

УДК 619:616.988.27:636.4

Научная статья

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-383-6-39-43

А.Г. Галеева<sup>1, 2</sup> ✉М.А. Ефимова<sup>1, 2</sup>Г.С. Фролов<sup>1</sup>Д.А. Зубринкин<sup>1</sup>А.Г. Хисамутдинов<sup>3</sup>Л.Н. Гарипов<sup>4</sup>Д.Н. Мингалеев<sup>1, 2</sup>Р.Х. Равилов<sup>1</sup><sup>1</sup> Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, Казань, Россия<sup>2</sup> Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, Россия<sup>3</sup> Главное управление ветеринарии Кабинета министров Республики Татарстан, Казань, Россия<sup>4</sup> Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Татарстан, Казань, Россия

✉ antonina-95@yandex.ru

Поступила в редакцию:  
07.03.2024Одобрена после рецензирования:  
15.05.2024Принята к публикации:  
30.05.2024

Research article

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-383-6-39-43

Antonina G. Galeeva<sup>1, 2</sup> ✉Marina A. Efimova<sup>1, 2</sup>Gennady S. Frolov<sup>1</sup>Danil A. Zubrinkin<sup>1</sup>Almaz G. Hisamutdinov<sup>3</sup>Lenar N. Garipov<sup>4</sup>Danil N. Mingaleev<sup>1, 2</sup>Rustam Kh. Ravilov<sup>1</sup><sup>1</sup> Kazan state academy of veterinary medicine named after N.E. Bauman, Kazan, Russia<sup>2</sup> Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia<sup>3</sup> Main Directorate of Veterinary, Cabinet of Ministers of Republic of Tatarstan, Kazan, Russia<sup>4</sup> Ministry of Agriculture and Food of Republic of Tatarstan, Kazan, Russia

✉ antonina-95@yandex.ru

Received by the editorial office:  
07.03.2024Accepted in revised:  
15.05.2024Accepted for publication:  
30.05.2024

# Функциональная оценка *in vivo* рекомбинантных аденоассоциированных вирусов, несущих гены протективно значимых антигенов вируса африканской чумы свиней

## РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Африканская чума свиней (АЧС) — вирусное геморрагическое заболевание с исключительно высокой летальностью представителей семейства *Suidae*, влекущее за собой серьезные экономические последствия, связанные с производственными потерями, торговыми ограничениями и реализацией программ эрадикации. По сей день эффективная коммерческая вакцина против АЧС не разработана. Особый интерес в конструировании кандидатных вакцин представляют вирусные векторы, в частности аденоассоциированный вирус 2-го серотипа (AAV2), успешно зарекомендовавший себя в качестве генотерапевтического средства. Ранее авторами сообщалось о способности rAAV2 эффективно доставлять гены вируса АЧС B646L, E183L, CP530R, CP204L в клетки свиней *in vitro*.

**Цель исследования** — оценка функциональности *in vivo* аденоассоциированных вирусов 2-го серотипа, несущих гены протективно значимых антигенов вируса африканской чумы свиней.

**Методы.** Путем клонирования попарно объединенных генов B646L-CP530R, E183L-CP204L в вектор rAAV-MCS были созданы бицистронные конструкции с самощепляющимся пептидом P2A. Сборка rAAV2 осуществлялась путем кальций-фосфатной трансфекции клеток AAV293. После очистки в градиенте плотности йодиксанола rAAV2 вводили свиньям в дозе  $3 \times 10^{11}$  вирусных частиц и оценивали показатели гуморального и клеточного иммунитета в течение 180 дней. Динамику антителогенеза оценивали в непрямом ИФА, иммунофенотипирование Т-лимфоцитов периферической крови — методом проточной цитометрии.

**Результаты.** Установлено, что разработанные бицистронные конструкции на основе rAAV2 безопасны и легко переносимы животными и вызывают индукцию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа: наблюдалось образование вирусспецифических антител, сохранившихся до конца эксперимента, а также повышенная экспрессия CD8+ и CD4+ лимфоцитов. Предлагаемая AAV-платформа является перспективным инструментом для создания вакцины, однако комплексная характеристика rAAV2 может быть составлена только после оценки их протективного эффекта.

