

УДК 619:616.98:578.822.2:615.37

**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор<sup>1</sup>**Красочко П.П.**, доктор биологических наук, доцент<sup>1</sup>**Колесникович К.В.**, аспирант<sup>1</sup>**Иващенко И.А.**, аспирант<sup>1</sup>**Прокулевич В.А.**, доктор биологических наук, профессор<sup>2</sup>**Зинченко А.И.**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси<sup>3</sup><sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь<sup>3</sup>ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

## ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ (ОБЗОР)

### Резюме

Анализ литературных источников, имеющих в открытой печати, показал, что генная инженерия является одним из наиболее перспективных направлений в области создания ряда противовирусных препаратов для ветеринарии. Использование технологий генной инженерии в разработке эффективных средств контроля вирусных инфекций животных является актуальным направлением для научного сообщества, так как позволит предотвратить развитие заболеваний в животноводческих комплексах и сохранить здоровье стада.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, рекомбинантные вакцины, вакцинация, инфекционные болезни, генная инженерия.

### Summary

An analysis of literary sources available in the open press showed that genetic engineering is one of the most promising areas in the field of creating a number of antiviral drugs for veterinary medicine. The use of genetic engineering technologies in the development of effective means of controlling animal viral infections is a relevant area for the scientific community, as it will prevent the development of diseases in livestock farms and preserve the health of the herd.

**Keywords:** cattle, recombinant vaccines, vaccination, infectious diseases, genetic engineering.

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

В настоящее время благодаря усилиям ветеринарной службы и результатам научных исследований ученых эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням в Республике Беларусь в целом остается стабильной [6]. Во многом этому способствует иммунопрофилактика животных, которая считается наиболее эффективным и экономически выгодным способом решения проблемы, особенно у молодняка [2]. Вакцинация позволяет сократить потребление ветеринарных препаратов, например антибиотиков, что приводит к уменьшению экологических последствий, побочных эффектов и нахождения их остатков в пищевых продуктах животного происхождения [20]. Профилактические ветеринарные вакцины играют важную роль в борьбе со многими инфекционными вирусными заболе-

ваниями, поражающими домашний скот [17]. Эффективность вакцинации обеспечивается безопасностью соответствующих вакцин, их способностью формировать напряженный иммунитет и генерировать продолжительную иммунологическую память. Последние достижения биотехнологии, иммунологии, молекулярной биологии и других дисциплин позволили усовершенствовать технологию разработки вакцин [9]. Новые подходы в разработке биопрепаратов позволили создать рекомбинантные, субъединичные, синтетические пептидные вакцины, вакцины на основе вирусоподобных и «репликонных» частиц, ДНК- и мРНК-вакцины. Это новое поколение иммунных препаратов, которые отличаются от традиционных вакцин большей безопасностью при введении, отсут-

ствием вредного воздействия из-за нежелательных антигенных материалов и репликации в организме, простотой производства и экономичностью. Немаловажным аспектом является и стоимость данных вакцин, которая значительно ниже за счет снижения себестоимости монокомпонентов вакцин, отсутствия издержек транспортировки и налоговых пошлин, возможности быстрого заказа препаратов и квалифицированной сервисной поддержкой от собственного производителя.

Следует отметить, что большинство ветеринарных вакцин – это корпускулярные вакцины, относящиеся к 1-му поколению (1<sup>st</sup> generation) (инактивированные (убитые) либо живые аттенуированные вакцины), которые требуют содержания адъювантов и многократного введения для индукции достаточного иммунитета и могут иметь потенциальный риск патогенности, при котором живые ослабленные вакцины возвращаются к своей вирулентности [20]. Таким образом, профилактика, основанная на использовании альтернативных вакцин следующих поколений для борьбы с инфек-

ционными заболеваниями животных, остается актуальной темой изучения для научного сообщества и ветеринарных специалистов [18].

**Цель** исследования – обзор литературных источников, касающихся применения генно-инженерных технологий в борьбе с инфекционными заболеваниями животных.

Вакцины, созданные на основе генной инженерии, – это новое поколение иммунных препаратов, которые позволяют значительно повысить эффективность вакцинации за счет снижения заболеваемости, падежа и выбраковки молодняка, снизить необходимость в проведении ветеринарно-санитарных мероприятий и получить в итоге значительный экономический эффект. Данные вакцины превосходят своей профилактической эффективностью при более низкой стоимости одной дозы и курса иммунизации, что увеличивает их конкурентоспособность.

В таблице 1 отображен перечень вакцин, конструируемых на основе генетической рекомбинации.

