

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-143-149

УДК 616.98:578.833.2

А.В. Семенова¹, Г.Ф. Сиволобова¹, А.А. Гражданцева¹, С.А. Пьянков¹, И.С. Шульгина^{1,2},
О.С. Таранов¹, О.В. Пьянков¹, Д.В. Антонен¹, Л.И. Карпенко¹, Е.В. Старостина¹, М.Б. Боргоякова¹,
А.Н. Чикаев³, Е.В. Гаврилова¹, Р.А. Максюттов¹, Г.В. Кочнева¹

ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО КАСSETу ГЕНОВ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА МАРБУРГ

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Российская Федерация;

³ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Цель исследования – создание высокоиммуногенной вакцинной конструкции на основе рекомбинантного варианта репликативно-дефектного штамма вируса осповакцины MVA, экспрессирующего вирусоподобные частицы, имитирующие природную инфекцию вирусом Марбург. **Материалы и методы.** Рекомбинантный вирус получали путем рекомбинации между гомологичными последовательностями вирусной ДНК и инсерционной плазмиды pDel2-GP-VP-Pat, которая несет трансгены структурных белков GP и VP40 вируса Марбург, фланкированные фрагментами генома штамма MVA. Структуру рекомбинантного вируса подтверждали методами ПЦР и секвенирования, экспрессию трансгенов анализировали методом Вестерн-блот, формирование вирусоподобных частиц фиксировали с помощью электронной микроскопии. Оценку иммуногенности и протективности проводили на модели морских свинок. Титр антител определяли в иммуноферментном анализе. Для оценки Т-клеточного ответа использовали метод внутриклеточного окрашивания цитокинов с последующим анализом образцов на проточном цитофлуориметре. **Результаты и обсуждение.** На основе высокоаттенуированного штамма MVA вируса осповакцины сконструирован рекомбинантный вариант MVA-GP-VP40-MARV, несущий в районе делеции II генома кассету трансгенов GP и VP40 вируса Марбург. Показана экспрессия трансгенов в пермиссивных для MVA клетках CER, инфицированных рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV, и секреция белков GP и VP40 вируса Марбург в культуральную среду. Электронно-микроскопический анализ выявил наличие вирусоподобных частиц вируса Марбург в культуральной среде клеток начиная с 12 часов после инфицирования. Двукратная вакцинация морских свинок рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV в дозе 10⁸ БОЕ/животное индуцировала формирование антител к вирусу Марбург и вирусу осповакцины, а также 100 % защиту от летальной инфекции вирусом Марбург (50 ЛД₅₀). С использованием оригинального программного обеспечения TEpredict предсказана структура Т-хелперных эпитопов белка GP вируса Марбург. С помощью метода ICS экспериментально подтверждена биологическая активность этих эпитопов и показано, что они обеспечивают индукцию Т-клеточного иммунного ответа в составе вакцинной конструкции MVA-GP-VP40-MARV.

Ключевые слова: штамм MVA вируса осповакцины, вирусоподобные частицы (ВПЧ), вирус Марбург (MARV), поверхностный гликопротеин (GP), вирионный белок VP40, внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS).

Корреспондирующий автор: Семенова Анастасия Викторовна, e-mail: tkacheva_av@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Семенова А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Пьянков С.А., Шульгина И.С., Таранов О.С., Пьянков О.В., Антонен Д.В., Карпенко Л.И., Старостина Е.В., Боргоякова М.Б., Чикаев А.Н., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А., Кочнева Г.В. Иммуногенные и протективные свойства рекомбинантного штамма вируса осповакцины, экспрессирующего кассету генов структурных белков вируса Марбург. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:143–149. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-143-149

Поступила 26.05.2021. Отправлена на доработку 02.06.2021. Принята к публ. 26.07.2021.

A.V. Semenova¹, G.F. Sivolobova¹, A.A. Grazhdantseva¹, S.A. P'yankov¹, I.S. Shul'gina^{1,2},
O.S. Taranov¹, O.V. P'yankov¹, D.V. Antonets¹, L.I. Karpenko¹, E.V. Starostina¹, M.B. Borgoyakova¹,
A.N. Chikaev³, E.V. Gavrilova¹, R.A. Maksyutov¹, G.V. Kochneva¹

Immunogenic and Protective Features of the Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Cassette of Genes of Marburg Virus Structural Proteins

¹State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation;

²Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russian Federation;

³Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to create a highly immunogenic vaccine construct based on a recombinant variant of a replication-defective MVA strain of vaccinia virus, expressing virus-like particles that mimic natural infection with Marburg virus. **Materials and methods.** The recombinant virus was obtained through recombination between homologous viral DNA sequences and the insertion plasmid pDel2-GP-VP-Pat which carries transgenes of the structural proteins GP and VP40 of Marburg virus, flanked by fragments of MVA strain genome. Structure of the recombinant virus was confirmed in PCR and using sequencing, transgenes expression was analyzed by Western blotting, virus-like particles formation was recorded using electron microscopy. Evaluation of immunogenicity and protectivity was carried out using a guinea pig model. The antibody titer was determined in enzyme-linked immunosorbent assay. To assess T-cell response, the intracellular staining of cytokines was used, followed by analysis of samples on a flow cytometer. **Results and discussion.** On the basis of highly attenuated MVA strain of vaccinia virus a recombinant variant