**Ключевые слова:** африканская чума свиней, аденоассоциированные вирусы, вирусный вектор, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет

**Для цитирования:** Галеева А.Г. и др. Функциональная оценка *in vivo* рекомбинантных аденоассоциированных вирусов, несущих гены протективно значимых антигенов вируса африканской чумы свиней. *Аграрная наука*. 2024; 383(6): 39–43.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-383-6-39-43>

© Галеева А.Г., Ефимова М.А., Фролов Г.С., Зубринкин Д.А., Хисамутдинов А.Г., Гарипов Л.Н., Мингалеев Д.Н., Равилов Р.Х.

## *In vivo* functional assessment of recombinant adeno-associated viruses carrying genes of protectively significant antigens of the African swine fever virus

### ABSTRACT

**Relevance.** African swine fever (ASF) is a viral hemorrhagic disease with exceptionally high mortality in members of the family *Suidae*, with serious economic consequences associated with production losses, trade restrictions and eradication programs. To date, no effective commercial vaccine against ASF has been developed. Of particular interest in the design of candidate vaccines are viral vectors, in particular the adenoassociated virus of the 2nd serotype (AAV2), which has successfully proven itself as a gene therapy agent. We previously reported the ability of rAAV2 to effectively deliver ASF virus genes B646L, E183L, CP530R, CP204L into porcine cells *in vitro*.

**The aim of the study** was to evaluate the *in vivo* functionality of adenoassociated viruses of the 2nd serotype carrying genes of protectively significant antigens of the African swine fever virus.

**Methods.** By cloning pairwise combined genes *B646L-CP530R*, *E183L-CP204L* into the pAAV-MCS vector, bicistronic constructs with the self-cleaving P2A peptide were created. Assembly of rAAV2 was accomplished by calcium phosphate transfection of AAV293 cells. After iodixanol density gradient purification, rAAV2 was administered to pigs at a dose of  $3 \times 10^{11}$  viral particles and humoral and cellular immunity was assessed for 180 days. The dynamics of antibody genesis were assessed by indirect ELISA, and immunophenotyping of peripheral blood T-lymphocytes was assessed by flow cytometry.

**Results.** It was found that the developed bicistronic constructs based on rAAV2 are safe and easily tolerated by animals and cause the induction of both humoral and cellular immune responses: the formation of virus-specific antibodies was observed, which persisted until the end of the experiment, as well as increased expression of CD8+ and CD4+ lymphocytes. The AAV platform we propose is a promising tool for creating a vaccine, however, a comprehensive characterization of rAAV2 can only be compiled after assessing its protective effect.

**Key words:** african swine fever, adeno-associated virus, viral vector, humoral immunity, cellular immunity

**For citation:** Galeeva A.G. *et al.* *In vivo* functional assessment of recombinant adeno-associated viruses carrying genes of protectively significant antigens of the African swine fever virus. *Agrarian science*. 2024; 383(6): 39–43 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-383-6-39-43>

© Galeeva A.G., Efimova M.A., Frolov G.S., Zubrinkin D.A., Hisamutdinov A.G., Garipov L.N., Mingaleev D.N., Ravilov R.Kh.

## Введение/Introduction

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусное геморрагическое заболевание с исключительно высокой летальностью представителей семейства *Suidae* (преимущественно домашних свиней и диких кабанов). Несмотря на ограниченный круг хозяев и отсутствие зоонозного потенциала, социально-экономическое воздействие данного заболевания очень велико [1]. АЧС является заболеванием, подотчетным Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ)<sup>1</sup>, так как влечет за собой серьезные экономические последствия, связанные с производственными потерями, торговыми ограничениями и реализацией программ эрадикации [2]. Несмотря на то что исследования в области изыскания вакцины против АЧС ведутся с 1920-х гг. [3], все существующие на сегодняшний день экспериментальные вакцины, включая живые аттенуированные вакцины, субъединичные вакцины, ДНК-вакцины и вирус-векторные вакцины, не обеспечивали достаточного протективного эффекта [4, 5]. Критическим фактором, препятствующим разработке эффективных и безопасных вакцин против АЧС, является отсутствие достаточных данных о патогенезе вируса, а также глубокого понимания стратегий уклонения вируса от врожденного иммунитета. Таким образом, несмотря на многообразие предложенных подходов к разработке вакцины против АЧС, многообещающих вакцин-кандидатов по-прежнему недостаточно [6].

