

УДК: 619:616.988.27:636.4

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.1.22

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА СБОРКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ 2 СЕРОТИПА ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Галеева А.Г.<sup>1,2,3</sup> – канд. ветеринар. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией вирусных антропоозонозов (ORCID: 0000-0003-2650-6459); Ефимова М.А.<sup>1,2\*</sup> – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник (ORCID: 0000-0001-8786-1310); Закирова Е.Ю.<sup>3</sup> – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник (ORCID: 0000-0001-6750-640X); Хаммадов Н.И.<sup>1,2</sup> – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник (ORCID: 0000-0001-5669-1486); Хисамутдинов А.Г.<sup>4</sup> – начальник; Гарипов Л.Н.<sup>5</sup> – первый заместитель министра; Мингалеев Д.Н.<sup>2</sup> – врио директора, д-р ветеринар. наук, доц. (ORCID: 0000-0001-7217-4083); Равилов Р.Х.<sup>1</sup> – д-р ветеринар. наук, проф. (ORCID: 0000-0001-7210-7470).

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия  
ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана»

<sup>2</sup>ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной  
и биологической безопасности»

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

<sup>4</sup>Главное управление ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан

<sup>5</sup>Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Татарстан

\*marina-2004r@mail.ru

**Ключевые слова:** африканская чума свиней, вирус-векторная вакцина, адено-ассоциированный вирус, трансдукция, экспрессия генов

**Keywords:** african swine fever, virally vectored vaccine, adeno-associated virus, transduction, gene expression

**Финансирование:** Материалы подготовлены в рамках гранта Российского научного фонда № 22-76-00013 «Оценка эффективности векторной системы на основе аденоассоциированного вируса для доставки генов, кодирующих иммунодоминантные белки вируса африканской чумы свиней, в клетки млекопитающих» (2022-2024 гг.)

Поступила: 18.12.2023

Принята к публикации: 25.03.2024

Опубликована онлайн: 02.04.2024

### РЕФЕРАТ



Африканская чума свиней (АЧС) – высококонтагиозная вирусная болезнь представителей семейства *Suidae*, смертность в первичных очагах которой достигает 100 %. До сегодняшнего дня средства специфической профилактики АЧС не разработаны. Несмотря на то, что исследователями предложены различные методы создания кандидатных вакцин против АЧС, до сих пор актуален вопрос разработки альтернативных антигенных вариантов, обладающих низкой реактогенностью и высокой иммуногенностью. Известно, что на продук-

цию рекомбинантных аденоассоциированных вирусов – потенциальных средств доставки целевых генов вируса АЧС в клетки млекопитающих – влияет множество факторов, в частности, клеточная линия, система экспрессии, условия культивирования клеток после трансфекции и качество исходных плазмидных ДНК. В настоящей работе изложены результаты оптимизации протокола сборки рекомбинантных AAV2, несущих ген мажорного капсидного белка *B646L* вируса АЧС в качестве модельного карго. В ходе исследований установлено, что применяемый протокол позволяет достичь истинного титра вируса  $(2,45 \pm 0,17) \times 10^7$  вирусных частиц на мкл, при этом на долю полноценно собранных вирусных капсидов приходится до  $(79,3 \pm 2,3) \%$  всех геномных копий. При оценке потенциального цитопатогенного действия рекомбинантных AAV2 на целевые клетки (SPEV, МСК свиней) было выявлено, что высокие MOI (до 10000 вирусных частиц на клетку) не приводят к увеличению доли апоптотических клеток. Подтверждена функциональность разработанной конструкции на основе AAV2: в лизатах трансдуцированных клеток обнаруживался зрелый белок p72 с молекулярной массой 73 кДа, специфически реагирующий в вестерн-блоте с гипериммунной сывороткой свиньи. Полученные нами данные в совокупности подтверждают потенциал AAV2 как инструмента доставки генов вируса АЧС в клетки свиней, что делает его многообещающей основой для конструирования кандидатных вакцин.

#### ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Африканская чума свиней (АЧС) – высококонтагиозная вирусная болезнь представителей семейства *Suidae*, смертность в первичных очагах которой достигает 100 %. Широкое распространение и колоссальные экономические убытки от АЧС оказали влияние на развитие животноводства большинства стран Африки и Европы, а с 2007 года – и Российской Федерации и ряда других стран [1, 2]. По сей день эпизоотическая ситуация по АЧС в России является напряженной: распространение инфекции в регионах страны стало значительным препятствием для развития свиноводческой отрасли, что обусловлено миллиардными убытками вследствие падежа и убоя животных, радикальной ликвидации инфекции, запретом на экспорт свиноводческой продукции. Распространение АЧС с захватом все новых территорий подтверждает её опасность как трансграничного заболевания, принявшего масштабы пандемии [3, 4]. До сегодняшнего дня средства специфической профилактики АЧС не разработаны. Несмотря на то, что исследователями предложены различные методы создания кандидатных вакцин против АЧС, до сих пор актуален вопрос разработки альтернативных антигенных вариантов, обладающих низкой реактогенностью и высокой

иммуногенностью [5, 6].