MVA-GP-VP40-MARV has been constructed, carrying a cassette of transgenes, GP and VP40, of Marburg virus in the region of deletion II of the genome. The expression of transgenes in MVA-permissive CER cells infected with recombinant MVA-GP-VP40-MARV strain and secretion of GP and VP40 proteins into culture medium have been demonstrated. Electron microscopy analysis has revealed the presence of Marburg virus-like particles in the culture medium of cells 12 hours after infection. Double vaccination of guinea pigs with MVA-GP-VP40-MARV strain at a dose of 10^8 PFU/animal induced the formation of antibodies to Marburg and vaccinia viruses, as well as 100 % protection against lethal Marburg virus infection (50 LD_{50}). Using original TEpredict software, the structure of T-helper epitopes of GP protein has been predicted. Using the ICS method, the biological activity of these epitopes has been experimentally confirmed and it was shown that they provide the induction of a T-cell immune response as part of the MVA-GP-VP40-MARV vaccine construct.

Key words: MVA strain of vaccinia virus, virus-like particles (VLP), Marburg virus (MARV), surface glycoprotein (GP), virion protein VP40, intracellular cytokine staining (ICS).

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Anastasiya V. Semenova, e-mail: tkacheva_av@vector.nsc.ru.

Citation: Semenova A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., P'yankov S.A., Shul'gina I.S., Taranov O.S., P'yankov O.V., Antonets D.V., Karpenko L.I., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Chikaev A.N., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Kochneva G.V. Immunogenic and Protective Features of the Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Cassette of Genes of Marburg Virus Structural Proteins. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:143–149. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-143-149

Received 26.05.2021. Revised 02.06.2021. Accepted 26.07.2021.

Semenova A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7767-0537>
Sivolobova G.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8362-0314>
Grazhdantseva A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7712-3699>
P'yankov S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>
Shul'gina I.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6850-338X>
Taranov O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
P'yankov O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>
Antonets D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1823-9701>

Karpenko L.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4365-8809>
Starostina E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1733-9524>
Borgoyakova M.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0768-1561>
Chikaev A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5423-3457>
Gavrilova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7118-5749>
Maksyutov R.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>
Kochneva G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2420-0483>

Проблема создания эффективных вакцин против особо опасных филовиральных инфекций, к которым относится вирус Марбург (Marburg virus, MARV), остается нерешенной в настоящее время. Перспективную вакцинную платформу представляет использование безопасного вирусного вектора, экспрессирующего непатогенные вирусоподобные частицы (ВПЧ), имитирующие вирионы вируса Марбург. Такая платформа широко используется за рубежом, в том числе и при разработке вакцин против инфекций, вызываемых вирусами Эбола [1] и Марбург [2].

В качестве высокоперспективного вируса-вектора мы предлагаем использовать штамм MVA вируса осповакцины (VACV), который является репликативно-дефектным штаммом для клеток человека. На различных доклинических моделях показано, что векторные вакцины на основе рекомбинантных штаммов MVA являются безопасными, высокоиммуногенными и обладают хорошими защитными свойствами [3].

Для продукции ВПЧ вируса Марбург в составе рекомбинантного вируса осповакцины (штамм MVA) необходимо произвести вставку в вирусный геном кассеты из генов нескольких структурных белков MARV. Основную роль в формировании ВПЧ играет матриксный вирионный белок VP40 MARV, который обладает способностью к самосборке и почкованию на мембране клетки [4]. Включение в ВПЧ поверхностного гликопротеина GP MARV является обязательным условием, поскольку он несет основные протективно значимые детерминанты вируса. Возможно также включение в состав экспрессируемой кассеты гена нуклеопротеина NP MARV, кото-

рый выполняет роль внутреннего каркаса (кора), однако данные о его роли в сборке ВПЧ носят противоречивый характер [5].

Целью настоящего исследования являлось создание высокоиммуногенной вакцинной конструкции на основе репликативно-дефектного штамма вируса осповакцины MVA, экспрессирующего вирусоподобные частицы, имитирующие природную инфекцию вирусом Марбург. Для реализации этой цели сконструирован рекомбинантный вариант MVA со встройкой кассеты генов GP-VP40 MARV и показана его 100 % протективность в отношении летальной инфекции морских свинок вирусом Марбург.

Материалы и методы

Штамм MVA получен из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, где он депонирован под номером V-713. Геномная последовательность музейного штамма MVA соответствует депонированной в GenBank под номером AY603355.1. Нами разработана система культивирования штамма MVA в клетках CER из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, которые являются гибридом клеток почки сирийского хомячка и куриных фибробластов.

Для определения концентрации (титра) вируса использовали метод бляшек. Бляшки получали на инфицированном монослое клеток CER, выращенном на 12-луночных культуральных планшетах. Визуализацию бляшек проводили раствором кристаллического фиолетового (2 г/л кристаллический

фиолетовый, 5 % формальдегид, 10 % этанол). Титр вируса выражали как количество бляшкообразующих единиц на 1 мл суспензии (БОЕ/мл).