Особый интерес в конструировании кандидатных вакцин представляют вирусные векторы. В подобных вакцинах геном вирусной частицы содержит один или несколько иммунодоминантных генов целевого вируса, которые могут ингибировать его репликацию [7]. Кроме того, вирус-векторные вакцины позволяют осуществлять дифференциацию инфицированных и вакцинированных животных (серологический подход DIVA) за счет использования иммуногена, кодируемого вирусным вектором, в качестве вакцинного маркера [4]. Имеются сведения об исследованиях функциональности различных вирусных инструментов для доставки генов вируса АЧС [8], одним из которых, на взгляд авторов, является аденоассоциированный вирус (AAV), успешно зарекомендовавший себя в качестве генотерапевтического средства в гуманной медицине [9]. AAV, принадлежащие к роду *Dependovirus* семейства *Parvoviridae*, содержат одноцепочечную ДНК с инвертированным терминальным повтором (ITR) и белковый капсид [10]. К основным преимуществам AAV относятся способность трансдуцировать делящиеся и неделящиеся клетки, низкая иммуногенность и долговременная экспрессия трансгена *in vivo* [11]. Ранее сообщалось о способности генетических конструкций на основе AAV2 серотипа и генов вируса АЧС B646L, E183L, CP204L, CP530R эффективно трансдуцировать клетки свиней *in vitro* [12, 13].

Цель данного исследования — функциональная оценка *in vivo* аденоассоциированных вирусов 2-го серотипа, несущих гены протективно значимых антигенов вируса африканской чумы свиней.

## Материалы и методы исследования / Materials and methods

Исследования проведены в межфакультетской лаборатории биотехнологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ» (г. Казань, Россия) в 2023 г.

**Генетические конструкции.** Последовательности генов B646L, CP204L, E183L, CP530R, кодирующих целевые белки p72, p30, p54, pp62 соответственно, были *in silico* оптимизированы по кодонам, при этом в качестве оптимальных кодонов использовали наиболее часто встречающиеся кодоны организма-реципиента — свиньи). Синтезированные на аутсорсинге (ЗАО «Евроген») гены, содержащие трансген и его регуляторные элементы, фланкированные инвертированными концевыми повторами (ITR), клонировали в плазмиду pAAV-MCS (Stratagene, США). Для создания бицистронных конструкций были попарно объединены гены E183L и CP204L, так как белки p54 и p30 задействованы в процессе интернализации вируса АЧС в клетку, и B646L и CP530R, так как белки p72 и pp62 являются доминирующими структурными вирусными белками и, как следствия, мишенями для серологической диагностики. Целевые фрагменты в бицистронных конструкциях были разделены линкером P2A.

Общую структуру вставки можно представить как CMV-ген1-P2A-ген2-stop-polyA. Бицистронные вставки были клонированы в вектор по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI, правильность последовательных этапов клонирования подтверждали секвенированием. Целевые моно- и бицистронные конструкции, а также оболочечную (pAAV-RepCap2) и упаковочную (pHelper) плазмиды (Stratagene, США), необходимые для сборки вирусного капсида, нарабатывали в клетках *E. Coli* DH5 $\alpha$ , трансформированных методом теплового шока, с селекцией по ампициллину. Плазмидную ДНК выделяли при помощи коммерческого набора MidiPrep (ЗАО «Евроген»), эффективность очистки подтверждали электрофоретически.

**Сборка rAAV2.** Для сборки рекомбинантных AAV2 (rAAV2) использовали клеточную линию AAV293 — производную линии эмбриональных клеток почек человека HEK293, стабильно экспрессирующую ген E1 аденовируса. Клетки AAV293 культивировали в культуральных блюдах (10 см<sup>2</sup>) на среде DMEM с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки, L-глутамина и пенициллина-стрептомицина до 70% плотности монослоя, после чего осуществляли кальций-фосфатную котрансфекцию тремя плазмидами (с геном интереса, оболочечной и упаковочной) из расчета по 10 мкг каждой на одно блюдо. Через 6 ч. инкубации при +37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> среду в блюдах заменяли на поддерживающую и инкубировали до 72 ч. Дополнительно осуществляли сборку rAAV2, содержащих ген дальнекрасного белка TurboFP635 для флуоресцентного контроля трансдукции клеток восприимчивых животных на следующих этапах исследования. По истечении срока инкубации среду собирали, клетки снимали механически и подвергали трехкратному криолизу при -80 °C с последующим переосаждением. В полученных образцах определяли титр rAAV2: образцы обрабатывали бензоназой (Benzonase Nuclease) из расчета 50 ед/мл и инкубировали при +37 °C в течение 30 мин. для избавления от неинкапсидированной ДНК, далее образцы инкубировали при +95 °C в течение 10 мин. для инактивации бензоназы и разрушения вирусных капсидов, после чего проводили количественную ПЦР-РВ с использованием праймеров и зонда на ITR, а также специфических праймеров, фланкирующих локусы целевых генов [13]; референсом служила плаزمид, содержащая локус ITR, в разведениях 10<sup>2</sup>–10<sup>8</sup>. Дополнительно наличие rAAV2 в

