

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Стабильность генома вакцинного штамма VACΔ6

Р.А. Максюттов, С.Н. Якубицкий, И.В. Колосова, Т.В. Трегубчак, А.Н. Швалов, Е.В. Гаврилова, С.Н. Щелкунов 

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия  
 [snshchel@rambler.ru](mailto:snshchel@rambler.ru)

**Аннотация.** В связи с прекращением после 1980 г. массовой противооспенной вакцинации в настоящее время практически полностью утрачен коллективный иммунитет человеческой популяции к ортопоксвирусным инфекциям. Вследствие этого увеличилась опасность распространения в мире зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека, обусловленных вирусами оспы обезьян или оспы коров. Противооспенные вакцины первого поколения на основе вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, VAC) являются реактогенными и поэтому в современных условиях не пригодны для массовой вакцинации. Это обуславливает необходимость разработки современных безопасных живых вакцин на основе VAC с применением методов генетической инженерии. С использованием метода временной доминантной селекции нами создан штамм VACΔ6, в геноме которого пять генов вирулентности направленно делетированы, а один ген инактивирован встройкой синтетического фрагмента ДНК. В процессе получения штамма VACΔ6 из клонового варианта VAC L1VP вирус прошел 71 пассаж в культуре клеток CV-1. Такая длинная пассажная история могла привести к дополнительным нецелевым изменениям в геноме штамма VACΔ6 относительно исходного L1VP. Поэтому для оценки возможных нецелевых изменений провели полногеномное секвенирование VAC L1VP, VACΔ6 и пяти промежуточных штаммов вируса. Сравнительный анализ полных вирусных геномов показал, что, помимо целевых нарушений, спонтанно произошли только две нуклеотидные замены при получении VACΔ4 из штамма VACΔ3 и сохранившиеся в геноме VACΔ5 и VACΔ6. При этом обе эти замены находятся в межгенных участках (позиции 1431 и 189738 относительно штамма L1VP), что указывает на крайне редкое возникновение нецелевых изменений при использовании методики временной доминантной селекции для получения рекомбинантных VAC со множественными встройками/делециями. Для выяснения стабильности генома полученного аттенуированного вакцинного штамма и в соответствии с «Руководством по проведению клинических исследований лекарственных средств...» выполнено 15 последовательных циклов культивирования производственного штамма вируса VACΔ6 в культуре клеток 4647, аттестованной для производства вакцины. ПЦП-анализ и секвенирование шести фрагментов ДНК, соответствующих районам нарушаемых генов VACΔ6, показали, что после 15 пассажей в культуре клеток 4647 все последовательности вирусной ДНК остались неизменными.

Ключевые слова: вирус осповакцины; временная доминантная селекция; направленная инактивация генов; стабильность генома.

**Для цитирования:** Максюттов Р.А., Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Трегубчак Т.В., Швалов А.Н., Гаврилова Е.В., Щелкунов С.Н. Стабильность генома вакцинного штамма VACΔ6. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):394-401. DOI 10.18699/VJGB-22-48

## Genome stability of the vaccine strain VACΔ6

R.A. Maksyutov, S.N. Yakubitskiy, I.V. Kolosova, T.V. Tregubchak, A.N. Shvalov, E.V. Gavrilova, S.N. Shchelkunov 

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia  
 [snshchel@rambler.ru](mailto:snshchel@rambler.ru)

**Abstract.** Due to cessation of mass smallpox vaccination in 1980, the collective immunity of humans against orthopoxvirus infections has virtually been lost. Therefore, the risk of spreading zoonotic human orthopoxvirus infections caused by monkeypox and cowpox viruses has increased in the world. First-generation smallpox vaccines based on *Vaccinia virus* (VAC) are reactogenic and therefore not suitable for mass vaccination under current conditions. This necessitates the development of modern safe live vaccines based on VAC using genetic engineering. We created the VACΔ6 strain by transient dominant selection. In the VACΔ6 genome, five virulence genes were intentionally deleted, and one gene was inactivated by inserting a synthetic DNA fragment. The virus was passaged 71 times in CV-1 cells to obtain the VACΔ6 strain from the VAC L1VP clonal variant. Such a long passage history might have led to additional off-target mutations in VACΔ6 compared to the original L1VP variant. To prevent this, we performed a genome-wide sequencing of VAC L1VP, VACΔ6, and five intermediate viral strains to assess possible off-target mutations. A comparative analysis of complete viral genomes showed that, in addition to target mutations, only two nucleotide substitutions occurred spontaneously when obtaining VACΔ4 from the VACΔ3 strain; the mutations persisting in the VACΔ5 and VACΔ6 genomes. Both nucleotide substitutions are located in intergenic regions (positions 1431 and 189738 relative to L1VP), which indicates an extremely rare occurrence of off-target mutations when using transient dominant selection to obtain recombinant VAC variants with multiple insertions/deletions. To assess the genome

stability of the resulting attenuated vaccine strain, 15 consecutive cycles of cultivation of the industrial VACΔ6 strain were performed in 4647 cells certified for vaccine production in accordance with the "Guidelines for Clinical Trials of Medicinal Products". PCR and sequencing analysis of six DNA fragments corresponding to the regions of disrupted genes in VACΔ6 showed that all viral DNA sequences remained unchanged after 15 passages in 4647 cells.