Модифицированный штамм MVA-GP-VP40-MARV получали путем рекомбинации между гомологичными последовательностями исходного штамма MVA и инсерционной плазмиды pDel2-GP-VP-Pat. Отбор рекомбинантных вариантов вируса проводили методом временной доминантной селекции. Ген устойчивости к пуромицину *pat* использовали в качестве селективного маркера [6].

Инсерционную плазмиду pDel2-GP-VP-Pat получали на базе плазмиды pDel2-Pat [6]. Ген, кодирующий GP MARV, синтезировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы кДНК вируса Марбург и пары праймеров с заложенными в их структуру сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции *AscI* и *PmeI* для клонирования в pDel2-Pat под контроль ранне-позднего синтетического промотора вируса осповакцины PE/L. Ген, кодирующий белок VP40 MARV, получали также методом ПЦР с использованием пары праймеров, которые содержат сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *BamHI* и *EcoRI*, что обеспечивает вставку гена VP40 MARV в плазмиду pXJP5.2 под контроль природного промотора P7,5 VACV [7]. Полученный оперон P7,5-VP40 MARV на втором этапе конструирования переносили в плазмиду pDel2-Pat с использованием эндонуклеаз рестрикции *EcoRV* и *NotI*.

Отбор рекомбинантных штаммов проводили ПЦР-анализом ДНК клонов с использованием пар праймеров, специфичных к участкам генома MVA, фланкирующим район встройки (делеция II): MVA_F1 5'-CATGCTACTACCTTCGGGTAAG и MVA_R7 5'-TGCGTCTAGTATGTACGTTGTT [6]. После двойного реклонирования проводили верификацию структуры ДНК рекомбинантного штамма с помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS) на платформе MiSEQ.

Экспрессию клонированных трансгенов в рекомбинантном варианте вируса Марбург оценивали методом Вестерн-блот. Для выявления GP MARV использовали коммерческие антитела, полученные на усеченный рекомбинантный белок (без трансмембранного домена) вируса Марбург (IBT Bioservices 0303-007). В качестве положительного контроля использовали recombinant MMARV GPdTM (IBT Bioservices 0503-001). Для иммунодетекции белка VP40 использована поликлональная анти-VP40 сыворотка мыши и рекомбинантный белок VP40 MARV, полученный в клетках *Escherichia coli* (любезно предоставлены Д.Н. Щербаковым).

Для подтверждения формирования ВПЧ вируса Марбург, продуцируемых штаммом MVA-GP-VP40-MARV, проведен электронно-микроскопический анализ. Монослой клеток CER инфицировали рекомбинантным и исходным штаммами MVA с множественностью 0,02 БОЕ/клетка. Инкубировали 12 ча-

сов, культуральную среду собирали и концентрировали ее с использованием Centrifugal Filter Units (Millipore) Ultracel-100K до уменьшения объема в 10 раз. Материал фиксировали добавлением равного объема 8 % раствора параформальдегида и наносили на медные сеточки, покрытые пленкой-подложкой из формвара и стабилизированные углеродом. Препараты дополнительно окрашивали 1 или 2 % водным раствором уранилацетата по общепринятой методике [8]. Образцы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотосъемка проводилась цифровой камерой Veleta (SIS, Германия). Анализ и обработка изображения осуществлялись с помощью программного пакета iTEM (SIS, Германия) [8].

Определение иммуногенности и протективности полученного штамма MVA-GP-VP40-MARV проводили на аутбредных морских свинках массой 200–250 г из питомника лабораторных животных ГНЦ ВБ «Вектор». Все эксперименты на животных проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утвержденными Биоэтическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор». Морских свинок иммунизировали рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV внутримышечно в дозе 10^8 БОЕ/животное дважды с интервалом в четыре недели. Для оценки протективности животных через четыре недели после второй иммунизации инфицировали вирусом Марбург в дозе 50 ЛД₅₀ (ЛД₅₀ – доза, летальная для 50 % тест-животных). Инфицированных животных наблюдали в течение 24 дней.

Титр антител к вирусу Марбург и вирусу осповакцины определяли в сыворотках крови иммунизированных морских свинок методом непрямого двухстадийного иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигена-сорбента использовали цельновирионные препараты MARV и VACV, очищенные центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Детекцию иммунных комплексов «антиген-IgG» осуществляли пероксидазным конъюгатом антител кролика против IgG морской свинки и визуализацией тетраметилбензидином (ТМБ) в цитрат-фосфатном растворе с перекисью водорода. Забор крови из сердца морских свинок осуществляли после премедикации раствором золетила (Valdepharm, Франция) через четыре недели после второй иммунизации.

