

РАЗРАБОТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА ОБЕЗЬЯН 25-ГО СЕРОТИПА

Т. А. Ожаровская [✉], О. Попова, О. В. Зубкова, И. В. Вавилова, А. А. Почтовый, Д. В. Щебляков, В. А. Гуцин, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

В настоящее время аденовирусные векторы широко используют в качестве вакцинных и генотерапевтических препаратов благодаря их технологичности и способности индуцировать стойкий гуморальный и клеточный иммунный ответ. Однако одни из наиболее часто используемых векторов для разработки кандидатных вакцин — рекомбинантные аденовирусы человека 5-го и 26-го серотипов (Ad5 и Ad26) становятся менее привлекательными из-за высокого процента населения с иммунитетом к данным векторам, вызванным вакцинацией «Спутником V». На сегодняшний день появляется тенденция к выбору альтернативных серотипов аденовирусов в качестве платформ для разработки вакцин против новых патогенов. Например, аденовирус обезьян 25-го серотипа (SAd25), принадлежащий к подгруппе E, генетически отдален от Ad5 и проявляет крайне низкую серопревалентность у людей, что делает его привлекательным альтернативным вакцинным вектором. Целью работы было создать и исследовать новую вакцинную платформу на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. Для конструирования и получения рекомбинантных аденовирусов использовали современные молекулярно-биологические и вирусологические методы, для филогенетического анализа применяли биоинформатические методы. Полученный рекомбинантный аденовирусный вектор способен эффективно реплицироваться в производственной культуре клеток HEK293 (клетки почки эмбриона человека). Результаты работы обосновывают целесообразность дальнейшего исследования вектора SAd25 в качестве платформы для разработки вакцин для профилактики различных инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: аденовирусный вектор, вакцинная платформа, рекомбинантный аденовирус, аденовирус обезьян 25-го серотипа

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка технологической платформы для создания рекомбинантных, в том числе живых вакцин для профилактики инфекционных болезней».

Благодарности: выражаем искреннюю благодарность научному сотруднику А. Э. Никоновой из лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» за помощь в проведении филогенетического анализа последовательностей гексонов аденовирусов, а также лаборанту-исследователю Д. Д. Кустовой за помощь в получении полногеномных последовательностей.

Вклад авторов: Т. А. Ожаровская, О. В. Зубкова, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург — концепция и план экспериментов; О. Попова, О. В. Зубкова — получение генно-инженерных конструкций и рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа; Т. А. Ожаровская, И. В. Вавилова — филогенетический анализ, вирусологические эксперименты; А. А. Почтовый — полногеномное секвенирование аденовирусов; Т. А. Ожаровская, О. В. Зубкова — подготовка и написание статьи, интерпретация результатов; Д. В. Щебляков, В. А. Гуцин — редактирование рукописи; В. А. Гуцин — руководство проектом госзадания.

Соблюдение этических стандартов: работа проведена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Андреевна Ожаровская
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098, Россия; t.ozh@yandex.ru

Статья получена: 29.12.2022 **Статья принята к печати:** 20.01.2023 **Опубликована онлайн:** 28.02.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.006

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A VECTOR SYSTEM BASED ON THE SIMIAN ADENOVIRUS TYPE 25

Ozharovskaia TA [✉], Popova O, Zubkova OV, Vavilova IV, Pochtovyi AA, Shcheblyakov DV, Gushchin VA, Logunov DYU, Gintsburg AL
Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Technological versatility and the humoral and cellular immune response induction capacity have conditioned wide spread of adenoviral vectors as vaccine and gene therapy drugs. However, vaccination with Sputnik V made a significant portion of the population immune to the types 5 and 26 (Ad5 and Ad26) recombinant human adenovirus vectors, which are some of the most frequently used bases for candidate vaccines. Today, vaccine designers tend to select alternative adenovirus serotypes as platforms to develop vaccines against new pathogens on. A good example is simian adenovirus type 25 (SAd25), which belongs to subgroup E. It is genetically distant from Ad5 and exhibits extremely low seroprevalence in human beings, which makes it an appealing alternative vaccine vector. The purpose of this work was to design and study a new vaccine platform based on simian adenovirus type 25. We relied on the advanced methods of molecular biology and virology to construct and make recombinant adenoviruses; the phylogenetic analysis in the context of this study was enabled with bioinformatic methods. The resulting recombinant adenoviral vector can effectively replicate itself in the HEK293 cell line (human embryonic kidney cells). This work substantiates the expediency of further investigation into the SAd25 vector as a platform for development of the prevention vaccines against various infectious diseases.

Keywords: adenovirus vector, vaccine platform, recombinant adenovirus, simian adenovirus type 25

Funding: the work is the result of the effort under the "Development of a recombinant vaccines platform (including live vaccines) enabling design of the infectious diseases prevention vaccines" task set by the Ministry of Health of the Russian Federation.

Acknowledgments: we express our sincere gratitude to AE Nikonova, a researcher with the Laboratory of Molecular Biotechnology of the NF Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology for her help in conducting the phylogenetic analysis of adenovirus hexon sequences, as well as to research laboratory assistant D.D. Kustova for her help in obtaining the whole genome sequences.

Author contribution: Ozharovskaia TA, Zubkova OV, Logunov DYU, Gintsburg AL — conceptualization and planning of the experimental part; Popova O, Zubkova OV — production of genetically engineered constructs and recombinant simian adenovirus type 25; Ozharovskaia TA, Vavilova IV — phylogenetic analysis, virological experiments; Pochtovyi AA — whole genome sequencing of adenoviruses; Ozharovskaia TA, Zubkova OV — article preparation and authoring, interpretation of the results; Shcheblyakov DV, Gushchin VA — manuscript editing; Gushchin VA — state assignment project management.