Таблица 1. – Классификация вакцин 2-го и 3-го поколения

2-е поколение / 2 <sup>nd</sup> generation	Рекомбинантные вакцины / Recombinant vaccines
	Субъединичные вакцины / Subunit vaccines
3-е поколение / 3 <sup>rd</sup> generation	Вакцины на основе вирусоподобных частиц / Virus-like particle-based vaccines
	Синтетические пептидные вакцины / Synthetic peptide vaccines
	Вакцины, содержащие «репликонные» частицы / Vaccines containing «replicon» particles
	ДНК-вакцины / DNA-vaccines
	мРНК-вакцины / mRNA-vaccines

**Рекомбинантные векторные вакцины.** Данный вид вакцин получают стандартными генно-инженерными методами. В качестве векторов используют живые аттенуированные вирусы, бактерии, дрожжи или эукариотические клетки, в которые встраивают ген, кодирующий образование протективного антигена возбудителя, против которого будет направлена вакцина. В качестве носителя бактериального вектора используют БЦЖ, *Vibrio cholera*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* [4]. В настоящее время *E. coli* широко используется для экспрессии белка в

качестве гетерологичного хозяина помимо ограничения в форме выхода, посттрансляционной модификации и фолдинга экспрессируемых рекомбинантных белков [19]. В ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» проведены исследования по конструированию рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента белка F1 респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота (КРС) путем создания новой плазмиды, несущей ген F1, кодирующий белок F вируса для конструирования и изготовления новых поливалентных вакцин. В качестве носителей вирусных векторов

используют вирусы осповакцины, бакуло-вирусы, аттенуированные аденовирусы [21]. Возможность встраивать относительно большие фрагменты чужеродной ДНК, легкость манипуляции с последовательностью генов, регуляция уровня экспрессии целевых генов путем подбора промоторов и количества копий обуславливают широкое распространение векторов в экспрессионных системах [15]. Использование векторов является удобным инструментом для получения рекомбинантных белков в ходе выполнения научно-исследовательских работ и рамках промышленного производства [10]. Накопление рекомбинантных белков в микробных клетках превышает их накопление в культуре клеток в 50–100 раз и способствует удешевлению себестоимости изготовления монокомпонентов вирусов при производстве противовирусных вакцин за счет их накопления реакторным способом. С помощью генной инженерии был создан вирус коровьей оспы, экспрессирующий гликопротеин вируса бешенства. Ярким примером рекомбинантной вакцины, созданной с помощью вируса оспы коров, а именно штамма «Копенгаген» в качестве вектора-носителя для внедрения чужеродного гена, является антирабическая живая рекомбинантная вакцина с названием VRG (The vaccinia-rabies glycoprotein). Титр вируса составлял  $10^8$  БОЕ на дозу [8]. Рядом исследований было установлено, что вакцина стабильна и безопасна для целевых и нецелевых животных, и ее успешно применили в качестве вакцины-приманки в обширных испытаниях в открытом поле [13]. Использование вируса осповакцины в качестве вектора для вакцинации привнесло ряд преимуществ: способность размножаться в клетках животных многих видов, экспрессировать несколько генов, индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет, термостабильность, экономичное производство и легкость применения. Выявленные ранее недостатки у вируса осповакцины, связанные с реактогенностью, были устранены с помощью генетических манипуляций. Возможность включения нескольких генов, кодирующих соответствующие иммуногены, дают возможность вакцинировать животных одновременно против нескольких вирусных болезней [14]. Также существует ряд профилактических препара-

ратов из рекомбинантного штамма вируса осповакцины, содержащего гены, кодирующие поверхностные гликопротеиды вирусов гриппа, бешенства, болезни Ауески, инфекционного ринотрахеита КРС [5]. В Нидерландах при помощи генной инженерии проводилось ослабление герпесвируса *Suid 1* – возбудителя болезни Ауески свиней. Полученный вакцинный вирус был успешно использован для искоренения болезни в стране [17].

Генная инженерия также позволила разработать мультивалентные и бивалентные вакцины. При этом использовался вирус герпеса индейки (HVT), защищающий цыплят от вируса болезни Марека, вызываемого родственным герпесвирусом *Gallid herpesvirus 2*, от вируса инфекционной бурсальной болезни, вируса болезни Ньюкасла, вируса инфекционного ларинготрахеита и вируса гриппа А [13]. Последний пример мультивалентной вакцины основан на аттенуированном миксомавирусе, который экспрессирует ген капсидного белка калицивирусного вируса геморрагической болезни кроликов, предупреждающей развитие миксоматоза и геморрагической болезни кроликов.