<sup>1</sup> WOHAN: African swine fever. <https://www.woah.org/en/disease/african-swine-fever/>

образцах контролировалось белковым электрофорезом в 12,5%-ном полиакриламидном геле, при этом визуализировался мажорный капсидный белок VP3 с молекулярной массой 62 кДа.

**Эксперименты на животных.** В эксперименте использовали клинически здоровых свиней крупной белой породы обоего пола в возрасте 3 месяцев ( $n = 6$ ) массой 35–40 кг, закупленных в эпизоотически благополучном хозяйстве Республики Татарстан. Эксперименты с участием животных проводились в соответствии с протоколом «Руководство по уходу и использованию лабораторных животных» и были одобрены локальным этическим комитетом (решение ЛЭК № 12/2022). Свиньи содержались в изолированных боксах в условиях вивария ФГБОУ «Казанская ГАВМ» и на протяжении эксперимента имели свободный доступ к корму и воде. Свиней опытной группы ( $n = 3$ ) иммунизировали внутримышечно в трапециевидную мышцу шеи материалом, содержащим коктейль бицистронных конструкций на основе gAAV2 ( $3 \times 10^{11}$  вирусных частиц), предварительно очищенных в градиенте плотности йодиксанола и ресуспендированных в конечном объеме 2 см<sup>3</sup> фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (прайм-иммунизация); буст-иммунизацию проводили через 30 суток. Свиньям контрольной группы ( $n = 3$ ) инъектировали ФСБ в эквивалентном объеме. Температуру тела свиней измеряли ректально ежедневно в течение 14 суток, отслеживая местные и системные реакции на введение лабораторного образца вакцины. Образцы крови у свиней брали из задней ушной вены на 0, 15, 30, 45, 60, 90 и 180-е сутки после введения gAAV2.

**Индикация вирусспецифических антител.** Образцы сыворотки крови тестировали в трех повторностях с использованием набора ID Screen<sup>®</sup> African Swine Fever Indirect (Ingenasa, Испания). Согласно инструкциям производителя, статус каждой тестируемой сыворотки выражали с помощью коэффициента ингибирования ( $K_{инг}$ ) (x%).

**Иммунофенотипирование субпопуляций лимфоцитов периферической крови.** Для дальнейшего изучения типов реактивных лимфоцитов методом проточной цитометрии определяли процентное содержание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови иммунизированных свиней на 30, 60 и 90-й день после иммунизации. Клеточную суспензию метили моноклональными антителами FITC (Bio-Rad, США) и соответствующими изотипическими контролями. Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов проводили с помощью цитометра FACS Canto II (Facs Calibur, BD, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva 7.0.

**Статистический анализ.** Обработку первичных данных и статистические тесты проводили с использованием пакетов программ MS Excel и Statistica 6.0 (StatSoft, США).

## Результаты и обсуждение / Results and discussion

Известно, что первоначальные исследования в области применения AAV для разработки вакцин проводились именно с применением AAV2 серотипа, которые, несмотря на низкую эффективность трансдукции относительно других серотипов, были способны к индукции наиболее мощных иммунных ответов [14]. Выбор пути введения генетической конструкции на основе AAV2 был продиктован доказанной способностью последнего к наиболее эффективной экспрессии трансгена после однократного внутримышечного введения. AAV2 являются наиболее безопасными используемыми вирусными

векторами, однако уровни гуморального и клеточного иммунного ответа, вызываемые разными дозами, у разных видов животных остаются дискуссионными [15]. Учитывая это, был рассмотрен критерий безопасности кандидатной вакцины на основе бицистронных gAAV2, несущих гены B646L, E183L, CP204L, CP530R.