Ранее нами сообщалось, что перспективным направлением исследования является разработка безопасных и эффективных векторов доставки генов, кодирующих иммунодоминантные белки вируса АЧС, на основе аденоассоциированного вируса 2 серотипа (AAV2) [7]. AAV, принадлежащий к роду *Dependoparvovirus* семейства *Parvoviridae*, изначально был обнаружен как контаминант лабораторных препаратов аденовирусов, однако в настоящее время аденоассоциированный механизм доставки генетического материала широко используется в молекулярной медицине [8]. Для его реализации геном AAV распределяют по векторизованным фрагментам ДНК, функционально дополняющим друг друга, но разобщи́нным физически (транс-комплементация) [9]. AAV обладают рядом преимуществ для применения *in vivo*: они непатогенны для человека и животных, и реверсия вируса к дикому типу не несет рисков инфицирования; AAV не интегрируется в геном организма-хозяина, что является важнейшим фактором безопасности; вирионы AAV за счет своего размера (20-22 нм) эффективнее проникают в ткани и характеризуются широким тропизмом, а в отдельных слу-

чаях способны преодолеть гематоэнцефалический барьер [10].

**Штаммы и плазмиды.** Для наработки рекомбинантных ДНК использовали штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  (Thermo Scientific, США), для сборки AAV2 – плазмиды pAAV-MCS, содержащую трансген и его регуляторные элементы, фланкированные ITR, pAAV-RC, содержащую гены *rep* и *cap*, и pHelper, содержащую гены *e2a*, *e4* и *va*, необходимые для продукции инфекционных частиц («Stratagene», США).

**Клеточные линии.** В работе использовали пакующую клеточную линию AAV293 (ATCC CRL-1573) – производную линии клеток эмбриональных почек человека HEK293, стабильно экспрессирующую ген *E1* аденовируса, а также линию HEK293 («БиолоТ», Россия), линию клеток эмбриональных почек свиньи SPEV («БиолоТ», Россия) и линию мезенхимальных стволовых клеток свиньи (МСК) (ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет).

**Создание генетической конструкции на основе AAV.** Фрагмент последовательности гена *B646L* эпизоотически значимого изолята вируса АЧС Georgia 2007/1 (Genbank ID NC\_044959.2) был *in silico* оптимизирован по кодонам, при этом в качестве оптимальных кодонов использовали наиболее часто встречающиеся кодоны организма-реципиента – свиньи. Синтезированный на аутсорсинге (ЗАО «Евроген») фрагмент, содержащий трансген и его регуляторные элементы, фланкированные инвертированными концевыми повторами (ITR), клонировали в плазмиду pAAV-MCS в 2 этапа: первоначально 3'-концевой фрагмент, ограниченный сайтами BsrGI и BamHI, промежуточно клонировали в целевую плазмиду (промежуточный клон RZ3-3), вторым этапом в полученный вектор pAAV-MCS/RZ1-3 был клонирован 5'-концевой фрагмент гена, ограниченный EcoRI – BsrGI. Конструкцию нарабатывали в химически компетентных клетках *E. coli* DH5 $\alpha$ , трансформированных методом теплового шока, с селекцией по гену устойчивости к ампициллину. Плазмидную ДНК выделя-

ли при помощи коммерческого набора «Midі Prep» (ЗАО «Евроген»), эффективность очистки подтверждали электрофоретически.

**Сборка рекомбинантных AAV2.** Сборку вирусных частиц осуществляли на клеточной линии AAV293. Клетки культивировали в культуральных блюдах (10 см<sup>2</sup>) на среде DMEM с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, Австралия), L-глутамина и пенициллина-стрептомицина («Панэко», Россия) до 70% плотности монослоя, после чего осуществляли кальций-фосфатную котрансфекцию тремя плазмидами (с геном интереса, оболочечной и упаковочной) из расчета по 10 мкг каждой на 1 блюдо. Через 6 ч инкубации при плюс 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> среду в блюдах заменяли на поддерживающую и инкубировали до 72 ч. Дополнительно осуществляли сборку pAAV2, содержащих ген дальне-красного белка TurboFP635 (ЗАО «Евроген») для флуоресцентного контроля трансдукции клеток восприимчивых животных. По истечении срока инкубации среду собирали, клетки снимали механически и подвергали трехкратному криолизу при минус 80 °C с последующим переосаждением. В полученных образцах определяли титр гAAV2: образцы обрабатывали бензоназой («Диаэм», Россия) из расчета 50 ед./мл и инкубировали при плюс 37 °C в течение 30 мин для избавления от неинкапсидированной ДНК. Образцы инкубировали при плюс 95 °C в течение 10 мин для инактивации бензоназы и разрушения вирусных капсидов.