Key words: vaccinia virus; transient dominant selection; targeted gene inactivation; genome stability.

**For citation:** Maksyutov R.A., Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Tregubchak T.V., Shvalov A.N., Gavrilova E.V., Shchelkunov S.N. Genome stability of the vaccine strain VACΔ6. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):394-401. DOI 10.18699/VJGB-22-48

## Введение

В 1980 г., после объявления о ликвидации натуральной оспы, Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) было рекомендовано прекратить вакцинацию людей против этого особо опасного заболевания. Такое решение было обусловлено тем, что прививки вируса осповакцины (VAC) могли в ряде случаев приводить к тяжелым поствакцинальным осложнениям, иногда со смертельным исходом (Smallpox and its Eradication, 1988; Kretzschmar et al., 2006).

В результате отказа от вакцинации против натуральной оспы в человеческой популяции с каждым годом становится все меньше людей со специфическим иммунитетом против данного заболевания. Это делает человечество беззащитнее перед возможным инфицированием не только вирусом натуральной оспы, но и другими близкородственными ортопоксвирусами, природным резервуаром которых служат различные животные, в первую очередь грызуны. К таким вирусам относятся вирусы оспы обезьян и оспы коров, вызывающие оспоподобные заболевания животных и человека. Распространение этих вирусов в человеческой популяции потенциально может привести к их адаптации к защитным системам организма человека и появлению вирусных вариантов, эпидемически опасных для людей (Shchelkunov, 2013). В последние годы в различных регионах мира стали регистрировать необычно массовые вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей (Singh et al., 2012; Nolen et al., 2016; Reynolds et al., 2019).

Единственный эффективный метод борьбы с возрастающей угрозой ортопоксвирусных инфекций человека – вакцинопрофилактика (Moss, 2011; Shchelkunov, 2011). Накопление в последние десятилетия в человеческой популяции иммунодефицитных состояний привело к тому, что использование классических живых вакцин на основе VAC для массовой вакцинации населения сейчас противопоказано, так как может привести ко множеству побочных реакций и более тяжелым их проявлениям, чем во время кампании по ликвидации натуральной оспы (Albarnaz et al., 2018; Shchelkunov, Shchelkunova, 2020). Поэтому существует настоятельная потребность в создании современных противоортопоксвирусных вакцин, которые должны быть значительно безопаснее по сравнению с предыдущими поколениями противооспенных вакцин и при этом высокоиммуногенны, обеспечивая надежную защиту от вирусной инфекции.

Первые аттенуированные штаммы VAC были получены в результате множественного пассажей вируса в культуре клеток гетерологичного хозяина: штамм MVA выделили после 572 пассажей VAC Ankara в первичной культуре

фибробластов куриных эмбрионов (Volz, Sutter, 2017), штамм LC16m8 – после 45 пассажей VAC Lister в первичной культуре клеток эпителия почки кролика (Kidokoro, Shida, 2014; Eto et al., 2015).

Аттенуация VAC MVA была обусловлена спонтанными протяженными делециями и мутациями в вирусном геноме, затрагивающими не только гены вирулентности, но и гены, функции которых определяют репликативные свойства вируса и круг чувствительных к нему хозяев (Blanchard et al., 1998; Drexler et al., 1998). Штамм MVA утратил способность формировать инфекционное потомство на большинстве культур клеток млекопитающих, включая клетки человека. В этих культурах клеток наблюдается экспрессия многих генов MVA, но образуются только незрелые вирионы. Данный штамм сохранил свои иммуногенные свойства как противооспенная вакцина, но для достижения достаточного иммунного ответа необходимо вводить вирус в более высоких дозах, по сравнению с классической вакциной, и многократно (Sanchez-Sampedro et al., 2015).

В клоновом варианте VAC LC16m8 аттенуация обусловлена однонуклеотидной делецией в гене *B5R*, кодирующем белок оболочки внеклеточных вирионов, приводящей к сбою рамки трансляции этого белка. Штамм LC16m8 продуцирует в клетках млекопитающих инфекционные вирусные частицы, но со сниженной способностью к распространению как в культурах клеток, так и в инфицированном/вакцинированном организме. Этот штамм является менее аттенуированной по сравнению с MVA, но репликативно компетентной вакциной (Sanchez-Sampedro et al., 2015; Albarnaz et al., 2018).

С развитием методов генетической инженерии стало возможным создавать модифицированные варианты VAC путем введения нужных нуклеотидных последовательностей в вирусный геном, удаления или нарушения генов самого вируса. Одно из наиболее перспективных направлений таких работ – создание методами генетической инженерии высокоаттенуированных вариантов VAC, обладающих иммуногенностью и протективностью на уровне классической противооспенной вакцины, но при этом с меньшей патогенностью (Shchelkunov, Shchelkunova, 2020).

Секвенирование полных геномов различных штаммов и разных видов патогенных для человека ортопоксвирусов, накопление данных о функциях многочисленных генов этих вирусов, а также разработка методов введения направленных изменений в вирусный геном позволили сформулировать и реализовать новый подход к созданию высокоаттенуированных вариантов VAC. Этот подход состоит в строго локализованном последовательном уда-

лении или инактивации индивидуальных генов вирулентности, не затрагивающем функции репликации вируса в культуре клеток и не влияющем на круг хозяев, чувствительных к вирусу (Yakubitskiy et al., 2015).