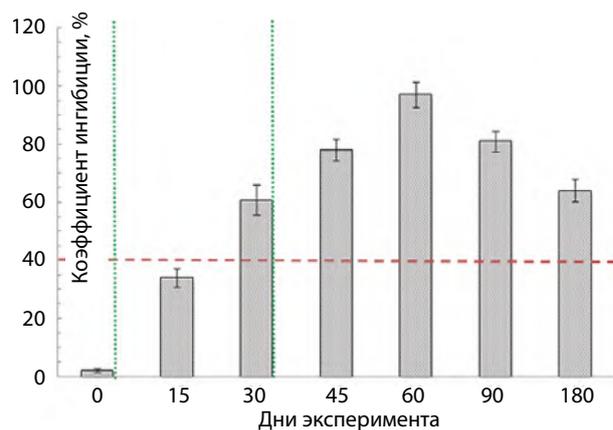
В результате исследований было установлено, что состояние животных опытной группы оставалось удовлетворительным как после прайм-, так и после бустерной иммунизации, признаков системных либо местных реакций на введение gAAV2 зафиксировано не было. Показатели температуры тела незначительно повышались на 1–2-е сутки после введения первой дозы gAAV2 и составили в среднем ( $39,9 \pm 0,3$ ) °C против ( $39,1 \pm 0,1$ ) °C в контрольной группе, однако ни у одного животного показатели не превысили фебрильный порог ( $40,5$  °C) и до конца срока наблюдений статистически не отличались от показателей контрольной группы. Умеренная гипертермия может быть связана с кратковременной провоспалительной реакцией организма на вирусные капсиды [16].

Было доказано, что животные опытной группы отвечали на введение gAAV2 образованием вирусспецифических антител. Через 15 суток после прайм-иммунизации образцы сывороток свиней имели статус сомнительных —  $K_{инг}$  ( $37,8 \pm 3,4$ )%, однако к 30-м суткам все животные были серопозитивными —  $K_{инг}$  ( $60,8 \pm 5,1$ )%. Повышение уровня антител после бустерной иммунизации наблюдалось вплоть до 60-х суток эксперимента ( $K_{инг}$  ( $95,1 \pm 4,2$ )%) и несколько снижалось к 180-м суткам —  $K_{инг}$  ( $79,2 \pm 3,2$ )% (рис. 1).

На следующем этапе исследования оценивалось влияние кандидатной вакцины на функциональный ответ Т-лимфоцитов (в частности, во внимание брались такие критерии, как распределение субпопуляций CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> клеток). Достоверное повышение уровней маркерных показателей наблюдалось у всех опытных животных, при этом наиболее интенсивная экспрессия наблюдалась относительно CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Так, после бустерной иммунизации их количество увеличилось на ( $61,6 \pm 7,1$ )% от первоначального уровня. Несколько меньшее влияние исследуемые конструкции оказывали на субпопуляцию CD4<sup>+</sup>, количество клеток в которой увеличилось на ( $23,1 \pm 4,5$ )% от первоначального уровня.

**Рис. 1.** Динамика уровня вирусспецифических антител у животных после иммунизации gAAV2. Данные представлены в виде групповых значений. Красной пунктирной линией отмечен порог серопозитивности, зелеными линиями — дни иммунизации

**Fig. 1.** Evolution of virus-specific antibodies level in animals after gAAV2 immunization. Data are presented as group values. The threshold of seropositivity is marked with a red dotted line, and the days of immunization are marked with green lines



Таким образом, было показано, что вводимые gAAV2 обеспечивают стимуляцию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. На сегодняшний день существуют веские доказательства роли обоих звеньев адаптивного ответа в протекции от вируса АЧС [17], чем и обусловлены современные подходы к дизайну рекомбинантных вакцин [7].

В данном исследовании было установлено, что наибольшая концентрация антител (коэффициент ингибиции — 95–97%) достигается в промежутке между 30-м и 60-м днями эксперимента при иммунизации коктейлем бицистронных конструкций в дозе  $3 \times 10^{11}$  в. ч. При этом коэкспрессия двух и более антигенов позволяет добиться снижения векторной нагрузки, что особенно важно при необходимости иммунизации пулом антигенов. Тем не менее конкретные механизмы нейтрализации вируса АЧС антителами остаются спорным вопросом, требующим выяснения [18].

При оценке уровней экспрессии отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов наибольшие изменения были зарегистрированы относительно CD8+ клеток, играющих важную роль в формировании протективного эффекта. Так, Oura *et al.* (2005 г.) в своих исследованиях показали, что свиньи, лишённые CD8+ лимфоцитов, при наличии антител не были полностью защищены от летального заражения гетерологичным штаммом вируса АЧС [19].