**Определение титра вируса в полимеразной цепной реакции (ПЦР).** Определение титра AAV в образцах, предварительно обработанных бензоназой, проводили методом ПЦР-РВ с использованием праймеров и зонда на ITR [13]. Для определения количества копий ДНК в образцах готовили разведения стандартной ITR-плазмиды с содержанием 10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> копий гена, на основании показателей которых строили калибровочный график для определения количества копий ДНК непосред-

ственно в исследуемых образцах. Состав реакционной смеси для ПЦР-амплификации был следующим (из расчета на одну пробу): 100 пМ растворы прямых и обратных праймеров – по 0,5 мкл; реакционная смесь qPCRMix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I (ЗАО «Евроген», Россия) – 5 мкл; деионизированная вода – 14 мкл; раствор выделенной ДНК (матрица) – 5 мкл. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе C1000 с оптическим блоком CFX96 («Bio-Rad», США) согласно следующей программе амплификации: (I) денатурация ДНК при 95 °C в течение 3 минут; (II) 40 циклов, состоящих из: 15 секунд при 95 °C, 30 секунд при 57 °C, с детекцией флуоресценции по каналу FAM на каждом из циклов при 57 °C. Учет результатов ПЦР проводили методом электрофоретического разделения в 1% агарозном геле в буфере TBE при напряжении 0,6 В/см<sup>2</sup> в течение 30 минут с последующим детектированием в УФ-свете после окраски бромистым этидием. В качестве стандарта при определении длин полученных ампликонов использовали маркер GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США) с линейкой фрагментов 250-10000 п.о. Дополнительно наличие rAAV2 в образцах контролировалось белковым электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ).

**Трансдукция клеток восприимчивых животных.** Для определения оптимальной множественности инфицирования (MOI) и оценки цитотоксичности вирусного вектора клетки HEK293, SPEV и МСК трансдуцировали при MOI 100, 500, 1000, 10000, 50000. Через 6 ч экспозиции вирусосодержащую среду заменяли поддерживающей средой и инкубировали до 72 ч. По истечении срока инкубации с клетками проводили оценку выживаемости при помощи микротетразолиевого теста (МТТ-теста). Интенсивность окраски клеток в тесте определяли спектрофотометрически при длине волны 570 нм после растворения кристаллов формазана

в диметилсульфоксиде.

**Анализ функциональности rAAV2.** Через 72 ч после трансдукции клетки снимали механически, осаждали путем центрифугирования при 1500 rpm в течение 5 мин и отмывали от среды фосфатным буфером. Осадок ресуспендировали в 200 мкл RIPA-буфера с добавлением 2 мкл ингибитора протеиназ, инкубировали во льду 30 мин, центрифугировали при 13000 rpm в течение 30 мин. Надосадок отбирали и проводили последовательно электрофорез по Laemmli с окрашиванием по Кумасси и вестерн-блоттинг с сывороткой свиньи, гипериммунизированной вирусом АЧС (ФГБНУ «ФИЦВиМ»), и антивидовым конъюгатом («Sigma», США). Документирование гелей и нитроцеллюлозных мембран осуществляли с помощью системы «GelDoc XR+» («Bio-Rad», США) с программным обеспечением «ImageLab Software 6.0» («Bio-Rad», США).

**Статистический анализ.** Полученные данные были обработаны с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism 7.0» («GraphPad Software Inc.», США) с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни либо с использованием t-критерия Стьюдента. Каждый эксперимент был проведен не менее чем в трех независимых повторностях; различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

**Сборка рекомбинантного AAV2, содержащего ген B646L вируса АЧС.** На первом этапе исследований нами перед нами стояла задача получения лабораторного образца рекомбинантного AAV. Для этого мы использовали экспрессионную плазмиду rAAV-MCS/B646L, оптимизированную по кодонам (при этом в качестве оптимальных кодонов использовали наиболее часто встречающиеся кодоны генов организма-реципиента – свиньи, что позволяет повысить эффективность экспрессии целевого гена), и осуществили ее наработку в препаративных количествах путем трансформации клеток *E. Coli* (штамм DH5α) с селекцией по гену

устойчивости к ампициллину и последующим выделением и очисткой плазмидной ДНК. Структура сконструированного экспрессионного вектора, содержащего ген *B646L* вируса АЧС, представлена на рисунке 1.

