

АННОТАЦИЯ

к диссертации Абай Жандоса на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе «8D05110 - Вирусология» на тему:
«Разработка
технологии изготовления векторной вакцины против туберкулеза
крупного рогатого скота»

Общая характеристика диссертационного исследования. Целью диссертации является создание отечественной векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота на основе рекомбинантного вируса птичьего гриппа путем создания вектора, несущего микобактериальные гены, а также исследование безопасности, защиты и иммуногенности вакцины на лабораторных и целевых животных.

Актуальность диссертационной работы. Туберкулез крупного рогатого скота (КРС)

— хроническое инфекционное заболевание крупного рогатого скота, вызываемое *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Важностью борьбы с туберкулезом КРС связана с его зоонозной способностью, то есть при определенных условиях он представляет риск естественной передачи от животных к человеку. В сельском хозяйстве Казахстана аграрный сектор занимает центральное место. Поэтому, учитывая значительное влияние на здоровье крупного рогатого скота, а также экономические и социальные последствия, изучение туберкулеза крупного рогатого скота в Казахстане остается актуальной проблемой.

В настоящее время, несмотря на значительные различия в эффективности вакцинации против *M. bovis*, БЦЖ для крупного рогатого скота и человека по-прежнему остается единственной коммерчески доступной вакциной-кандидатом, потенциально полезной для снижения распространенности туберкулеза крупного рогатого скота. Однако в последние годы поступило много жалоб на применение вакцины БЦЖ в

связи с возникновением поствакцинальных реакций, низкой иммуногенностью и трудностью их дифференциации у иммунизированных животных при алергоисследованиях. Перспективным направлением разработки эффективных вакцин против инфекционных заболеваний является создание аттенуированных рекомбинантных векторов, доставляющих в организм защитные антигены, связанные с формированием профилактического или лечебного эффекта вакцинации.

Развитие метода обратной генетики создало уникальную возможность использовать модифицированную интраназальную векторную вакцину против гриппа. Одной из перспективных мишеней для генетических манипуляций при создании векторов гриппа является неструктурный белок NS1 вируса гриппа. Этот белок синтезируется в больших количествах в инфицированных клетках во время естественной инфекции гриппа и вызывает выраженный антители- и Т-клеточный иммунный ответ. Ген NS1 вируса гриппа показал высокую устойчивость к встраиванию большого количества чужеродных нуклеотидных последовательностей в открытую рамку считывания белка NS1.

Культуральные фильтрующие белки *Mycobacterium Tuberculosis* в настоящее время представляют большой интерес для разработки новых кандидатов на вакцины. Одним из них является ранний секреторный антиген ESAT-6 (ранний секреторный антиген, 6 кДа). Этот белок кодируется геномной областью микобактерий RD1, и эта геномная область утрачена при длительном культивировании вакцинного штамма БЦЖ и является иммунодоминантной мишенью клеточного иммунного ответа как на начальной стадии туберкулезной инфекции людей и животных.

Одним из способов повышения иммуногенности микобактериальных антигенов без использования адьюванта является использование аттенуированных вирусов в качестве векторов для доставки генов и их экспрессии в организме. На основе аттенуированных вирусов (аденовирус, вирус гриппа) разрабатываются вирусные векторы, несущие

микобактериальные гены.

Использование вакцин является важным инструментом для остановки инфекции. Разработка вакцин-кандидатов, а также разработка стратегий вакцинации должны учитывать все особенности патогенеза *M. bovis* и особенности организма человека по сравнению с животными моделями, на которых проходят доклинические испытания вакцины-кандидаты.

Цель исследования: разработать технологию создания новой векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота на основе рекомбинантных вирусов гриппа, экспрессирующих микобактериальные белки.

Задачи исследования:

1. Создание рекомбинантных векторов гриппа, экспрессирующих иммунодоминантные белки *Mycobacterium bovis*;
2. Разработка технологии разработки векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота;
3. проведение внутриинститутных комиссионных испытаний опытных промышленных образцов вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота.

Объекты исследования:

- Рекомбинантный вирус птичьего гриппа;
- Протективные белки *Mycobacterium bovis*;
- Векторная вакцина против туберкулеза КРС.

Методы исследования: В ходе работы использовались методы молекулярной биологии, биотехнологии, вирусологии, серологии, проводились эксперименты на животных.

Научная новизна исследования: Впервые в Республике Казахстан с использованием новейших достижений молекулярной биологии произведена и апробирована новая векторная вакцина против туберкулеза крупного рогатого скота.

