

ГЛАВА 2.3

ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ВЕТЕРИНАРНЫХ ВАКЦИН

ВВЕДЕНИЕ

Практика применения вакцинации для профилактики болезни животных используется веками и оказалась мощным инструментом для облегчения мучений животных, а также для экономического благополучия производителей продуктов животноводства. Еще 15-20 лет назад вакцины были мало отличимыми от первоначально изобретенной вакцины Дженнера и Пастера. С того времени произошли значительные изменения типов вакцин, произошедшие вследствие ряда факторов, включая использование в программах ускорения и в стратегиях международной торговли, а также рентабельность производства. Первые рекомбинантные вакцины были введены в конце 1980-х гг. для борьбы с болезнью Ауэски и с бешенством среди диких животных (Pastoret et al., 1988), и они являются предшественниками подобных продуктов, которые будут применяться в будущем.

Подходы, используемые при разработке вакцин, быстро расширяются в результате повышения знаний о механизмах, которые вызывают защитный иммунитет, а также вследствие бурного роста количества геномных данных как о патогенах, так и об их хозяевах. Кроме того, связанная с этим эволюция новых технологий в области молекулярной биологии и иммунологии оказала большое влияние на развитие новых стратегий вакцинации и на качество производимых продуктов. Она позволила создавать вакцины, направленные на контроль и искоренение специфичных патогенов в рамках региональных, национальных и международных требований. Использование рекомбинантных технологий несет с собой необходимость применения оценки соотношения риск-выгода, которая учитывает особые аспекты, которые необходимо принимать во внимание, в частности, в отношении безопасности (см. Глава 1.1.8 Принципы производства ветеринарных вакцин данного Руководства по наземным животным).

В данной главе описан ряд технологий, которые используются при производстве вакцин, сконструированных для особой цели. Категоризация направлена на то, чтобы помочь читателю понять применяемые технологии, но следует признать, что категории не являются взаимоисключающими (т.е. обратная генетика может быть использована при производстве химерных вакцин). В принципе, данные технологии могут быть использованы для изменения самого целевого патогенна путем замены его свойств посредством делеции, вставки, других генетических модификаций, или они могут быть использованы для изменения выделенных генов или для кодирования последовательностей патогенов в целях получения специфичных иммуногенов, ассоциированных с защитным иммунитетом.

А. ОБРАТНАЯ ГЕНЕТИКА

Развитие системы обратной генетики для ряда различных РНК и ДНК вирусов стало революцией в сфере вирусологии, сделав возможным введение в вирусный геном живых вирусов сконструированных мутаций, вставок и делеций. На настоящий момент она используется в нескольких областях, которые включают аттенуацию вирусов, изменение специфичности хозяина и выработку нереплицирующихся вирусов. Эти стратегии также применяются при разработке новых стратегий вакцинации и широко применяются при описании структуры и функционировании вирусных генов и кодирующих последовательностей.

Технология обратной генетики включает выработку клонированной копии комплиментарной ДНК (кДНК) из РНК посредством обратной транскрипции *in vitro*, манипуляции с ДНК *in vitro* с последующей выработкой модифицированного живого вируса посредством трансфекции пермиссивных клеток клонированной ДНК. Впервые данная технология была продемонстрирована с использованием бактериофага Q-Бета, вируса, содержащего плюс-цепь РНК (Taniguchi, 1978). Впоследствии было восстановлено большое количество вирусов с плюс-цепью РНК и с большим геномом, включая коронавирус атипичной пневмонии (SARS), что помогло при исследовании биологии этих вирусов и при разработке новых живых аттенуированных вирус-вакцин. Например, обратная генетика использовалась при разработке инфекционного клона вируса трансмиссивного гастроэнтерита (ТГЭ), который вызывает лактогенный иммунитет у иммунизированных поросят (Sola *et al.*, 2003). Эта новая технология также используется при разработке модифицированного вируса респираторно-репродуктивного синдрома свиней, который может быть использован для DIVA вакцины (дифференциация инфицированных и вакцинированных животных вакцина) для распознавания между вакцинированными и инфицированными свиньями (de Lima *et al.*, 2008).

Вследствие природных характеристик вирусов с РНК с минус-цепью потребовались годы работы, прежде чем была разработана и использована технология разработки сконструированных вирусов, содержащих геномы с РНК с минус-цепью. Обратная генетика была впервые разработана для вируса гриппа, сегментированного вируса с РНК с минус-цепью. С тех пор эта технология успешно используется для разработки ряда РНК-вирусов, содержащих либо несегментированные, либо сегментированные геномы с минус-цепью. Например, использование данной технологии с применением каркаса вируса H1N1 привело к разработке вакцины против вируса гриппа птиц, в которой сконструированный вирус содержал ген гемагглютинаина (НА) от вируса H5N1, а ген нейраминидазы от вируса H2N3 (Meeusen *et al.*, 2007). Получившаяся в результате инактивированная вирус-вакцина H5N3 обеспечивает полную защиту птиц от контрольного заражения высоко-патогенным гриппом H5N1. Стратегия обратной генетики также используется при разработке вакцин против ящура, классической чумы свиней и болезни Ньюкасла (см. Главы МЭБ 2.1.8, 2.8.3 и 2.3.14, соответственно). В последнее время системы обратной генетики разрабатываются для вирусов с сегментированной двухцепочечной РНК, включая вирус блютанга, что дает возможность разработать новые стратегии вакцинации от этих вирусов (Boyce *et al.*, 2008).

Ослабленная инфекционная одноциклическая вакцина (DISC) включает делецию открытой рамки считывания, кодирующей ключевой белок, участвующий в репликации вируса или в образовании вирусного капсида (Widman *et al.*, 2008). DISC-вирус выделяют

в клетках, экспрессирующих ключевой белок, таким образом обеспечивая отсутствующий белок *in trans*. При введении животным такой вирус может совершить только один цикл репликации, не произведя вируса-потомка. Вакцины, основанные на DISC-вирусах более стимулирующие по сравнению с убитыми вирус-вакцинами и лишены проблем, связанных с живыми вакцинами.

В. ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВЕКТОРОВ

Достижения в области обратной генетики, геномики и протеомики способствовали идентификации механизмов вирулентности, взаимодействий хозяин-патоген и защитных антигенов от многих патогенных микроорганизмов, а также разработке подходящих носителей/векторов для доставки этих антигенов хозяину. Наличие последовательностей бактериального и вирусного генома способствовало оперативному созданию определенных делеций в геномах широкого спектра патогенов, что не только приводит к атенуации, но также создает пространство для вставки чужеродных генов, кодирующих антигены от гетерологичных микробов. Как правило, живые бактериальные и вирусные векторы имеют общие характеристики, включая легкость и экономию производства, невключение в геном хозяина, стабильность, а также обладают способностью включать гены, кодирующие гетерологичные антигены. Кроме того, как и в случае любой живой вакцины, вектор должен быть авирулентным, а также следует проводить оценку воздействия иммунитета на вектор.

1. Бактериальные векторы

В общем и целом, бактериальные векторы аттенуируют посредством делеции генов, необходимых для ключевых метаболических процессов, или генов, ассоциированных по вирулентности. Несмотря на то, что они не используются для животных регулярно, быстро продвигается разработка и оценка различных бактерий в качестве векторов. В течение нескольких лет BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) и *Salmonella* разрабатываются в качестве векторов для доставки животным вакцинных антигенов, а последняя используется для разработки живых вакцинных штаммов для домашней птицы. В настоящее время разрабатывается ряд других бактериальных векторов, основанных на микроорганизмах-комменсалах (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Staphylococcus*) или на аттенуированных патогенных организмах (*Shigella*, *Bacillus*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Cornebacteria* и *Bordetella*), каждый из которых оценивается по своим способностям вызывать защитный иммунитет.

2. Вирусные векторы

Большинство вирусных векторов разработаны с использованием вирусов, ассоциированных с легкой болезнью или с отсутствием болезни, или используя вирусы, которые патогенны, но аттенуированы посредством делеции генов вирулентности. Разработаны и определены в качестве средства доставки вакцины репликационно-компетентные вирусные векторы, которые могут производить вирус-потомок, а также репликационно-дефективные вирусные векторы, которые не производят вируса-потомка. Ряд коммерческих вакцин, основанных на векторах на основе ДНК-вирусов, включая поксивирусы и герпесвирусы, успешно зарегистрированы для использования в ветеринарии (рассмотрено Gerdtts *et al.*, 2006). Сюда входят вирусные векторы на основе вируса коровьей оспы, вируса оспы канареек, вируса оспы кур и герпесвируса индеек.

Разработан или находится в процессе разработки, а также утвержден и апробирован ряд вирусных векторов. Сюда входят РНК-вирусы, такие как вирус венесуэльского энцефалита лошадей, вирус болезни Ньюкасла, пенящий вирус кошек, а также ДНК-вирусы, такие как аденовирусы, герпесвирусы и вирусы оспы. Векторы на основе вирусов оспы кур и оспы канареек имеют широкий круг применения (MacLachlan *et al.*, 2007; Swayne, 2009), в то время как векторы на основе нереплицирующихся аденовирусов человека успешно используются при разработке противоящурных вирус-вакцин (Rodriguez & Grubman, 2009). Зарегистрированные вакцины на основе вируса оспы канареек включают вакцины против гриппа лошадей и лейкемии кошек. Другие зарегистрированные векторные вакцины включают герпесвирус индеек, доставляемый вставкой в виде вируса инфекционной бурсальной болезни.

С. ГЕН-ДЕЛЕТИРОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ

Знание особого(ых) фактора(ов) вирулентности патогена и имеющиеся технологии рекомбинантной ДНК способствовали созданию особых патогенов с делетированным геном для использования в качестве живых вакцин. Метод создания и тестирования определенных делетированных генов, несомненно, способствует снижению патогенности/вирулентности организма без воздействия на иммуногенность. Эти организмы с делетированным геном можно использовать в качестве вакцин, т.к. они сохраняют иммуногенные характеристики организма дикого типа, но не могут вызвать болезнь. Однако чтобы быть эффективными в качестве рентабельной вакцины, эти организмы должны быть генетически устойчивыми, их должно быть легко выращивать и применять. До настоящего времени, предметом данных делеций были гены, участвующие либо в определении вирулентности, либо в регулировании ключевых метаболических путей организма(ов).

Данный подход успешно используется для создания нескольких живых аттенуированных вакцинных штаммов бактериальных патогенов, которые генетически устойчивы, безопасны в использовании и обеспечивают лучшую защиту, чем инактивированные вакцины. Ген-делементированные вакцины на основе *Salmonella enterica* серовара *typhimurium* и серовара *enteritidis* сертифицированы для использования для домашней птицы (Babu *et al.*, 2004; Meesun *et al.*, 2007) и, подобным образом, *aroA*-ген-делементированная вакцина на основе *Streptococcus equi* сертифицирована для использования для лошадей (Jakobs *et al.*, 2000; Meesun *et al.*, 2007).

Данная технология также успешно используется для создания живых аттенуированных вакцинных штаммов вирусных патогенов, которые генетически устойчивы и могут быть использованы в качестве маркерных вакцин при дифференциации между вакцинированными и инфицированными животными. Маркерная вирус-вакцина против псевдобешенства с двумя делетированными генами (gE и ТК) сертифицирована для использования для свиней (Ferrari *et al.*, 2000; Meesun *et al.*, 2007) и, подобным образом, маркерная вакцина против герпесвируса-1 КРС с делетированным геном gE сертифицирована для использования для КРС (Meesun *et al.*, 2007; Van Oirschot *et al.*, 1996).