Другая весьма успешная вакцинная платформа основана на вирусе канарской оспы. Примеры коммерчески зарегистрированных вакцин – это вакцины для защиты лошадей от гриппа и вируса Западного Нила, кошек – от бешенства и вируса кошачьего лейкоза, а также собак и хорьков – от вируса собачьей чумы [13].

**Субъединичные вакцины** представляют особый интерес, поскольку они могут быть использованы для устранения многих осложнений, связанных с применением имеющихся в настоящее время инактивированных либо живых аттенуированных вирусных вакцин [12]. Эти вакцины не содержат живых компонентов патогена, они состоят из одной или нескольких субъединиц белков, которые могут вырабатывать протективный иммунитет против вирусов [11]. Многообещающими являются субъединичные вакцины, полученные как с использованием белков-носителей, так и на основе вирусоподобных частиц [7]. Субъединичные вакцины безопасны, стабильны, не содержат дополнительных балластных белков и нуклеиновых кислот, ко-

торые могут вызвать нежелательные побочные реакции при вакцинации. Могут быть получены с использованием рекомбинантных экспрессирующих хозяев, которые предлагают такие преимущества, как высокий выход, быстрое производство, масштабируемость и сниженные трудозатраты [13]. Примерами данного типа вакцин являются субъединичная вакцина против вируса ньюкаслской болезни (NDV) с использованием гена гемагглютинин-нейраминидазы (HN), субъединичная вакцина против вируса ящура с использованием гена VP-1, субъединичная вакцина против цирковируса свиней типа 2 (PCV-2) на основе открытой рамки считывания-2 (коммерциализированная) и субъединичная вакцина против японского энцефалита на основе белка оболочки ргМ и Е.

**Вакцины на основе вирусоподобных частиц.** Вирусоподобные частицы – это пустые частицы вирусов, состоящие из основных структурных белков, имитирующие организацию и конформацию нативных вирусов. На сегодняшний день сконструированы вакцины против ВИЧ и коронавируса, которые вызывают образование вируснейтрализующих антител и стимулируют Т-клеточный цитотоксический иммунитет. Создание представленных вакцин является перспективным направлением, так как сохраняется конформационная структура эпитопов, что имеет значение для иммуногенности вакцин; кроме того, отсутствует риск получения вирулентных ревертантов, что имеет место при применении живых аттенуированных вакцин [11].

**Синтетические пептидные вакцины** – препараты, содержащие синтезированные или выделенные нуклеиновые кислоты или полипептидные последовательности, образующие антигенные детерминанты, распознаваемые нейтрализующими антителами. Основные компоненты таких вакцин – антиген, высокомолекулярный носитель и адъювант [3]. Целесообразность использования адъюванта в вакцинах заключается в повышении иммуногенности вакцин, изменении характера иммунного ответа, снижении количества антигена, необходимого для успешной иммунизации, уменьшении кратности введения вакцины и повышении интенсивности иммунного ответа у животных [1].

**ДНК-вакцины** созданы на основе технологии, при которой накопление протективного антигена происходит в организме вакцинируемого. При этом ДНК конструкция, которая кодирует синтез протективного антигена, встраивается в вектор, в качестве которого выступают плазмиды, фаги, вирусы, липосомы, эукариотические клетки. Вектор со встроенной ДНК вводится в организм вакцинируемого, в котором происходит наработка протективного антигена. ДНК-вакцины формируют более слабый иммунный ответ по сравнению с цельновирионными, поэтому для повышения их иммуногенности включают иммуностимулирующие нуклеотидные последовательности в конструкцию ДНК, адъюванты либо усовершенствованные методы доставки, в частности с использованием липосом [11]. Технологии на основе рекомбинантной ДНК продвинули стратегию вакцинации дальше, когда антигены экспрессируются в векторных вирусах, и создали аттенуированные вирусы и бактерии [16].

**Вакцины на основе мРНК** получают путем транскрипции *in vitro* из линейной ДНК-матрицы, в качестве которой выступает плаزمид, с использованием различных РНК-полимераз бактериофагов. При использовании мРНК не возникает трудностей с иммунным ответом на вектор, который часто препятствует повторному введению других вакцин. Также мРНК не может интегрироваться в геном клетки организма. В настоящее время зарегистрированы две вакцины на основе генно-инженерных РНК-вирусов, которые основаны на использовании генно-инженерных вирусов диареи бычьего вируса (BVDV). Первая вакцина содержит два генно-инженерных возбудителя вирусной диареи (ВД), которые защищают крупный рогатый скот от ВД I и II типов. Вторая вакцина содержит аттенуированный вирус ВД, который экспрессирует белок Е2 вируса классической чумы свиней [13].