Compliance with ethical standards: the work was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Ozharovskaia
Gamalei, 18, Moscow, 123098, Russia; t.ozh@yandex.ru

Received: 29.12.2022 **Accepted:** 20.01.2023 **Published online:** 28.02.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.006

Рекомбинантные аденовирусные векторы (rAd) являются популярным инструментом для доставки генов в клетки млекопитающих, в частности при разработке кандидатных вакцинных препаратов [1–4]. Несмотря на то что вакцины на основе аденовирусов человека 5-го и 26-го серотипов (Ad5 и Ad26 соответственно) против болезни, вызванной вирусом Эбола, и COVID-19 показали свою эффективность [5, 6], существует необходимость в получении новых аденовирусных векторов других серотипов в качестве альтернативы имеющимся. Данная потребность обусловлена формированием у населения поствакцинального иммунитета к аденовирусным векторам, который может влиять на эффективность вакцинации. В связи с этим серотипы других аденовирусов человека, отличные от Ad5 и Ad26, а также серотипы аденовирусов обезьян могут быть использованы для облегчения разработки новых препаратов и гетерологичных схем прайм-буст иммунизации. Существует более 80 серотипов аденовирусов человека, которые по разным данным относят или к семи отдельным подгруппам (A–G), или к семи видам аденовирусов (*Human mastadenovirus A–G*) [7, 8].

Аденовирусы обезьян (SAd) тоже широко исследуют в качестве векторных вакцин. Целый ряд аденовирусных векторов на основе SAd в настоящее время изучают в качестве кандидатных вакцинных препаратов, включая аденовирусы шимпанзе (ChAd) ChAd3 [9], ChAd63 [10, 11], ChAd68 (также называемый SAd25) [12, 13], ChAd83 и ChAd155 [14, 15], а также SAd22 [16], SAd23 [16, 17], SAd24 [16, 18]. Эти векторы показали высокую иммуногенность на животных моделях, а также в клинических исследованиях кандидатных вакцин [13, 19, 20]. Кроме того, они обладают значительным биологическим сходством с аденовирусами человека и низкой перекрестной активностью сывороток с вируснейтрализующими антителами к Ad5 и Ad26 [12, 21].

Один из альтернативных серотипов, используемых в качестве платформы для терапевтического применения, — аденовирус обезьян 25-го серотипа (SAd25). Будучи членом подгруппы E, он может стать привлекательным вектором как при самостоятельном применении, так и в схеме гетерологичной иммунизации. Кроме того, вируснейтрализующие антитела к Ad2, Ad4, Ad5, Ad7 и Ad12 не обладают нейтрализующей активностью по отношению к SAd25, что делает данный вектор многообещающим кандидатом для разработки вакцинной платформы [12].

Целью данной работы было создание новой векторной платформы на основе SAd25 и исследование ее биологических и физических характеристик.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и клеточные линии

В ходе работы использовали лабораторный штамм *Escherichia coli DH5α* (New England Biolabs; США), штамм *E. coli BJ5183* (Stratagene; США) и клеточную линию HEK293 — клетки почки эмбриона человека, содержащие в геноме E1 область Ad5 («Российская коллекция клеточных линий позвоночных»; Россия). HEK293 культивировали в среде DMEM1× (минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко; HyClone, США) с добавлением 5% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота (HyClone; США) и 25 мл бикарбоната натрия 7,5% («ПанЭко»; Россия), в присутствии 146 мг L-глутамина («ПанЭко»; Россия) и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина («ПанЭко»; Россия) при 37 °C с 5% CO₂.

Секвенирование генома SAd25

Штамм вируса SAd25 дикого типа (wt-) был получен из Государственной коллекции вирусов II–IV групп патогенности института вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. Данный вирус был пассирован на клетках HEK293 и очищен методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия (CsCl). Геномную ДНК выделяли из очищенного wt-SAd25 по стандартной методике [22]. Нуклеотидную последовательность wt-SAd25 определяли с помощью полногеномного секвенирования на приборе Oxford MinION (Oxford Nanopore Technologies; Великобритания).

Конструирование рекомбинантных аденовирусных векторов

На первом этапе для создания плазмиды pArms-SAd25-EGFP левое плечо гомологии (нуклеотиды 1–537 и 3406–3801 в соответствии с геномом wt-SAd25) и правое плечо гомологии (нуклеотиды 35969–36519) амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Экспрессионная кассета, состоящая из раннего промотора цитомегаловируса (CMV-промотор), гена зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и сигнала полиаденилирования вируса SV40, располагается на месте делеции E1 (нуклеотиды 538–3405). Для дальнейшей линейаризации плазмиды pArms-SAd25-EGFP сайт SwaI был вставлен между плечами гомологии.

Для конструирования плазмиды pSAd25ΔE1-EGFP, несущей полноразмерный геном SAd25 и экспрессионную кассету с геном EGFP на месте удаленной E1 области генома, был использован метод гомологичной рекомбинации между линейаризованной плазмидой pArms-SAd25-EGFP и геномной ДНК wt-SAd25 в клетках *E. coli* штамма BJ5183. Трансформацию бактериальных клеток проводили методом электропорации в соответствии с инструкциями производителя на приборе MicroPulser (Bio-Rad, Hercules; США). Полученную плазмиду pSAd25ΔE1-EGFP анализировали с помощью ПЦР и рестрикционного картирования.

Для модификации E3 области была сконструирована плаزمиды pBS-E3-SAd25, несущая фрагмент генома SAd25 (12804 нуклеотидов), заклонированный по NheI. Делецию E3-области генома (нуклеотиды 27131–31051) проводили с использованием сайтов для NcoI и Sall и метода гомологичной рекомбинации. Конечная плаزمиды pSAd25-EGFP содержала делеции в E1- и E3-областях генома. Полученный молекулярный клон анализировали с помощью рестрикционного картирования и полногеномного секвенирования.

Получение рекомбинантных аденовирусов

Для получения рекомбинантного аденовируса pSAd25-EGFP использовали плазмиду pSAd25-EGFP. Клетки HEK293 высевали в шестилуночные культуральные планшеты и инкубировали ночь до достижения 80%-й конфлюентности. Для удаления бактериальной части плазмидную ДНК гидролизировали эндонуклеазами рестрикции PacI и SspI и затем трансфицировали в клетки HEK293 с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific; США) в соответствии с инструкциями производителя. После визуального обнаружения вирусного цитопатического

действия (ЦПД) с помощью инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus; Япония) клетки в культуральной среде подвергали трем циклам замораживания–оттаивания.