Ранее нами в результате последовательной направленной инактивации отдельных вирусных генов был получен штамм VACΔ6 живой аттенуированной вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека (Yakubitskiy et al., 2015, 2016). При создании этого штамма использовали методику временной доминантной селекции (Falkner, Moss, 1990), на каждой стадии которой осуществляются множественные циклы размножения (пассажи) вируса в культуре клеток. Причем отсутствовала информация о том, как такие процедуры могут сказываться на сохранении нуклеотидной последовательности крупного ДНК-генома VAC.

Цель настоящей работы – с применением технологии полногеномного секвенирования изучить, насколько сохранился геном VAC в процессе получения штамма VACΔ6 из родительского штамма LIVP. Другой, не менее важный вопрос касался анализа геномной стабильности производственного вакцинного штамма VACΔ6 в процессе 15 пассажей в культуре клеток 4647, используемой для производства данной противооспенной вакцины.

## Материалы и методы

**Вирусы, культуры клеток.** В работе использовали клон 14 штамма VAC LIVP (LIVP), полученный нами ранее методом предельного разведения трехкратным пересевом через чашку под агарозным покрытием (Yakubitskiy et al., 2015), а также созданные на его основе мутантные VAC с инактивацией целевых генов (Yakubitskiy et al., 2015, 2016). Вирусы выращивали и титровали на культурах клеток почки африканской зеленой маргитки линий CV-1 и 4647 из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Линия 4647 аттестована Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов (ГИСК) им. Л.А. Тарасевича в соответствии с требованиями РД 42-28-10-89 и рекомендована для производства профилактических медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) (протокол № 14 от 28.10.2003 заседания Ученого совета ГИСК им. Л.А. Тарасевича; протокол № 9 от 20.11.2003 комитета МИБП).

**Олигонуклеотидные праймеры.** Олигонуклеотиды для проведения аналитической полимеразной цепной реакции (ПЦР) в районах инактивируемых вирусных генов (табл. 1) были синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Расчет этих олигонуклеотидных праймеров производили с помощью программы “Oligo” (версия 3.3) фирмы Borland International (США).

**Клонирование вируса.** Перед клонированием вирусную суспензию обрабатывали ультразвуком и определяли титр методом бляшек на культуре клеток CV-1. Клонирование вируса осуществляли в 6-луночных культуральных планшетах методом бляшек под агарозным покрытием. Для этого монослой клеток CV-1 заражали вирусной суспензией в разведении 10–20 БОЕ/лунку и проводили адсорбцию вируса в течение 60 мин при 37 °С в атмосфере

**Таблица 1.** Перечень олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-анализа модифицированных областей генома VAC при создании вакцины VACΔ6

Ген	Олигонуклеотидные праймеры
A56R	5' TTTTGAGACTCATCAACGATGAAAACCTT 3'
	5' GTGGTATGGGACACCACAAATCCAA 3'
B8R	5' TCACAAATATGATGGTGATGAGCGA 3'
	5' CGTGATATACCCCTAGCCATAGGCAT 3'
J2R	5' CGGACATATTCAGTTGATAATCG 3'
	5' AACACTTTCTACACACCGATTGA 3'
C3L	5' TCGCGCTTTACATTCTCGAATCT 3'
	5' TGTTCTGTGTCTTCTGCGGTGA 3'
N1L	5' CTAGAATGGCAAATCTAAGT 3'
	5' ATGGCTGTTGAAGTGGGATCC 3'
A35R	5' ACGACGGATGCTGAAGCGTGTATA 3'
	5' AAACGATGTTACCAATCGTTTCTAGGT 3'

5 % CO<sub>2</sub>. Среду с несорбированным вирусом удаляли и заливали 2 мл/лунку среды ДМЕМ (ООО «БиолоТ», Россия) с 2 % эмбриональной сывороткой коров (ЭСК) (HyClone, США), содержащей 1 % легкоплавкой агарозы. После застывания агарозы планшеты инкубировали в термостате при 37 °С в течение 48 ч в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Затем добавляли по 1.5 мл/лунку 0.05 % раствора нейтрального красного в среде ДМЕМ и выдерживали при 37 °С в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. После этого раствор нейтрального красного удаляли, а индивидуальные бляшки отбирали при помощи автоматической пипетки и переносили в 100 мкл среды ДМЕМ с 2 % ЭСК. Полученный вирусный материал после однократного замораживания-оттаивания наносили на сформированный монослой клеток CV-1 в 6-луночных планшетах в отдельные лунки с 1 мл/лунку среды ДМЕМ с 2 % ЭСК. Растили 48–72 ч при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Дважды замораживали-оттаивали и использовали полученную вирусную суспензию для дальнейшей наработки клона до рабочего титра 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> БОЕ/мл.