D. ХИМЕРНЫЕ ВИРУСЫ

Химерные вирусы определяются как рекомбинантные вирусы, которые могут содержать части двух близко родственных геномов. Например, химерный вирус может содержать структурные гены одного вирусного серотипа и неструктурные гены другого серотипа того же вируса. И наоборот, химерный вирус может содержать часть генома от разных членов, принадлежащих к одному семейству вирусов. Одним из основных достижений данного подхода является тот факт, что одна доза химерного вируса доставляет полный антигенный репертуар, близко напоминая патоген(ы), который может индуцировать защитный иммунный ответ на многочисленные вирусные патогены, принадлежащие к одному или разным серотипам одного и того же вирусного патогенна.

Возможность получения инфекционных полноразмерных комплиментарных ДНК (кДНК)-клонов различных РНК-вирусов привела к появлению новых стратегий разработки вакцин. Химерные пестивирусы были сконструированы с использованием инфекционного кДНК-клона, содержащего каркасы генома вируса классической чумы свиней (КЧСВ) или генома вируса вирусной диареи КРС. В одном случае химерный пестивирус был сконструирован посредством замещения кодирующей последовательности E2 вируса вирусной диареи КРС в инфекционной ДНК-копии штамма CP7 вируса вирусной диареи КРС на соответствующую E2 кодирующую последовательность штамма Alfort 187 вируса КЧС (Reimann *et al.*, 2004). Другой химерный вирус был сконструирован посредством замещения E2 кодирующей последовательности инфекционной ДНК-копии штамма С вируса КЧС на соответствующую E2 кодирующую последовательность вируса вирусной диареи КРС (van Gennip *et al.*, 2000). По-видимому, эти химерные вирусы аттенуируются в свиньях, вызывают полную защиту от контрольного заражения вирусом КЧС, а также помогают различить между вакцинированными и инфицированными свиньями (Reinmann *et al.*, 2004; van Gennip *et al.*, 2000).

В другом случае химерный цирковир свиней выделяли с использованием инфекционных кДНК-клонов цирковируса свиней PCV-1, в которых капсидный белок от патогенного PCV2 использовался для замещения соответствующего гена в непатогенном штамме PCV1 (PCV1-2). Подобным образом капсидный ген в PCV2 был замещен на ген из PCV1 (PCV2-1). Химерный вирус PCV1-2, вероятно, аттенуировался в свиньях и вызывал защитный иммунитет против контрольного заражения свиней PCV2 дикого типа (Fenaux *et al.*, 2004).

Данная базовая технология также используется для получения химерных флавивирусов. В одном случае химерный вирус был получен посредством замещения последовательностей, кодирующих структурные белки вируса желтой лихорадки YF-17D, на такие же последовательности вируса лихорадки Западного Нила. Одна доза вакцины на основе этого химерного флавивируса вызывала как клеточно-опосредованный, так и гуморальный иммунные ответы у лошадей, а также обеспечивали защиту против контрольного заражения вирусом лихорадки Западного Нила, не вызывая какой-либо клинической болезни (Meeusen *et al.*, 2007). Эта базовая технология также используется для разработки вакцин против вируса японского энцефалита, вируса лихорадки Западного Нила и вируса лихорадки Денге для человека. Несмотря на то, что химерные флавивирусные вакцины проявили удовлетворительные показатели безопасности и эффективности, следует проявлять осторожность при оценке химерных вирусов на предмет изменения вирулентности.

Е. СУБЪЕДИНИЧНЫЕ ВАКЦИНЫ

Субъединичные вакцины, состоящие из получистых или очищенных белков, имеются в продаже с начала 1980-х гг., причем субъединичные компоненты производятся посредством технологии получения рекомбинантной ДНК, действующей с 1990-х гг. (Cohen, 1993; Rhodes *et al.*, 1994; Ulmer *et al.*, 1993; 1995). С того времени последние привлекают растущий интерес и вызывают бурную деятельность. Субъединичные вакцины не предполагают использования технологий на основе живого рекомбинантного вектора, который обеспечивает доставку рекомбинантных белков *in vivo*. Сфера геномики и родственные области революционизировали способ идентификации микробных антигенов. С момента секвенирования первого бактериального генома в 1995 году, наблюдается гигантский рост количества бактериальных, вирусных и паразитарных геномов, для которых имеются геномные последовательности. Действительно, представлены почти все патогены животных, а также те патогены, которые не представлены, могут быть получены менее чем за день. Что более важно, параллельно происходит развитие ресурсов биоинформатики и инструментов, необходимых для анализа этих геномов, и сейчас достаточно просто идентифицировать экспонированные на поверхности антигены, специфичные В- и Т-клеточные эпитопы и т.д. Отсутствует необходимость обязательно выращивать организм в культуре: например, субъединичные вакцины от *Piscirickettsia salmonis*, патогена лососевых, разработана даже несмотря на то, что организм нелегко вырастить (Kuzyk *et al.*, 2001).

Субъединичные антигены можно получить как при использовании традиционных биохимических, так и рекомбинантных ДНК-технологий. Последние включают ряд прокариотных и эукариотных систем экспрессии, включая дрожжи, клетки насекомых и растений (Chichester & Yusibov, 2007), посредством ряда интегрированных или транзитных стратегий экспрессирования. Биохимические методы остаются целесообразными в тех случаях, когда экспрессирование рекомбинантов не подходит, например, в случае антигенов, требующих комплексной сборки (например, фимбрии), или когда необходимо посттрансляционное изменение. Например, *Compylobacter jejuni* – один из видов бактерий, которые гликозилируют многие поверхностные белки и, как таковые, лучше всего продуцируются в *C. Jejuni*, а не в гетерологичных системах экспрессирования, несмотря на то, что для выполнения тех же функций разработаны штаммы *Escherihia coli* (Wacker *et al.*, 2002). Отличным примером субъединичной вакцины, состоящей из аутентичного антигена, который сохранил трехмерную структуру, является оригинальная вакцина *E.coli* K99 против дизентерии телят, которая была протестирована три десятилетия назад (Acres *et al.*, 1979). Данный продукт был основан на антигене фимбрий K99, который можно легко экстрагировать из клеток посредством термообработки, таким образом сохраняя трехмерную структуру фимбрий. Другой пример включает вакцину на основе бакуловирусной системы экспрессии против цирковируса свиней типа 2 (Fchinger *et al.*, 2008). В ряде случаев экспрессированный белок субъединичной вакцины спонтанно собирается в хорошо различимые частицы, которые могут напоминать собой вирусные частицы. Эти вирус-подобные частицы (VLP) – это подкласс субъединичных вакцин (Roy & Noad, 2008), и их применение при разработке вакцин рассмотрено в разделе F. Вакцины, содержащие белок ORF 2 PCV-2, экспрессированный в бакуловирусе, выпущены в торговый оборот.