В настоящее время в Европе зарегистрировано большое количество генно-инженерных вирусных вакцин. К ним также относятся иммуногенные композиции, содержащие так называемые «репликонные» частицы вируса, которые кодируют антиген другого вируса. Частицы реплика-

на фенотипически напоминают вирусы, от которых они произошли, но лишены гена, необходимого для производства частиц-потомков. Эти частицы способны инфицировать клетки-мишени вакцинированного животного, но не могут распространяться из исходного места заражения. Благодаря этой способности частицы репликона сочетают в себе эффективность живых вакцин и безопасность инактивированных. Примером служат вакцины на основе репликационных частиц, нацеленные на вирус эпидемической диареи свиней и вирус птичьего гриппа [13].

Следует отметить достижения белорусских ученых, которые ведут работу в области терапии вирусных инфекций животных в Белорусском государственном университете. На данный момент проводится конструирование линейки противовирусных препаратов – рекомбинантных видоспецифичных  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферонов для лечения вирусных инфекций животных. В основе сконструированных штаммов-продуцентов *E. coli* лежит внесение плазмиды с генами бычьего, собачьего, птичьего, овечьего, собачьего  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферона в бактерии по методике, разработанной В.А. Прокулевичем и М.И. Потаповичем. В данной организации проводятся исследования по созданию рекомбинантного штамма-продуцента синтетического полиэпитопного белка, а также разработки технологий культивирования, рефолдинга и очистки действующих веществ, что в итоге должно привести к получению очищенных субстанций; подобрать дополнительные противовирусные иммуномодулирующие ингредиенты препарата и создать высокоэффективный лечебно-профилактический видоспе-

цифический ветеринарный препарат для борьбы с различными формами вируса диареи КРС.

Подводя итог, следует отметить, что при современной технологии введения животноводства заболеваемость животных вирусными инфекциями остается весомой проблемой для сельскохозяйственного комплекса страны. Применение антибиотиков для лечения вирусных заболеваний неэффективно, так как они не оказывают воздействия на вирусы, однако поражают патогенную и нормофлору кишечника, что ведет к ряду негативных последствий для организма. Однако благодаря достижениям современной иммунологии, молекулярной биологии, вирусологии и генетики стал доступен переход от фундаментальных исследований к разработке и применению новых видов конкурентоспособной биотехнологической продукции на основе рекомбинантных и оригинальных технологий, обеспечивающих получение товарных форм с повышенной эффективностью и стабильностью, что является импортозамещающей и экспортоориентированной биотехнологической продукцией, востребованной сельскохозяйственной отраслью экономики страны. Каждая группа рассмотренных препаратов имеет свои преимущества по сравнению с общепринятыми средствами и способна вызвать широкий интерес в научных кругах.

Приведенные в настоящем обзоре данные свидетельствуют о перспективности использования генно-инженерных технологий в повышении эффективности методов борьбы с инфекционными болезнями животных.

### СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Авдеева, Ж. И. Вакцины с адъювантами. Доклинические исследования / Ж. И. Авдеева, Н. А. Алпатова, В. П. Бондарев // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* – 2015. – № 1. – С. 15–20.
2. Алпатова, Н. А. Иммунный ответ при иммунизации противовирусными вакцинами / Н. А. Алпатова, Ж. И. Авдеева, Л. А. Гайдерова // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* – 2020. – № 20(1). – С. 21–29. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-21-29>.
3. Барышникова, М. А. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для создания модели противомеланомной вакцины / М. А. Барышникова, А. А. Рудакова, З. С. Соколова // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2019. – № 18(4). – С. 76–81. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81>.
4. Беликова, Ю. А. Современные вакцины и коронавирусные инфекции / Ю. А. Беликова, Ю. В. Самсонов, Е. В. Абакушина // *Research'n Practical Medicine Journal.* – 2020. – № 7(4). – С. 135–154. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2020-7-4-11>.

