РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ ПОЛУЧЕНИЮ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ТКАНЕВЫХ ГЕЛЬМИНТОЗОВ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Карагяур М. Н.¹,

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории паразитарных зоонозов

Успенский А. В.¹,

доктор ветеринарных наук, профессор, чл.-корр. РАН,
зав. лабораторией паразитарных зоонозов
a.v.uspensky@yandex.ru

Абрамов В. Е.¹,

доктор ветеринарных наук,
главный научный сотрудник лаборатории паразитарных зоонозов

Архипов И. А.¹,

доктор ветеринарных наук, профессор,
зав. лабораторией экспериментальной терапии

Абрамов С. В.¹,

кандидат ветеринарных наук,
старший научный сотрудник лаборатории паразитарных зоонозов

Балышев А. В.¹,

кандидат ветеринарных наук,
старший научный сотрудник лаборатории паразитарных зоонозов

Аннотация

Тканевые гельминтозы, в частности, цистный эхинококкоз и гидатидоз, цену-роз, трихинеллез и др. являются серьезной проблемой в местах интенсивного развития животноводства и производства сельскохозяйственной продукции во многих странах мира. Существующая система профилактики ларвальных цестодозов основана на реализации ветеринарно-санитарных, терапевтических и

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (117218, РФ, Москва, Б. Черемушкинская, 28)

организационно-хозяйственных мероприятий. Однако уровень ведения животноводства, особенно в индивидуальном секторе, не позволяет их выполнять в полном объеме. В связи с этим важное ветеринарное и медико-санитарное значение приобретает разработка и внедрение протективных препаратов на основе рекомбинантных белков. С этой целью в настоящей работе дан краткий анализ перспектив создания противопаразитарных вакцин с использованием системы экспрессии рекомбинантных белков на основе дрожжей *Pichia pastoris*, позволяющих проводить модификации экспрессируемых белков и их секретирование. Данный подход обеспечивает наработку в достаточном объеме относительно не дорогого рекомбинантного белка.

Ключевые слова: цистный эхинококкоз, антиген, вакцинопрофилактика, рекомбинантный белок.

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO BIOTECHNOLOGICAL OBTAINING VACCINES FOR PREVENTION OF TISSUE HELMINTOSIS IN LIVE-STOCK ANIMALS

Karagiaur M. N.¹,

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher, Laboratory of Parasitic Zoonoses

Uspensky A. V.¹,

Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member RAS,
Head of the Laboratory of Parasitic Zoonoses
a.v.uspensky@yandex.ru

Abramov V. E.¹,

Doctor of Veterinary Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Parasitic Zoonoses

Arkhipov I. A.¹,

Doctor of Veterinary Sciences, Professor,
Head of the Laboratory of Experimental Therapy

Abramov S. V.¹,

Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher,
Laboratory of Parasitic Zoonoses

Balyshev A. V.¹,

Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher,
Laboratory of Parasitic Zoonoses

¹ All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (28, Bolshaya Chermushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

Abstract

Tissue helminthiases, in particular, cystic echinococcosis and hydatidosis, coenurosis, trichinosis, etc. are a serious problem in places of intensive development of animal husbandry and agricultural production in many countries of the world. The existing system for the prevention of larval cestodosis is based on the implementation of veterinary-sanitary, therapeutic and organizational-economic measures. However, the level of livestock farming, especially in the individual sector, does not allow them to be fully implemented. In this regard, the development and implementation of protective drugs based on recombinant proteins is gaining important veterinary and health care value. For this purpose, in this work, a brief analysis of the prospects for the creation of antiparasitic vaccines using the expression system of recombinant proteins based on the yeast *Pichia pastoris*, allowing modification of expressed proteins and their secretion, was given. This approach provides the sufficient amount of relatively inexpensive recombinant protein.

Keywords: cystic echinococcosis, antigen, vaccine prophylaxis, recombinant protein.

Введение. Тканевые гельминтозы, в частности, цистный эхинококкоз и гидатидоз, ценуроз, трихинеллез и др. являются серьезной проблемой в местах интенсивного развития животноводства и производства сельскохозяйственной продукции во многих странах мира [1]. По ряду причин широко применяемая дегельминтизация домашних и хищных плотоядных не позволяет в полной мере обеспечить необходимый уровень защиты сельскохозяйственных животных и человека.