Научная и практическая значимость работы: Повышение

иммуногенности вакцины, создание новых вакцинных составов, создание противотуберкулезных вакцин на основе достижений современной молекулярной биологии и иммунологии имеют большое значение для ветеринарной медицины. В результате проведенных научных исследований создан препарат нового поколения для профилактики туберкулеза КРС.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Векторная вакцина против туберкулеза крупного рогатого скота, которая использует вирус птичьего гриппа в качестве переносчика, является эффективным методом профилактики заболевания.

2. Оптимальной является технология, разработанная для получения векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота. По разработанной технологии вакцина соответствует стандарту организации ИС 405-1919-04 ДП-146-2023 по качеству.

3. Векторная вакцина против туберкулеза крупного рогатого скота на основе вируса птичьего гриппа безопасна для лабораторных животных, обладает протективными свойствами и обеспечивает иммунитет, что подтверждается результатами внутрибольничных испытаний.

Основные результаты исследований и выводы:

1. Методом обратной генетики были сконструированы рекомбинантные штаммы вируса гриппа, экспрессирующие белки *M. bovis* Esat-6 и TB10.4. В состав двух рекомбинантных штаммов входят гены штамма A/PR/8/34(H1N1) (гены PB2, PB1, PA, NP и химерный NS1) и штамма A/Astana/6/05 (гены поверхностных антигенов HA, NA и M).

2. Оптимизированы условия выращивания рекомбинантных штаммов в куриных эмбрионах: доза вирусного заражения - 1000-10000 ЭИД50; возраст эмбриона – 10 дней;

температура – 37 °С; продолжительность инкубации - 48 часов. Инфицирующая активность рабочей биомассы рекомбинантных штаммов составила $8,87 \pm 0,22 \lg$ ЭИД50/мл.

3. С целью подбора перспективного состава вакцины была проведена

предварительная оценка безопасности, иммуногенности и защищенности вектора гриппа на лабораторных животных, в результате чего были отобраны образцы вакцины: вектор гриппа, кодирующий иммунодоминантные белки ESAT-6 и TB10.4 + Montanide Gel с адьювантом (объем - 1,0 мл, способ введения - подкожно); Вектор гриппа, кодирующий иммунодоминантные белки ESAT-6 и TB10.4 (объем - 1,0 мл, путь введения - подкожно). Отобранные образцы вакцин-кандидатов были использованы для дальнейших исследований по разработке вакцин. Разработан оптимальный способ применения векторной вакцины против туберкулеза Республики Казахстан. Телятам путем внутрикожного введения были подобраны две дозы по 2 мл/кг 6,25 ЭИД50 с интервалом 21 день. Данная схема иммунизации обеспечивала устойчивый иммунитет у вакцинированных телят в течение 12 месяцев (контрольный период).

4. Разработана технология производства векторной вакцины против туберкулеза на основе вектора гриппа. Были выбраны среды для стабилизации вакцины и под контролем качества подготовлена опытная серия векторной вакцины, которая стерильная и безопасная для лабораторных животных. Разработана нормативно-техническая документация на вакцину, включающая: Инструкция по производству и контролю векторной вакцины против туберкулеза крупного рогатого скота; СТ 405-1919-04 ГП-146-2023 «Вакцина векторная против туберкулеза крупного рогатого скота»; Инструкция по применению препарата «Векторная вакцина против туберкулеза крупного рогатого скота».

5. В соответствии с приказом № 468-О (08.12.2022) Генерального директора НИИПББ МЗ РК проведены внутренние комиссионные испытания по безопасности, иммуногенности и физико-биологическим показателям векторной вакцины против туберкулеза КРС. Испытания показали, что векторная вакцина соответствует всем требованиям СТ 405-1919-04 ГП-146-2023, является безвредной и иммуногенной.

6. На основе материалов диссертаций опубликовано 9 научных

публикаций.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования AP09259683 «Разработка технологии производства векторной вакцины для профилактики туберкулеза крупного рогатого скота» 2021-2023 гг.

Публикации: Основные результаты диссертации опубликованы в 9 опубликованных научных работах, в том числе 1 статья в отечественных периодических изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования Министерства

просвещения Республики Казахстан; 1 статья в журнале «Vaccines», включенная в базы данных Web of Science (Q1) и Scopus (82%), 1 статья в журнале «Journal of Genetic Engineering and Biotechnology», включенная в базы данных Web of Science (Q2) и 1 статья из Scopus (44%). Кроме того, получен патент на 2 полезные модели.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из 118 страниц, 97 ссылок, 40 рисунка и 30 таблиц, включая обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их анализ, заключение, библиографию.