Следует отметить, что для AAV2 ранее была документирована индукция трансгенспецифических CD8+ Т-клеточных ответов, а также сообщалось о возможности их регулирования путем внесения изменений в структуру вирусного капсида [17]. Дополнительно было

зарегистрировано повышение уровней CD4+ клеток, что может быть обусловлено наличием соответствующих эпитопов в пептидном пуле белков р30, рр62, р72. Учитывая роль NK-клеток и Т-хелперов в защитном иммунитете, а также то, что распределение данных субпопуляций может быть суррогатным маркером при вакцинации против АЧС [20], предлагаемая AAV-платформа является многообещающим инструментом для создания вакцины.

### Выводы/Conclusions

В работе отражены данные предварительной оценки безопасности и иммуногенности бицистронных конструкций на основе AAV2 и иммунодоминантных генов вируса АЧС B646L, E183L, CP204L, CP530R. В ходе исследований было установлено, что предлагаемые конструкции безопасны, легко переносимы животными и вызывают индукцию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, однако комплексная характеристика кандидатной вакцины на основе AAV2 может быть составлена после проведения летального заражения. Детерминанты баланса между переносимостью и иммуногенностью AAV2 до конца не изучены, поэтому дальнейшая перспектива разработки темы лежит в области оптимизации механизма доставки целевых генов в клетки организма-хозяина, а также поиска дополнительных консервативных антигенов, что будет особенно актуальным при конструировании экономичной и эффективной вакцины для регионов, эндемичных по АЧС и характеризующихся высоким генетическим разнообразием циркулирующих штаммов.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные. Все авторы внесли равный вклад в работу. Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data. All authors made an equal contribution to the work. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-76-00013 «Оценка эффективности векторной системы на основе аденоассоциированного вируса для доставки генов, кодирующих иммунодоминантные белки вируса африканской чумы свиней, в клетки млекопитающих».

### FUNDING

The materials were prepared as part of the grant of Russian Science Foundation No. 22-76-00013 "Evaluation of the effectiveness of a vector system based on adeno-associated virus for the delivery of genes encoding immunodominant proteins of the African swine fever virus into mammalian cells".

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Макаров В.В. Африканская чума свиней. *Российский ветеринарный журнал*. 2018; 6: 15–19. [https://doi.org/10.32416/article\\_5c050abbcf8d70.94861250](https://doi.org/10.32416/article_5c050abbcf8d70.94861250)
2. Brown V.R., Bevins S.N. A Review of African Swine Fever and the Potential for Introduction into the United States and the Possibility of Subsequent Establishment in Feral Swine and Native Ticks. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018; 5: 11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00011>
3. Netherton C.L. *et al.* Identification and Immunogenicity of African Swine Fever Virus Antigens. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1318. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01318>
4. Gaudreault N.N., Richt J.A. Subunit Vaccine Approaches for African Swine Fever Virus. *Vaccines*. 2019; 7(2): 56. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020056>
5. Колбасов Д. Африканская чума свиней: создание вакцины актуально. *Животноводство России*. 2020; 7: 29–33. <https://doi.org/10.25701/ZZR.2020.48.46.008>
6. Chathuranga K., Lee J.-S. African Swine Fever Virus (ASFV): Immunity and Vaccine Development. *Vaccines*. 2023; 11(2): 199. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020199>
7. Zhang H., Zhao S., Zhang H., Qin Z., Shan H., Cai X. Vaccines for African swine fever: an update. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14: 1139494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1139494>
8. Raviлов R.Kh. *et al.* Viral Vector Vaccines Against ASF Problems and Prospectives. *Frontiers in Veterinary Sciences*. 2022; 9: 830244. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.830244>
9. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019; 18(5): 358–378. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
10. Pillay S. *et al.* An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature*. 2016; 530(7588): 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature16465>
11. Deyle D.R., Russell D.W. Adeno-associated virus vector integration. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 2009; 11(4): 442–447.

