

На правах рукописи



*Максютов Ринат Амирович*

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ДНК-ВАКЦИНА  
ПРОТИВ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ И ДРУГИХ  
ОРТОПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА**

*03.01.03 – молекулярная биология*

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**25 НОЯ 2010**

Кольцово - 2010

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Минздравсоцразвития России.

*Научный руководитель*

доктор биологических наук, профессор Щелкунов С.Н.

*Официальные оппоненты*

доктор биологических наук, профессор Белявская В.А.

кандидат биологических наук, доцент Коваленко С.П.

*Ведущая организация*

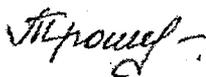
Институт химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ)  
СО РАН (Новосибирск).

Защита состоится 03 декабря 2010 года в 9.00 часов на заседании диссертационного совета при ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской области, 630559, тел. (383)336-74-28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Автореферат разослан 02 ноября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Трошкова Г.П.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Исторически первым способом защиты людей от опустошительных эпидемий натуральной оспы являлась так называемая вариоляция, заключающаяся во внутрикожном внесении инфекционного материала от больных оспой здоровым людям. Индуцированное таким образом заболевание имело более короткий инкубационный период и протекало в относительно легкой форме по сравнению с обычной респираторной передачей инфекции от человека к человеку. Смертность при вариоляции составляла 0.5-2 % вместо 20-30 %, наблюдавшихся во время эпидемий натуральной оспы. Открытие возможности вакцинации людей, используя инокуляцию вируса оспы коров (ВОК), а затем вируса осповакцины (ВОВ), привело к значительному снижению риска тяжелых побочных реакций.

В 1980 г., учитывая наличие тяжелых поствакцинальных осложнений при использовании классической живой вакцины и подтверждение ликвидации оспы, вакцинацию против данной инфекции ВОЗ рекомендовала в дальнейшем не проводить. Последующее прекращение вакцинации против оспы создало опасную ситуацию, когда человеческая популяция с каждым годом становится все более беззащитной не только перед возможным инфицированием вирусом натуральной оспы (ВНО) в результате тиракта или возникновения вируса в природе, но и перед заражением другими близкородственными ортопоксвирусами, такими как вирусы оспы обезьян (ВОО) или оспы коров, природным резервуаром которых являются мелкие грызуны. Об этом свидетельствуют участвовавшие многочисленные вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей, вызванные такими вирусами как ВОО, ВОК и ВОВ. Кроме того, ВНО рассматривают как возможный агент биотеррористических атак, которые могут иметь катастрофические последствия для всего населения Земли. Отсутствие эффективных противовирусных препаратов оставляет вакцинопрофилактику единственным специфическим средством сдерживания ортопоксвирусных инфекций среди людей.

Использование классической живой вакцины на основе ВОВ для массовой вакцинации в настоящее время недопустимо из-за относительно большого числа возможных осложнений, что объясняется возросшим в последние годы количеством

категорий людей с супрессивным иммунитетом, таких как пациенты, перенесшие трансплантацию, ВИЧ-инфицированные пациенты, лица принимающие иммунодепрессанты и др. В связи с этим особенно актуальным является разработка современных безопасных вакцин против ортопоксвирусов.

Перспективным является использование ДНК-вакцин – новейшего подхода к иммунопрофилактике вирусных инфекций. При полной безопасности они индуцируют полноценный иммунный ответ против вирусной инфекции. На основе данных о геномных последовательностях ортопоксвирусов и протективных иммуногенов, возникла возможность создания поливалентной ДНК-вакцины на основе комбинации генов вируса натуральной оспы, обеспечивающей высокую иммуногенность и защиту против ортопоксвирусов, патогенных для человека.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы являлось получение и изучение свойств экспериментальной ДНК-вакцины против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Выбрать гены вируса натуральной оспы для конструирования ДНК-вакцины, обеспечивающие высокую иммуногенность.
- Сконструировать рекомбинантные плазмиды, экспрессирующие под контролем эукариотического промотора иммунодоминантные гены ВНО.
- Определить оптимальный способ иммунизации ДНК-вакцины в зависимости от использованного промотора для эукариотической экспрессии на развитие протективного иммунного ответа.
- Определить влияние изменения кодового состава выбранного гена ВНО, оптимизированного для экспрессии в клетках млекопитающих, на протективную эффективность соответствующей ДНК-вакцины.
- Оценить иммуногенность и протективную эффективность поливалентной ДНК-вакцины.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Обоснована необходимость использования генов вируса натуральной оспы для создания ДНК-вакцины против натуральной оспы.

Впервые показано, что ДНК-вакцина на основе генов вируса натуральной оспы обеспечивает защиту против других ортопоксвирусов.

Впервые обнаружено, что ДНК-вакцина на основе гена F8L ВНО с промотором из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса наиболее эффективна при внутрибрюшинном способе иммунизации, а ДНК-вакцина с промотором цитомегаловируса наиболее эффективна при внутрикожном способе иммунизации мышей.

Показано отсутствие влияния измененного кодонового состава гена A30L ВНО, оптимизированного для экспрессии в клетках млекопитающих, на протективную эффективность ДНК-вакцины на его основе.

Показана высокая иммуногенность и протективная эффективность созданной экспериментальной поливалентной ДНК-вакцины на основе комбинации плазмид, экспрессирующих гены A30L, F8L, M1R, A36R и B7R ВНО.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Поливалентная ДНК-вакцина на основе генов A30L, F8L, M1R, A36R и B7R ВНО обеспечивает полную защиту мышей от инфицирования летальной дозой ортопоксвируса.
2. ДНК-вакцина на основе гена F8L ВНО с промотором из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса наиболее эффективна при внутрибрюшинном способе иммунизации, а ДНК-вакцина с промотором цитомегаловируса и тем же геном наиболее эффективна при внутрикожном способе иммунизации мышей.
3. Изменение кодонового состава гена A30L ВНО, оптимизированного для экспрессии в клетках млекопитающих, не оказывает существенного влияния на протективную эффективность ДНК-вакцины на основе такого гена по сравнению с ДНК-вакциной с природным вариантом этого гена ВНО.

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

По материалам диссертации опубликованы 2 статьи в реферируемых научных журналах. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Всероссийская конференция “Фундаментальные науки – медицине” (Новосибирск, Россия, 2005), II Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням (Москва, Россия, 2010), XVIII International Poxvirus, Asfivirus, and Iridovirus Symposium (Sedona, USA, 2010)

## **Вклад автора**

Поиск генов и последующий компьютерный анализ потенциальных антигенных детерминант выбранных белков для ВНО, ВОВ, ВОК и ВОО, синтез искусственного гена для определения влияния измененного кодонового состава на эффективность ДНК-вакцины, конструирование поливалентной ДНК-вакцины на основе пяти генов ВНО в составе двух векторных плазмид выполнено лично автором. Исследование иммуногенных свойств и протективной эффективности ДНК-вакцины на модельных животных выполнено лично автором при участии Бабкиной И.Н., Гавриловой Е.В., Кочневой Г.В., Нестерова А.Е.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы (206 ссылок). Работа изложена на 109 страницах, содержит 5 таблиц и 25 рисунков.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Выбор генов ВНО для конструирования ДНК-вакцины**

Вирусы рода *Orthopoxvirus* близкородственны и вакцинация животных или человека представителем одного из видов этого рода приводит к защите от инфекции вирусами других видов. При планировании работы по созданию ДНК-вакцины необходимо было определить спектр генов ортопоксвирусов, кодирующих протективно-значимые белки. Такие исследования ранее были выполнены для белков ВОВ. При отборе мы полагались на то, насколько сильными антигенными свойствами обладает тот или иной вирусный белок, опирались на данные о динамике иммунного ответа организма при вакцинации этим белком, наличии высоких титров антител, специфичных данному белку, в сыворотках людей, вакцинированных классической противосспенной вакциной. По данным литературы наиболее подходящими, на наш взгляд, являются белки ВОВ, кодируемые генами A4L, A27L, A33R, B5R, D8L, H5R, L1R и L4R. В случае ВНО данные гены имеют обозначения A4L, A30L, A36R, B7R, F8L, I5R, M1R и M4R, соответственно. Целесообразно было сравнить организацию выявленных иммунодоминантных белков ортопоксвирусов, поскольку, только люди,





В7R вируса натуральной оспы. При этом из 10 оставшихся моноклональных антител, минимум 3 обладают вируснейтрализующей активностью.

