

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего  
образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.03.01 – Биология

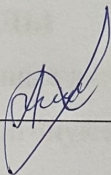
Профиль (специализация): Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ БИЦИСТРОННЫХ ВЕКТОРОВ  
НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА, НЕСУЩИХ  
ГЕНЫ ВИРУСА АЧС, В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

Обучающийся 4 курса

группы 01-004

« » \_\_\_\_\_ 2024 г.

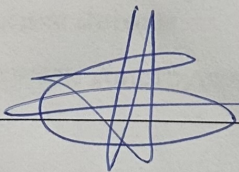


Айдешова А.А.

Научные руководители:

канд. биол. наук, доцент

« » \_\_\_\_\_ 2024 г.



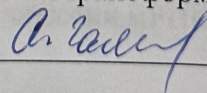
Зеленихин П.В.

канд. ветеринар. наук,

младший научный сотрудник

НИЛ «Микробные модуляторы онкотрансформации»

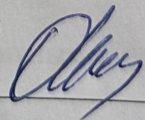
« » \_\_\_\_\_ 2024 г.



Галеева А.Г.

Заведующий кафедрой микробиологии

д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	7
1.1 Аденоассоциированные вирусы как платформа для конструирования кандидатной вакцины против АЧС	7
1.2 Вирус-векторная доставка генов вируса АЧС в клетки млекопитающих	9
1.2.1 АЧС: краткая нозологическая характеристика	9
1.2.2 Перспективы разработки вирус-векторных вакцин против АЧС	12
1.3 Особенности формирования протективного иммунитета против АЧС	14
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	18
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	18
2.1 Микроорганизмы и клеточные линии	18
2.2 Векторные плазмиды и олигонуклеотидные праймеры	18
2.3 Лабораторные животные	19
2.4 Молекулярно-генетические методы	20
2.4.1 Получение бицистронных конструкций на основе вектора рAAV-MCS	20
2.4.2 Сборка рекомбинантных AAV2	20
2.4.3 Определение титра рекомбинантных AAV2	21
2.4.4 Определение уровней экспрессии мРНК целевых генов	21
2.5 Культуральные методы	22
2.5.1 Культивирование клеточных линий	22
2.5.2 Трансдукция клеток рекомбинантными конструкциями	22
2.5.3 Проточная цитометрия апоптоза	22
2.6 Иммунологические методы	22

2.6.1	Иммунизация лабораторных животных	22
2.6.2	Индикация вирусспецифических антител	24
2.6.3	Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови	24
2.7	Статистические методы	25
<b>3</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>26</b>
3.1	Получение бицистронных конструкций на основе AAB2	26
3.2	Оценка функциональности бицистронных конструкций на основе AAB2 в условиях <i>in vitro</i>	28
3.3	Оценка функциональности бицистронных конструкций на основе AAB2 в условиях <i>in vivo</i>	30
3.3.1	Оценка безопасности и переносимости AAB2	30
3.3.2	Динамика образования вирусспецифических антител	31
3.3.3	Оценка состояния клеточного иммунитета при иммунизации AAB2	33
	<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>36</b>
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>38</b>

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день особо опасные вирусные инфекции продуктивных животных являются одной из важнейших угроз мировой продовольственной безопасности [Колбасов, 2020]. В свиноводческой отрасли таким фактором является африканская чума свиней (АЧС) – особо опасная высококонтагиозная вирусная болезнь домашних и диких свиней, характеризующаяся быстрым распространением, высокой степенью смертности зараженных животных и высоким экономическим ущербом. Российская Федерация эндемична по АЧС с 2007 года с тенденцией к распространению в благополучные регионы. По данным Россельхознадзора, ежегодно экономический ущерб от убоя восприимчивых животных и противоэпизоотических мероприятий составляет около 10 миллиардов рублей [Макаров, 2012; Тарасов с соавт., 2021]. Искоренение болезни возможно только путем ликвидации зараженного поголовья свиней. Основные меры биобезопасности подразумевают контроль за перемещением свиней, персонала, инвентаря, материалов и потенциальных биологических или механических переносчиков вируса АЧС.