Рекомбинантные аденовирусы Ad5-mCherry и Ad26-EGFP были получены как описано ранее [23].

Накопление и очистка рекомбинантных аденовирусов

Рекомбинантные аденовирусы накапливали в культуре клеток линии HEK293. Клетки HEK293 высевали на 10 культуральных чашек диаметром 15 см в количестве $15\text{--}17 \times 10^6$ на чашку. На следующий день монослой клеток с конфлюэнтностью 65–75% инфицировали рекомбинантными Ad, в дозе 10^7 БОЕ на чашку. Через двое суток, с наступлением 90–100% ЦПД, инфицированные клетки собирали, концентрировали низкоскоростным центрифугированием, ресуспендировали в буфере (0,01 M трис-HCl pH 8,0, 0,01 M NaCl, 5 mM ЭДТА) и подвергали трем циклам замораживания–оттаивания для разрушения клеточной и ядерной мембран и высвобождения вируса из клеток. Клеточные лизаты центрифугировали при 5000 об./мин в течение 10 мин на комнатной температуре, осадок удаляли.

Рекомбинантные аденовирусы очищали с помощью двукратного ультрацентрифугирования в градиенте CsCl (в ступенчатом и равновесном градиенте) на приборе Optima XPN-90 (Beckman Coulter Inc.; США).

Чистоту и идентичность Ad подтверждали с помощью ПЦР и полногеномным секвенированием. Титры очищенных вирусов определяли с использованием ТЦД₅₀ на культуре клеток HEK293 [24]. Учет результатов проводили на 10–12-й день после трансдукции клеток.

Определение количества аденовирусных частиц

Количество частиц определяли с использованием реагентов из набора Pico488 dsDNA quantification qit (Lumiprobe; США). В каждую лунку 96-луночного микропланшета вносили по 10 мкл калибровочных растворов (с известной концентрацией) и растворов испытуемого образца. Далее в лунки вносили по 10 мкл раствора для лизиса (TE буфер + 0,1% SDS),

перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем в лунки вносили по 80 мкл раствора TE и по 100 мкл раствора для окрашивания и инкубировали в течение 5 мин. После этого определяли интенсивность флуоресценции измерением на спектрофлуориметре при длинах волн возбуждения 480 нм и эмиссии 520 нм. Далее строили график линейной зависимости интенсивности флуоресценции калибровочных растворов (ось ординат) от концентрации вирусных частиц (ось абсцисс).

Определение количества геномов аденовирусов

Тотальную ДНК выделяли с помощью набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» (Promega; США). Количество геномов определяли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-PB) с помощью универсальных праймеров для всех трех исследуемых серотипов (F: 5'GGCGGCTGGCGGTAGAG, R: 5'GCAACATCTGGAACCGCG). Использовали смесь qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия) согласно инструкции производителя. ПЦР-PB проводили в автоматическом режиме на приборе CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad; США); данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Bio-Rad SFX (США).

Филогенетический анализ последовательностей геномов, фибров и пентонов аденовирусов различных серотипов

Нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов аденовирусов человека (45 серотипов) и обезьян (5 серотипов) были взяты из базы данных NCBI (США). С использованием программы Geneious Prime проводили выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых белков аденовирусов различных серотипов. Эволюционная история была выведена с использованием метода Neighbor-Joining [25]. Древо нарисовано в масштабе с длинами ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для вывода филогенетического дерева. Эволюционные расстояния рассчитывали с использованием метода number of differences и выражали в единицах количества аминокислотных различий на последовательность. Построение древа осуществляли в программе MEGA 11 [26].

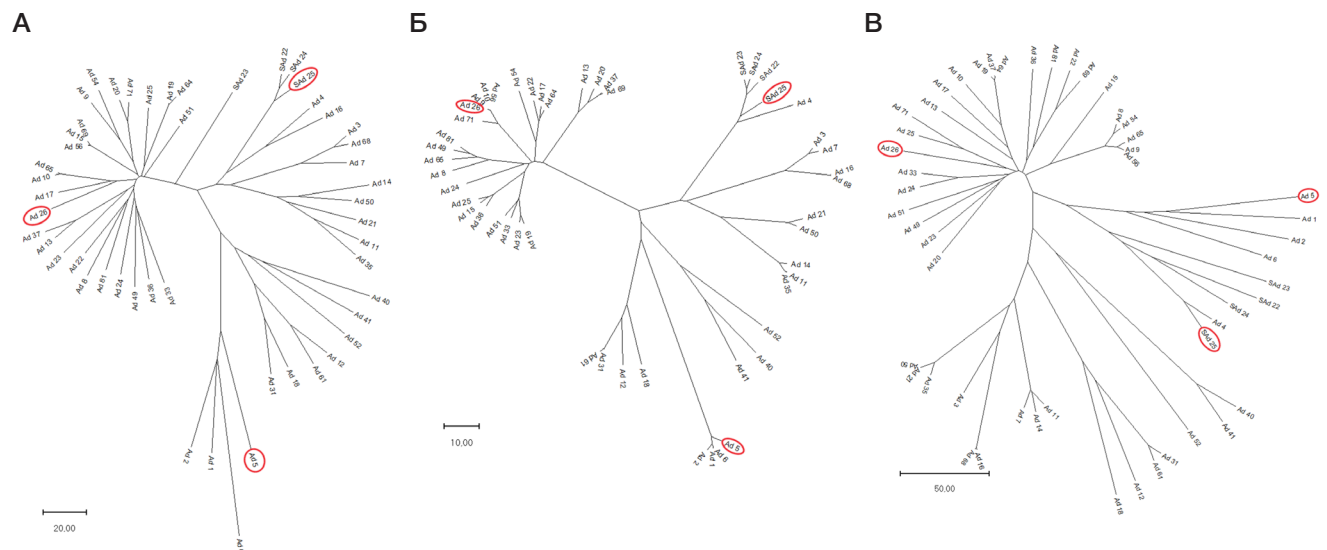


Рис. 1. Филогенетическое древо, показывающее родство последовательностей гексонов (А), пентонов (Б) и фибров (В) аденовирусов различных серотипов. Древо построено на основе аминокислотных последовательностей гексонов 45 серотипов аденовирусов человека и 5 серотипов аденовирусов обезьян. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода количества различий (number of differences method) и выражены в единицах аминокислотных различий на последовательность. Красным выделены Ad5, Ad26 и SAd25