Оценку клеточного иммунитета проводили через три недели после второй иммунизации [9]. Для оценки Т-клеточного ответа использовали метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (intracellular cytokine staining, ICS), который проводили в соответствии со стандартным протоколом, как описано в [10]. В качестве источника Т-клеток использовали спленоциты, полученные стандартным методом из селезенок морских свинок [9], а в качестве индикаторного цитокина – интерферон-гамма (ИФН γ). Стимуляцию спленоцитов проводили смесью синтетических пептидов, представляющих потенциаль-

ные CD4⁺ Т-клеточные эпитопы белков GP и VP40 вируса Марбург. Предсказание эпитопов проводили с использованием программного обеспечения TEpredict [10]. Пептиды синтезированы в Elabscience Biotechnology Co., Ltd (Wuhan, Китай), чистота $\geq 90,0\%$. В работе использовали девять пептидов, четыре из которых представляют Т-хелперные эпитопы белка VP40 MARV, а пять – белка GP MARV. Для стимуляции спленоцитов пептиды объединили в две группы, соответствующие белкам VP40 и GP, и добавляли в концентрации 20 мкг/мл каждого пептида на 10^6 клеток. После стимуляции клетки окрашивали моноклональными антителами PEAnti-guinea pig CD4 (MA1-81852, ThermoFisher Scientific) и PF647P Anti-guinea pig IFN-gamma (MT4A27, MabtechAB). Образцы анализировали на проточном цитометре FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США) с использованием программного обеспечения Everest.

Результаты и обсуждение

Для получения рекомбинантного штамма MVA сконструирована базовая плаزمиды интеграции pDel2-GP-VP-Pat, обеспечивающая вставку трансгенов в район делеции II генома MVA, не существенный для репродукции вируса. Плазмиды pDel2-GP-VP-Pat содержит последовательности,

фланкирующие район делеции II MVA, между которыми расположены высокоэффективные ранне-поздние промоторы VACV и полилинкер для встройки трансгенов. Также в плазмиду pDel2-GP-VP-Pat дополнительно введен доминантный селективный маркер для получения рекомбинантных вирусов – ген устойчивости к пуромину *pat* под контролем промотора VACV [6].

Схема генома сконструированного рекомбинантного штамма MVA со встройкой кассеты генов GP-VP40-MARV представлена на рис. 1, А. Секвенирование ДНК штамма MVA-GP-VP40-MARV показало, что в районе встройки кассеты GP-VP40-MARV имеется делеция С-концевой части гена GP (129 п.н.), которая включает трансмембранный домен белка (90 п.н.) и цитоплазматический «хвост» (24 п.н.). В результате этой делеции сдвига рамки трансляции не произошло, а новый стоп-кодон образовался через восемь аминокислот от начала делетированного участка.

Результаты Вестерн-блот-анализа представлены на рис. 1, В. Анализ экспрессии трансгенов проводили в перmissive для MVA культуре клеток CER. Как следует из рисунка, в культуральной среде инфицированных рекомбинантным штаммом клеток выявляется зрелая форма GP в виде двух расщепленных полипептидов GP1 массой 160 кДа и GP2 – 38 кДа. В лизатах инфицированных клеток выявля-

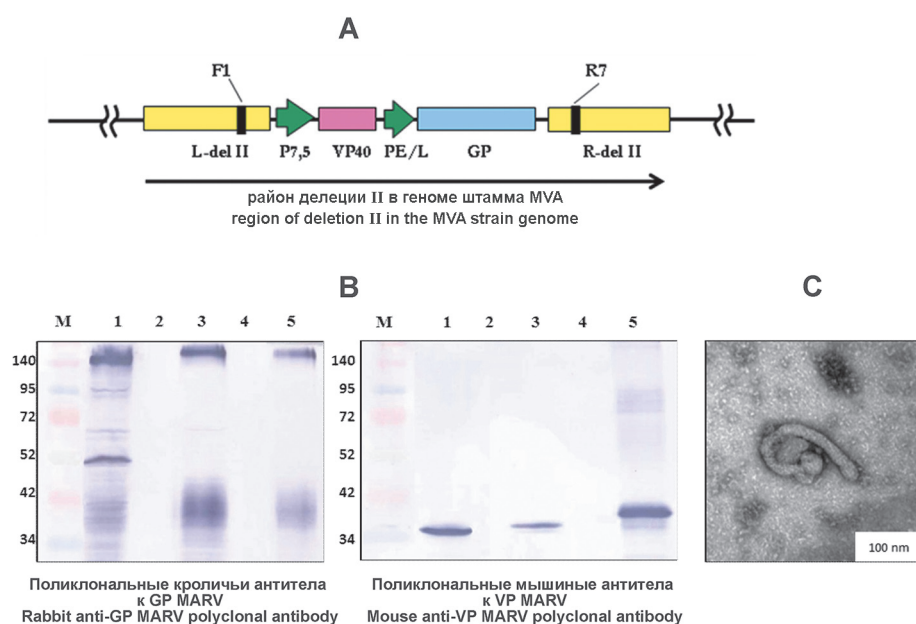


Рис. 1. Характеристики рекомбинантного штамма MVA-GP-VP40-MARV:

A – схема генома штамма MVA-GP-VP40-MARV, на которой указаны позиции праймеров, использованных в ПЦР-анализе. **B** – Вестерн-блот-анализ экспрессии кассеты генов GP-VP40 MARV в составе рекомбинантного MVA: *M* – контроль молекулярных весов Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, 26634); 1 – лизат клеток CER, инфицированных MVA-GP-VP40-MARV; 2 – лизат клеток CER, инфицированных MVA; 3 – культуральная среда клеток CER, инфицированных MVA-GP-VP40-MARV; 4 – культуральная среда клеток CER, инфицированных MVA; 5 – положительные контроли GP (слева) и VP40 (справа). **C** – электронно-микроскопический анализ ВПЧ в культуральной среде клеток CER, инфицированных рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV

Fig. 1. Characteristics of the recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV:

A – the genome of MVA-GP-VP40-MARV with the positions of the primers used in PCR analysis of recombinant viral DNA; **B** – Western blot analysis of GP-VP40 MARV gene cassette expression in recombinant MVA: *M* – control of molecular weights Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, 26634); 1 – cell lysates infected with MVA-GP-VP40-MARV; 2 – cell lysates infected with MVA; 3 – culture medium of CER cells infected with MVA-GP-VP40-MARV; 4 – culture medium of CER cells infected with MVA; 5 – positive controls of purified recombinant GP protein (to the left) and VP40 MARV (to the right). **C** – electron microscopy analysis of VLP in the culture medium of CER cells infected with the recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV

ются частично гликозилированные и расщепленные формы GP. Поскольку матриксный белок VP40 не содержит сайтов гликозилирования, он выявляется в виде белка с молекулярной массой 40 кДа как в культуральной среде инфицированных рекомбинантным вирусом клеток, так и в лизатах данных клеток.

Из данных Вестерн-блот-анализа можно сделать вывод, что происходит секреция ВПЧ вируса Марбург, поскольку оба белка GP и VP40 MARV регистрируются в культуральной среде клеток. Электронно-микроскопический анализ образцов среды клеток, инфицированных рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV, подтверждает эту гипотезу: выявлено большое количество ВПЧ с характерной формой вирионов MARV размером 35–40 нм × 700–900 нм (рис. 1, С).

Оценку иммуногенности и протективности штамма MVA-GP-VP40-MARV проводили на морских свинках, которые чувствительны к летальной инфекции вирусом Марбург. На рис. 2, А представлена выживаемость животных в иммунизированной (опытной) и контрольной группах после инфекции вирусом Марбург в дозе 50 ЛД₅₀. Инфицированных животных наблюдали в течение 24 дней (инкубационный период для лихорадки Марбург). Все животные контрольной группы погибли на 8–14-й день после инфекции, в то время как все животные опытной группы выжили без каких-либо признаков заболевания.

Как следует из рис. 2, В, ИФА образцов сывороток, полученных через четыре недели после двукратной иммунизации морских свинок рекомбинантным вариантом MVA-GP-VP40-MARV, показал наличие антител к вирусу Марбург в титрах от 1:1600 до 1:6400, а антител к вирусу осповакцины – от 1:12800 до 1:102400. Известно, что вирус осповак-

цины формирует перекрестный иммунный ответ на разные ортопоксвирусы, включая высокопатогенные для человека вирус натуральной оспы и вирус оспы обезьян [11]. Таким образом, иммунизация штаммом MVA-GP-VP40-MARV обеспечивает защиту и против этих инфекций.

С целью оценки Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного рекомбинантом MVA-GP-VP40-MARV, проведен анализ структуры генов GP и VP40 MARV с использованием оригинального программного обеспечения TEpredict [10] и предсказана структура пептидов, содержащих Т-хелперные эпитопы этих белков (таблица). Несмотря на то, что программа TEpredict не предназначена для предсказания эпитопов, рестриктированных молекулами МНСII класса морской свинки, мы провели предсказание нонамерных пептидов, способных связываться с наиболее широким спектром алломорф молекул МНСII класса (promiscuous binders), и выбрали фрагменты длиной 16–25 аминокислотных остатков, содержащие несколько таких эпитопов.

Пептиды разделили на две группы, соответствующие белкам VP40 (пептиды 1–4) и GP (пептиды 5–9), и использовали в виде соответствующих смесей для стимуляции спленоцитов вакцинированных морских свинок. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

Как следует из рис. 3, статистически значимое увеличение количества ИФНγ-продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов по сравнению с контролем ($p < 0,01$) зарегистрировано только при стимуляции спленоцитов смесью пептидов белка GP MARV (пептиды 5–9). Полученные данные свидетельствуют о способности рекомбинантной вакцины MVA-GP-VP40-MARV индуцировать не только гуморальное, но и клеточное звено иммунитета против