Субъединичные вакцины могли бы иметь некоторые преимущества над другими аттенуированными и инактивированными вакцинами, включая способность вызывать

сильный гуморальный или клеточно-опосредованный иммунный ответ. Более того, эти вакцины имеют отличные характеристики безопасности, и их можно использовать в сочетании с другими субъединичными вакцинами. Однако эффективность зависит от защитного иммунитета, индуцированного при введении одного или ряда определенных рекомбинантных белков. Опыт показал, что на это может повлиять используемая система экспрессирования генов. Кроме того, субъединичные вакцины могут быть дорогими в производстве из-за некоторых гликопротеинов, и может потребоваться использование адъювантов для усиления иммунных ответов.

Одно из самых значительных достижений субъединичных вакцин заключается в том, что они обычно совместимы со стратегиями DIVA, если антиген не используется в качестве маркера. В случае герпесвируса КРС гликопротеин gD успешно используется в составе субъединичных вакцин. Несмотря на то, что иммунизация gD оказалась эффективной на уровне отдельных животных (Harland *et al.*, 1992; van Dunen Little-van den Hurk *et al.*, 1994), она не снизила превалентность вируса в полевых условиях, таким образом, ограничив ее использование. Субъединичные вакцины против ряда других респираторных и кишечных вирусов, включая вирус вирусной диареи КРС, респираторно-синцитиальный вирус КРС, Р13, ротавирус и коронавирусы успешно протестированы, хотя ни один из них не используется на коммерческой основе. Бактериальные субъединицы вероятно оказались более успешными, чем их вирусные коллеги. Это вследствие экономичности выращивания как традиционных, так и рекомбинантных организмов, а также вследствие выработанного во многих случаях требования относительно иммунного ответа, смещенного в сторону Th₂. В продаже имеются рекомбинантные вакцины против респираторных патогенов, таких как *Mannheimia haemolytica* и *Actinobacillus pleuropneumoniae*, основанные на лейкотоксинах, продуцируемых этими организмами, а также на трансферрин-связывающих белках. *Actinobacillus pleuropneumoniae* является отличным примером вакцины, состоящей из субъединиц, выбранных по реактивности между серотипами, таким образом, обеспечивая широкомасштабную защиту от болезни. Подобным образом, в продажу выпущена вакцина против хронического атрофического ринита, содержащая нетоксичную производную дермонекротического токсина *Pasturella multocida*, продуцированного генетически модифицированным штаммом *Escherichia coli* вместе с традиционным бактерином *B. bronchiseptica*:

Вакцины против КЧС наглядно демонстрируют необходимость направлять рекомбинантную технологию на определенную цель. Традиционные, живые аттенуированные вакцины против КЧС вызывают быструю выработку иммунитета и эффективны для предотвращения передачи инфекции (Van Oirschot, 2003), но их недостатком является невозможность провести различие между инфицированными поросятами и поросятами, которые просто были вакцинированы. Коммерческие субъединичные вакцины E₂ вызывают более медленное установление иммунитета и снижают, но не предотвращают, распространение вируса. Однако они позволяют следовать стратегии DIVA, таким образом, способствуя стратегии «вакцинация для жизни». Следовательно, их использование, вероятно, будет особо полезно для ценных племенных свиней, когда вакцину можно использовать для снижения клинического воздействия болезни, одновременно позволяя идентифицировать и удалять отдельных инфицированных свиней.

Ф. ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ

Вирусоподобные частицы (VLP) – это надмолекулярные структуры, состоящие из одного и более рекомбинантных белков. Частицы образуются посредством самосборки и обычно имеют размер в диапазоне от 20 до 100 нм. В зависимости от происхождения они могут иметь либо икосаэдрическую, либо палочковидную структуру (рассмотрено Jennings & Bachmann, 2008). VLP представляют преимущество образования вакцинного антигена в виде частиц, таким образом, повышая иммуногенность вакцины. VLP можно использовать либо в качестве самой вакцины, либо в качестве носителя генетически слитых (химерных), встроенных или ковалентно связанных антигенов. В последние 20 лет VLP усиленно изучаются; в продаже имеются вакцины для человека против вируса гепатита В (Zuckerman, 2006) и вируса папилломы человека (Sranley, 2008), а также разрабатываются несколько вакцин для использования в ветеринарии. Сюда входят вакцины от вируса блютанга, рота- и парвовируса.

VLP предлагают несколько преимуществ при использовании в качестве вакцины, включая высокий профиль безопасности, подобие вирусных и бактериальных структур, возможность крупномасштабного производства и вероятность объединения VLP с другими адъювантами. Обычно, иммунизация вирусоподобными частицами вызывает быстрые и устойчивые гуморальные иммунные ответы. Подобно вирусам и бактериям многочисленные копии вакцинных антигенов отражаются в виде часто повторяющихся и упорядоченных, квазикристаллических структур (Bachmann & Zinkernagel, 1996), которые могут сшивать В-клеточный рецептор, что приводит к активации В-клетки и к последующему индуцированию Т-независимых IgM ответов (Thyagarajan *et al.*, 2003). При этом, это позволяет обеспечить взаимодействие с системой комплемента, приводящей к повышенному фагоцитозу. Более того, нерастворимая структура VLP также усиливает поглощение дендритными клетками и последующую перекрестную презентацию антигена. Lenz *et al.* (2001) показали, что перекрестная презентация нерастворимых антигенов была более эффективной, чем презентация растворимых антигенов. Однако индуцирование Т-клеточных ответов в целом все еще не настолько эффективно, чем презентация растворимых антигенов. Для исправления этой ситуации вирусоподобные частицы успешно комбинируют с молекулярными адъювантами, например, с CpG ODN и одноцепочечной РНК. Показано, что другие VLP непосредственно стимулируют дендритные клетки (DC). Например, вирусоподобный белок L1 вируса папилломы непосредственно активирует дендритные клетки.