**Получение вариантов вируса с направленно deletированными генами.** Рекомбинантные VAC были получены в культуре клеток CV-1 с помощью катионоактивной липид-опосредованной трансфекции, при использовании Lipofectin Reagent (Invitrogen, США) и селективной среды, содержащей микофеноловую кислоту (МФК), ксантин и гипоксантин (Sigma, США). Для этого 80–90 % монослой клеток CV-1 в 6-луночных культуральных планшетах заражали VAC со множественностью заражения 1 БОЕ/клетку с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Затем монослой клеток отмывали селективной средой без сыворотки и проводили трансфекцию рекомбинантной плазмидой интеграции следующим образом: 3 мкл плазмиды в концентрации 1 мкг/мл смешивали с 15 мкл липофектина в концентрации 1 мг/мл, добавляли 1 мл среды ДМЕМ, содержащей 25 мкг/мл МФК, 250 мкг/мл ксантина и 15 мкг/мл гипоксантина, и оставляли на 15 мин при комнатной температуре, затем



**Таблица 2.** Длины ПЦР-продуктов для исходного штамма LIVP и вариантов VAC с инактивированными генами

Ген	Исходный VAC LIVP, п. н.	Варианты VAC с инактивированными генами, п. н.
A56R	2354	1537
B8R	1535	716
C3L	1543	743
N1L	1785	1549
J2R	512	616
A35R	1888	1372

наносили по каплям на монослой клеток с последующей инкубацией при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Через 24 ч среду заменяли на селективную поддерживающую (с 2 % ЭСК) и инкубировали при тех же условиях еще 1 сутки.

Для обогащения вирусного потомства рекомбинантным вариантом VAC выполняли несколько пассажей (последовательных размножений на культуре клеток) в 6-луночных планшетах под селективной средой. На пассаже, при котором достигалось 90–100 % цитопатического действия (ЦПД) вируса, культуру дважды замораживали-оттаивали для разрушения клеток и выхода вируса в культуральную среду. Полученную вирусную суспензию обрабатывали ультразвуком и использовали для клонирования через чашку под агарозным покрытием в неселективных условиях (без добавления к питательной среде ДМЕМ кантаина, гипоксантина и МФК). Отбирали несколько вирусных клонов, которые затем подвергали пассажам в неселективных условиях на культуре клеток CV-1 до появления 100 % ЦПД. Титр полученных препаратов вирусных клонов определяли на культуре клеток CV-1, как описано в (Yakubitskiy et al., 2015).

Выделение вирусной ДНК независимых клонов проводили с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия), согласно инструкции производителя, с последующим ПЦР-анализом с применением специфических олигонуклеотидных праймеров (см. табл. 1) для скрининга клонов по району вирусного генома, в котором произведена целевая делеция или вставка нуклеотидной последовательности (табл. 2).

По результатам ПЦР-анализа отбирали клоны с нарушенным целевым геном (первое клонирование) и повторно их клонировали методом бляшек под агарозным покрытием для предотвращения возможного загрязнения исходным вариантом вируса. После проведенных дополнительных пассажей полученных субклонов в неселективных условиях и достижения 100 % ЦПД монослоя клеток проводили ПЦР-анализ и отбирали вирусные клоны с инактивированным целевым геном (второе клонирование), определяли инфекционные титры вирусных препаратов, расфасовывали их на отдельные аликвоты, замораживали и использовали для дальнейшей работы.

**Секвенирование полных геномов VAC.** Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США). Для

этого на первом этапе работы осуществляли выделение вирусной ДНК из культур клеток, зараженных соответствующими вирусами. Выделение проводили с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Анализ полногеномных последовательностей ДНК VAC** выполняли при помощи пакета MIRA (v. 4.9.6), BWA (v. 0.7.15) (Li, Durbin, 2009), IGV (v. 2.3.78) (Robinson et al., 2011), Samtools (v. 1.3.1) (Li et al., 2009), Tabix (v. 0.2.5) (Li et al., 2009), GenomeAnalysisTK (v. 3.6) (McKenna et al., 2010). Выравнивание полногеномных последовательностей проводили при помощи Ugene (v. 1.24.1) (Okonechnikov et al., 2012) с применением алгоритма MAFFT (Katoh et al., 2002).