### REFERENCES

1. Makarov V.V. African swine fever. *Russian veterinary journal*. 2018; 6: 15–19 (in Russian). [https://doi.org/10.32416/article\\_5c050abbcf8d70.94861250](https://doi.org/10.32416/article_5c050abbcf8d70.94861250)
2. Brown V.R., Bevins S.N. A Review of African Swine Fever and the Potential for Introduction into the United States and the Possibility of Subsequent Establishment in Feral Swine and Native Ticks. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018; 5: 11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00011>
3. Netherton C.L. *et al.* Identification and Immunogenicity of African Swine Fever Virus Antigens. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1318. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01318>
4. Gaudreault N.N., Richt J.A. Subunit Vaccine Approaches for African Swine Fever Virus. *Vaccines*. 2019; 7(2): 56. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020056>
5. Kolbasov D. African swine fever: creation of vaccine is urgent. *Animal Husbandry of Russia*. 2020; 7: 29–33 (in Russian). <https://doi.org/10.25701/ZZR.2020.48.46.008>
6. Chathuranga K., Lee J.-S. African Swine Fever Virus (ASFV): Immunity and Vaccine Development. *Vaccines*. 2023; 11(2): 199. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020199>
7. Zhang H., Zhao S., Zhang H., Qin Z., Shan H., Cai X. Vaccines for African swine fever: an update. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14: 1139494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1139494>
8. Raviлов R.Kh. *et al.* Viral Vector Vaccines Against ASF Problems and Prospectives. *Frontiers in Veterinary Sciences*. 2022; 9: 830244. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.830244>
9. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019; 18(5): 358–378. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
10. Pillay S. *et al.* An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature*. 2016; 530(7588): 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature16465>
11. Deyle D.R., Russell D.W. Adeno-associated virus vector integration. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 2009; 11(4): 442–447.

12. Ефимова М.А., Галеева А.Г., Хамидуллина А.И., Равилов Р.Х. Анализ иммунодоминантных пептидов вируса африканской чумы свиней для конструирования кандидатных вакцин. *Аграрная наука*. 2023; 3: 40–45. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-368-3-40-45>
13. Ravirov R. *et al.* Efficient delivery of the immunodominant genes of African swine fever virus by adeno-associated virus serotype 2. *Veterinary World*. 2023; 16(12): 2425–2430. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.2425-2430>
14. Nieto K., Salvetti A. AAV vectors vaccines against infectious diseases. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00005>
15. Zhou X. *et al.* Comparison of mucosal immune responses to African swine fever virus antigens intranasally delivered with two different viral vectors. *Research in Veterinary Science*. 2022; 150: 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.06.025>
16. Mingozzi F., High K.A. Overcoming the Host Immune Response to Adeno-Associated Virus Gene Delivery Vectors: The Race Between Clearance, Tolerance, Neutralization, and Escape. *Annual Review in Virology*. 2017; 4(1): 511–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041936>
17. Goatley L.C. *et al.* Cellular and Humoral Immune Responses after Immunisation with Low Virulent African Swine Fever Virus in the Large White Inbred Babraham Line and Outbred Domestic Pigs. *Viruses*. 2022; 14(7): 1487. <https://doi.org/10.3390/v14071487>
18. Silva E.B. *et al.* The Presence of Virus Neutralizing Antibodies Is Highly Associated with Protection against Virulent Challenge in Domestic Pigs Immunized with ASFV live Attenuated Vaccine Candidates. *Pathogens*. 2022; 11(11): 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111311>
19. Oura C.A.L., Denyer M.S., Takamatsu H., Parkhouse R.M.E. *In vivo* depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *Journal of General Virology*. 2005; 86(9): 2445–2450. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81038-0>
20. Attreed S.E. *et al.* A Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine Elicits a Memory T Cell Response in Vaccinated Swine. *Pathogens*. 2022; 11(12): 1438. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121438>
12. Efimova M.A., Galeeva A.G., Khamidullina A.I., Ravirov R.Kh. Analysis of immunodominant African swine fever virus peptides for candidate vaccine design. *Agrarian science*. 2023; 3: 40–45 (in Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-368-3-40-45>
13. Ravirov R. *et al.* Efficient delivery of the immunodominant genes of African swine fever virus by adeno-associated virus serotype 2. *Veterinary World*. 2023; 16(12): 2425–2430. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.2425-2430>
14. Nieto K., Salvetti A. AAV vectors vaccines against infectious diseases. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00005>
15. Zhou X. *et al.* Comparison of mucosal immune responses to African swine fever virus antigens intranasally delivered with two different viral vectors. *Research in Veterinary Science*. 2022; 150: 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.06.025>
16. Mingozzi F., High K.A. Overcoming the Host Immune Response to Adeno-Associated Virus Gene Delivery Vectors: The Race Between Clearance, Tolerance, Neutralization, and Escape. *Annual Review in Virology*. 2017; 4(1): 511–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041936>
17. Goatley L.C. *et al.* Cellular and Humoral Immune Responses after Immunisation with Low Virulent African Swine Fever Virus in the Large White Inbred Babraham Line and Outbred Domestic Pigs. *Viruses*. 2022; 14(7): 1487. <https://doi.org/10.3390/v14071487>
18. Silva E.B. *et al.* The Presence of Virus Neutralizing Antibodies Is Highly Associated with Protection against Virulent Challenge in Domestic Pigs Immunized with ASFV live Attenuated Vaccine Candidates. *Pathogens*. 2022; 11(11): 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111311>
19. Oura C.A.L., Denyer M.S., Takamatsu H., Parkhouse R.M.E. *In vivo* depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *Journal of General Virology*. 2005; 86(9): 2445–2450. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81038-0>
20. Attreed S.E. *et al.* A Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine Elicits a Memory T Cell Response in Vaccinated Swine. *Pathogens*. 2022; 11(12): 1438. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121438>