После выделения и очистки плазмидная ДНК была готова к процессу сборки рекомбинантного AAV2. Стандартные протоколы сборки AAV, как правило, подразумевают использование клеточной линии эмбриональных почек человека HEK293; в данной работе нами была использована ее производная линия – AAV293, стабильно экспрессирующая ген E1 аденовируса, необходимый для повышенной продукции инфекционных частиц AAV. В ходе инкубации после кальций-фосфатной котрансфекции клеток AAV293 экспрессионной, упаковочной и оболочечной плазмидами ежедневно оценивалась динамика увеличения первоначального (детектируемого в культуральной жидкости) и истинного (детектируемого после обработки бензоназой) титров рекомбинантного AAV2 методом количественной ПЦР (рисунок 2).

Из данных диаграммы видно, что продукция вирусных частиц начинается непосредственно в первые часы после

трансфекции, первоначальный титр существенно возрастает на вторые сутки и к окончанию инкубации достигает  $(3,1 \pm 0,25) \times 10^7$  вирусных частиц (по ITR) на мкл культуральной жидкости. Истинный титр, рассчитанный по детекции исключительно инкапсидированных ITR, достигает  $(2,45 \pm 0,17) \times 10^7$  вирусных частиц на мкл, из чего следует, что на долю полноценно собранных вирусных капсидов приходится до  $(79,3 \pm 2,3) \%$  всех геномных копий. Прочие детектируемые ITR, вероятно, являются элементами дефектных частиц, однако их количество является приемлемым для сборки AAV на монослойной культуре в лабораторных условиях.

После механического снятия трансфицированных клеток, трехкратного криолиза при минус 80 °C и переосаждения истинный титр AAV увеличивался в среднем на  $(11,2 \pm 0,71) \%$ . Наличие целевого гена *B646L* было подтверждено методом ПЦР во всех очищенных образцах рекомбинантного AAV. Полученные данные говорят о том, что применяемая нами методика сборки и очистки AAV позволяет получить вирусосодержащий материал с достаточно высокой (не менее  $2,4 \times 10^7$  г.к./мкл) концентрацией вирусных частиц.

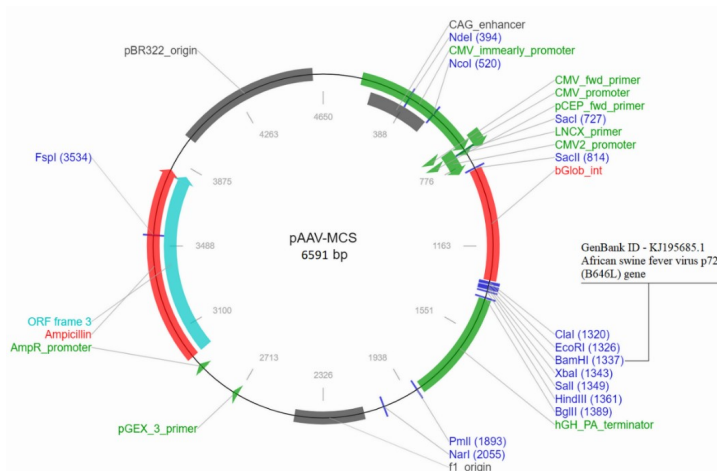


Рисунок 1 – Структура экспрессионного вектора pAAV-MCS/B646L.

Оценка цитопатогенного действия гAAV2 на клетки млекопитающих. Одним из главных требований, предъявляемым к кандидатным вирусным векторам, является отсутствие цитопатогенного действия при трансдукции целевых клеток, – соблюдение этого условия позволит в дальнейшем увеличивать векторную нагрузку на организм при необходимости введения в схему иммунизации нескольких конструкций, содержащих гены, кодирующие, например, другие значимые иммунодоминантные белки. Считается, что большинство серотипов AAV не оказывает цитопатогенного действия, однако оценка данного показателя *in vitro* является обязательной для дальнейшего безопасного проведения испытаний *in vivo*.

В качестве целевой клеточной линии нами были выбраны эпителиоподобные клетки почки эмбриона свиньи (SPEV) и почки эмбриона человека (HEK293), что обусловлено нефротропизмом, свойственным AAV2, а также МСК свиней. Резуль-

таты оценки цитопатогенного действия AAV2, содержащего ген B646L вируса АЧС, на клеточные линии через 72 часа после трансдукции при разных значениях MOI, представлены в таблице 1.

Из данных таблицы видно, что даже при высоких MOI (свыше 1000 вирусных частиц на клетку) суммарная доля апоптотических клеток в популяции не превышает  $(4,7 \pm 0,3) \%$ , что сопоставимо с отрицательным контролем. При оценке цитопатического действия на моделях других клеточных линий статистически значимых изменений данного показателя выявлено не было. Отсутствие цитопатогенного действия при трансдукции целевых клеток рекомбинантным AAV2 подтверждает его безопасность в качестве основы для кандидатной вакцины и дает основание к увеличению векторной нагрузки в случае необходимости введения других конструкций в пул потенциальных иммуногенов.