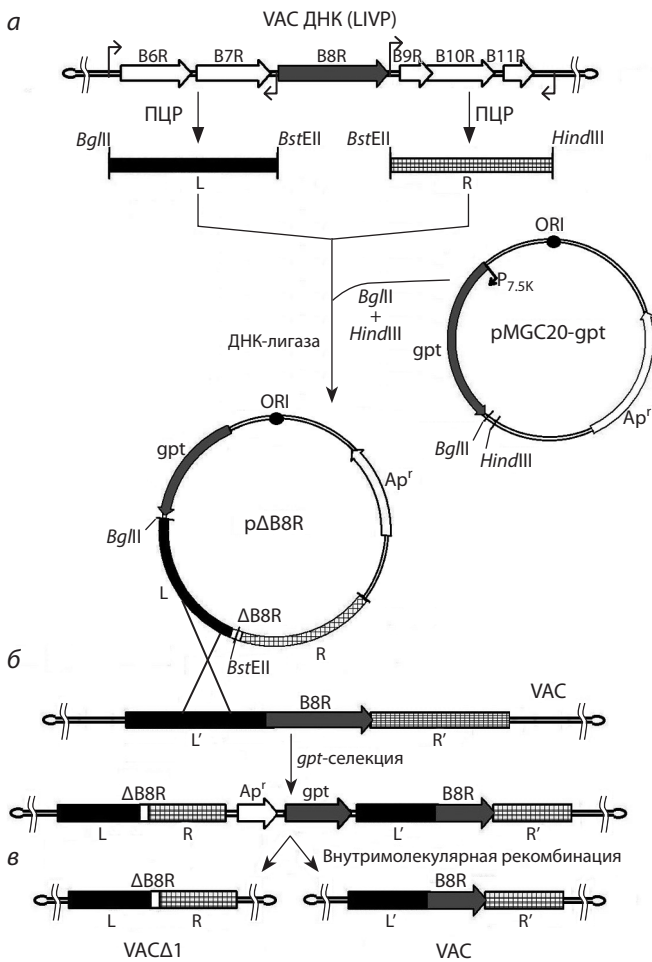
## Результаты

### Введение направленных делеций/инсерций в геном VAC

Для получения VAC с направленной модификацией генетического материала в данной работе использовали методику временной доминантной селекции (Falkner, Moss, 1990). Плаزمиды интеграции-делеции (рис. 1, а) несут доминантный селективный маркер (ген *gpt* *Escherichia coli*, кодирующий ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу, под контролем промотора белка 7.5K VAC), расположенный вне протяженных областей гомологии с ДНК вируса, фланкирующей нарушаемый/делегируемый ген (R – правая и L – левая область).

Бактериальный фермент ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза, синтезируемый в клетках млекопитающих, способен восстанавливать метаболизм пуриновых нуклеотидов, блокируемый микофеноловой кислотой. В результате единичного кроссинговера плазмиды интеграции и вирусной ДНК образуется рекомбинантный вирусный геном, содержащий полностью интегрированную рекомбинантную плазмиду (см. рис. 1, б). В таком вирусном геноме находятся как ген *gpt*, так и протяженные повторяющиеся последовательности R, R' и L, L'. Генетическая конструкция с протяженными повторами нестабильна и может существовать лишь под селективным давлением по гену *gpt*. При снятии селективных условий (культивирование на обычной питательной среде) в вирусном геноме происходит внутримолекулярная рекомбинация по областям гомологии (R-R' или L-L'), в результате которой образуются два варианта вирусов – с нарушенным и исходным геном (рис. 1, в). Следует отметить, что в результате внутримолекулярной рекомбинации удаляются из генома вируса все чужеродные последовательности, что является важным при создании иммунобиологических препаратов на основе VAC. Кроме того, выщепление всей плазмидной последовательности из вирусного генома позволяет получать в дальнейшем двойные, тройные и т. д. рекомбинантные вирусы с нарушенными локусами в различных участках генома при использовании этой же методики и того же селективного маркера (рис. 2).

Схема получения рекомбинантных VAC с шестью инактивированными генами вирулентности представлена на рис. 2. В плазмиде интеграции rΔJ2R ген тимидинкиназы нарушен встройкой синтетического фрагмента ДНК,

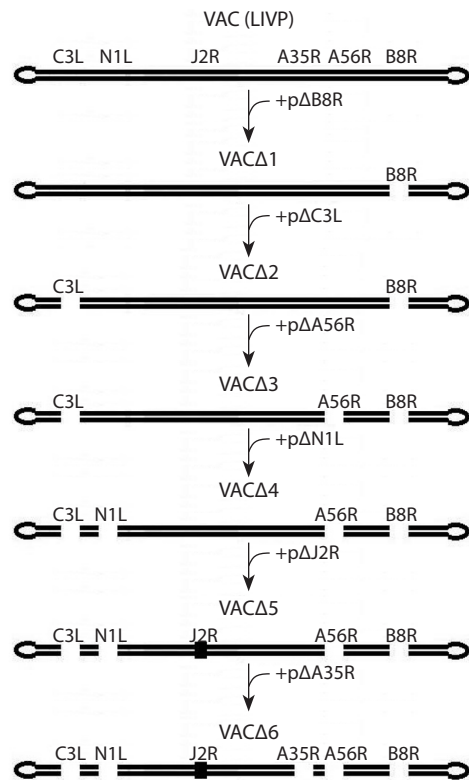


**Рис. 1.** Общая схема получения вируса VACΔ1 с направленной делецией гена B8R.

а – схема конструирования гибридной плазмиды pΔB8R; б – рекомбинационная встройка гибридной плазмиды в вирусный геном; в – расщепление потомства рекомбинантного вируса на два варианта после снятия селективного давления по гену *gpt* (см. пояснения в тексте).

в остальных рекомбинантных плаزمидах целевые гены делетированы (Yakubitskiy et al., 2015, 2016).

В процессе получения рекомбинантного VACΔ6 из штамма LIVP было проведено 18 последовательных серий пассажей на культуре клеток CV-1: 6 серий пассажей под селективным давлением (от 3 до 7 пассажей), 6 серий пассажей без селективного давления после первого кло-



**Рис. 2.** Схема получения рекомбинантного VACΔ6.

нирования (3–4 пассажа) и 6 серий пассажей без селективного давления после второго клонирования (2–4 пассажа) (табл. 3).