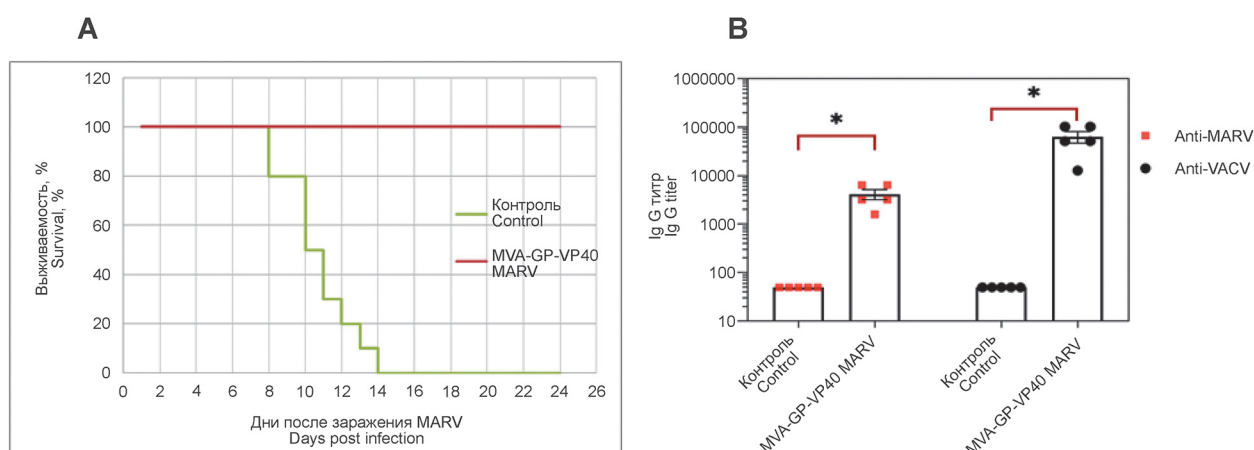


Рис. 2. Оценка протективности (А) и иммуногенности (В) рекомбинантного вируса MVA-GP-VP40-MARV на модели морских свинок:

В – статистическую значимость оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони; * – различия достоверны при $p < 0,05$. Порог детекции антител – разведение сыворотки 1:40

Fig. 2. Evaluation of the protectivity (А) and immunogenicity (В) of the recombinant virus MVA-GP-VP40-MARV using guinea pig model:

В – P values were determined by 1-way ANOVA followed by Bonferroni post-test; * – differences are significant at $p < 0.05$. The antibody detection limit is serum dilution 1:40

Предсказанные CD4+ Т-хелперные эпитопы белков GP и VP40 вируса Марбург
Predicted CD4+ T-helper epitopes of the GP and VP40 proteins of Marburg virus

№ пептида Peptide No.	Белок Protein	Пептид Peptide	Фрагмент Fragment	Количество эпитопов Number of epitopes	Количество алломорф Number of allomorph
1	VP40	NYNTYMQYLNPPPYADHGA	6–24	3	17
2	VP40	GVPAPWLPLGIMSNFEYPLAH	79–98	4	17
3	VP40	EKTSLEFRISLPADMFSVKE	242–260	2	45
4	VP40	PLNGFNNRQVVLAYANPTLS	282–301	5	24
5	GP	LHLWGAFFLYDRIASTTMYRG	137–157	5	29
6	GP	IVNKTVHKMIFSRQGGQYRH	169–188	3	31
7	GP	TQHLVYFRKKRSILWREGDM	425–444	4	36
8	GP	ARLRRLANQTAKSLEL	557–572	2	28
9	GP	LLLRVTTEERTFSLINRHAI	571–590	3	11

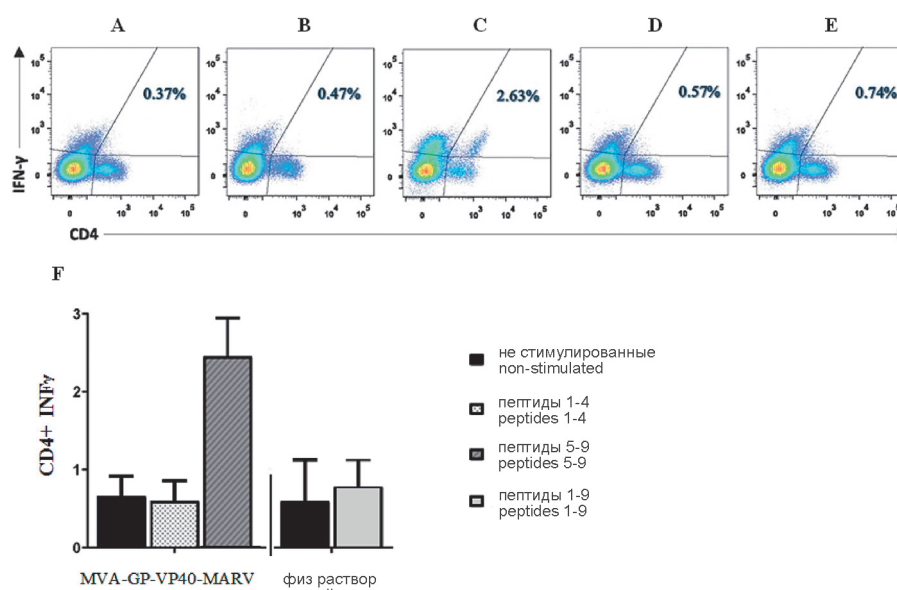


Рис. 3. Результаты анализа вирус-специфического Т-клеточного ответа морских свинок, иммунизированных рекомбинантом MVA-GP-VP40-MARV (n=5) с использованием метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS):