## ОБ АВТОРАХ

### Антонина Глебовна Галеева<sup>1, 2</sup>

кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник<sup>1</sup>  
кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник<sup>2</sup>  
antonina-95@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>

### Марина Анатольевна Ефимова<sup>1, 2</sup>

доктор биологических наук, профессор<sup>1</sup>  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник<sup>2</sup>  
marina-2004r@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-8786-1310>

### Данил Александрович Зубринкин<sup>1</sup>

аспирант  
zubrinkin-yande2013@yandex.ru  
<https://orcid.org/0009-0007-2186-1300>

### Алмаз Габтраупович Хисамутдинов<sup>3</sup>

кандидат ветеринарных наук  
guv@tatar.ru

### Ленар Наилевич Гарипов<sup>4</sup>

заместитель министра  
Garipov.Lenar@tatar.ru

### Данил Наильевич Мингалеев<sup>1, 2</sup>

доктор ветеринарных наук, доцент<sup>1</sup>  
доктор ветеринарных наук, врио директора<sup>2</sup>  
damin80@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7217-4083>

### Рустам Хаметович Равилов<sup>1</sup>

доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент  
Академии наук Республики Татарстан  
rustam.ravirov@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7210-7470>

<sup>1</sup>Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, Сибирский тракт, 35, Казань, 420029, Россия

<sup>2</sup>Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Научный городок, 2, Казань, 420075, Россия

<sup>3</sup>Главное управление ветеринарии Кабинета министров Республики Татарстан, ул. Федосеевская, 36, Казань, 420111, Россия

<sup>4</sup>Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Татарстан, ул. Федосеевская, 36, Казань, 420111, Россия

## ABOUT THE AUTHORS

### Antonina Glebovna Galeeva<sup>1, 2</sup>

Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher<sup>1</sup>  
Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher<sup>2</sup>  
antonina-95@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>

### Marina Anatolyevna Efimova<sup>1, 2</sup>

Doctor of Biological Sciences, Professor<sup>1</sup>  
Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher<sup>2</sup>  
marina-2004r@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-8786-1310>

### Danil Aleksandrovich Zubrinkin<sup>1</sup>

Graduate Student  
zubrinkin-yande2013@yandex.ru  
<https://orcid.org/0009-0007-2186-1300>

### Almaz Gabtraupovich Hisamutdinov<sup>3</sup>

Candidate of Veterinary Sciences  
guv@tatar.ru

### Lenar Nailevich Garipov<sup>4</sup>

Deputy Minister  
Garipov.Lenar@tatar.ru

### Danil Nailevich Mingaleev<sup>1, 2</sup>

Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor<sup>1</sup>  
Doctor of Veterinary Sciences, Acting Director<sup>2</sup>  
damin80@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7217-4083>

### Rustam Khametovich Ravirov<sup>1</sup>

Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member of the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan  
rustam.ravirov@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7210-7470>

<sup>1</sup>Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, 35 Sibirsky trakt, Kazan, 420029, Russia

<sup>2</sup>Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, 2 Nauchny gorodok, Kazan, 420075, Russia

<sup>3</sup>The Main Department of Veterinary Medicine of the Cabinet of Ministers of the Republic of Tatarstan, 36 Fedoseevskaya Str., Kazan, 420111, Russia

<sup>4</sup>Ministry of Agriculture and Food of Tatarstan Republic, 36 Fedoseevskaya Str., Kazan, 420111, Russia