### Полногеномное секвенирование вариантов VAC

При получении VACΔ6 вирус подвергся 71 пассажу на культуре клеток, из которых 31 был проведен под селективным давлением по гену *gpt* и 40 – без селективного давления. Такая длинная пассажная история могла привести к дополнительным нецелевым изменениям в геноме штамма VACΔ6 относительно штамма LIVP. Поэтому с целью оценки возможных нецелевых изменений при использовании методики временной доминантной селекции, стабильности исходного штамма LIVP и его рекомбинантных вариантов выполнено полногеномное секвенирование семи штаммов VAC: LIVP кл. 14, VACΔ1, VACΔ2, VACΔ3, VACΔ4, VACΔ5, VACΔ6.

**Таблица 3.** Пассажная история получения штамма VACΔ6 из штамма LIVP на культуре клеток CV-1

Исходный штамм VAC	Количество пассажей под селективным давлением*	Количество пассажей без селективного давления		Итоговый штамм VAC
		Первое клонирование	Второе клонирование	
LIVP кл. 14	6	3	4	VACΔ1
VACΔ1	7	4	3	VACΔ2
VACΔ2	4	3	4	VACΔ3
VACΔ3	3	3	3	VACΔ4
VACΔ4	6	4	3	VACΔ5
VACΔ5	5	4	2	VACΔ6

\* Без учета этапа трансфекции под селективным давлением.

В результате проделанной работы получено семь нуклеотидных последовательностей геномов исследуемых VAC. Нуклеотидную последовательность исходного клонового варианта VAC LIVP депонировали в GenBank под номером доступа KX781953.

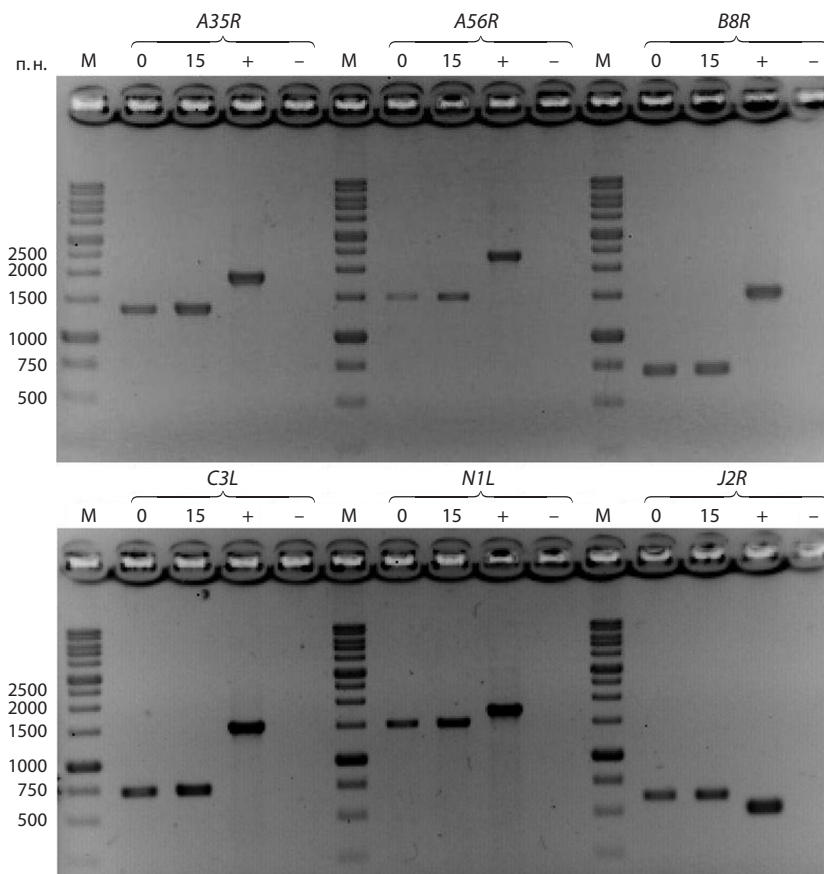
Сравнительный анализ полных вирусных геномов показал, что помимо целевых нарушений спонтанно произошли только две нуклеотидные замены при получении VACΔ4 из штамма VACΔ3 и сохранившиеся в геноме VACΔ5 и VACΔ6. При этом обе нуклеотидные замены находятся в межгенных участках (позиции 1431 и 189738 относительно штамма LIVP), что с учетом общей длины вирусного генома (более 190 т. п. н.) и длительной пассажной истории указывает на отсутствие нецелевых изменений вирусной ДНК при использовании методики временной доминантной селекции для получения рекомбинантных VAC.

#### Изучение генетической стабильности производственного штамма VACΔ6

Обнаруженная стабильность генома VAC на протяжении 71 пассажа в культуре клеток CV-1 указала на целесообразность в дальнейшем при массовом производстве вакцины на основе VACΔ6 проводить подтверждение подлинности штамма более доступным методом – при помощи ПЦР с использованием праймеров, комплементарных шести районам вирусного генома, по которым были произведены модификации родительского VAC LIVP (см. табл. 1). В связи с этим в процессе доклинических исследований оценку генетической стабильности производственного штамма VACΔ6 при множественном пассировании в культуре клеток 4647 (аттестована для культивирования вакцинного штамма) выполняли с помощью ПЦР.