Таблица 1

Результаты компьютерного анализа белков ВНО, ВОВ, ВОК, ВОО и ВЭ

Белок ВНО штамма India-1967	Длина, а.к. / кол-во эпитопов	Гомология, % / кол-во совпадающих эпитопов *				
		ВНО **	ВОВ **	ВОК **	ВОО **	ВЭ ***
A30L	110 / 5	99.1-100.0 / 5	96.4-97.3 / 4	97.3-98.2 / 4	92.7-93.6 / 3-4	95.6 / 3
A36R	184 / 6	100.0 / 6	93.6-94.1 / 3	92.0-95.2 / 3-4	89.8 / 3	85.3 / 1
A4L	271 / 9	99.0-100.0 / 7-9	88.5-93.2 / 6	84.5-90.2 / 6-7	87.1-88.2 / 4	87.5 / 6
B7R	317 / 7	99.7-100.0 / 6-7	92.7-93.1 / 3-4	92.4-94.0 / 4-5	92.7 / 4	91.1 / 3
F8L	304 / 8	100.0 / 8	95.7-96.1 / 6-7	93.4-95.1 / 6-7	92.8 / 6	93.8 / 6
M1R	250 / 8	99.6-100.0 / 7-8	99.2-99.6 / 7	99.2 / 7-8	99.2 / 8	98.4 / 7
M4R	251 / 8	99.2-100.0 / 8	98.8-99.6 / 8	99.2 / 8	98.4 / 8	98.4 / 7
I5R	221 / 8	96.8-100.0 / 7-8	88.3-88.7 / 4	87.4-93.7 / 5-6	90.5-92.8 / 5	91.4 / 4

Примечание.

\* % гомологии и количество совпадающих эпитопов рассчитаны по отношению к белкам ВНО штамм India-1967; \*\* Данные по нескольким штаммам; \*\*\* Данные по одному штамму.

Высокий процент гомологии и большое количество совпадающих эпитопов для белков ВОК и ВОО по отношению к белкам ВНО (табл. 1), позволяет предполагать, что ДНК-вакцина на основе генов ВНО сможет также обеспечить перекрестную защиту против оспы коров и оспы обезьян. Количества совпадающих эпитопов для белков ВОК и ВОО по отношению к белкам ВНО и ВОВ примерно одинаковы. Это говорит о том, что вакцины на основе генов как ВНО, так и ВОВ будут сравнимо эффективны в индукции защиты против оспы коров и оспы обезьян. Исходя из всего вышесказанного, мы решили исследовать иммуногенность ДНК-вакцин, кодирующих восемь различных белков ВНО: три белка сердцевины вириона (A4L, M4R и I5R), три белка поверхностной мембраны внутриклеточных вирионов (A30L, F8L и M1R) и два белка оболочки внеклеточной формы вируса (A36R и B7R).

Несмотря на то, что ортопоксвирусы отличаются по числу и расположению потенциальных антигенных детерминант, при иммунизации животных представителем одного из видов, формируется перекрестный иммунный ответ, обеспечивающий защиту от других видов ортопоксвирусов. И хотя защита является

субоптимальной, это позволяет проводить доклинические исследования создаваемых вакцин против натуральной оспы на мелких лабораторных животных и патогенных для них ортопоксвирусах. Для мышей самым высокопатогенным ортопоксвирусом является вирус экстремелии, который и был выбран нами для оценки протективной эффективности ДНК-вакцины.

Для конструирования ДНК-вакцин провели расчет олигонуклеотидных праймеров с использованием компьютерной программы Oligo 6.31 на основе нуклеотидной последовательности ВНО штамм India-1967. На основе выполненного анализа в праймеры для последующего клонирования ввели сайты рестрикции *Asu*NIH и *Sal*I. Для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих непосредственно перед АТГ-кодоном ввели последовательность Козака. Последовательности праймеров и соответствующие им расчетные длины амплификационных продуктов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Праймеры для амплификации генов ВНО с помощью ПЦР

Ген ВНО	Последовательности праймеров	Длина ПЦР-продукта (п.н.)	Название ДНК-вакцины
A4L	5'-CCCGGCTAGCCGCCACCATGGACTTCTTTAACAAGTTCTC-3' 5'-CCCGTCGACTT <u>ACT</u> CTTTGGAATCGTCAAA-3'	842	pBKRSV-A4L
A30L	5'-CCCGGCTAGCCGCCACCATGGACGGAACCTCTTTCCCTG-3' 5'-CCCGTCGACGTT <u>ACT</u> TCATATGGGCGCCGAC-3'	360	pBKRSV-A30L
A36R	5'-CCCGGCTAGCCGCCACCATGATGACACCAGAAAACGAC-3' 5'-CCCGTCGACTT <u>AGT</u> TCATGTGTTTAAACACAATAAT-3'	581	pBKRSV-A36R
B7R	5'-CCCGGCTAGCCGCCACCATGAAAACGATTTCCGTTGTTA-3' 5'-CCCGTCGACACGGATTTATAT <u>TCA</u> CAGCAACA-3'	992	pBKRSV-B7R
F8L	5'-CCCGGCTAGCCGCCACCATGTCACACAACATCTCTCTTA-3' 5'-CCCGTCGACAAT <u>CTA</u> GTTTTGTGTTTTCTCG-3'	944	pBKRSV-F8L
I5R	5'-CCCGGCTAGCCGCCACCATGGCGTGGTCAATTACGAATAA-3' 5'-CCCGTCGACTT <u>ACT</u> CTCTACAAGTTTAACTTTTTTACGA-3'	692	pBKRSV-I5R
M1R	5'-CCCGGCTAGCCGCCACCATGGGTGCCGCGGCAAG-3' 5'-CCCGTCGACTT <u>CAG</u> TTTTGTATATCCGTGGTAGCAAT-3'	781	pBKRSV-M1R
M4R	5'-CCCGGCTAGCCGCCACCATGAGTCTACTGCTAGAAAACCT-3' 5'-CCCGTCGACT <u>CA</u> ATCCTTTGTCCGAATAT-3'	782	pBKRSV-M4R

Примечание.

Сайты рестрикции *Asu*NIH и *Sal*I выделены жирным шрифтом, иницирующий и стоп кодоны подчеркнуты, курсивом выделена последовательность Козака.

Гены ВНО A4L, A30L, A36R, B7R, F8L, I5R, M1R и M4R амплифицировали методом ПЦР, используя созданную ранее коллекцию гибридных плазмид, содержащих фрагменты ДНК ВНО в качестве матрицы (рис. 3) и клонировали в векторную плазмиду pBKRSV ("Stratagene", США) по сайтам рестрикции *Asu*NI и *Sal*I.

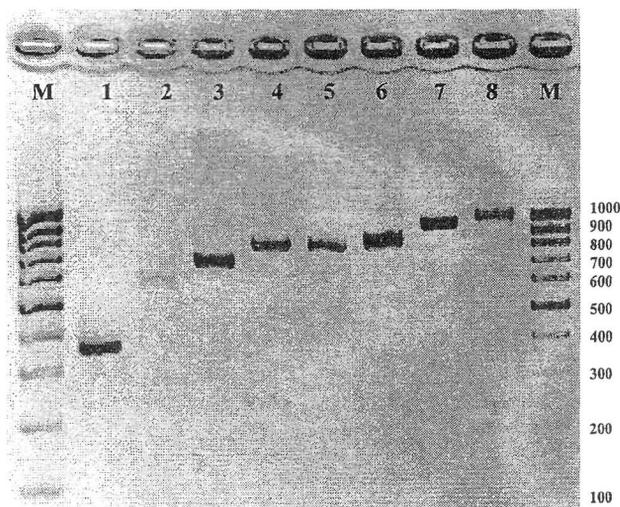


Рис. 3. Результат электрофоретического разделения в 2.5 % геле агарозы фрагментов ДНК, полученных после ПЦР при использовании олигонуклеотидных праймеров подобранных для амплификации генов ВНО.  
1. A30L; 2. A36R; 3. I5R; 4. M1R; 5. M4R; 6. A4L; 7. F8L; 8. B7R;  
M. ДНК-маркер, длина в п.н. показана справа.

Наличие вставок подтверждали рестрикционным анализом эндонуклеазами рестрикции *Asu*NI и *Sal*I (рис. 4). Для подтверждения правильности вставок секвенировали несколько клонов каждой полученной конструкции.