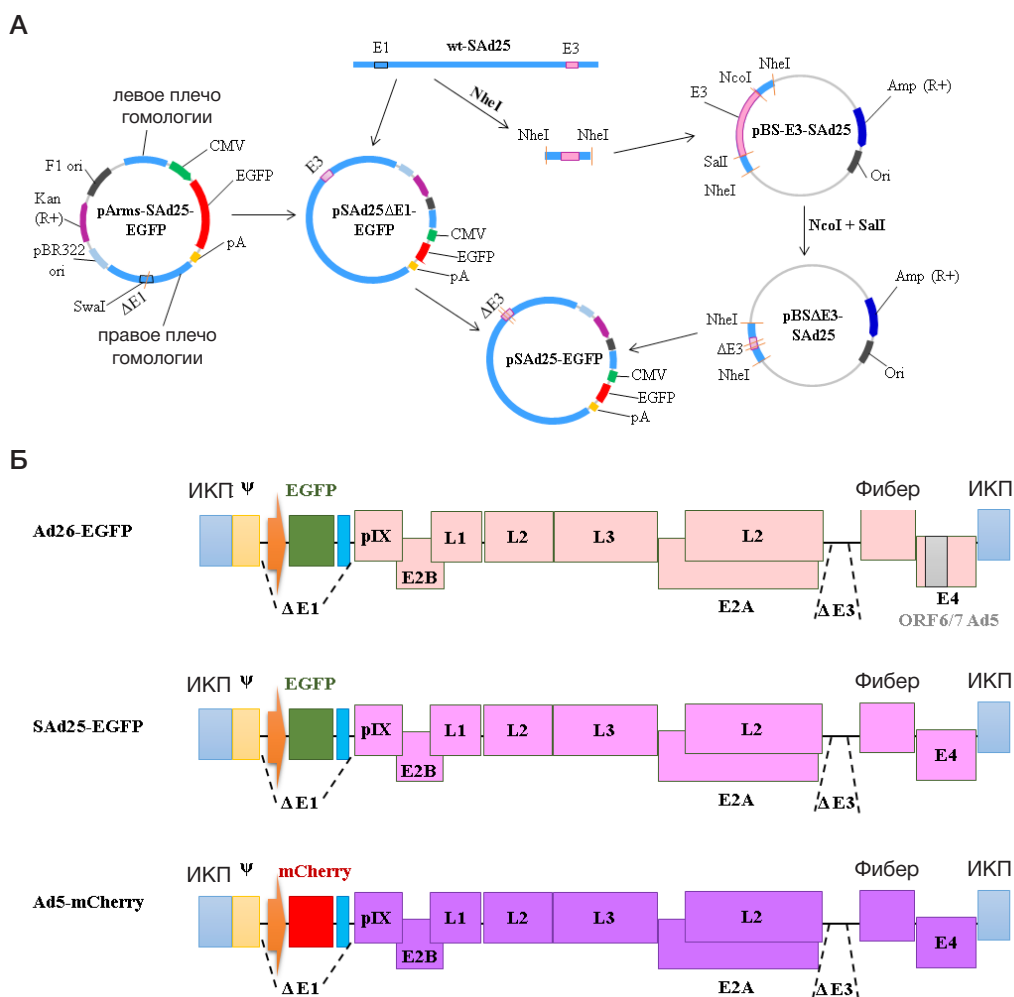


Рис. 2. Схемы рекомбинантных аденовирусных векторов. **А.** Схема создания плазмидной конструкции, содержащей полноразмерный геном аденовируса обезьян 25-го серотипа и несущей экспрессионную кассету с геном EGFP. **Б.** Схемы геномов рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов, используемых в данном исследовании

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение гексонов, пентонов и фибров различных серотипов аденовирусов человека и обезьян

Поскольку структурные белки аденовируса гексон, пентон и фибер содержат типоспецифичные антигенные детерминанты, являющиеся мишенями для нейтрализующих антител, при выборе серотипа аденовируса для разработки новой векторной платформы важно учитывать то, насколько эти белки данного серотипа отличаются от аналогичных белков уже используемых рекомбинантных аденовирусов, в частности от Ad5 и Ad26. Поэтому после получения результатов полногеномного секвенирования wt-SAd25 нами был проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей гексонов, пентонов и фибров различных серотипов и сравнение их с гексоном SAd25 (рис. 1).

По результатам анализа видно, что гексон, пентон и фибер SAd25 достаточно эволюционно удалены от тех же белков аденовирусов Ad5, (подгруппа C) и Ad26 (подгруппа D), которые использовали в вакцине «Спутник V», поэтому с высокой долей вероятности вируснейтрализующие антитела, сформированные вакцинацией Ad5 или Ad26, нацеленные на данные белки, не будут нейтрализовывать SAd25 и этот вектор может стать подходящим кандидатом

как при самостоятельном использовании, так и для праймирования или бустирования.

Конструирование вектора на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа

Рекомбинантный репликативно-дефектный вектор на основе SAd25 был сконструирован по стандартной схеме модификации вирусного генома, которую применяют для создания векторов на основе Ad5 и Ad26 (рис. 2А). Делеция E1-области превращает аденовирусный геном в дефектный по репликации (способен размножаться только в специальной клеточной линии). На месте удаленной E1-области находится кассета с репортерным геном (CMV-промотор, ген EGFP, сигнал полиаденилирования). Для увеличения пакующей емкости дополнительно проводили делецию E3-области. Плаزمида, несущая геном рекомбинантного SAd25-EGFP, была сконструирована методом гомологичной рекомбинации в бактериальных клетках.