В соответствии с «Руководством по проведению клинических исследований лекарственных средств...» (2012) проводили 15 последовательных циклов заражения монослоя культуры клеток 4647 производственным штаммом вируса VACΔ6 и получения вирусного потомства. Далее осуществляли выделение вирусной ДНК из исходного материала и из криолизата культуры клеток 4647, зараженной вирусом VACΔ6, полученным после 14-го пассажа. ПЦР-анализ выполняли с использованием олигонуклеотидных праймеров, указанных в табл. 1.

При проведении ПЦР-анализа в качестве отрицательного контроля брали ДНК,



**Рис. 3.** Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных в результате ПЦР-анализа в районах вирусных генов A35R, A56R, B8R, C3L, N1L и J2R.

0 – ПЦР-продукт, полученный при использовании геномной ДНК исходного штамма VACΔ6; 15 – ПЦР-продукт, полученный при использовании геномной ДНК штамма VACΔ6 после 15 пассажей на культуре клеток 4647; М – ДНК-маркер; «+» – ПЦР-продукт, полученный при использовании ДНК VAC LIVP; «-» – отрицательный контроль.

выделенную из чистой культуры 4647, в качестве положительного контроля использовали ДНК VAC LIVP. Теоретически рассчитанные длины фрагментов ДНК, получаемых в результате ПЦР с применением специфичных пар праймеров, приведены в табл. 2. Результаты электрофоретического анализа полученных ампликонов (рис. 3) свидетельствуют о том, что после 15 пассажей производственного штамма вируса VACΔ6 на культуре клеток 4647 длины ПЦР-продуктов соответствуют теоретически рассчитанным величинам и не отличаются по этому параметру от ПЦР-продуктов, полученных с ДНК производственного штамма VACΔ6 до пассирования.

Секвенирование шести фрагментов ДНК, соответствующих районам нарушаемых генов VACΔ6, показало, что после 15 пассажей в культуре клеток 4647 все последовательности вирусной ДНК остались неизменными.

#### Обсуждение

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VAC) входит в состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Представители данного рода являются крупнейшими вирусами млекопитающих, их ДНК-геном содержит около 200 генов. Поксвирусы размножаются в цитоплазме клеток, и продукты многочисленных вирусных генов осуществляют контроль репликации вирусной ДНК, транскрипции и трансляции вирусных генов. Кроме того, множество генов участвует в регулировании противовирусного иммунного ответа, круга чувствительных хозяев, патогенности и других свойств этих вирусов. Наиболее изучен ортопоксвирус VAC, он сыграл решающую роль



в качестве живой вакцины при глобальной ликвидации натуральной оспы (Shchelkunov, Shchelkunova, 2020).

Противооспенные вакцины на основе разных штаммов VAC умеренно реактогенны, но при массовой вакцинации вызывают у людей в небольшом проценте случаев тяжелые побочные реакции, иногда завершающиеся летальным исходом. Поэтому после подтверждения ликвидации натуральной оспы в 1980 г. ВОЗ настоятельно рекомендовала прекратить противооспенную вакцинацию (Smallpox and its Eradication, 1988).

Остановка этой вакцинации привела к тому, что в настоящее время практически все человечество утратило иммунную защиту не только от натуральной оспы, но и от других зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека, таких как оспа обезьян и оспа коров. Особые опасения вызывает оспа обезьян, клинические проявления которой у людей напоминают натуральную оспу. Все это выдвинуло на повестку дня вопрос о необходимости создания современными методами новых безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций.

Нами реализован подход по введению методами генетической инженерии направленных делеций (инактивации) по индивидуальным генам вирулентности VAC без нарушения функций репликации вируса в клетках млекопитающих (Yakubitskiy et al., 2015). Используемая процедура временной доминантной селекции при инаktivации каждого избранного вирусного гена осуществляется в процессе множественных пересевов и клонирований вируса в культуре клеток. Отбор создаваемых вариантов VAC проводится на основе данных ПЦР в целевом районе вирусного генома. При этом до появления современных методов полногеномного секвенирования вся последовательность нуклеотидов крупной ДНК VAC не контролировалась. Соответственно не было ответа на вопрос, как такие множественные пассажи VAC в культуре клеток могут сказаться на стабильности вирусного генома в целом.

Впервые на примере получения штамма VACΔ6, у которого было инаktivировано шесть генов в разных районах вирусного генома, нами проведено полногеномное секвенирование исходного клонового варианта VAC LIVP, вакцинного штамма VACΔ6 и пяти промежуточных вариантов вируса с последовательно нарушенными целевыми генами (см. рис. 2). Сравнительный анализ полных вирусных геномов показал, что помимо целевых нарушений спонтанно произошли только две нуклеотидные замены при получении VACΔ4 из штамма VACΔ3 и сохранившиеся в геноме VACΔ5 и VACΔ6. При этом обе нуклеотидные замены находятся в межгенных участках (позиции 1431 и 189738 относительно исходного штамма LIVP). Эти результаты демонстрируют, что использованная процедура временной доминантной селекции не вносит существенных незапланированных изменений в вирусный геном. По-видимому, это указывает также на то, что исходный VAC LIVP адаптирован к размножению в культуре клеток CV-1 и поэтому стабильно сохраняет целостность своего генома в условиях выполненного эксперимента.