Для дальнейшей работы выбрали по одному клону каждой рекомбинантной плазмиды с подтвержденными кодирующими последовательностями вирусных генов. Восемь рекомбинантных плазмид были наработаны в препаративных количествах и очищены от эндотоксинов центрифугированием в двухступенчатом градиенте CsCl. Эукариотическая экспрессия генов в плазмиде pBKRSV осуществляется под контролем промотора вируса саркомы Рауса, который наравне с цитомегаловирусным промотором наиболее часто используется при создании ДНК-вакцин.

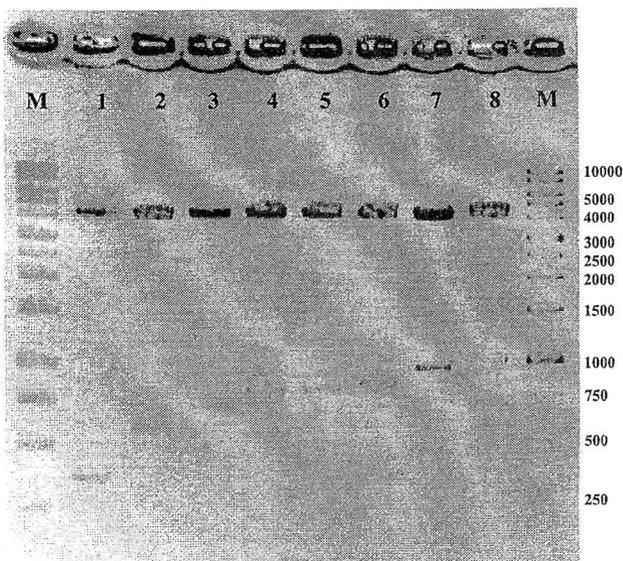


Рис. 4. Результат электрофоретического разделения в 1.5 % геле агарозы фрагментов ДНК, полученных после гидролиза рекомбинантных плазмид эндонуклеазами рестрикции *Asu*NI и *Sa*II.

1. pBKRSV-A30L; 2. pBKRSV-A36R; 3. pBKRSV-I5R; 4. pBKRSV-M1R; 5. pBKRSV-M4R; 6. pBKRSV-A4L; 7. pBKRSV-F8L; 8. pBKRSV-B7R;  
 М. ДНК-маркер, длина в п.н. показана справа.

Для изучения иммуногенных свойств полученных конструкций группы животных были дважды независимо иммунизированы каждым из 8-ми препаратов ДНК-вакцин. Также одна группа была иммунизирована смесью 8-ми плазмид с пропорциональным уменьшением концентрации каждой плазмиды. Повторная иммунизация была проведена через три недели после первой.

Были выявлены относительно низкие показатели иммуногенности, требующие оптимизации ДНК-вакцины. Лучшие результаты были получены для ДНК-вакцины, содержащей ген вируса натуральной оспы F8L, которая при двукратном внутрибрюшинном введении мышам индуцировала специфический клеточный и гуморальный иммунный ответ против ВОВ. Отсутствие высокого титра антител, нейтрализующих ВОВ, при иммунизации животных смесью восьми плазмид, по-видимому, обусловлено меньшим количеством каждой плазмиды при инъекции в смеси. Последнее говорит о необходимости уменьшения количества генов в составе

мультиплазмидной ДНК-вакцины с целью увеличения представительства нескольких наиболее протективных иммуногенов.

### **Определение оптимального способа иммунизации ДНК-вакцины в зависимости от использованного промотора для эукариотической экспрессии на развитие протективного иммунного ответа**

Известно, что на эффективность ДНК-вакцины в значительной степени влияют используемый эукариотический промотор для экспрессии антигена и способ иммунизации. Поэтому для усиления эффективности создаваемой нами ДНК-вакцины необходимо было определить оптимальный способ иммунизации в зависимости от использованного промотора для эукариотической экспрессии на примере гена F8L ВНО в плане развития протективного иммунного ответа на модели мышей и высокопатогенного для них вируса экстремелии (оспы мышей).

Ген F8L ВНО переклонировали из полученной ранее рекомбинантной плазмиды pBKRSV-F8L в плазмиду pcDNA (pcDNA3.1/Мyc-His(-)/lacZ, "Invitrogen", США) по сайтам гидролиза рестриктаз *Asu*NI и *Hind*III. Эукариотическая экспрессия гена в плаزمиде pBKRSV и pcDNA осуществляется под контролем промотора из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса и цитомегаловирусного промотора, соответственно. Рекомбинантные плазмиды pBKRSV-F8L и pcDNA-F8L нарабатывали в препаративных количествах и очищали от бактериального эндотоксина центрифугированием в двухступенчатом градиенте CsCl.

Для изучения оптимального способа иммунизации и используемого промотора, группы по 14 мышей в каждой иммунизировали следующими препаратами ДНК-вакцин в дозе 100 мкг на мышь: pBKRSV-F8L или pcDNA-F8L внутрибрюшинно, внутримышечно, внутрикожно или подкожно. В качестве отрицательного и положительного контролей мышей в двух группах внутрибрюшинно иммунизировали физиологическим раствором или вирусом осповакцины в дозе  $10^6$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мышь, соответственно. Вакцины вводили трехкратно с трехнедельными интервалами, и через три недели после последней иммунизации все мыши в группах были внутрибрюшинно инфицированы вирусом экстремелии штамм К1 в дозе 10 LD<sub>50</sub>.

Наличие ВОВ-специфичных антител в сыворотках крови мышей на 56-е сутки эксперимента определяли методом ИФА с сорбированным вирусом осповакцины

штамм Л-ИВП (рис. 5). Исходя из полученных данных, все мыши, иммунизированные плазмидами рBKRSV-F8L или рсDNA-F8L, продуцировали ВОВ-специфичные антитела. При этом максимальные титры сывороток были получены для внутрибрюшинного способа иммунизации ДНК-вакциной рBKRSV-F8L ( $1/2400 \pm 1/428$ ) и внутрикожного способа иммунизации ДНК-вакциной рсDNA-F8L ( $1/3000 \pm 1/370$ ). Немного меньшие титры были получены при внутрибрюшинном способе иммунизации ДНК-вакциной рсDNA-F8L ( $1/1550 \pm 1/141$ ) и при внутрикожном способе иммунизации ДНК-вакциной рBKRSV-F8L ( $1/1600 \pm 1/370$ ). Минимальные титры наблюдали для обеих ДНК-вакцин, вводимых внутримышечно (рBKRSV-F8L ( $1/775 \pm 1/271$ ) и рсDNA-F8L ( $1/1100 \pm 1/283$ )) или подкожно (рBKRSV-F8L ( $1/1400 \pm 1/214$ ) и рсDNA-F8L ( $1/800 \pm 1/214$ )).

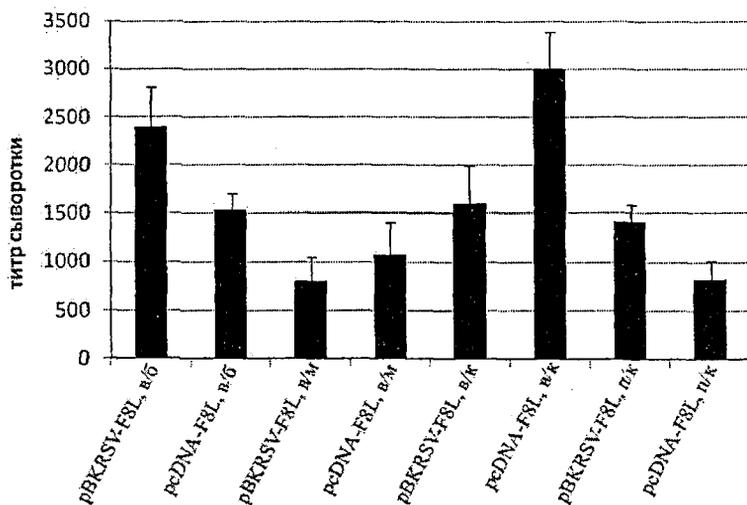


Рис. 5. Уровень ВОВ-специфичных антител при иммунизации мышей линии BALB/c внутрибрюшинно (в/б), внутримышечно (в/м), внутрикожно (в/к) или подкожно (п/к) препаратами ДНК-вакцин рсDNA-F8L или рBKRSV-F8L. Представлены средние значения обратных титров сывороток  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 8$ ).