A – E – представлены типичные плоты (диаграммы) CD4+ Т-лимфоцитов животных, иммунизированных MVA-GP-VP40-MARV (A, B, C) или физ. раствором (D, E), полученные с помощью проточного цитофлуориметра. На каждом плоте процентное содержание IFN-γ указано в правом верхнем углу; A, D – нестимулированные CD4+ лимфоциты; B – CD4+ лимфоциты, стимулированные пулом пептидов 1–4; C – CD4+ лимфоциты, стимулированные пулом пептидов 5–9; E – CD4+ лимфоциты, стимулированные пулом пептидов 1–9; F – графическое изображение полученных результатов. По оси Y отложен процент CD4+ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0. Данные представлены как среднее значение ± среднее квадратичное отклонение

Fig. 3. Results of virus-specific T-cell response in guinea pigs immunized with the recombinant MVA-GP-VP40-MARV (n=5) using the method of intracellular cytokine staining (ICS):

A – E – representative rafts (diagrams) of CD4+ T-lymphocytes from animals immunized with MVA-GP-VP40-MARV (A, B, C) or saline (D, E), obtained with the help of flow cytometer. On each raft, the percentage of IFN-γ is indicated in the upper right corner; A, D – un-stimulated CD4+ lymphocytes; B – CD4+ lymphocytes stimulated by a pool of peptides 1–4; C – CD4+ lymphocytes stimulated by a pool of peptides 5–9; E – CD4+ lymphocytes stimulated by a pool of peptides 1–9; F – graphical image of the results obtained. The y-axis is the percentage of CD4+ T-lymphocytes producing IFN-γ. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 software. Data are presented as mean ± standard deviation

инфекции MARV. Кроме того, нам удалось экспериментально подтвердить биологическую активность Т-хелперных эпитопов белка GP MARV, которые входят в состав группы пептидов 5–9, предсказанных с помощью программы TEPredict.

Сконструированный нами рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-MARV является перспективным вакцинным штаммом, обеспечивающим 100 % защиту от летальной дозы MARV. Штамм MVA-GP-VP40-MARV кроме индукции гуморального и кле-

точного иммунного ответа на вирус Марбург формирует иммунитет и против ортопоксвирусов, включая вирус оспы обезьян [11]. Эта инфекция также чрезвычайно важна для эндемичных в отношении филовирюсов районов Африканского континента. Вспышки оспы обезьян регулярно регистрируются в Африке, в частности в октябре 2016 г. Всемирная организация здравоохранения зарегистрировала более 20 случаев оспы обезьян в Центральноафриканской Республике. Созданный рекомбинантный вариант

VACV может рассматриваться как бивалентная вакцина против вирусов Марбург и оспы обезьян, что представляется целесообразным в связи с высоким пересечением ареалов распространения этих вирусов и опасностью двойного инфицирования.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Lázaro-Frías A., Gómez-Medina S., Sánchez-Sampedro L., Ljungberg K., Ustav M., Liljeström P., Muñoz-Fontela C., Esteban M., García-Arriaza J. Distinct immunogenicity and efficacy of poxvirus-based vaccine candidates against Ebola virus expressing GP and VP40 proteins. *J. Virol.* 2018; 92(11):e00363-18. DOI: 10.1128/JVI.00363-18.
2. Malherbe D.C., Domi A., Hauser M.J., Meyer M., Gunn B.M., Alter G., Bukreyev A., Guirakhoo F. Modified vaccinia Ankara vaccine expressing Marburg virus-like particles protects guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *NPJ Vaccines.* 2020; 5:78. DOI: 10.1038/s41541-020-00226-y.
3. 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/b.s.aivir.2016.07.001.
4. Kolesnikova L., Bohil A.B., Cheney R.E., Becker S. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol.* 2007; 9(4):939–51. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00842.x.
5. Dye J.M., Warfield K.L., Wells J.B., Unfer R.C., Shulenin S., Vu H., Nichols D.K., Aman M.J., Bavari S. Virus-like particle vaccination protects nonhuman primates from lethal aerosol exposure with Marburgvirus (VLP vaccination protects macaques against aerosol challenges). *Viruses.* 2016; 8(4):94. DOI: 10.3390/v8040094.
6. Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Шевелев О.Б., Разумов И.А., Завьялов Е.Л., Локтев В.Б., Кочнева Г.В. Таргетная терапия глиобластомы человека с использованием онколитического потенциала парвовируса и аттенуированных штаммов вируса осповакцины. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2019; 37(2):83–91. DOI: 10.17116/molgen20193702183.
7. Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Shvalov A.N., Unusova A.Yu., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. Model of artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for the examination of oncolytic activity of the vaccinia virus. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016; 6(4):469–76. DOI: 10.1134/S2079059716040109.
8. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубичский С.Н., Филатов П.В. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*). *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(6):291–7. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297.
9. Srivastava R., Roy S., Coulon P.-G., Vahed H., Prakash S., Dhanushkodi N., Kim G.J., Fouladi M.A., Campo J., Teng A.A., Liang X., Schaefer H., BenMohamed L. Therapeutic mucosal vaccination of herpes simplex virus 2-infected guinea pigs with ribonucleotide reductase 2 (RR2) protein boosts antiviral neutralizing antibodies and local tissue-resident CD4+ and CD8+ TRM cells associated with protection against recurrent genital herpes. *J. Virol.* 2019; 93(9):e02309-18. DOI: 10.1128/JVI.02309-18.
10. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0116412. DOI: 10.1371/journal.pone.0116412.
11. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D.L., Hughes L.J., Satheshkumar P.S., Townsend M.B., Kondas A.V., Reed Z., Weiner Z., Olson V.A., Hammarlund E., Raue H.-P., Slifka M.K., Slaughter J.C., Graham B.S., Edwards K.M., Eisenberg R.J., Cohen G.H., Joyce S., Crowe J.R. Jr. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell.* 2016; 167(3):684–694.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.049.