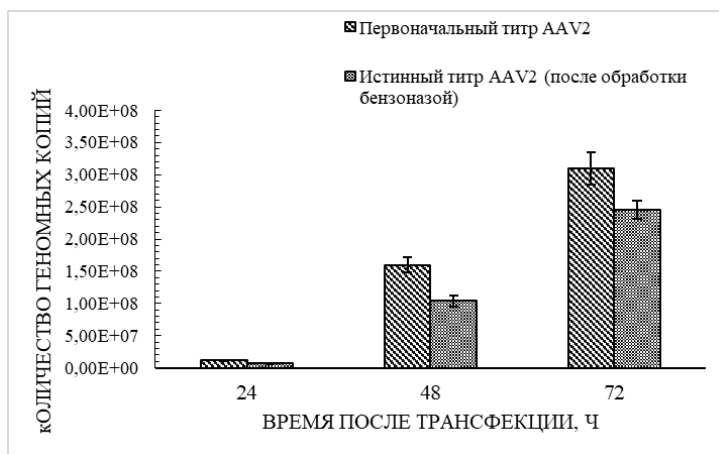


Рисунок 2 – Динамика нарастания титров AAV2 после трансфекции.

Таблица 1 – Выживаемость клеток линий HEK293, SPEV, МСК свиней после трансдукции гAAV2 при разных значениях MOI, %

MOI, геномных копий на клетку	HEK293	SPEV	МСК
100	98,2±0,3	97,8±0,5	99,1±0,4
500	97,2±0,2	96,1±0,9	98,4±0,7
1000	95,3±1,4	97,1±0,8	97,9±0,4
10000	98,1±1,1	96,1±0,4	95,8±0,7
50000	95,5±1,6	96,9±0,7	95,6±0,9

**Оценка функциональности rAAV2.**

Основным критерием функциональности разработанных векторных конструкций, как правило, служат показатели транскрибирования генов для синтеза функциональных генных продуктов. В случае с трансдукцией клеток организма-хозяина рекомбинантным AAV2 таким показателем является наличие зрелого белка р72 – продукта целевого гена *B646L*, выполняющего свою функцию. Для оценки функциональности AAV2 трансдукцию клеток SPEV осуществляли при рекомендованной стандартными методиками MOI 2000. Наличие зрелого белка определяли электрофоретически через 72 часа после трансдукции, а также проводили вестерн-блот с сывороткой свиньи, гипериммунизированной штаммом «Georgia 2007/1» вируса АЧС. Дополнительно были оценены уровни экспрессии мРНК соответствующего гена для всех трансдуцированных клеточных линий без вспомогательного агента и в присутствии протамин сульфата (10 мкг/мл). Данные представлены на рисунке 3 и в таблице 2.

Из рисунка 3 видно, что на электрофореграмме визуализируется рекомбинантный вирусный белок р72 с молекулярной массой, соответствующей расчетной (73 кДа). Специфичность экспрессируемого белка подтверждается вестерн-блотом с сывороткой свиньи, иммунизированной цельным вирионом того же эпидемиологически значимого штамма «Georgia 2007/1», нуклеотидная последовательность которого использовалась при конструировании экспрессионного вектора rAAV-MCS/B646L, ведь генетическое разнообразие вируса АЧС по гену *B646L* является самым высоким в Центральной и

Восточной Африке [14]. Показатели уровня экспрессии мРНК целевого гена были наиболее высокими в клетках HEK293 (до 13 млн копий на 1 мкг суммарной РНК). Уровень экспрессии мРНК в клетках SPEV был в среднем в 1,25 раз ниже ( $p < 0,01$ ), в клетках МСК – в 3,6 раз ниже ( $p < 0,005$ ), что согласуется с литературными данными: так, сообщается, что при трансдукции МСК человека AAV2 при MOI 1000 ее эффективность не превышает 30 %, однако показана возможность повышения этого показателя до 65 % при условии эскалации MOI до 10000 и инкубации клеток в течение 8 дней после трансдукции [15]. Проведение трансдукции в присутствии протамин сульфата – специфического антагониста гепарина – позволило повысить уровни экспрессии трансгена: для HEK293 – на  $(12,7 \pm 2,1) \%$ , для клеток SPEV – на  $(8,5 \pm 1,8) \%$ , для МСК статистически значимых различий выявлено не было.

Белок р72 является основным структурным компонентом вируса АЧС, занимая до 35% его массы, продуцируется на поздних стадиях инфекции, а антитела к нему способны ингибировать начальный этап репликативного цикла вируса АЧС, связанного с его прикреплением [16], что подтверждает его значимость в вирусной нейтрализации и в лабораторной диагностике АЧС. Полученные нами результаты экспрессии зрелого белка р72, обнаруживаемого в вестерн-блоте со специфичной сывороткой, демонстрируют функциональность разработанной конструкции на основе рекомбинантного AAV2, что дает основание для дальнейшего создания конструкций – вакцинных кандидатов – на вирус-векторной платформе.