VLP можно использовать либо в качестве самой вакцины, либо в качестве носителя рекомбинантных антигенов, или инкорпорированных, непосредственно или генетически слитых, или ковалентно связанных. Например, белок 6 ротавируса КРС (VP6) образует вирусоподобные частицы, которые высоко иммуногены и уже вызывают защиту от контрольного заражения (Redmond *et al.*, 1993). Однако при использовании VP4 и VP7 другие антигены могут ковалентно связываться с частицами VP6 и использоваться для иммунизации (Redmond *et al.*, 1993). Другие известные примеры включают VLP поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg-VLP), вируса иммунодефицита человека 1, VLP вируса денге, VLP норовируса и VLP вируса гриппа А. Примеры вирусоподобных частиц, используемых в качестве переносчиков, включают хорошо описанные VLP ядерного антигена вируса гепатита В (HBcAg VLP); [Blanchet & Sureu, 2006; Pumpens & Grens, 2001] в качестве переносчиков белка М2 вируса гриппа А (M2-HBcAg) или В- или Т-клеточных эпитопов вируса малярии (Nardin *et al.*, 2004). Поскольку

большинство применяется систематически, некоторые вакцины на основе VLP исследованы на предмет введения через слизистую.

Г. ДНК-ВАКЦИНЫ

Иммунизация ДНК представляет собой достаточно новую стратегию вакцинации, которая основана на простой концепции. ДНК-вакцины можно определить как антиген-кодирующие бактериальные плазмиды, которые могут индуцировать специфичные иммунные ответы при введении подходящему хозяину. Иммунизация проводится посредством поглощения очищенной плазмиды клетками хозяина, где они персистируют вне хромосом в ядрах. Последующее экспрессирование белка приводит к презентированию стандартно процессированных или модифицированных форм белка в иммунную систему. В хозяине нативные формы белков имеют доступ к путям презентирования посредством антигенов комплекса гистосовместимости класса I (МНС) в дополнение к презентированию в комплекс гистосовместимости класса II, что приводит к получению сбалансированного иммунного ответа. Использование чистой плазмидной ДНК предлагает множество преимуществ над другими средствами доставки вакцины. Одно из самых больших достижений – способность ДНК-вакцин индуцировать как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ, что очень важно для защиты от многих болезней. Также имеется доказательство того, что ДНК-вакцины могут индуцировать долгосрочный иммунитет, что является еще одним требованием в области эффективности вакцины. Так как сам по себе вектор не индуцирует иммунных ответов, ДНК-вакцины можно вводить повторно, не препятствуя антителам. С технической точки зрения ДНК-вакцины легко спроектировать, произвести и очистить, поэтому новые ДНК-вакцины можно сконструировать и оценить на модели животных в считанные месяцы. Безопасность ДНК-вакцин установлена в ходе различных испытаний на различных видах, включая людей (Bagarazzi *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001).

Как только началось использование ДНК-иммунизации, данная технология оказалась очень эффективной для грызунов, но изначально не действовала также хорошо на более крупных видах. Однако последние достижения привели к разработке ДНК-вакцин в ряде аутобредных целевых видов (Carvalho *et al.*, 2009; Redding & Weiner, 2009). В настоящее время зарегистрировано четыре ветеринарные ДНК-вакцины против гормона, высвобождающего гормон роста свиней в Австралии, вируса инфекционного гематопоэтического некроза лососевых в Канаде, вируса лихорадки Западного Нила для лошадей и против меланомы собак в США (Kutzler & Weiner, 2008). Для достижения более высокой эффективности для видов крупных животных требуется оптимизация на различных уровнях, включая (i) модификации вектора; (ii) конструирование белков для изменения субклеточной локализации; (iii) усовершенствование путей и методов доставки ДНК; (iv) включение адъювантов в качестве гена или совместно вводимого возбудителя и (v) антиген, направленный на антиген-презентирующие клетки (АРС). Есть вероятность того, что часто неудовлетворительная эффективность ДНК-вакцин для крупных животных вызвана неэффективной трансфекцией, а также «иммунологической умеренностью» вводимых плазмид. Показано, что использование безыгольного прибора для доставки вакцин снижает эффективную дозу экспериментальной поливалентной ДНК-вакцины от гриппа птиц, а также быстро доставляет повторную инъекцию птице (Rao *et al.*, 2009).

Н. ДОСТАВКА АНТИГЕНА И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АДЬЮВАНТЫ

Адьюванты – это вещества, которые усиливают иммунные ответы при введении совместно с антигеном. Они являются важным компонентом инактивированных (рекомбинантных и субъединичных) вакцин, которые зачастую недостаточно иммуногены. Адьюванты можно классифицировать по двум обширным категориям на основании их предполагаемого механизма действия: i) системы доставки, и ii) иммуностимулирующие адьюванты. Системы доставки включают многие традиционные адьюванты и многочисленные дисперсионные адьюванты и будут отдельно обсуждены ниже.