Все мыши, вакцинированные рBKRSV-F8L или рсDNA-F8L, на 56-е сутки эксперимента продуцировали ВОВ-нейтрализующие антитела, что подтверждали методом нейтрализации вируса осповакцины на культуре клеток Vero (рис. 6). Для группы мышей положительного контроля, иммунизированных вирусом осповакцины,

была получена  $87.0 \pm 4.6\%$  нейтрализация для разведения сыворотки 1:100, а для группы отрицательного контроля –  $4.0 \pm 2.6\%$  нейтрализация. При таких же разведениях сывороток более чем 50% нейтрализация наблюдалась только для внутрибрюшинного способа иммунизации ДНК-вакциной рBKRSV-F8L ( $50.7 \pm 4.9\%$ ) и внутрикожного способа иммунизации ДНК-вакциной рсDNA-F8L ( $57.0 \pm 3.6\%$ ). Промежуточные значения нейтрализации обеспечивали ДНК-вакцина рBKRSV-F8L при внутрикожном ( $34.7 \pm 2.5\%$ ) и подкожном ( $32.7 \pm 3.1\%$ ) способах иммунизации и ДНК-вакцина рсDNA-F8L при внутрибрюшинном ( $24.7 \pm 2.9\%$ ) и подкожном ( $22.3 \pm 4.5\%$ ) способах иммунизации. Наименьшую нейтрализацию ВОВ обеспечивали сыворотки, полученные при иммунизации мышей плазмидами рBKRSV-F8L и рсDNA-F8L при введении их животным внутримышечно:  $20.7 \pm 1.5\%$  и  $21.3 \pm 2.5\%$ , соответственно.

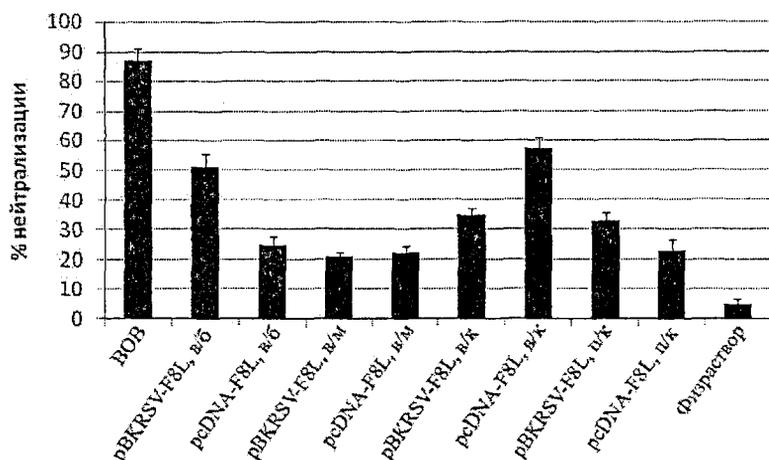


Рис. 6. Уровень вируснейтрализующих антител при иммунизации мышей линии BALB/c внутрибрюшинно (в/б), внутримышечно (в/м), внутрикожно (в/к) или подкожно (п/к) препаратами ДНК-вакцин рсDNA-F8L или рBKRSV-F8L, выявляемый методом нейтрализации ВОВ на культуре клеток Vero. Представлены средние значения процентов нейтрализации для разведения сывороток 1:100  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 3$ ).

При изучении протективности инфицированием иммунизированных мышей высоковирулентным вирусом экстремелии штамм K1 в дозе  $10 LD_{50}$ , лучшие результаты были получены для внутрикожного способа иммунизации ДНК-вакциной

pcDNA-F8L (40 % выживших) (рис. 7А) и внутрибрюшинного способа иммунизации ДНК-вакциной pBKRSV-F8L (45 % выживших) (рис. 7Б).

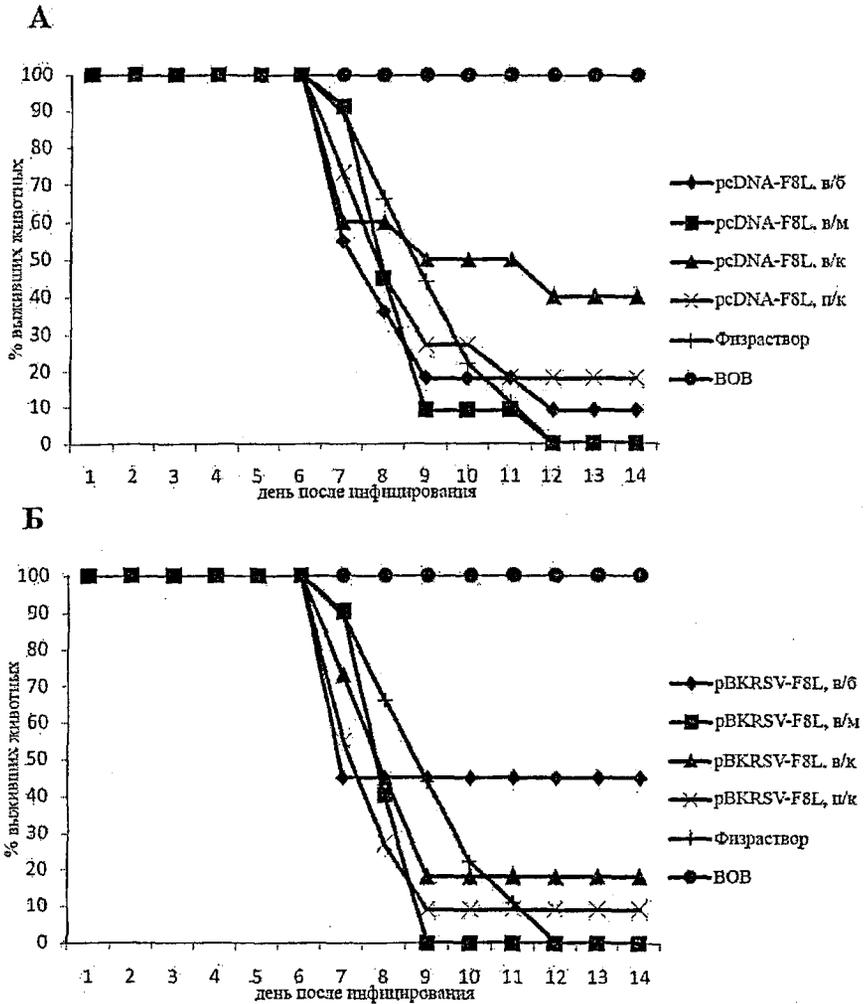


Рис. 7. Выживаемость групп мышей линии BALB/c трехкратно иммунизированных внутрибрюшинно (в/б), внутримышечно (в/м), внутрикожно (в/к) или подкожно (п/к) ДНК-вакцинами pcDNA-F8L (А) или pBKRSV-F8L (Б) и внутрибрюшинно инфицированных 10 LD<sub>50</sub> вируса экстремелии штамм К1.

Комбинации pcDNA-F8L/внутрибрюшинно, pcDNA-F8L/подкожно, pBKRSV-F8L/внутрикожно, pBKRSV-F8L/подкожно обеспечивали существенно меньшие

уровни защиты – 9, 18, 18 и 9 %, соответственно. В группах, иммунизированных внутримышечно ДНК-вакцинами рBKRSV-F8L или рсDNA-F8L, выживших животных не было.

Таким образом, в настоящем эксперименте мы протестировали на мышах линии BALB/c два препарата ДНК-вакцин: рBKRSV-F8L или рсDNA-F8L, вводимых внутрибрюшинно, внутримышечно, внутрикожно или подкожно с последующим инфицированием летальной дозой вируса экстремели. ДНК иммунизация во всех исследуемых группах приводила к наработке ВОВ-специфичных и ВОВ-нейтрализующих антител. Закономерно, что для всех групп мышей, иммунизированных ДНК-вакцинами рBKRSV-F8L или рсDNA-F8L, титры ВОВ-специфичных антител коррелируют с титрами ВОВ-нейтрализующих антител.

Нами впервые обнаружено, что ДНК-вакцина с промотором из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса (рBKRSV) наиболее эффективна при внутрибрюшинном способе иммунизации, а ДНК-вакцина с промотором цитомегаловируса (рсDNA) и тем же геном иммунодоминантного белка ВНО наиболее эффективна при внутрикожном способе иммунизации.