**Таблица 2 – Уровни экспрессии мРНК разными клеточными линиями**

Клеточная линия	Количество копий целевого гена на 1 мкг суммарной РНК, млн	
	Без вспомогательного агента	В присутствии протамин сульфата (10 мкг/мл)
HEK293	12,1 $\pm$ 0,9	13,63 $\pm$ 0,7
SPEV	9,7 $\pm$ 0,46	10,52 $\pm$ 0,6
МСК свиней	3,4 $\pm$ 0,35	3,5 $\pm$ 0,5

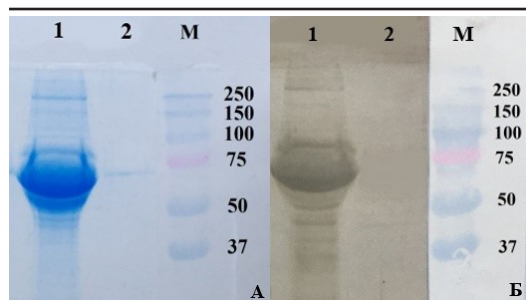


Рисунок 3 – Электрофореграмма (А) и блотограмма (Б) зрелого белка р72 вируса АЧС. Треки: 1 – лизат клеток SPEV, трансдуцированных рекомбинантным AAV2 при MOI 2000; 2 – лизат intact-ных клеток SPEV; М – маркер молекулярных масс «Bio-Rad Precision Plus Protein Standards Dual Color».

## ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В ходе исследований был сконструирован экспрессионный вектор pAAV-MCS/B646L, содержащий ген мажорного иммунодоминантного белка р72 вируса АЧС. Оптимизированы условия сборки рекомбинантного AAV2 на клеточной линии AAV293, стабильно экспрессирующей ген *E1* аденовируса и позволяющей достичь концентрации AAV2 (по детектируемому ITR) не менее  $(2,45 \pm 0,17) \times 10^7$  г.к./мкл, при этом средняя доля вирусных частиц с полноценным капсидом составляет  $(79,3 \pm 2,3)$  %. При оценке потенциального цитопатогенного действия рекомбинантных AAV2 на целевые клетки было выявлено, что высокие MOI (до 10000 вирусных частиц на клетку) не приводят к увеличению доли апоптотических клеток. Их суммарная доля в общей клеточной популяции не превышает 5 %, что сопоставимо с показателями intactных клеточных образцов. Отсутствие ЦПД свидетельствует о безопасности вирусного вектора, что позволит увеличивать векторную нагрузку при необходимости введения в схему иммунизации дополнительных конструкций, содержащих другие иммунодоминантные гены. Подтверждена функциональность разработанной конструкции на основе AAV2: через 72 часа в лизатах трансдуцированных клеток SPEV электрофоретически обнаруживался зрелый белок р72 с молекулярной массой 73 кДа. Специфичность белка подтверждалась в вестерн-блоте с сывороткой свиньи, гипериммунизированной целым вирионом того же эпидемиологически значимого штамма вируса АЧС.

Полученные нами данные в совокупности подтверждают потенциал AAV2

как инструмента доставки генов вируса АЧС в клетки свиней, что делает его многообещающей основой для конструирования кандидатных вакцин.

## OPTIMIZATION OF THE PROTOCOL FOR ASSEMBLY OF RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUSES OF SEROTYPE 2 FOR DELIVERY OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS GENES INTO MAMMALIAN CELLS

**Galeeva A.G.**<sup>1,2,3</sup> – Candidate of Veterinary Sciences, senior researcher, head of the Lab of Viral Antropozoonoses (ORCID: 0000-0003-2650-6459); **Efimova M.A.**<sup>1,2\*</sup> – Doctor of Biological Sciences, leading researcher (ORCID: 0000-0001-8786-1310); **Zakirova E.Yu.**<sup>3</sup> – Candidate of Biological Sciences, leading researcher (ORCID: 0000-0001-6750-640X); **Khammadov N.I.**<sup>1,2</sup> – Candidate of Biological Sciences, leading researcher (ORCID: 0000-0001-5669-1486); **Khisamutdinov A.G.**<sup>4</sup> – chief; **Garipov L.N.**<sup>5</sup> – First Deputy Minister; **Mingaleev D.N.**<sup>2</sup> – acting director, Doctor of Veterinary Sciences, associated professor (ORCID: 0000-0001-7217-4083); **Ravilov R.K.**<sup>1</sup> – Doctor of Veterinary Sciences, professor (ORCID: 0000-0001-7210-7470)

<sup>1</sup>Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan

<sup>2</sup>Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan

<sup>3</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

<sup>4</sup>Main Directorate of Veterinary Medicine of the Cabinet of Ministers of the Republic of Tatarstan, Kazan

<sup>5</sup>Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Tatarstan, Kazan