References

1. Lázaro-Frías A., Gómez-Medina S., Sánchez-Sampedro L., Ljungberg K., Ustav M., Liljeström P., Muñoz-Fontela C., Esteban M., García-Arriaza J. Distinct immunogenicity and efficacy of poxvirus-based vaccine candidates against Ebola virus expressing GP and VP40 proteins. *J. Virol.* 2018; 92(11):e00363-18. DOI: 10.1128/JVI.00363-18.
2. Malherbe D.C., Domi A., Hauser M.J., Meyer M., Gunn B.M., Alter G., Bukreyev A., Guirakhoo F. Modified vaccinia Ankara

vaccine expressing Marburg virus-like particles protects guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *NPJ Vaccines.* 2020; 5:78. DOI: 10.1038/s41541-020-00226-y.

3. 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/b.s.aivir.2016.07.001.

4. Kolesnikova L., Bohil A.B., Cheney R.E., Becker S. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol.* 2007; 9(4):939–51. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00842.x.

5. Dye J.M., Warfield K.L., Wells J.B., Unfer R.C., Shulenin S., Vu H., Nichols D.K., Aman M.J., Bavari S. Virus-like particle vaccination protects nonhuman primates from lethal aerosol exposure with Marburgvirus (VLP vaccination protects macaques against aerosol challenges). *Viruses.* 2016; 8(4):94. DOI: 10.3390/v8040094.

6. Tkacheva A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Shevelev O.B., Razumov I.A., Zav'yalov E.L., Loktev V.B., Kochneva G.V. [Targeted therapy of human glioblastoma combining the oncolytic properties of parvovirus H-1 and attenuated strains of the vaccinia virus]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2019; 37(2):83–91. DOI: 10.17116/molgen20193702183.

7. Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Shvalov A.N., Unusova A.Yu., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. Model of artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for the examination of oncolytic activity of the vaccinia virus. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016; 6(4):469–76. DOI: 10.1134/S2079059716040109.

8. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitsky S.N., Filatov P.V. [Rapid immunochemical method for the detection of orthopoxviruses (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*)]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2019; 64(6):291–7. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297.

9. Srivastava R., Roy S., Coulon P.-G., Vahed H., Prakash S., Dhanushkodi N., Kim G.J., Fouladi M.A., Campo J., Teng A.A., Liang X., Schaefer H., BenMohamed L. Therapeutic mucosal vaccination of herpes simplex virus 2-infected guinea pigs with ribonucleotide reductase 2 (RR2) protein boosts antiviral neutralizing antibodies and local tissue-resident CD4+ and CD8+ TRM cells associated with protection against recurrent genital herpes. *J. Virol.* 2019; 93(9):e02309-18. DOI: 10.1128/JVI.02309-18.

10. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0116412. DOI: 10.1371/journal.pone.0116412.

11. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D.L., Hughes L.J., Satheshkumar P.S., Townsend M.B., Kondas A.V., Reed Z., Weiner Z., Olson V.A., Hammarlund E., Raue H.-P., Slifka M.K., Slaughter J.C., Graham B.S., Edwards K.M., Eisenberg R.J., Cohen G.H., Joyce S., Crowe J.R. Jr. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell.* 2016; 167(3):684–694.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.049.

Authors:

Semenova A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., P'yankov S.A., Taranov O.S., P'yankov O.V., Antonets D.V., Karpenko L.I., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Kochneva G.V. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Shul'gina I.S. State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector"; Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation; e-mail: vector@vector.nsc.ru. Novosibirsk State Agrarian University; 160, Dobrolyubova St., Novosibirsk, 630039, Russian Federation; e-mail: rector@nsau.edu.ru.

Chikaev A.N. Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. 8/2, Academician Lavrent'ev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russian Federation. E-mail: info@mcb.nsc.ru.

Об авторах:

Семенова А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Пьянков С.А., Таранов О.С., Пьянков О.В., Антонет Д.В., Карпенко Л.И., Старостина Е.В., Боргоякова М.Б., Гаврилова Е.В., Максютков Р.А., Кочнева Г.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Шульгина И.С. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»; Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. Новосибирский государственный аграрный университет; Российская Федерация, 630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160; e-mail: rector@nsau.edu.ru.

Чикаев А.Н. Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН. Российская Федерация, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8/2. E-mail: info@mcb.nsc.ru.