**Исследование влияния изменения кодонового состава гена,  
оптимизированного для экспрессии в клетках млекопитающих,  
на протективную эффективность ДНК-вакцины**

На повышение эффективности ДНК-вакцины может оказывать влияние оптимизация кодонового состава генов протективных вирусных антигенов, приводящая к увеличению синтеза вирусного белка в клетках млекопитающих. Учитывая то, что весь цикл развития ортопоксвируса проходит в цитоплазматических образованиях, называемых виросомами или вирусными фабриками, и то, что вирус использует свои собственные ферментативные системы синтеза РНК и ДНК, а вирусная ДНК имеет более низкий GC состав по сравнению с геномом клеток млекопитающих, важно было проверить, можно ли значительно увеличить эффективность разрабатываемой вакцины против натуральной оспы в результате оптимизации кодонового состава ортопоксвирусного гена для его экспрессии в ядре клеток млекопитающих.

Поэтому следующей задачей являлось сравнение эффективности ДНК-вакцин на основе природного гена А30L ВНО и искусственного гена А30L<sub>opt</sub> с измененным

кодонавым составом, оптимизированным для экспрессии в клетках млекопитающих (рис. 8).

	M D G T L F P G D D D L A I P A T E F F	
A30L	ATGGACGGAACTCTTTCCSTGGAGATGATGATCTTGC AATCCAGCAACTGAATTTTC	60
A30L <sub>opt</sub>	.....C..C..G....C..C..C..C..G..C..C..C..C..G..C...	
	S T K A A K K P E A K R E A I V K A D G	
A30L	TCTACAAAGGCTGCTAAAAGCCAGAGCCTAAACCGCGAAGCAATTGTAAAGCCGATGGA	120
A30L <sub>opt</sub>	AGC...C...C....G..C..G....C....C..G..G..G..C..C..G..G....C..C	
	D N N E E T L K Q R L T N L E K K I T N	
A30L	GACAAATATGAGGAACTCTCAAACACCGGCTAACTAATTTGGAAAAAATACTAAT	180
A30L <sub>opt</sub>	.....C..C....G..C..G..G....G....G..C..CC....G..G..G..C..C..C	
	V T T K F E Q I E K C C K R N D D V L F	
A30L	GTAAACAACAAGTTTGAACAAATAGAAAAGTGGTGTAAACGCAATGATGACGTTTATTT	240
A30L <sub>opt</sub>	..G..C..C....C..G..G..C..G....C..C..G..G..C..C....G..G..C	
	R L E N H A E T L R A A M I S L A K K I	
A30L	AGGTTGGAATAACACGCTGAAACTCTAAGAGCGGSTATGATATCTCTGGCTAAAAAGATT	300
A30L <sub>opt</sub>	C..C....G..C....C..G..C..GC..G..C..C....CAGC....C..G....C	
	D V Q T G R R P Y E *	
A30L	GATGTTCCAGACTGGTCGGCGCCCATATGAGTAA	333
A30L <sub>opt</sub>	..C..G....C..C....G..C..C....G..	

Рис. 8. Сравнение нуклеотидной последовательности гена A30L ВНО с последовательностью гена A30L<sub>opt</sub>, оптимизированной по частоте встречаемости кодонов для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих. Идентичные нуклеотиды в сравниваемой последовательности гена A30L<sub>opt</sub> по отношению к последовательности гена A30L ВНО обозначены точками. Цифры справа от нуклеотидной последовательности обозначают позицию нуклеотидов в гене A30L ВНО. Аминокислотная последовательность белка A30L приведена над нуклеотидной последовательностью гена A30L ВНО.

Имеются различные стратегии синтеза искусственной полинуклеотидной последовательности, основанные на лигировании и/или амплификации длинных олигонуклеотидов. Нами была выбрана стратегия блочного синтеза полинуклеотидной последовательности методом ПЦР. Используя оптимизированную последовательность, рассчитали олигонуклеотидные праймеры длиной 45-49 нуклеотидов с учетом того, что 20 нуклеотидов являются взаимно комплементарными по концевым участкам. Схематическое изображение синтеза искусственного гена A30L ВНО, оптимизированного по частоте встречаемости кодонов для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих, представлено на рисунке 9.

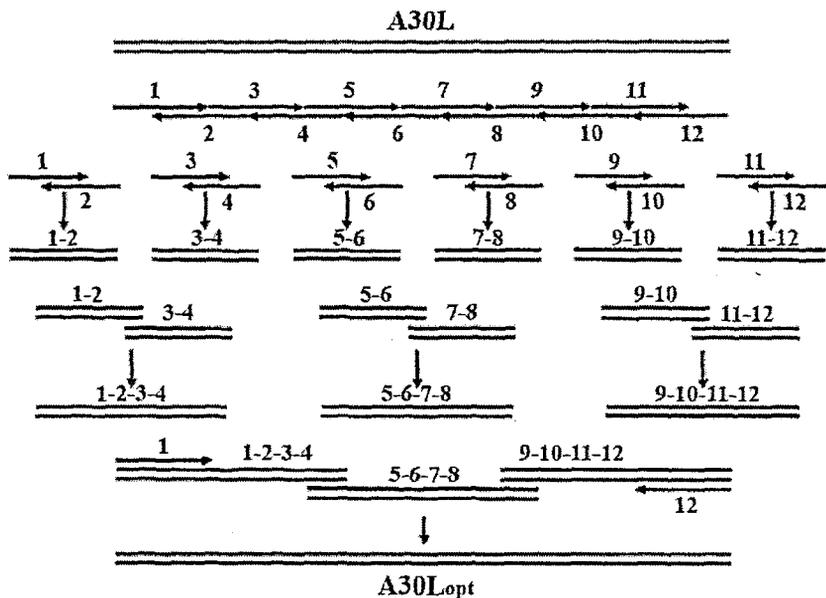


Рис. 9. Схематическое изображение синтеза искусственного гена A30L ВНО, оптимизированного по частоте встречаемости кодонов для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих. Над стрелками приведены номера соответствующих олигонуклеотидов.

В первом раунде провели независимые шесть ПЦР для каждой пары праймеров Sense-Antisense: 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12 (5 циклов). Во втором раунде провели три ПЦР для соответствующих пар ПЦР-продуктов первого раунда: 12-34, 56-78, 910-1112 (10 циклов). В третьем раунде провели ПЦР для трех ПЦР-продуктов второго раунда: 1234-5678-9101112 с добавлением крайних олигонуклеотидов (25 циклов) (рис. 9). Полученный ПЦР-продукт очищали от неспецифических ПЦР-продуктов, длина которых не соответствовала расчетной, с помощью Gel Extraction Kit ("QIAGEN", Германия) согласно инструкции производителя.

Синтетический ген A30L<sub>opt</sub> клонировали в плазмиду pсDNA и после отбора гибридных плазмид осуществляли секвенирование клонированного гена и регуляторных 5'- и 3'-концевых последовательностей. Исправление нуклеотидных замес проводили методом ПЦР с использованием внутренних праймеров, соответствующих выявленным замесам, и внешних праймеров 1/12 с дальнейшим повторением вышеописанных этапов до получения клона без нуклеотидных замесов.

Природный ген А30L ВНО переклонировали из полученной ранее рекомбинантной плазмиды рВКРСV-A30L в плазмиду рсDNA с последующим подтверждением правильности вставки рестрикционным анализом и секвенированием. Плазмидные ДНК рсDNA, рсDNA-A30L и рсDNA-A30L<sub>opt</sub> нарабатывали в клетках *E.coli* в препаративном количестве и очищали с помощью EndoFree Plasmid Giga Kit ("QIAGEN", Германия) согласно инструкции производителя.

Для изучения влияния оптимального кодового состава гена на эффективность ДНК-вакцины, четыре группы по 16 мышей в каждой иммунизировали внутривожно дозой 100 мкг на мышь ДНК-вакцинами рсDNA-A30L и рсDNA-A30L<sub>opt</sub>, контрольной плазмидой рсDNA и внутривбрюшинно вирусом осповакцины в дозе 10<sup>6</sup> БОЕ на мышь в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Вакцины вводили трехкратно с трехнедельными интервалами, и через три недели после последней иммунизации все мыши в группах были внутривбрюшинно инфицированы вирусом экстремелии штамм К1 в дозе 10 LD<sub>50</sub>. Эксперименты на животных проводили в трех повторах.