Известные стратегии разработки вакцин против АЧС можно подразделить на следующие категории: живые аттенуированные вирусы АЧС, инактивированный вирус АЧС, субъединица с живым вектором, ДНК-экспрессирующая плазида млекопитающих, субъединица-кандидат на основе рекомбинантных белков и их комбинации [Argilaguet *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2017; Borca *et al.*, 2020]. У всех этих подходов есть ограничения, которые мешают быстрому прогрессу в разработке безопасных и эффективных вакцин для борьбы с вирусом. Согласно литературным данным, в мировом научном сообществе осуществляются попытки создания вакцин против АЧС на основе вирусных векторов. Вакцины с живым вектором схожи по принципу действия с ДНК-вакцинами за исключением того, что гены, кодирующие целевые антигены, доставляются в клетку-

хозяина с использованием непатогенного аттенуированного вируса или бактерий [Власова с соавт., 2022; Казакова с соавт., 2011].

Многообещающим инструментом для конструирования прототипной вакцины является аденоассоциированный вирус (ААВ) – член семейства *Parvoviridae*, который широко используется в качестве вектора для генной терапии ввиду его безопасности (отсутствие интеграции в геном реципиента), способности проникать в делящиеся и неделящиеся клетки, а также его низкой иммуногенности [Sánchez *et al.*, 2019]. Исследования *in vitro* показали, что ААВ 2 серотипа (ААВ2) имеет значительно более высокий уровень трансфекции в культивируемых фетальных фибробластах свиньи, чем ААВ8 и ААВ9, которые имеют довольно низкую эффективность трансдукции. Кроме того, ААВ2 не оказывает токсического влияния на клетки [Lokhandwala *et al.*, 2019]. Ранее нами сообщалось о способности моноцистронных конструкций на основе ААВ2 эффективно трансдуцировать клетки свиней с последующей экспрессией генов вируса АЧС [Ravilov *et al.*, 2022].

В связи с этим, целью настоящей работы явилась оценка функциональности бицистронных генетических конструкций на основе ААВ2 и генов, кодирующих иммунодоминантные белки вируса АЧС, в условиях *in vivo*.

Для достижения поставленной цели нами были обозначены следующие задачи:

- 1) Получить бицистронные конструкции на основе ААВ2 и генов, кодирующих протективно значимые антигены *B646L*, *E183L*, *CP530R*, *CP204L*;
- 2) Оценить функциональность бицистронных конструкций *in vitro* и сравнить эффективность экспрессии трансгенов относительно моноцистронных конструкций;
- 3) Изучить профиль безопасности и иммуногенности разработанных конструкций на естественно восприимчивых животных.

## ВЫВОДЫ

1) Были созданы бицистронные конструкции на основе вектора рAAV-MCS и генов вируса АЧС *B646L*, *CP204L*, *E183L*, *CP530R* с общей структурой вставки «CMV-ген1-P2A-ген2-stop-polyA». При помощи данных конструкций была осуществлена сборка рекомбинантных аденоассоциированных вирусов 2 серотипа.

2) Была подтверждена функциональность полученных ААВ2 в условиях *in vitro*: установлена их способность эффективно трансдуцировать целевые клетки – МСК свиней и SPEV при отсутствии цитопатогенного действия. Уровни экспрессии мРНК целевых генов варьировали в диапазоне от 3.2 до 10.8 млн копий на 1 мкг суммарной РНК.

3) При оценке функциональности моно- и бицистронных ААВ2 в условиях *in vivo* (на естественно восприимчивых животных) было установлено, что предлагаемые конструкции безопасны и удовлетворительно переносимы свиньями. рААВ2 индуцировали образование вирусспецифических антител и активацию маркерных субпопуляций Т-лимфоцитов, при этом применение бицистронных конструкций позволяло снизить векторную нагрузку на организм.

Таким образом, рекомбинантные ААВ2 являются перспективной платформой для создания кандидатной вакцины против АЧС, поскольку они биологически безопасны и стимулируют гуморальный и клеточный иммунный ответ, что чрезвычайно важно для формирования протективного иммунитета.