Несмотря на значение адьювантов в вакцинах, их механизмы действия остаются плохо понятыми. Последние достижения в изучении врожденного иммунитета обеспечили важные ключи к разгадке молекулярных механизмов действия иммуностимулирующих адьювантов. В этой связи иммунные клетки экспрессируют ряд рецепторов, совместно называемых образраспознающие рецепторы (ОРР), которые обширно распознают консервативные микробные компоненты, которые называются патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (ПАМП). Описан ряд ОРР, включая toll-подобные рецепторы (ТТР): например, ТТР 9 распознает бактериальный CpG-мотив нуклеиновой кислоты, естественные агонисты ТТР7/8, одноцепочечные вирусные РНК (оригонуклеотиды, ORN) в большой степени активируют врожденный иммунный ответ у мышей, людей и являются особенно сильнодействующими для больших животных; агонист ТТР4, например, липолисахарид (ЛПС), который известен своими мощными иммуностимулирующими и адьювантными свойствами, но, к сожалению, эта молекула высоко токсична; нуклеотид-связывающий домен олигомеризации (NOD)-подобный рецептор (NLL), индуцируемый ретиноевой кислотой ген (RIG)-подобный рецептор (RLL) и С-типа рецепторы лектина, все из которых выявляют микробные компоненты. Привлечение этих рецепторов их агонистами приводит к образованию каскада молекулярных и клеточных явлений, что приводит к активации врожденного иммунитета, который управляет антиген-специфичным приобретенным иммунитетом. Из этих рецепторов ТТР-агонисты используются наиболее широко и являются наиболее перспективными в качестве адьювантов. Интересен тот факт, что живая аттенуированная вакцина против желтой лихорадки 17D (YF-17D), одна из наиболее успешных имеющихся вакцин, активирует ТТР2, 7, 8 и 9 (Querec *et al.*, 2006), что позволяет предположить, что успех, как минимум, некоторых живых вакцин может быть результатом их способности активировать ТТР. Это вызвало большой интерес к ТТР в качестве адьювантов.

Существующая парадигма отрасли производства ветеринарных вакцин – «один адьювант – одна вакцина» - частично обусловлена затратами, связанными с включением более, чем одного адьюванта в вакцину; однако это может сильно ограничить эффективность потенциально безопасных вакцинных кандидатов и может объяснить, по крайней мере частично, почему некоторые вакцины или адьюванты достигли оптимальной эффективности только частично. Медленно накапливаются доказательства того, что многочисленные адьюванты предлагают больше, чем может быть достигнуто одним адьювантом. Например, несмотря на то, что CpG ODN являются хорошими адьювантами, они могут обладать еще большей адьювантной активностью, если объединены или вводятся совместно с другими соединениями, например, частицами, минеральными солями, сапонидами, липосомами, катионными пептидами, полисахаридами и

бактериальными токсинами, а также синтетическими полимерами, полифосфазенами (Wack *et al.*, 2008).

Адьювантный эффект микрочастиц известен в течение некоторого времени и ранее рассматривался (Mutwiri *et al.*, 2005). Считается, что определенные системы доставки способствуют улавливанию и удерживанию антигенов в локальных лимфоузлах. Кроме того, микрочастицы способствуют презентированию антигена APC как по пути ограниченного процессинга МНС класса I и МНС класса II, так и по пути презентирования. Одно из основных достижений микрочастиц при целевой доставке антигена заключается в том, что они могут быть гибкой платформой доставки, которую можно использовать для доставки, как антигенов, так и иммуностимулирующих молекул.

Другая потенциальная система доставки антигенов включает полифосфазены, класс синтетических полимеров, состоящих из каркаса с чередующимися атомами фосфора и азота и органических боковых групп, прикрепленных к каждому атому фосфора (Mutwiri *et al.*, 2007). Комплекс с иммуностимулирующими свойствами (ИСКОМ), который является небольшой 40 нм наночастицей, состоящей из сапонина (адьювант), липидов и антигенов, описан в качестве системы доставки антигена, т.к. он обладает не только адьювантной активностью, но также имеет способность нацеливаться на APC (Morein *et al.*, 2004). Коммерческая вакцина на основе ИСКОМ против гриппа лошадей зарегистрирована много лет назад (Heldens *et al.*, 2009).

I. ДОСТАВКА ВАКЦИНЫ

Доставка вакцины включает разнообразный ряд подходов, имеющих целью обеспечение вакцинами для массовой вакцинации во время вспышек, а также доставку вакцин диким животным. Оральные вакцины, используемые при вакцинации диких животных против бешенства, например, лис, были изначально основаны на аттенуированных вакцинных вирусах против бешенства, таких как штамм ERA, но озабоченность тем, что эти вакцины изредка могли вызывать бешенство (Fehler-Gardiner *et al.*, 2008) в основном привела к их замене. В Канаде живые вакцины против бешенства с аденовирусом в качестве вектора и с хорошими показателями безопасности (Knowles *et al.*, 2009) в настоящее время используются в компаниях по вакцинации против бешенства, направленных на контроль бешенства среди скунсов и енотов (Rosatte *et al.*, 2009). Живая оральная вакцина на основе гликопротеина вируса коровьей оспы (V-RG) широко используется повсеместно, и предприняты попытки оптимизировать вакцинные приманки с тем, чтобы сделать их эффективными для других видов животных, включая собак (Cliquet *et al.*, 2008). Инфекция бешенства у бродячих собак и диких животных представляет серьезную проблему для людей во всем мире, и исследования для получения более безопасной, устойчивой и эффективной живой оральной вакцины против бешенства продолжаются (Faber *et al.*, 2009). Активно исследуются другие возможности для массовой вакцинации с использованием съедобных растительных вакцин, но, несмотря на биотехнологические достижения в экспрессировании растениями вакцинных антигенов, на настоящий момент не выявлены коммерческие продукты для орального применения (Rice *et al.*, 2005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ACRES S.D., ISAACSON R.E., BABIUK L.A. & KAPITANY R.A. (1979). Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.*, **25**, 121–126.
- BABU U., DALLOUL R.A., OKAMURA M., LILLEHOJ H.S., XIE H., RAYBOURNE R.B., GAINES D. & HECKERT R. (2004). Salmonella enteritidis clearance and immune responses in chickens following Salmonella vaccination and challenge. *Vet. Immunol. & Immunopathol.*, **101**, 251–257.
- BACHMANN M.F. & ZINKERNAGEL R.M. (1996). The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol. Today*, **17**, 553–558.
- BAGARAZZI M.L., BOYER J.D., UGEN K.E., JAVADIAN M.A., CHATTERGOON M., SHAH A., BENNETT M., CICCARELLI R., CARRANO R., CONEY L. & WEINER D.B. (1998). Safety and immunogenicity of HIV-1 DNA constructs in chimpanzees. *Vaccine*, **16**, 1836–1841.
- BLANCHET M. & SUREAU C. (2006). Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J. Virol.*, **80**, 11935–11945.
- BOYCE M., CELMA C.C. & ROY. P. (2008). Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J. Virol.*, **82** (17), 8339–8348.
- CARVALHO J.A., PRAZERES D.M. & MONTEIRO GA. (2009). Bringing DNA vaccines closer to commercial use. *IDrugs*, **12** (10), 642–647.
- CHICHESTER J.A. & YUSIBOV V. (2007). Plants as alternative systems for production of vaccines. *Hum. Vaccin.*, **3** (4), 146–148.
- CLIQUET et al., (2008). Efficacy and bait acceptance of vaccinia vectored rabies glycoprotein vaccine in captive foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and dogs (*Canis familiaris*). *Vaccine*, **26**, 4627–4638.
- COHEN J. (1993). Naked DNA points way to vaccines. *Science*, **259** (5102), 1745–1749.
- DE LIMA M., KWON B., ANSARI I.H., PATTNAIK A.K., FLORES E.F. & OSORIO F.A. (2008). Development of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes. *Vaccine*, **26**, 3594–3600.
- FABER M., DIETZSCHOLD B. & LI J. (2009). Immunogenicity and safety of recombinant rabies viruses used for oral vaccination of stray dogs and wildlife. *Zoonoses Public Health*, **56**, 262–269.
- FACHINGER V., BISCHOFF R., JEDIDIA S.B., SAALMÜLLER A. & ELBERS K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*, **26** (11), 1488–1499.
- FEHLNER-GARDINER C, NADIN-DAVIS S., ARMSTRONG J., MULDOON F., BACHMANN P. & WANDELER A. (2008). ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J. Wildl. Dis.*, **44** (1), 71–85.