Культивирование VAC, являющегося вирусом млекопитающих, в гетерологичной первичной культуре клеток птиц (фибробластах куриных эмбрионов), по-видимому, оказывает большое селективное давление на данный вирус

и приводит при множественных пассажах к значительным изменениям в вирусном геноме, что установлено для варианта MVA (Volz, Sutter, 2017).

При использовании VACΔ6 в качестве безопасной живой вакцины для массовой вакцинации необходимо полученный штамм подвергать многим циклам размножения в аттестованной для этих целей культуре клеток. При этом важнейшим критерием является сохранение аттенуированного фенотипа/генотипа вакцинного штамма при такой масштабной наработке вируса. В связи с этим в соответствии с «Руководством по проведению клинических исследований лекарственных средств...» (2012) осуществлено 15 последовательных циклов заражения монослоя культуры клеток 4647 производственным штаммом вируса VACΔ6. ПЦР-анализ и секвенирование шести фрагментов ДНК, соответствующих районам нарушаемых генов VACΔ6, показали, что после 15 пассажей в культуре клеток 4647 последовательности вирусной ДНК в этих районах остались неизменными.

## Заключение

Таким образом, полученные результаты демонстрируют высокую генетическую стабильность исследованных рекомбинантных штаммов при длительной пассажной истории на культурах клеток CV-1 и 4647. Это важная положительная характеристика рекомбинантного штамма VACΔ6 как стабильного вакцинного штамма для получения живой противооспенной вакцины четвертого поколения.

## Список литературы / References

- Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К, 2012.  
[Guidelines for Clinical Trials of Medicinal Products (Immunobiological Medicinal Products). Part 2. Moscow: Grif and K Publ., 2012. (in Russian)]
- Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses*. 2018; 10(3):101. DOI 10.3390/v10030101.
- Blanchard T.J., Alcamí A., Andrea P., Smith G.L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* 1998;79(Pt. 5):1159-1167. DOI 10.1099/0022-1317-79-5-1159.
- Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V., Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 1998;79(Pt. 2): 347-352. DOI 10.1099/0022-1317-79-2-347.
- Eto A., Saito T., Yokote H., Kurane I., Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine*. 2015;33(45):6106-6111. DOI 10.1016/j.vaccine.2015.07.111.
- Falkner F.G., Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 1990;64(6):3108-3111. DOI 10.1128/JVI.64.6.3108-3111.1990.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(14):3059-3066. DOI 10.1093/nar/gkf436.
- Kidokoro M., Shida H. Vaccinia virus LC16m8Δ as a vaccine vector for clinical applications. *Vaccines*. 2014;2(4):755-771. DOI 10.3390/vaccines2040755.

- Kretzschmar M., Wallinga J., Teunis P., Xing S., Mikolajczyk R. Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Med.* 2006;3(8):e272. DOI 10.1371/journal.pmed.0030272.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-2079. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
- McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. The genome analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. DOI 10.1101/gr.107524.110.
- Moss B. Smallpox vaccines: Targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* 2011;239(1):8-26. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x.
- Nolen L.D., Osadebe L., Katomba J., Likofata J., Mukadi D., Monroe B., Doty J., Hughes C.M., Kabamba J., Malekani J., Bomponda P.L., Lokota J.I., Balilo M.P., Likafi T., Lushima R.S., Ilunga B.K., Nkawa F., Pukuta E., Karhemere S., Tamfum J.J., Nguete B., Wema-koy E.O., McCollum A.M., Reynolds M.G. Extended human-to-human transmission during a monkeypox outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerg. Infect. Dis.* 2016;22(6):1014-1021. DOI 10.3201/eid2206.150579.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012; 28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. Monkeypox re-emergence in Africa: a call to expand the concept and practice of One Health. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2019;17(2): 129-139. DOI 10.1080/14787210.2019.1567330.
- Robinson J.T., Thorvaldsdottir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(1):24-26. DOI 10.1038/nbt.1754.
- Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses.* 2015;7(4):1726-1803. DOI 10.3390/v7041726.
- Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine.* 2011;29(Suppl. 4):D49-D53. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.05.037.
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003756. DOI 10.1371/journal.ppat.1003756.
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. Genes that control vaccinia virus immunogenicity. *Acta Naturae.* 2020;12(1):33-41. DOI 10.32607/actanaturae.10935.
- Singh R.K., Balamurugan V., Bhanuprakash V., Venkatesan G., Hosamani M. Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: global scenario and perspectives. *Indian J. Virol.* 2012;23(1):1-11. DOI 10.1007/s13337-012-0068-1.
- Smallpox and its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988.
- Volz A., Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara. History, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* 2017;97:187-243. DOI 10.1016/bs.aivir.2016.07.001.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae.* 2015;7(4):113-121. DOI 10.32607/20758251-2015-7-4-113-121.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Highly immunogenic variant of attenuated vaccinia virus. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016;466:35-38. DOI 10.1134/S1607672916010105.

#### ORCID ID

S.N. Yakubitskiy orcid.org/0000-0002-0496-390X  
S.N. Shchelkunov orcid.org/0000-0002-6255-9745

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.12.2021. После доработки 09.03.2022. Принята к публикации 14.03.2022.