Получение инфекционного потомства аденовируса проводили в клетках линии HEK293, трансфицированных плазмидной конструкцией pSAd25-EGFP, у которой предварительно удалили векторную часть (содержащую точку начала репликации ori и ген канамицина). Несмотря на то что клетки HEK293 экспрессируют белки E1A-области, обладающие некоторой специфичностью, особенно E1B55K, нами показано, что в данной клеточной линии

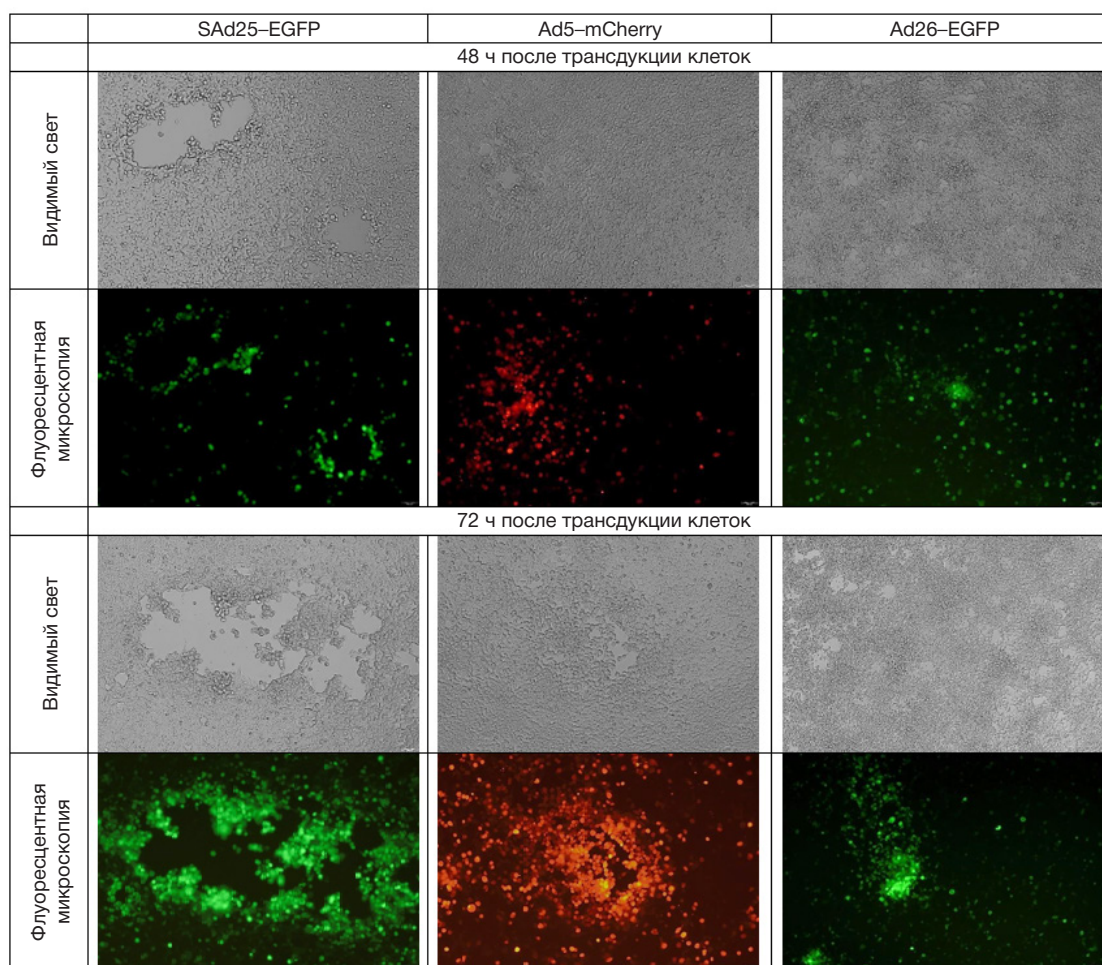


Рис. 3. Цитопатическое действие аденовирусов на клетки линии HEK293 через 48 и 72 ч после трансдукции

происходит эффективная сборка рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа.

Исследование биологических и физических свойств нового аденовирусного вектора

Одна из немаловажных характеристик вирусного вектора — генетическая стабильность генома аденовируса. Для ее исследования провели ряд пассажей аденовируса SAd25-EGFP на культуре клеток HEK293. Геномную ДНК выделяли из пассажей № 1, 5 и 10, а затем изучали с помощью полногеномного секвенирования. Результаты показали, что мутаций в геноме не произошло, последовательности геномов со всех трех пассажей обладали 100% идентичностью, что позволяет заключить, что рекомбинантный аденовирус SAd25-EGFP остается генетически стабильным по крайней мере при 10-кратном пассировании в условиях *in vitro*.

Для сравнения эффективности репликации полученного аденовируса SAd25-EGFP и двух полученных ранее в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России рекомбинантных аденовирусов других серотипов (Ad5 и Ad26) использовали векторы, экспрессирующие гены флуоресцентных белков EGFP и mCherry (красный флуоресцентный белок). Аденовирусами SAd25-EGFP, Ad5-mCherry и Ad26-EGFP (схемы геномов представлены на рис. 2Б) трансдуцировали лунки 96-луночного планшета с клетками HEK293 (5×10^4 кл./лунка) в дозе 1×10^4 вирусных частиц (в. ч.) и инкубировали в течение 72 ч. Вирусные бляшки детектировали с помощью

инвертированного микроскопа Olympus IX73 (Olympus; Япония) с флуоресцентным модулем U-RFL-T (Olympus; Япония) во всех лунках, инфицированных разными аденовирусами. Вирусные бляшки, обнаруженные в клетках, инфицированных SAd25-EGFP, были заметно больше, чем в клетках, инфицированных другими аденовирусами, кроме того, отчетливо увеличена зона лизиса, что свидетельствует о более высокой вирусной цитотоксичности (рис. 3). Это согласуется с результатами, полученными для другого аденовируса обезьян — SAd23 [17].

