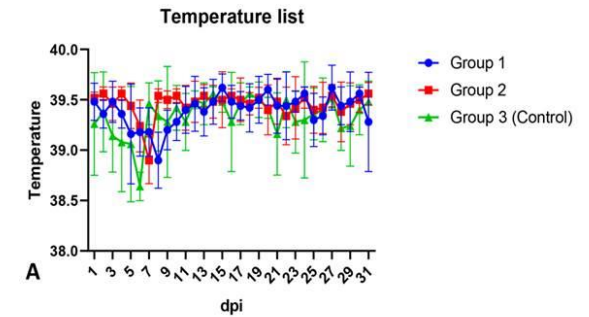
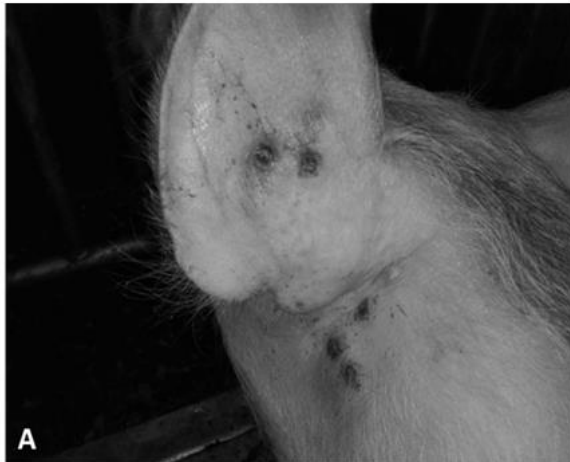
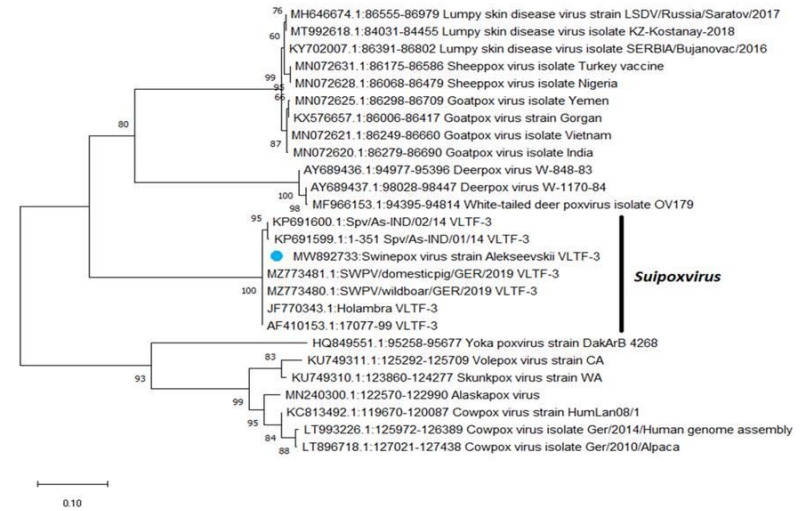
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ВИРУСА АЧС МЕТОДОМ ВЕСТЕРН-БЛОТ



- 1 – лизат клеток COS-1, трансфицированных плазмидой pCMV_p54.
 - 2 – лизат клеток РК-15, инфицированных вирусом $\Delta gE_PRV_p54_Congo-v$ cl 2.
 - 3 – лизат клеток РК-15, инфицированных вирусом $\Delta gE_PRV_p54_Congo-v$ cl 3.
 - 4 – лизат клеток COS-1, трансфицированных плазмидой pEF1a_3HA_p30.
 - 5 – лизат клеток РК-15, инфицированных вирусом $\Delta gE_PRV_p30_Congo-v$ cl 3.
- M- маркер молекулярных масс

ВИРУС ОСПЫ СВИНЕЙ

1. Выделен и охарактеризован изолят вируса оспы свиней.
2. Адаптирован к перевиваемой культуре клеток РК-15.
3. Изучены биологические свойства адаптированного варианта.



ВИРУС МИКСОМЫ КРОЛИКОВ

- Вирус рода *Leporipoxvirus* семейства *Poxviridae*.
- Геном представлен линейной ДНК длиной около 160 кбр.



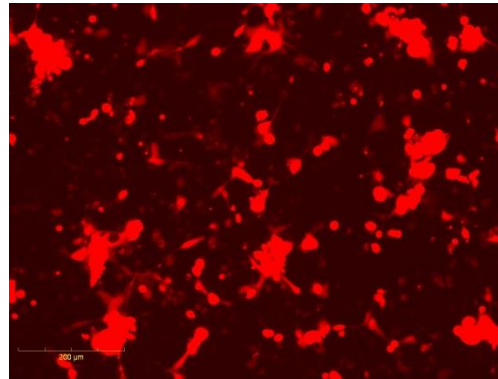
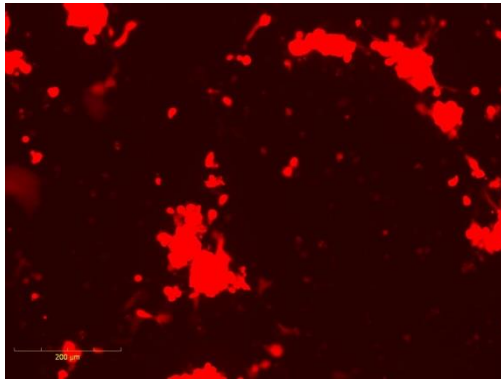
Преимущества как вирусного вектора:

- большой геном;
- способность к гомологичной рекомбинации;
- до 25 кбр чужеродной ДНК для вставки;
- безопасность;
- иммуногенность.