Все мыши, вакцинированные рсDNA-A30L или рсDNA-A30L<sub>opt</sub>, продуцировали ВОВ-специфичные антитела на 56-е сутки эксперимента, что подтверждали методом ИФА с сорбированным вирусом осповакцины штамм Л-ИВП. Максимальные титры сывороток составили 1/3200 для ДНК-вакцины рсDNA-A30L и 1/6400 для ДНК-вакцины рсDNA-A30L<sub>opt</sub>.

Вакцинация мышей ДНК-вакцинами рсDNA-A30L или рсDNA-A30L<sub>opt</sub>, вызывала наработку ВОВ-нейтрализующих антител, что подтверждали методом нейтрализации вируса осповакцины на культуре клеток Vero на 56-е сутки эксперимента. Результаты исследований представлены на рисунке 10. Для группы мышей, иммунизированных ДНК-вакциной рсDNA-A30L, выявили 62.0 ± 4.0 % нейтрализации инфекционности ВОВ для разведения сыворотки 1:100, для группы рсDNA-A30L<sub>opt</sub> – 67.0 ± 4.0 % (для группы положительного контроля – 85.0 ± 4.5 %, для группы отрицательного контроля – 3.5 ± 0.5 %).

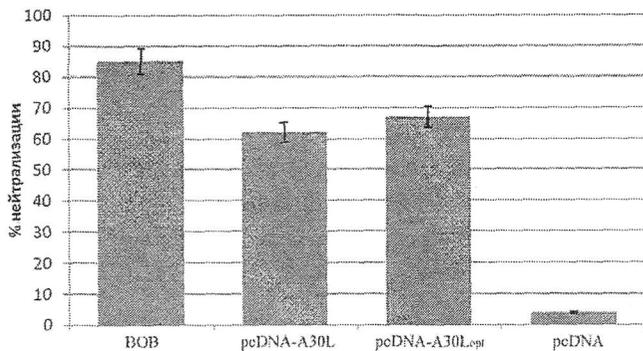


Рис. 10. Уровень вируснейтрализующих антител при иммунизации мышей линии BALB/c внутривенно препаратами ДНК-вакцин pcDNA-A30L, pcDNA-A30L<sub>opt</sub> или BOB, выявляемый методом нейтрализации BOB на культуре клеток Vero. Представлены средние значения процентов нейтрализации для разведения сывороток 1:100 ± стандартное отклонение (n = 3).

При изучении протективности инфицированием вирусом экстремелии штамм KI в дозе 10 LD<sub>50</sub> за мышами проводили наблюдение в течение 14 суток (рис. 11). В трех группах отрицательного контроля к окончанию срока наблюдения погибли все мыши (выжило 0 %). В трех группах положительного контроля к окончанию срока наблюдения не погибло ни одной мыши (100 %). В трех группах, иммунизированных ДНК-вакциной pcDNA-A30L, к окончанию срока наблюдения выжило 4, 4 и 2 мыши из 10 (33.3 ± 11.5 %). В трех группах иммунизированных ДНК-вакциной pcDNA-A30L<sub>opt</sub> к окончанию срока наблюдения выжило 7, 4 и 3 мыши из 10 (46.7 ± 20.8 %). Среднее значение протективности для pcDNA-A30L<sub>opt</sub> выше среднего значения протективности для pcDNA-A30L, однако, превышение не является статистически достоверным.

Таким образом, в настоящем эксперименте мы показали, что иммунизация мышей ДНК-вакцинами на основе природного гена A30L ВНО или гена A30L<sub>opt</sub> с оптимизированным кодоновым составом, приводит к наработке BOB-нейтрализующих антител и обеспечивает частичную защиту от инфицирования летальной дозой вируса оспы мышей. При этом ДНК-вакцина на основе гена A30L<sub>opt</sub> с оптимизированным кодоновым составом дает более высокие титры BOB-специфичных антител по сравнению с ДНК-вакциной на основе природного гена A30L ВНО. Отсутствие статистически достоверных отличий для ДНК-вакцин на основе природного и оптимизированного гена A30L по протективности и титру BOB-

нейтрализующих антител свидетельствуют о нецелесообразности оптимизации кодового состава остальных генов ВНО, входящих в состав разрабатываемой нами противооспенной поливалентной ДНК-вакцины.

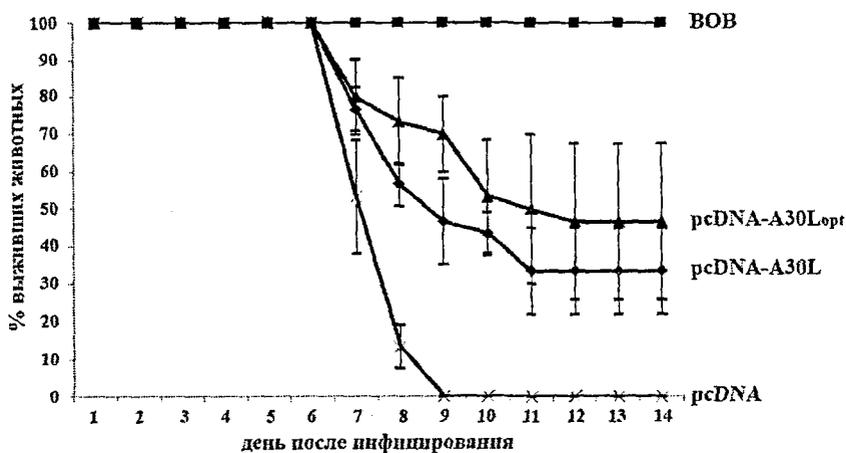


Рис. 11. Выживаемость мышей линии BALB/c трехкратно иммунизированных внутрикожно ДНК-вакцинами pcDNA-A30L или pcDNA-A30L<sub>opt</sub> и внутрибрюшинно инфицированных вирусом экстремелии штамм K1 в дозе 10 LD<sub>50</sub>. Приведены средние значения трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение (n = 3).

### Оценка иммуногенности и протективной эффективности поливалентной ДНК-вакцины на основе генов A30L, M1R, F8L, A36R и B7R ВНО

Надежная защита против ортопоксвирусов подразумевает формирование иммунного ответа против двух инфекционных форм вируса – внутриклеточного вириона и внеклеточной формы вируса одновременно, что может быть достигнуто только при использовании иммуногенов поверхностной мембраны внутриклеточного вириона и оболочки внеклеточной формы вируса в составе одной вакцины. Перспективность использования генов A30L, M1R и F8L поверхностной мембраны и генов A36R и B7R оболочки ВНО в разработке ДНК-вакцин против ортопоксвирусов в последние годы была показана для их генов-ортологов ВОВ.

Из ранее исследованных нами восьми генов ВНО, мы выбрали указанные пять для создания поливалентной ДНК-вакцины. Оценку иммуногенности и протективной эффективности решено было проводить для двух вариантов поливалентной ДНК-

вакцины: на основе вектора рBKRSV при внутрибрюшинном способе иммунизации и на основе вектора рсDNA при внутрикожном способе иммунизации. Указанные комбинации промотора и способа иммунизации были определены нами ранее как наиболее эффективные.

Гены M1R, A36R и B7R ВНО переклонировали из полученных нами ранее рекомбинантных плазмид рBKRSV-M1R, рBKRSV-A36R и рBKRSV-B7R в плазмиду рсDNA с последующим подтверждением правильности вставки рестрикционным анализом (рис. 12) и секвенированием.

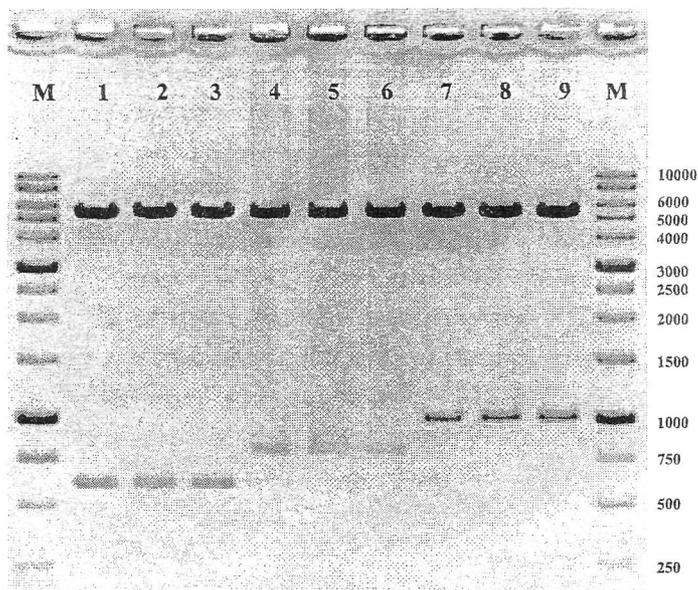


Рис. 12. Результат электрофоретического разделения в 1.5 % геле агарозы фрагментов ДНК, полученных после гидролиза рекомбинантной плазмиды эндонуклеазами рестрикции *AsuNI* и *HindIII*.