Для более детального анализа эффективности репликации полученного аденовирусного вектора и сравнения с другими аденовирусными векторами SAd25-EGFP, Ad5-mCherry и Ad26-EGFP наращивали на десяти культуральных чашках (150 мм), проводили очистку методом ультрацентрифугирования, собирали в равном конечном объеме (2 мл). Конечный препарат может содержать вирусные частицы без генома (не упакованные или пустые), с полным геномом (упакованные или полные) или различные промежуточные формы между ними. Далее проводили физико-биологическую характеристику полученных аденовирусов (табл.).

Количество в. ч. SAd25-EGFP оказалось схожим с количеством в. ч. Ad5-mCherry и Ad26-EGFP, но инфекционный титр SAd25-EGFP оказался ниже, чем у Ad5 и Ad26. Полученные данные свидетельствуют о наличии большего количества неинфекционных вирусных частиц у SAd25-EGFP по сравнению с Ad5 и Ad26. Выход рекомбинантного аденовируса обезьян при этом оказался ниже в сравнении с Ad26-EGFP. Обнаружение

Таблица. Биологические и физические характеристики рекомбинантных аденовирусов

Серотип	ТЦД ₅₀ /мл	Число геномов/мл	Количество в.ч./мл	Число геномов/ ТЦД ₅₀	Количество в.ч./ ТЦД ₅₀
SAd25-EGFP	$2,15 \times 10^9$	$1,79 \times 10^{12}$	$1,15 \times 10^{12}$	833	535
Ad5-mCherry	$4,64 \times 10^9$	$1,01 \times 10^{12}$	$1,02 \times 10^{12}$	218	220
Ad26-EGFP	$6,81 \times 10^9$	$1,88 \times 10^{12}$	$1,91 \times 10^{12}$	276	281

большого количества вирусных геномов для SAd25-EGFP свидетельствует о наличии неупакованной вирусной ДНК. Таким образом, данные результаты показали, что рекомбинантный SAd25 эффективно накапливается в клетках HEK293. Ввиду наличия у SAd25-EGFP большого количества неинфекционных вирусных частиц и свободной вирусной ДНК требуется подбор оптимальных условий культивирования и очистки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аденовирусы обезьян уже долгое время являются объектами исследований вирусологов и изучаются на предмет их использования в качестве векторов для доставки целевых генов в клетки. Их неоспоримое преимущество — практически полное отсутствие вируснейтрализующих антител у людей к распространённым серотипам, в том числе к CAd63 и CAd68. Так, первым вектором на основе аденовируса шимпанзе стал вектор CAd68, у которого была делетирована E1-область [12]. В доклинических исследованиях вакцины против ВИЧ-1 было показано, что данный рекомбинантный аденовирус является высокоиммуногенным вакцинным вектором [20]. Позднее был разработан рекомбинантный аденовирусный вектор на основе аденовируса обезьян серотипа Y25, который в дальнейшем назвали ChAdOx1. Созданная на его основе вакцинная платформа обладает хорошим профилем безопасности, что показано в клинических исследованиях I–III фаз векторных вакцин на основе ChAdOx1, полученных для профилактики ряда болезней, включая грипп, туберкулез, малярию, рак предстательной железы, Ближневосточный респираторный синдром, лихорадку Зика и COVID-19 [27].

Аденовирус SAd25 обладает благоприятным профилем безопасности и высокой иммуногенностью [27], однако в России до сих пор отсутствуют вакцинные или генотерапевтические препараты на его основе, поэтому нами была разработана векторная платформа на основе SAd25 с перспективой дальнейшего применения в качестве вакцинной платформы.

На первом этапе своей работы мы провели биоинформатический анализ последовательности генома wt-SAd25. Наше внимание было сосредоточено на последовательностях гексона, пентона и фибера аденовируса, т. е. основных белках капсида вириона. Эпитопы, расположенные в гексоне, являются мишенями для нейтрализующих антител *in vivo*, распознаются цитотоксическими Т-клетками и служат одним из параметров при выделении аденовирусов в различные серотипы [28]. Поэтому важно было установить, насколько эволюционно удален гексон SAd25 от других серотипов, в том числе используемых при разработке вакцин Ad5 и Ad26. В результате показано, что гексон, пентон и фибер SAd25 достаточно эволюционно удалены от тех же белков Ad5 и Ad26. В связи с этим следующей нашей задачей стало создание векторной системы на основе SAd25.

Существует несколько методов конструирования аденовирусных векторов: клонирование, получение

вектора через космиды, использование метода гомологичной рекомбинации в бактериях и гомологичной рекомбинации в эукариотических клетках [29]. Среди них получение плазмиды, содержащей геном аденовируса, путем гомологичной рекомбинации челночного вектора, несущего области гомологии с геномом аденовируса и геномной аденовирусной ДНК в клетках *E. coli* штамма BJ5183, является одним из общепринятых методов, который также использовали в данной работе.

Большинство создаваемых векторов на основе аденовирусов, исследуемых в качестве кандидатных вакцин, относят к так называемым векторам первого поколения, у которых удалены E1- и E3-области генома. Удаление E1-области приводит к тому, что аденовирус становится репликативно-дефектным, т. е. не способным размножаться в клетках животных. Это существенно повышает безопасность и снижает вероятность возникновения побочных эффектов. Делеция еще одной области генома, E3, увеличивает возможный размер вставки до 8 т.п.н., обеспечивая гибкость в дизайне экспрессионной кассеты. Кроме того, данная делеция не влияет на рост в комплементирующей клеточной линии. В полученном нами рекомбинантном аденовирусном векторе на основе SAd25 были удалены обе упомянутые области, как E1, так и E3.

Для последующего клинического применения необходимо получить вектор, который будет эффективно реплицироваться в производственной культуре клеток. Поскольку в России для производства рекомбинантных аденовирусных векторов используют клеточную линию HEK293, которая является комплементирующей и содержит E1-область генома Ad5, в случае создания вектора с делетированной E1-областью, есть риск, что данный вектор будет образовывать при наращивании репликативно компетентные аденовирусные частицы. Однако в случае с SAd25 данный риск отсутствует, поскольку процент гомологии нуклеотидной последовательности этой области недостаточно высок и не будет происходить гомологичной рекомбинации между геномом SAd25 и E1-областью в клетках линии HEK293.