5. Генно-инженерные вакцины [Электронный ресурс] / РГАУ-МСХ зооинженерный факультет. – Режим доступа: <http://www.activestudy.info/genno-inzhenernye-vakciny>. – Дата доступа: 05.09.2023.
6. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с респираторными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии : рекомендации / Н. В. Сеница [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, кафедра эпизоотологии и инфекционных болезней. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – 55 с.
7. Кондакова, О. А. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки / О. А. Кондакова, Н. А. Никитин, Е. А. Трифонова // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2017. – № 72(4). – С. 199–208.
8. Красочко, П. П. Принципы конструирования рекомбинантных противовирусных вакцин и их использование в ветеринарной медицине / П. П. Красочко, Т. К. Бычкова, К. В. Колесникович // Место и роль аграрной науки в обеспечении продовольственной безопасности страны : сб. материалов Междунар. науч. Конф. (9 декабря 2022 г.) / Смоленск : ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА : в 5 т. – Т 2. – Смоленск : Смоленская ГСХА, 2022. – С. 103-108.
9. Мякиньюкова Л. Л. Современные проблемы, вызовы и перспективные направления в области вакцинологии / Л. Л. Мякиньюкова, О. В. Букач, А. В. Логунова // Инноватика и экспертиза : науч. тр. – 2015. № 1(14). – С. 96–109.
10. Хайруллин, Р. Ф. Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli* : учеб. пособие / Р. Ф. Хайруллин, Р. Г. Киямова, А. А. Ризванов. – Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2018. – 142 с.
11. Яговкин Э.А., Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Соловьев М.Ю., и др. Состояние и перспективы разработки вакцин для специфической профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(4):74–82. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-74-82>.
12. Bayne A-CV, Boltz D, Owen C, Betz Y, Maia G, Azadi P, et al. (2013) Vaccination against Influenza with Recombinant Hemagglutinin Expressed by *Schizochytrium* sp. Confers Protective Immunity. *PLoS ONE* 8(4): e61790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061790>
13. Ramezanpour B, de Foucauld J, Kortekaas J. Emergency deployment of genetically engineered veterinary vaccines in Europe. *Vaccine*. 2016 Jun 24;34(30):3435-40. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.05.013. Epub 2016 May 18. PMID: 27208587.
14. Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, Spencer AJ, Hill AV, Dorrell L. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. *Curr Opin Immunol*. 2016 Aug;41:47-54. doi: 10.1016/j.coi.2016.05.014. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27286566.
15. Gu, P., Yang, F., Su, T. et al. A rapid and reliable strategy for chromosomal integration of gene (s) with multiple copies. *Sci Rep* 5, 9684 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep09684>
16. Panchavarnam S, Kollanoor RJ, Mulloorpeedikayil RG, Mohaideenpitchai MM, Palraj MK, Muthumariyapan S. Development of recombinant major capsid protein Vaccine and assessment of its efficacy against SRDV in similar damselfish (*Pomacentrus similis*). *Fish Shellfish Immunol*. 2023 Oct;141:109035. doi: 10.1016/j.fsi.2023.109035. Epub 2023 Sep 1. PMID: 37659655.
17. Ping Y. Lye, Eiji Kotani & Mervyn W.O. Liew. (2023) Progress and challenges in production of recombinant Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase subunit vaccine. *Process Biochemistry* 132, pages 263-277.
18. Rodrigues Rodrigues R, Freitas Motta J, Alves Ferreira MR, Moreira Júnior C, Ferreira Alves ML, Costa AV, Andrade Bilhalva M, Amaral Donassolo R, Cancela Galvão C, Silva Martins FM, Masiero Salvarani F, Rochedo Conceição F. Immunization of sheep with a recombinant vaccine containing immunogenic nontoxic domains of *Clostridium perfringens* alpha and beta toxins. *Microb Pathog*. 2023 Sep;182:106269. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106269. Epub 2023 Jul 28. PMID: 37516212.
19. Sastry M, Zhang B, Chen M, Joyce MG, Kong WP, Chuang GY, Ko K, Kumar A, Silacci C, Thom M, Salazar AM, Corti D, Lanzavecchia A, Taylor G, Mascola JR, Graham BS, Kwong PD. Adjuvants and the vaccine response to the DS-Cav1-stabilized fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *PLoS One*. 2017 Oct 26;12(10):e0186854. doi: 10.1371/journal.pone.0186854. PMID: 29073183; PMCID: PMC5658087.
20. Shin MK, Yoo HS. Animal vaccines based on orally presented yeast recombinants. *Vaccine*. 2013 Sep 13;31(40):4287-92. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.029. Epub 2013 Jul 24. PMID: 23891501.
21. Zhang X, Cui H, Zhang W, Li Z, Gao J. Engineered tumor cell-derived vaccines against cancer: The art of combating poison with poison. *Bioact Mater*. 2022 Oct 26;22:491-517. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.10.016. PMID: 36330160; PMCID: PMC9619151.