- FENAUX M., OPRIESSNIG T., HALBUR P.G., ELVINGER F. & MENG X.J. (2004). A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J. Virol.*, **78**, 6297–6303.
- FERRARI M., BRACK A., ROMANELLI M.G., METTENLEITER T.C., CORRADI A., DAL MAS N., LOSIO M.N., SILINI R., PINONI C. & PRATELLI A. (2000). A study of the ability of a TKnegative and gE/gI negative pseudorabies virus (PRV) mutant inoculated by different routes to protect pigs against PRV infection. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, **47**, 753–762.
- GERDTS V., MUTWIRI G.K., TIKOO S.K. & BABIUK L.A. (2006). Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. *Vet. Res.*, **37**, 487–510.
- HARLAND R.J., POTTER A.A., VAN DRUNEN-LITTEL-VAN DEN HURK S., VAN DONKERSGOED J., PARKER M.D., ZAMB T.J. & JANZEN E.D. (1992). The effect of subunit or modified live bovine herpesvirus-1 vaccines on the efficacy of a recombinant *Pasteurella haemolytica* vaccine for the prevention of respiratory disease in feedlot calves. *Can. Vet. J.*, **33**, 734–741.
- HELDENS J.G., POWWELS H.G., DERKS C.G., VAN DE ZANDE S.M. & HOEIJMAKERS M.J. (2009). The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine*, **27** (40), 5530–5537.
- JAKOBS A.A., GOOVAERTS D., NUIJTEN P.J., THEELAN R.P., HARTFORD O.M. & FOSTER T.J. (2000). Investigation towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.*, **147**, 563–567
- JEGERLEHNER A., TISSOT A., LECHNER F., SEBBEL P., ERDMANN I., KÜNDIG T., BÄCHI T., STORNI T., JENNINGS G., PUMPENS P., RENNER W.A. & BACHMANN M.F. (2002). A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*, **20**, 3104–3112.
- JENNINGS G.T. & BACHMANN M.F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.*, **389**, 521–536.
- KIM J.J., YANG J.S., NOTTINGHAM L.K., TANG W., DANG K., MANSON K.H., WYAND M.S., WILSON D.M. & WEINER D.B. (2001). Induction of immune responses and safety profiles in rhesus macaques immunized with a DNA vaccine expressing human prostate specific antigen. *Oncogene*, **20**, 4497–4506.
- KNOWLES M.K., NADIN-DAVIS S.A., SHEEN M., ROSATTE R., MUELLER R. & BERESFORD A. (2009). Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB) in target and non-target species. *Vaccine*, **27**, 6619–6626.
- KUTZLER M.A. & WEINER D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 776–788.
- KUZYK M.A., BURIAN J., MACHANDER D., DOLHAINE D., CAMERON S., THORNTON J.C. & KAY W.W. (2001). An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine*, **19**, 2337–2344.