Ранее было показано, что возможно создание антигельминтных вакцин на основе онкосферальных антигенов [2, 3]. Однако основными недостатками коммерческого производства таких вакцин являются: опасность заражения персонала яйцами цестод, дороговизна и невозможность получения достаточного количества взрослых гельминтов от собак. Альтернативой таким вакцинам могут служить препараты на основе рекомбинантных антигенов, полученных методами генной инженерии. Существует множество систем экспрессии рекомбинантных белков, однако в последнее время широкое развитие получили системы на основе дрожжей *Pichia pastoris*. Они обладают рядом преимуществ по сравнению *E.coli*: способны осуществлять посттрансляционные модификации экспрессируемых белков и секретировать их; они не содержат эндотоксина, способны расти на простой культуральной среде и легко поддаются масштабированию. Все это позволяет относительно дешево получать достаточно большие количества чистого рекомбинантного белка, в частности, протективного антигена для создания антигельминтной вакцины.

Материалы и методы. Ген протективного антигена *Echinococcus granulosus* собирали из синтетических нуклеотидов и встраивали в шаттл-вектор для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*. Полученную генетическую конструкцию доставляли в клетки дрожжей с помощью электропорации, а ее интеграцию в геном дрожжей стимулировали селекцией на среде с зеотином. Скрининг среды культивирования на содержание целевого рекомбинантного антигена осуществляли с помощью метода иммуноблоттинга. Образец полученного рекомбинантного антигена был проанализирован с помощью масс-спектрометрии. Для наработки экспериментального количества антигена использовали ферментацию. Белковую фракцию, содержащую искомый антиген, получали из среды культивирования методом тангенциальной фильтрации. В качестве методов хранения рекомбинантного антигена были опробованы заморозка и лиофилизация. После хранения стабильность белка оценивали с помощью иммуноблоттинга.

Результаты исследований. Правильность сборки гена протективного антигена *Echinococcus granulosus* была подтверждена с помощью секвенирования по Сэнгеру. После электропорации на чашках, содержащих зеотин в концентрациях 100–1000 нг/мл, выросло несколько десятков колоний. Скрининг среды культивирования на содержание целевого рекомбинантного антигена позволил отобрать несколько клонов *Pichia pastoris*, обладающих наибольшей продуктивностью. Масс-спектрометрия полученного белка показала перекрытие с последовательностью искомого рекомбинантного антигена на 78%. С помощью тангенциальной фильтрации была получена белковая фракция, на 90% содержащая искомый протективный антиген. Масса лиофилизированного образца белка составила около 0.8 г, что по расчетам позволяет иммунизировать 2000 голов молодняка из группы риска (двукратная иммунизация по 200 мкг антигена/дозу). Результаты исследования стабильности полученного белкового препарата показали, что замораживание белка не обеспечивает необходимой стабильности. В то время как лиофилизация сохраняет белок интактным как минимум в течение 2-х лет после наработки.

Заключение. Дрожжи *Pichia pastoris* могут быть использованы как система биотехнологического получения рекомбинантных белков. Данный подход позволяет получать достаточно большое количество дешевого рекомбинантного антигена, не содержащего эндотоксина и пригодного для иммунизации сельскохозяйственных животных.

Литература

1. Бессонов А.С. Цистный эхинококкоз и гидатидоз / Всерос. ин-т гельминтологии им. К.И. Скрябина. М., 2007. 672 с.
2. Gemmell M.A. Hydatidosis and cysticercosis. Induced resistance to the larval phase // Aust. Vet. J. (1970) 46:366–369
3. Osborn P.J., Heath D.D., Parmeter S.N. Immunisation of lambs against infection with *Taenia ovis* using an extract of *Taenia ovis* eggs // Research in Veterinary Science (1981) 31:90–92.

References

1. Bessonov A.S. Cystic echinococcosis and hydatidosis / All-Russian K.I. Skryabin Scientific Research Institute of Helminthology. Moscow, 2007. 672 p. (In Russ.)
2. Gemmell M.A. Hydatidosis and cysticercosis. Induced resistance to the larval phase. Aust. Vet. J. 1970; 46:366–369.
3. Osborn P.J., Heath D.D., Parmeter S.N. Immunisation of lambs against infection with *Taenia ovis* using an extract of *Taenia ovis* eggs. *Research in Veterinary Science*. 1981; 31:90–92.