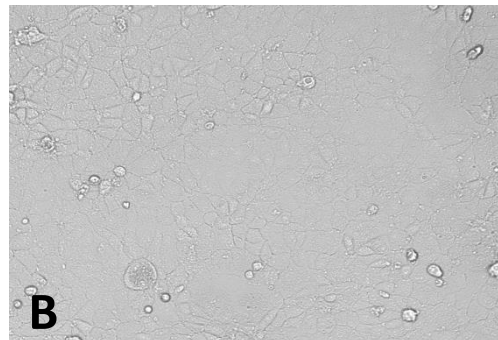
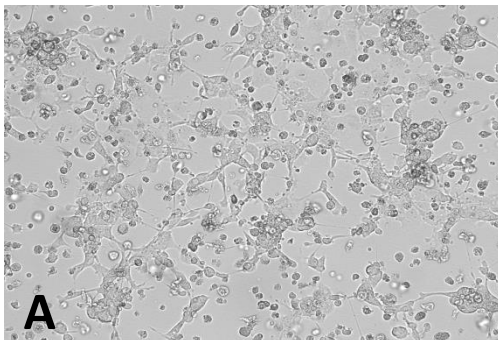


КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА МИКСОМЫ

- Вирус эффективно реплицировался в культуре клеток РК-13 с титрами накопления 6-7 lg TCD50.
- Репликация вируса сопровождалась развитием характерного цитопатического действия (ЦПД).
- Кинетика репликации *in vitro* рекомбинантного вируса не отличалась от «родительского» вируса миксомы кроликов.



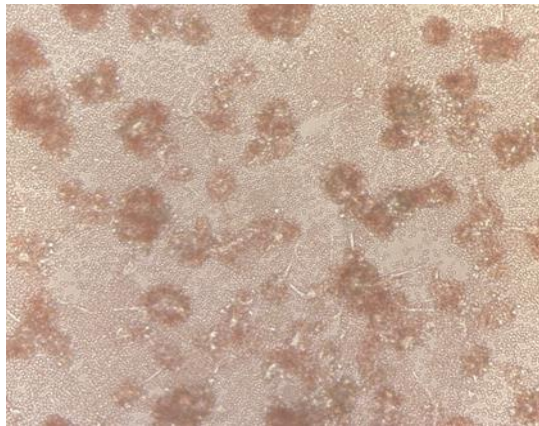
Флюоресцентная микроскопия культуры клеток РК-13, инфицированной рекомбинантным вирусом миксомы кроликов



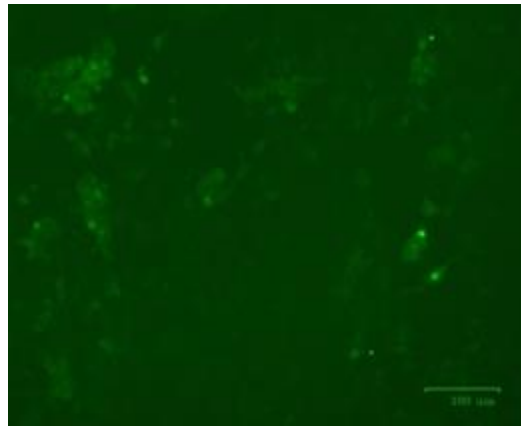
А - культура клеток РК-13, инфицированная рекомбинантным вирусом миксомы кроликов.
В – Неинфицированная культура клеток.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА CD2V

- Репликация рекомбинантного вируса миксомы в культуре клеток РК-13 с добавлением эритроцитов свиней сопровождалась развитием феномена гемадсорбции.
- Экспрессия чужеродного гена при инфекции рекомбинантным вирусом была подтверждена методом вестерн-блота и иммунофлюоресцентного анализа.



Гемадсорбция клеток РК-13, инфицированных рекомбинантным вирусом



Иммунофлюоресцентный анализ клеток РК-13, инфицированных рекомбинантным вирусом



Вестер-блот анализ: 1-РК-13, инфицированные штаммом В-82, 2 – макрофаги свиней, инфицированные вирусом АЧС, 3 - РК-13, инфицированные рекомбинантным штаммом

ВЫВОДЫ

1. Векторные вакцины имеют свои преимущества и недостатки. Наиболее важные этапы создания таких вакцин – подбор оптимального вектора, комбинации защитных антигенов.
2. Векторные вакцины широко используются в медицине, но реже используются в ветеринарии.
3. Наиболее перспективными являются поливалентные вакцины на основе одного вирусного вектора.
4. Для увеличения эффективности возможно использование адъювантов или включение в состав генов, кодирующих цитокины/хемокины.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр вирусологии и
микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

ВОПРОСЫ???