- LENZ P., DAY P.M., PANG Y.Y., FRYE S.A., JENSEN P.N., LOWY D.R. & SCHILLER J.T. (2001). Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J. Immunol.*, **166**, 5346–5355.
- MACLACHLAN N.J., BALASURIYA U.B., DAVIS N.L., COLLIER M., JOHNSTON R.E., FERRARO G.L. & GUTHRIE A.J. (2007). Experiences with new generation vaccines against equine viral arteritis, West Nile disease and African horse sickness. *Vaccine*, **25** (30), 5577–5582.
- MEEUSEN E.N., WALKER J., PETERS A., PASTORET P.P. & JUNGENSEN G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**, 489–510, table of contents.
- MOREIN B., HU K.F. & ABUSUGRA I. (2004). Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1367–1382.
- MUTWIRI G., BENJAMIN P, SOITA H, TOWNSEND H., YOST R., ROBERTS B., ANDRIANOV A.K. & BABIUK L.A. (2007). Poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene] (PCEP) is a potent enhancer of mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with influenza virus antigens. *Vaccine*, **25**, 1204–1213.
- MUTWIRI G., BOWERSOCK T.L. & BABIUK L.A. (2005). Microparticles for oral delivery of vaccines. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2**, 791–806.
- NARDIN E.H., OLIVEIRA G.A., CALVO-CALLE J.M., WETZEL K., MAIER C., BIRKETT A.J., SARPOTDAR P., CORADO M.L., THORNTON G.B. & SCHMIDT A. (2004). Phase I testing of a malaria vaccine composed of hepatitis B virus core particles expressing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite epitopes. *Infect. Immun.*, **72**, 6519–6527.
- PASTORET P.P., BROCHIER B., LANGUET B., THOMAS I., PAQUOT A., BAUDUIN B., KIENY M.P., LECOCQ J.P., DE BRUYN J., COSTY F., ET AL. (1988): First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *Vet. Rec.*, **123**, 481–483.
- PUMPENS P. & GRENS E. (2001). HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*, **44**, 98–114.
- QUEREC T., BENNOUNA S., ALKAN S., LAOUAR Y., GORDEN K., FLAVELL R., AKIRA S., AHMED R. & PULENDRAN B. (2006). Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.*, **203**, 413–424.
- RAO S.S., STYLES D., KONG W., ANDREWS C., GORRES J.P. & NABEL G.J. (2009). A gene-based avian influenza vaccine in poultry. *Poult. Sci.*, **88**, 860–866.
- REDDING L. & WEINER D.B. (2009). DNA vaccines in veterinary use. *Exp. Rev. Vaccines*, **8** (9), 1251–1276.
- REDMOND M.J., IJAZ M.K., PARKER M.D., SABARA M.I., DENT D., GIBBONS E. & BABIUK L.A. (1993). Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine*, **11**, 273–281.
- REIMANN I., DEPNER K., TRAPP S. & BEER M. (2004). An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, **322**, 143–157.

- RHODES G.H., ABAI A.M., MARGALITH M., KUWAHARA-RUNDELL A., MORROW J., PARKER S.E. & DWARKI V.J. (1994). Characterization of humoral immunity after DNA injection. *Dev. Biol. Stand.*, **82**, 229–236.
- RICE J., AINLEY W.M. & SHEWEN P. (2005). Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. *Animal Health Res. Rev.*, **6** (2), 199–209.
- RODRIGUEZ L.L. & GRUBMAN M.J. (2009). Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, **27**, Suppl 4: D90-4.
- ROSATTE R.C., DONOVAN D., DAVIES J.C., ALLAN M., BACHMANN P., STEVENSON B., SOBEY K., BROWN L., SILVER A., BENNETT K., BUCHANAN T., BRUCE L., GIBSON M., BERESFORD A., BEATH A., FEHLNER-GARDINER C. & LAWSON K. (2009). Aerial distribution of ONRAB baits as a tactic to control rabies in raccoons and striped skunks in Ontario, Canada. *J. Wildl. Dis.*, **45** (2), 363–374.
- ROY P. & R. NOAD (2008). Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Hum. Vaccin.*, **4** (1), 5–12.
- SOLA I., ALONSO S., ZÚÑIGA S., BALASCH M., PLANA-DURÁN J. & ENJUANES L. (2003). Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J. Virol.*, **77**, 4357–4369.
- STANLEY M. (2008). HPV vaccines: are they the answer? *Br. Med. Bull.*, **88** (1), 59–74.
- SWAYNE D.E. (2008). Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **32** (4), 351–363.
- TANIGUCHI T. (1978). Site-directed mutagenesis on bacteriophage Qbeta RNA (author's transl). *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **23**, 159–169.
- THYAGARAJAN R., ARUNKUMAR N. & SONG W. (2003). Polyvalent antigens stabilize B cell antigen receptor surface signaling microdomains. *J. Immunol.*, **170**, 6099–6106.
- ULMER J.B., DONNELLY J.J., DECK R.R., DEWITT C.M. & LIU M.A. (1995). Immunization against viral proteins with naked DNA. *Ann. NY Acad. Sci.*, **772**, 117–125.
- ULMER J.B., DONNELLY J.J., PARKER S.E., RHODES G.H., FELGNER P.L., DWARKI V.J., GROMKOWSKI S.H., DECK R.R., DEWITT C.M., FRIEDMAN A., ET AL. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, **259** (5102), 1691–1692.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VAN DONKERSGOED J., KOWALSKI J., VAN DEN HURK J.V., HARLAND R., BABIUK L.A. & ZAMB T.J. (1994). A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine*, **12**, 1295–1302.
- VAN GENNIP H.G., VAN RIJN P.A., WIDJOJOATMODJO M.N., DE SMIT A.J. & MOORMANN R.J. (2000). Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E(RNS) or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. *Vaccine*, **19**, 447–459.
- VAN OIRSCHOT J.T. (2003). Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet. Microbiol.*, **96**, 367–384.

VAN OIRSCHOT J., KAASHOEK T.M.J. & RIJSEWIJK F.A. (1996). Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet. Microbiol.*, **53**, 43–54.

WACK A., BAUDNER B.C., HILBERT A.K., MANINI I., NUTI S., TAVARINI S., SCHEFFCZIK H., UGOZZOLI M., SINGH M., KAZZAZ J., MONTOMOLI E., DEL GIUDICE G., RAPPUOLI R. & O'HAGAN D.T. (2008). Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*, **26**, 552–561.

WACKER M., LINTON D., HITCHEN P.G., NITA-LAZAR M., HASLAM S.M., NORTH S.J., PANICO M., MORRIS H.R., DELL A., WREN B.W. & AEBI M. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, **298**, 1790–1793.

WIDMAN D.G., FROLOV I. & MASON P.W. (2008). Third-generation flavivirus vaccines based on single-cycle, encapsidation-defective viruses. *Adv. Virus Res.*, **72**, 77–126.

ZUCKERMAN J.N. (2006). Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **19** (5), 456–459.

*

* *