1, 2, 3. независимые клоны рекомбинантной плазмиды рсDNA-A36R.

4, 5, 6. независимые клоны рекомбинантной плазмиды рсDNA-M1R.

7, 8, 9. независимые клоны рекомбинантной плазмиды рсDNA-B7R.

М. ДНК-маркер, длина в п.н. показана справа.

Плазмидные ДНК рсDNA, рсDNA-A30L, рсDNA-F8L, рсDNA-M1R, рсDNA-A36R, рсDNA-B7R, рBKRSV, рBKRSV-A30L, рBKRSV-F8L, рBKRSV-M1R, рBKRSV-A36R и рBKRSV-B7R нарабатывали в клетках *E.coli* в препаративном

количестве и очищали с помощью EndoFree Plasmid Giga Kit (“QIAGEN”, Германия) согласно инструкции производителя.

Для оценки эффективности поливалентной ДНК-вакцины, группы по 22 мыши в каждой иммунизировали внутривенно смесью плазмид pcDNA-A30L, pcDNA-F8L, pcDNA-M1R, pcDNA-A36R и pcDNA-B7R в дозе 50 мкг каждой (суммарная доза 250 мкг на мышь); внутривенно смесью плазмид pBKRSV-A30L, pBKRSV-F8L, pBKRSV-M1R, pBKRSV-A36R и pBKRSV-B7R в дозе 50 мкг каждой (суммарная доза 250 мкг на мышь); внутривенно плазмидой pcDNA в дозе 250 мкг на мышь (отрицательный контроль №1); внутривенно плазмидой pBKRSV в дозе 250 мкг на мышь (отрицательный контроль №2); внутривенно вирусом осповакцины в дозе  $10^6$  БОЕ на мышь (положительный контроль). Вакцины вводили трехкратно с трехнедельными интервалами, и через три недели после последней иммунизации все мыши в группах были внутривенно инфицированы вирусом экстремелии штамм K1 в дозе  $10$  LD<sub>50</sub>. Эксперименты на животных проводили в двух повторах.

Ранее, в двух независимых исследованиях других лабораторий были получены противоречивые данные насчет способности гена L1R BOB (ортолог M1R BHO) обеспечивать протективный иммунитет против вируса осповакцины. Так, в работе (Hooper *et al.*, 2000) была показана 80 % защита при вакцинации одиночным геном L1R BOB, в то время как Pulford *et al.* (2004) показали полную гибель мышей, вакцинированных ДНК-вакциной на основе гена L1R BOB, при инфицировании летальной дозой BOB. Исходя из этого, представлялось интересным оценить возможность ДНК-вакцины на основе одного гена M1R BHO обеспечивать хотя бы частичную защиту против вируса экстремелии в условиях нашего эксперимента. В противном случае включение гена M1R в состав поливалентной ДНК-вакцины было бы неоправданным. Поэтому, еще одна группа в 22 мыши была иммунизирована внутривенно плазмидой pcDNA-M1R в дозе 100 мкг. Условия экспериментов были идентичны вышеописанным.

Наличие BOB-нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей определяли методом нейтрализации вируса осповакцины на культуре клеток Vero спустя две недели после каждой иммунизации (рис. 13). Было показано, что иммунизация мышей ДНК-вакциной на основе только одного гена M1R BHO вызывает наработку BOB-нейтрализующих антител. После трех иммунизаций при

титре сывороток мышей равном 1/100 достигалась  $25.0 \pm 3.5$  % нейтрализация вируса осповакцины. Полученные данные подтверждают результаты независимого исследования (Hooger *et al.*, 2000) в котором было показано, что при титре сывороток мышей, иммунизированных ДНК-вакциной на основе одного гена L1R BOB (ортолог M1R ВНО), равном 1/200 достигалась 50 % нейтрализация BOB.

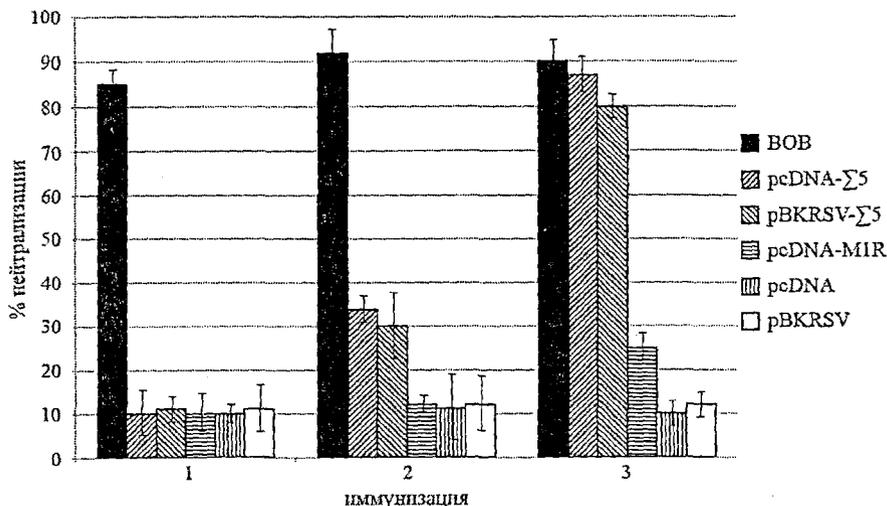


Рис. 13. Динамика уровня вируснейтрализующих антител при иммунизации мышей линии BALB/c внутрикожно поливалентной ДНК-вакциной pcDNA-A30L, pcDNA-F8L, pcDNA-M1R, pcDNA-A36R, pcDNA-B7R (pcDNA-Σ5); ДНК-вакциной pcDNA-M1R; внутрибрюшинно поливалентной ДНК-вакциной pBKRSV-A30L, pBKRSV-F8L, pBKRSV-M1R, pBKRSV-A36R, pBKRSV-B7R (pBKRSV-Σ5) или BOB, выявляемого методом нейтрализации BOB на культуре клеток Vero. Представлены средние значения процентов нейтрализации для разведения сывороток 1:100 ± стандартное отклонение (n = 3).

Иммунизация обоими вариантами поливалентной ДНК-вакцины также индуцировала наработку антител, нейтрализующих BOB (рис. 13). При этом проценты нейтрализации BOB антителами, полученными после третьей иммунизации ДНК-вакцинами, были сравнимы с процентами нейтрализации, полученными после иммунизации живым вирусом осповакцины ( $90.0 \pm 5.0$  %) (представлены данные для титра сывороток мышей равном 1/100). Поливалентная ДНК-вакцина на основе вектора pcDNA ( $87.0 \pm 4.0$  %) вызывала наработку более высокого титра BOB-нейтрализующих антител, нежели на основе вектора pBKRSV ( $80.0 \pm 2.5$  %). Это

вполне ожидаемый результат, т.к. ранее было показано, что в ряде случаев цитомегаловирусный промотор может быть более эффективным, чем промотор из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса в плане индукции иммунного ответа.

При изучении протективности инфицированием вирусом экстремелии штамм К1 в дозе 10 LD<sub>50</sub> за мышами проводили наблюдение в течение 14 суток (рис. 14). В двух группах отрицательного контроля к окончанию срока наблюдения погибло 90 % (иммунизированные рBKRSV) и 100 % (иммунизированные рсDNA) мышей. В группе положительного контроля к окончанию срока наблюдения не погибло ни одной мыши. ВОВ-нейтрализующая активность сывороток мышей, трижды иммунизированных ДНК-вакциной на основе гена M1R ВНО, обеспечивала выживаемость 25 % мышей после инфицирования 10 LD<sub>50</sub> вируса экстремелии.