\*marina-2004r@mail.ru

**Financing:** *Materials were prepared within the framework of the Russian Science Foundation grant No. 22-76-00013 «Evaluation of the effectiveness of a vector system based on adeno-associated virus for the delivery of genes encoding immunodominant proteins of the African swine fever virus into mammalian cells» (2022-2024).*

## ABSTRACT

African swine fever (ASF) is a highly contagious viral disease of the *Suidae* family representatives, the mortality rate in primary foci of which reaches 100 %. To date, no specific means of preventing ASF have been developed. Despite the fact that researchers have proposed various methods for creating candidate vaccines against ASF, the issue of developing alternative antigenic variants with low reactogenicity and high immunogenicity is still relevant. It is known that the production of recombinant adeno-associated virus, a potential tool for delivering ASF virus target genes into mammalian cells, is influenced by many factors, in particular, the cell line, expression system, cell culture conditions after transfection, and the quality of the initial plasmid DNA. This work presents the results of optimization of the assembly protocol for recombinant AAV2 carrying the major capsid protein gene of the ASFV B646L as a model cargo. During the research, it was established that the protocol used allows to achieve a veritable virus titer of  $(2.45 \pm 0.17) \times 10^7$  viral particles per  $\mu\text{l}$ , while the share of fully assembled viral capsids accounts for up to  $(79.3 \pm 2.3)$  % of all genomic copies. When assessing the potential cytopathogenic effect of recombinant AAV2 on target cells (SPEV, porcine MSCs), it was found that high MOI (up to 10,000 viral particles per cell) does not lead to an increase in the proportion of apoptotic cells. The functionality of the developed

AAV2-based construct was confirmed: in the lysates of transduced cells, the mature p72 protein with a molecular weight of 73 kDa was detected, specifically reacting in a western blot with hyperimmune pig serum. Our data confirm the potential of AAV2 as a tool for delivering ASF virus genes into porcine cells, which makes it a promising basis for the design of candidate vaccines.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Макаров В.В. Африканская чума свиней. Российский ветеринарный журнал. 2018; 6: 15-19. DOI: 10.32416/article\_5c050abbcf8d70.94861250.
2. Груздев К.Н., Закутский Н.И., Диев В.И. Африканская чума свиней: современное состояние, эпизоотология и меры борьбы (аналитический обзор). Ветеринарный врач. 2017; 5: 3-10.
3. Алипер Т. И., Забережный А. Д., Гребенникова Т. В. Африканская чума свиней в Российской Федерации. Вопросы вирусологии. 2012; S1: 127-136.
4. Макаров В.В., Барсуков Ю.И. Эпизоотический процесс африканской чумы свиней. Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2022; 4(56): 8-14. DOI: 10.24412/2074-5036-2022-4-8-14.
5. Колбасов Д.В. Африканская чума свиней: создание вакцины актуально. Животноводство России. 2020; 7: 29-32. DOI: 10.25701/ZZR.2020.48.46.008.
6. Ефимова М.А., Галеева А.Г., Хамидулина А.И., Равилов Р.Х. Анализ иммунодоминантных пептидов вируса африканской чумы свиней для конструирования кандидатных вакцин. Аграрная наука. 2023; 3: 40-45. DOI: 10.32634/0869-8155-2023-368-3-40-45.
7. Ravilov R.K., Rizvanov A.A., Mingaleev D.N., Galeeva A.G., Zakirova E.Yu., Shuralev E.A., Rutland C.S., Khammadoov N.I., Efimova M.A. Viral Vector Vaccines Against ASF: Problems and Prospectives. Front Vet Sci. 2022; 9: 830244. DOI: 10.3389/fvets.2022.830244.
8. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat Rev Drug Discov.

- 2019; 18(5): 358-378. DOI: 10.1038/s41573-019-0012-9.
9. Усман Н.Ю., Ребриков Д.В. Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы как средство доставки генов для использования в молекулярной медицине. Вестник РГМУ. 2021; 5: 5-11. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.051.
10. Oziolor E.M., Kumpf S.W., Qian J., Gosink M., Sheehan M., Rubitski D.M., Newman L., Whiteley L.O., Lanz T.A. Comparing molecular and computational approaches for detecting viral integration of AAV gene therapy constructs. Mol Ther Methods Clin Dev. 2023; 29: 395-405. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.04.009.
11. Grieger J.C., Soltys S.M., Samulski R.J. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector. Mol Ther. 2016; 24(2): 287-97. DOI: 10.1038/mt.2015.187.
12. Рябова Е.И., Деркаев А.А., Есмагамбетов И.Б., Щедляков Д.В., Довгий М.А., Бырихина Д.В., Прокофьев В.В., Чемоданова И.П. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021; 21(4): 266-278. DOI: 10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278.
13. Ravilov R., Galeeva A., Frolov G., Efimova M., Zakirova A., Rizvanov A., Hisamutdinov A., Garipov L., Mingaleev D. Efficient delivery of the immunodominant genes of African swine fever virus by adeno-associated virus serotype 2. Vet World. 2023; 12(16): 2425-2430. DOI: 10.14202/vetworld.2023.2425-2430.
14. De Villiers E.P., Gallardo C., Arias M., da Silva M., Upton C., Martin R., Bishop R.P. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. Virology. 2010; 400(1):128-136. DOI: 10.1016/j.virol.2010.01.019.
15. Stender S., Murphy M., O'Brien T., Stengaard C., Ulrich-Vinther M., Søballe K., Barry F. Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. Eur Cell Mater. 2007; 13: 93-99. DOI: 10.22203/escm.v013a10.
16. Середа А.Д., Колбасов Д.В. Белки вируса африканской чумы свиней. Научный журнал КубГАУ. 2012; 77: 21-37.