Для подтверждения стабильности вакцинного вектора на протяжении всего производственного процесса проверяется генетическая стабильность рекомбинантного вирусного вектора. Для ее исследования проводится такое количество пассажей вирусных векторов, которое превышает уровень, используемый в производстве, обычно 5–10 пассажей [30]. Частота мутаций в геноме репликативно-дефектного аденовируса считается редкой; но несмотря на это, данный анализ важен для оценки того, что не изменяется экспрессионная кассета, а соответственно и экспрессия целевого гена. Нами было проведено 10 пассажей полученного рекомбинантного аденовируса SAd25-EGFP, после чего геномную ДНК анализировали методом полногеномного секвенирования. Было установлено, что вектор на основе SAd25 генетически стабилен.

Дальнейшее получение и исследование аденовирусных векторов на основе SAd25, в том числе изучение безопасности и иммуногенности данного вектора, и их

сравнение с профилем безопасности и иммуногенностью уже существующих аденовирусных векторов (в том числе Ad5 и Ad26) будет способствовать расширению панели рекомбинантных вирусов, которые можно использовать при разработке средств для профилактики широкого круга инфекционных заболеваний.

ВЫВОДЫ

Получен рекомбинантный аденовирусный вектор на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа, в котором на месте E1-области генома находится экспрессионная кассета

с целевым геном (EGFP), а также удалена E3-область генома для увеличения его потенциальной генетической емкости. Данный рекомбинантный аденовирус способен эффективно реплицироваться в клеточной линии HEK293, используемой в производстве для наработки препаратов на основе аденовирусов. Отмечено, что у полученного аденовируса фенотип вирусных бляшек отличается от Ad5 и Ad26, поскольку бляшки SAd25 обладают большей зоной лизиса и более крупными размерами. Полученные данные свидетельствуют о возможности дальнейшего исследования аденовирусного вектора в качестве платформы для создания профилактических препаратов.

Литература

1. Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*. 2004; 10 (4): 616–29.
2. Appaiahgari MB, Vratsi S. Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15 (3): 337–51.
3. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis*. 2017; 4 (2): 43–63.
4. Trapnell BC, Gorziglia M. Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr Opin Biotechnol*. 1994; 5 (6): 617–25.
5. Dolzhikova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-Vectored Ebola Vaccines. *Acta Naturae*. 2017; 9 (3): 4–11.
6. Lundstrom K. Viral Vectors for COVID-19 Vaccine Development. *Viruses*. 2021; 13 (2): 317.
7. Henaff D, Salinas S, Kremer EJ. An adenovirus traffic update: From receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiol*. 2011; 6 (2): 179–92.
8. ICTV. The ICTV report virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. 2022. Available from: <https://ictv.global/taxonomy/>.
9. Tapia MD, Sow SO, Ndiaye BP, Mbaye KD, Thiongane A, Ndour CT, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus vectored Ebola vaccine in adults in Africa: a randomised, observer-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (6): 707–18.
10. O'Hara GA, Duncan CJA, Ewer KJ, Collins KA, Elias SC, Halstead FD, et al. Clinical Assessment of a Recombinant Simian Adenovirus ChAd63: A Potent New Vaccine Vector. *J Infect Dis*. 2012; 205 (5): 772–81.
11. Younis BM, Osman M, Khalil EAG, Santoro F, Furini S, Wiggins R, et al. Safety and immunogenicity of ChAd63-KH vaccine in post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in Sudan. *Mol Ther*. 2021; 29 (7): 2366–77.
12. Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR, et al. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol*. 2001; 75 (23): 11603–13.
13. Zhou D, Cun A, Li Y, Xiang Z, Ertl HCJ. A Chimpanzee-Origin Adenovirus Vector Expressing the Rabies Virus Glycoprotein as an Oral Vaccine against Inhalation Infection with Rabies Virus. *Mol Ther*. 2006; 14 (5): 662–72.
14. Napolitano F, Merone R, Abbate A, Ammendola V, Horncastle E, Lanzaro F, et al. A next generation vaccine against human rabies based on a single dose of a chimpanzee adenovirus vector serotype C. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14 (7): e0008459.
15. de Jong R, Stockhofe-Zurwieden N, Bonsing J, Wang KF, Vandepaer S, Bouzya B, et al. ChAd155-RSV vaccine is immunogenic and efficacious against bovine RSV infection-induced disease in young calves. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 6142.
16. Roy S, Gao G, Lu Y, Zhou X, Lock M, Calcedo R, et al. Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*. 2004; 15 (5): 519–30.
17. Luo S, Zhang P, Ma X, Wang Q, Lu J, Liu B, et al. A rapid strategy for constructing novel simian adenovirus vectors with high viral titer and expressing highly antigenic proteins applicable for vaccine development. *Virus Res*. 2019; 268: 1–10.
18. Belousova N, Mikheeva G, Xiong C, Soghomonian S, Young D, Le Roux L, et al. Development of a targeted gene vector platform based on simian adenovirus serotype 24. *J Virol*. 2010; 84 (19): 10087–101.
19. Bauza K, Malinauskas T, Pfander C, Anar B, Jones EY, Billker O, et al. Efficacy of a plasmodium vivax malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia Ankara expressing thrombospondin-related anonymous protein as assessed with transgenic plasmodium berghei parasites. *Infect Immun*. 2014; 82 (3): 1277–86.
20. Fitzgerald JC, Gao GP, Reyes-Sandoval A, Pavlakis GN, Xiang ZQ, Wlazlo AP, et al. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 Gag. *J Immunol*. 2003; 170 (3): 1416–22.
21. Roy S, Medina-Jaszek A, Wilson MJ, Sandhu A, Calcedo R, Lin J, et al. Creation of a panel of vectors based on ape adenovirus isolates. *J Gene Med*. 2011; 13 (1): 17–25.
22. Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol*. 2001; 18 (1): 63–70.
23. Logunov DY, Zubkova OV, Karyagina-Zhulina AS, Shuvalova EA, Karpov AP, Shmarov MM, et al. Identification of HI-Like Loop in CELO adenovirus fiber for incorporation of receptor binding motifs. *J Virol*. 2007; 81 (18): 9641–52.
24. Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol*. 1994; 47 (3): 157–66.
25. N Saitou, M Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4 (4): 406–25. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
26. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018; 35 (6): 1547–9.
27. Folegatti PM, Jenkin D, Morris S, Gilbert S, Kim D, Robertson JS, et al. Vaccines based on the replication-deficient simian adenoviral vector ChAdOx1: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*. 2022; 40 (35): 5248–62.
28. Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J Virol*. 2005; 79 (20): 12635–42.
29. Zhang W, Ehrhardt A. Getting genetic access to natural adenovirus genomes to explore vector diversity. *Virus Genes*. 2017; 53 (5): 675–83.
30. Fernandes P, Silva AC, Coroadinha AS, Alves PM. Upstream bioprocess for adenovirus vectors. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Elsevier, 2016; p. 139–61.