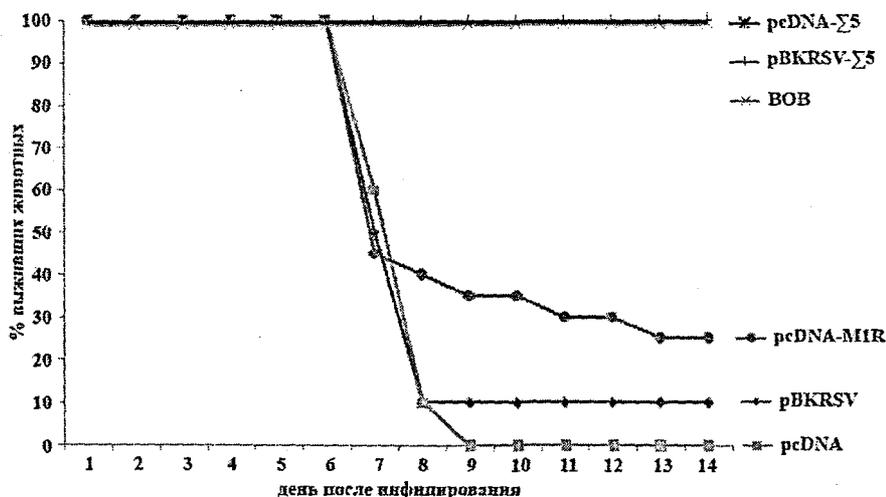


Рис. 14. Выживаемость мышей линии BALB/c трехкратно иммунизированных внутрикожно поливалентной ДНК-вакциной рсDNA-A30L, рсDNA-F8L, рсDNA-M1R, рсDNA-A36R, рсDNA-B7R (рсDNA-Σ5); ДНК-вакциной рсDNA-M1R; трехкратно иммунизированных внутрибрюшинно поливалентной ДНК-вакциной рBKRSV-A30L, рBKRSV-F8L, рBKRSV-M1R, рBKRSV-A36R, рBKRSV-B7R (рBKRSV-Σ5) и внутрибрюшинно инфицированных вирусом экстремелии штамм К1 в дозе 10 LD<sub>50</sub>.

Ранее мы показали, что гены F8L и A30L поверхностной мембраны ВНО в составе вектора рсDNA при внутрикожной иммунизации обеспечивают 40 % (рис. 7А)

и 33 % (рис. 11) защиту от инфицирования 10 LD<sub>50</sub> вируса экстремелии, соответственно. Последний ген поверхностной мембраны ВНО – M1R, входящий в состав разрабатываемой нами поливалентной ДНК-вакцины, в меньшей степени защищает мышей от летальной экстремелии. Однако даже частичная защита говорит о необходимости включения гена M1R ВНО в состав поливалентной ДНК-вакцины против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

Оба варианта экспериментальной поливалентной ДНК-вакцины на основе генов A30L, F8L, M1R, A36R и B7R ВНО, наравне с положительным контролем (мышами, иммунизированными живым ВОВ), обеспечивали полную защиту мышей от инфицирования летальной дозой вируса экстремелии. Мы впервые продемонстрировали, что гены вируса натуральной оспы в составе ДНК-вакцины полностью защищают мышей от летальной ортопоксвирусной инфекции. Ранее подобные исследования были проведены только для генов вируса осповакцины и вируса оспы обезьян.

Таким образом, мы создали экспериментальную поливалентную ДНК-вакцину на основе генов пяти протективных антигенов ВНО – A30L, F8L, M1R поверхностной мембраны внутриклеточных вирионов и A36R и B7R оболочки внеклеточной формы вируса. Созданная ДНК-вакцина против натуральной оспы может быть важна для первичной безопасной вакцинации с возможной последующей ревакцинацией классической вакциной. В этом случае число побочных реакций должно быть значительно снижено. Созданная ДНК-вакцина также обладает потенциалом обеспечивать защиту против других ортопоксвирусов. В группу риска потенциального заражения ортопоксвирусами входят, например, научные сотрудники, работающие с вирусами осповакцины или оспой коров, медицинский персонал и военнослужащие, для которых иммунизация безопасной ДНК-вакциной будет более предпочтительной в силу отсутствия массы побочных эффектов. Также созданная ДНК-вакцина может быть использована в случае массовых вспышек ортопоксвирусных инфекций среди людей, таких как вспышки оспы обезьян, оспы коров или осповакцины. Успешное применение ДНК-вакцины при естественных вспышках ортопоксвирусных инфекций усилит уверенность в возможности ее использования для противодействия натуральной оспе.

## ВЫВОДЫ

1. На основании результатов выполненного компьютерного анализа показано, что вирионные белки A30L, A36R, B7R, F8L и M1R ВНО отличаются по 1, 3, 4, 2 и 1 потенциальной антигенной детерминанте от их ортологов ВОВ и сделано заключение о необходимости использования генов вируса натуральной оспы для создания ДНК-вакцины против натуральной оспы.
2. Создан набор рекомбинантных плазмид на основе векторной плазмиды рBKRSV, несущей гены A4L, A30L, A36R, B7R, F8L, I5R, M1R и M4R ВНО под контролем промотора из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса, и на основе векторной плазмиды рсDNA3.1, несущей гены A30L, A36R, B7R, F8L и M1R ВНО под контролем промотора цитомегаловируса.
3. Показано, что ген F8L ВНО в составе ДНК-вакцины с промотором из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса наиболее эффективен при внутрибрюшинном способе иммунизации, а в составе ДНК-вакцины с промотором цитомегаловируса наиболее эффективен при внутрикожном способе иммунизации.
4. Показано, что изменение кодового состава гена A30L ВНО, оптимизированного для экспрессии в клетках млекопитающих, не оказывает влияния на протективную эффективность ДНК-вакцины.
5. Показано, что ДНК-вакцины на основе индивидуальных генов M1R, A30L и F8L ВНО под контролем промотора цитомегаловируса при внутрикожном способе иммунизации вызывают наработку ВОВ-нейтрализующих антител и обеспечивают 25, 33 и 40 % защиту мышей от инфицирования вирусом экстремелии в дозе  $10LD_{50}$ , соответственно.
6. Показано, что экспериментальная ДНК-вакцина на основе смеси рекомбинантных плазмид, содержащих гены пяти антигенов ВНО – A30L, F8L, M1R поверхностной мембраны внутриклеточных вирионов и A36R и B7L оболочки внеклеточной формы вируса, вызывает наработку высоких титров ВОВ-нейтрализующих антител и обеспечивает полную защиту мышей от инфицирования вирусом экстремелии в дозе  $10LD_{50}$ .

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Максютов Р.А., Бабкина И.Н., Нестеров А.Е., Щелкунов С.Н. Создание кандидатной ДНК-вакцины против ортопоксвирусных инфекций человека // Биотехнология. – 2006. – Т. 4. – С. 23–30.
2. Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. Оптимизация ДНК-вакцины против ортопоксвирусных инфекций человека на основе гена F8L вируса натуральной оспы // Российский Иммунологический Журнал. – 2010. – Т. 4. – С. 25–32.
3. Maksyutov R.A., Nazina E.A., Babkina I.N., Shchelkunov S.N. Studies of candidate DNA vaccine against orthopoxvirus infections based on variola virus F8L gene. // Всероссийская конференция “Фундаментальные науки – медицине”, Новосибирск, Россия, 4-8 сентября 2005, с. 94.
4. Максютов Р.А., Гаврилова Е.В., Щелкунов С.Н. Влияние гуманизации гена A30L вируса натуральной оспы на эффективность ДНК-вакцины против патогенных для человека ортопоксвирусов // II Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням, Москва, Россия, 29-31 марта 2010, с. 186.
5. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Shchelkunov S.N. Studies of smallpox DNA-vaccine // XVIII International Poxvirus, Asfivirus, and Iridovirus Symposium, Sedona, Arizona, USA, June 5-10 2010, P8.16.

### Список используемых сокращений

- БОЕ – бляшкообразующая единица  
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека  
ВНО (VARV) – вирус натуральной оспы  
ВОВ (VACV) – вирус осповакцины  
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения  
ВОК (CPXV) – вирус оспы коров  
ВОО (MPXV) – вирус оспы обезьян  
ВЭ (ECTV) – вирус экстремелии  
п.н. – пара нуклеотидов  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
LD<sub>50</sub> – летальная доза, 50%

Максютов Ринат Амирович

Экспериментальная днк-вакцина против натуральной оспы и других  
ортопоксвирусных инфекций человека.

Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Отпечатано в центре оперативной полиграфии ИП. Нестеров. П.Н.  
630084 г. Новосибирск, ул. Кропоткина, 555