## REFERENCES

1. Makarov V.V. African swine fever. Russian veterinary journal. 2018; 6:15-19. DOI: 10.32416/article\_5c050abbcf8d70.94861250. (In Russ.)
2. Gruzdev K.N., Zakutsky N.I., Diev V.I. African swine fever: current status, epizootology and control measures (analytical review). The Veterinarian. 2017; 5: 3-10. (In Russ.)
3. Aliper T.I., Zaberezhny A.D., Grebennikova T.V. African swine fever in the Russian Federation. Problems of virology. 2012; S1: 127-136. (In Russ.)
4. Makarov V.V., Barsukov Yu.I. Epizootic process of African swine fever. Current issues in veterinary biology. 2022; 4(56): 8-14. DOI: 10.24412/2074-5036-2022-4-8-14. (In Russ.)
5. Kolbasov D.V. African swine fever: the creation of a vaccine is urgent. Russian animal husbandry. 2020; 7: 29-32. DOI: 10.25701/ZZR.2020.48.46.008. (In Russ.)
6. Efimova M.A., Galeeva A.G., Khamidullina A.I., Ravilov R.Kh. Analysis of immunodominant peptides of the African swine fever virus for the design of candidate vaccines. Agrarian Science. 2023; 3: 40-45. DOI: 10.32634/0869-8155-2023-368-3-40-45. (In Russ.)
7. Ravilov R.K., Rizvanov A.A., Mingaleev D.N., Galeeva A.G., Zakirova E.Yu., Shuralev E.A., Rutland C.S., Khammatov N.I., Efimova M.A. Viral Vector Vaccines Against ASF: Problems and Prospectives. Front Vet Sci. 2022; 9: 830244. DOI: 10.3389/fvets.2022.830244.
8. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat Rev Drug Discov. 2019; 18(5): 358-378. DOI: 10.1038/s41573-

- 019-0012-9.
9. Usman N.Yu., Rebrikov D.V. Recombinant adeno-associated viruses as a means of gene delivery for use in molecular medicine. *Bulletin of RSMU*. 2021; 5:5-11. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.051. (In Russ.)
10. Oziolor E.M., Kumpf S.W., Qian J., Gosink M., Sheehan M., Rubitski D.M., Newman L., Whiteley L.O., Lanz T.A. Comparing molecular and computational approaches for detecting viral integration of AAV gene therapy constructs. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023; 29: 395-405. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.04.009.
11. Grieger J.C., Soltys S.M., Samulski R.J. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector. *Mol Ther*. 2016; 24(2): 287–97. DOI: 10.1038/mt.2015.187.
12. Ryabova E.I., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Dovgiy M.A., Byrikhina D.V., Prokofiev V.V., Chemodanova I.P. Comparison of various technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *BIO-preparations. Prevention, diagnosis, treatment*. 2021; 21(4): 266–278. DOI: 10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278. (In Russ.)
13. Raviolov R., Galeeva A., Frolov G., Efimova M., Zakirova A., Rizvanov A., Hisamutdinov A., Garipov L., Mingaleev D. Efficient delivery of the immunodominant genes of African swine fever virus by adeno-associated virus serotype 2. *Vet World*. 2023; 12(16): 2425-2430. DOI: 10.14202/vetworld.2023.2425-2430.
14. De Villiers E.P., Gallardo C., Arias M., da Silva M., Upton C., Martin R., Bishop R.P. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*. 2010; 400(1):128-136. DOI: 10.1016/j.virol.2010.01.019.
15. Stender S., Murphy M., O'Brien T., Stengaard C., Ulrich-Vinther M., Søballe K., Barry F. Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater*. 2007; 13: 93-99. DOI: 10.22203/ecm.v013a10.
16. Sereda A.D., Kolbasov D.V. African swine fever virus proteins. *Scientific journal of KubSAU*. 2012; 77: 21-37. (In Russ.)