References

1. Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*. 2004; 10 (4): 616–29.
2. Appaiahgari MB, Vrati S. Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15 (3): 337–51.
3. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis*. 2017; 4 (2): 43–63.
4. Trapnell BC, Gorziglia M. Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr Opin Biotechnol*. 1994; 5 (6): 617–25.
5. Dolzhikova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tikhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-Vectored Ebola Vaccines. *Acta Naturae*. 2017; 9 (3): 4–11.
6. Lundstrom K. Viral Vectors for COVID-19 Vaccine Development. *Viruses*. 2021; 13 (2): 317.
7. Henaff D, Salinas S, Kremer EJ. An adenovirus traffic update: From receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiol*. 2011; 6 (2): 179–92.
8. ICTV. The ICTV report virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. 2022. Available from: <https://ictv.global/taxonomy/>.
9. Tapia MD, Sow SO, Ndiaye BP, Mbaye KD, Thiongane A, Ndour CT, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus vectored Ebola vaccine in adults in Africa: a randomised, observer-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (6): 707–18.
10. O'Hara GA, Duncan CJA, Ewer KJ, Collins KA, Elias SC, Halstead FD, et al. Clinical Assessment of a Recombinant Simian Adenovirus ChAd63: A Potent New Vaccine Vector. *J Infect Dis*. 2012; 205 (5): 772–81.
11. Younis BM, Osman M, Khalil EAG, Santoro F, Furini S, Wiggins R, et al. Safety and immunogenicity of ChAd63-KH vaccine in post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in Sudan. *Mol Ther*. 2021; 29 (7): 2366–77.
12. Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR, et al. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol*. 2001; 75 (23): 11603–13.
13. Zhou D, Cun A, Li Y, Xiang Z, Ertl HCJ. A Chimpanzee-Origin Adenovirus Vector Expressing the Rabies Virus Glycoprotein as an Oral Vaccine against Inhalation Infection with Rabies Virus. *Mol Ther*. 2006; 14 (5): 662–72.
14. Napolitano F, Merone R, Abbate A, Ammendola V, Horncastle E, Lanzaro F, et al. A next generation vaccine against human rabies based on a single dose of a chimpanzee adenovirus vector serotype C. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14 (7): e0008459.
15. de Jong R, Stockhofe-Zurwieden N, Bonsing J, Wang KF, Vandepaer S, Bouzya B, et al. ChAd155-RSV vaccine is immunogenic and efficacious against bovine RSV infection-induced disease in young calves. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 6142.
16. Roy S, Gao G, Lu Y, Zhou X, Lock M, Calcedo R, et al. Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*. 2004; 15 (5): 519–30.
17. Luo S, Zhang P, Ma X, Wang Q, Lu J, Liu B, et al. A rapid strategy for constructing novel simian adenovirus vectors with high viral titer and expressing highly antigenic proteins applicable for vaccine development. *Virus Res*. 2019; 268: 1–10.
18. Belousova N, Mikheeva G, Xiong C, Soghomonian S, Young D, Le Roux L, et al. Development of a targeted gene vector platform based on simian adenovirus serotype 24. *J Virol*. 2010; 84 (19): 10087–101.
19. Bauza K, Malinauskas T, Pfander C, Anar B, Jones EY, Billker O, et al. Efficacy of a plasmodium vivax malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia Ankara expressing thrombospondin-related anonymous protein as assessed with transgenic plasmodium berghei parasites. *Infect Immun*. 2014; 82 (3): 1277–86.
20. Fitzgerald JC, Gao GP, Reyes-Sandoval A, Pavlakis GN, Xiang ZQ, Wlazlo AP, et al. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 Gag. *J Immunol*. 2003; 170 (3): 1416–22.
21. Roy S, Medina-Jaszek A, Wilson MJ, Sandhu A, Calcedo R, Lin J, et al. Creation of a panel of vectors based on ape adenovirus isolates. *J Gene Med*. 2011; 13 (1): 17–25.
22. Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol*. 2001; 18 (1): 63–70.
23. Logunov DY, Zubkova OV, Karyagina-Zhulina AS, Shuvalova EA, Karpov AP, Shmarov MM, et al. Identification of HI-Like Loop in CELO adenovirus fiber for incorporation of receptor binding motifs. *J Virol*. 2007; 81 (18): 9641–52.
24. Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol*. 1994; 47 (3): 157–66.
25. N Saitou, M Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4 (4): 406–25. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
26. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018; 35 (6): 1547–9.
27. Folegatti PM, Jenkin D, Morris S, Gilbert S, Kim D, Robertson JS, et al. Vaccines based on the replication-deficient simian adenoviral vector ChAdOx1: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*. 2022; 40 (35): 5248–62.
28. Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J Virol*. 2005; 79 (20): 12635–42.
29. Zhang W, Ehrhardt A. Getting genetic access to natural adenovirus genomes to explore vector diversity. *Virus Genes*. 2017; 53 (5): 675–83.
30. Fernandes P, Silva AC, Coroadinha AS, Alves PM. Upstream bioprocess for adenovirus vectors. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Elsevier, 2016; p. 139–61.