

УДК 577.21

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА В ОСПОВАКЦИННОМ ВЕКТОРЕ MVA ПОД КОНТРОЛЕМ ПРОМОТОРОВ p11, p13.5, pLEO160, p7.5 И mH5, НЕЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНА ОТ ЛОКУСА ВСТРАИВАНИЯ

© 2025 г. О. В. Орлова^{a, *}, Д. В. Глазкова^a, О. Н. Сидорова^a, Ф. А. Урусов^{a, b},
Г. А. Шипулин^a, Е. В. Богословская^a

^aЦентр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119121 Россия

^bНаучно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова,
Москва, 119121 Россия

*e-mail: oorlova@cspmtz.ru

Поступила в редакцию 14.06.2024 г.

После доработки 16.09.2024 г.

Принята к публикации 30.09.2024 г.

Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), обладающий высокой иммуногенностью и доказанной безопасностью, считается перспективным в качестве вектора для разработки вакцин. Неоспоримым достоинством MVA-вектора является его большая емкость и возможность встраивания нескольких трансгенов в разные локусы вирусного генома, что позволяет создавать мультивалентные вакцины, кодирующие несколько антигенов одновременно. В настоящей работе изучена экспрессия трансгена, кодирующего эпитопы белков вируса гриппа, после его интеграции в пять локусов генома MVA. Показана независимость уровня экспрессии трансгена от локуса встраивания. Также определена динамика экспрессии репортерного гена, кодирующего усиленный зеленый флуоресцентный белок (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP), под контролем осповакцинных промоторов p11, p13.5, pLEO160, p7.5 и mH5 при встраивании экспрессионной кассеты в локус гена *F13L* MVA. Максимальный уровень экспрессии, но с более поздним началом синтеза белка, обеспечивал поздний промотор p11. Использование промотора p13.5 приводило к более раннему синтезу белка EGFP в клетке и более высокому уровню экспрессии гена, чем при использовании промоторов pLEO160, p7.5 и mH5, которые обеспечивали одинаковый уровень и динамику экспрессии репортерного гена. Полученные данные могут быть полезны для создания векторных MVA-вакцин, содержащих несколько антигенов.

Ключевые слова: модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), геномные локусы, поксвирусные промоторы, векторная вакцина, p11, p13.5, pLEO160, p7.5, mH5

DOI: 10.31857/S0026898425020065, **EDN:** GGEKOK

ВВЕДЕНИЕ

Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) — это вирус осповакцины VACV, аттенуированный в 1960-е гг. путем многократного пассирования на культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов (CEF) [1]. Помимо того, что вирус MVA может использоваться в качестве вакцины от оспы, он также нашел применение как вектор для создания вакцин против других патогенов [2]. Высокая иммуногенность MVA и хороший профиль его безопасности, обусловленный отсутствием репликации, позволяют считать MVA перспективным вирусным вектором. Кроме того, MVA позволяет интегрировать в свой геном чужеродные

гены суммарной длиной до 25 т.п.н., которые могут кодировать сразу несколько антигенов, причем синтез антигенов в клетке обеспечивает их правильную посттрансляционную модификацию. Такая возможность позволяет использовать MVA для создания комбинированных вакцин против разных патогенов, а также для повышения эффективности вакцин против одного патогена за счет использования нескольких антигенов [3].

В процессе аттенуации MVA лишился около 15% своего генома, при этом крупные делеции произошли в шести областях генома [1]. Именно эти области часто используются для интегра-

ции трансгенов [4–6]. Однако обнаружено, что встроенные в эти локусы трансгены, несмотря на эффективность экспрессии, склонны к спонтанным делециям и/или мутациям после серийных пассажей в культуре клеток, что свидетельствует о нестабильности этих участков генома [5], поэтому для интеграции трансгенов более предпочтительны локусы, расположенные в межгенных областях [7].

Экспрессия трансгенов в рекомбинантных MVA регулируется поксвирусными промоторами. При интеграции нескольких трансгенов в разные локусы желательно использовать разные промоторы для контроля экспрессии трансгена, чтобы избежать присутствия в геноме MVA повторяющихся последовательностей, способных дестабилизировать геном. На сегодняшний день для экспрессии чужеродных генов в MVA-векторе используются как природные поксвирусные промоторы [8–14], так и полученные в результате их модификации или искусственно созданные [12, 15, 16]. Классификация промоторов вируса осповакцины основана на временном периоде экспрессии контролируемых ими генов в цикле репликации вируса, в соответствии с которым выделяют ранние, сверхранние, промежуточные, ранне-поздние и поздние промоторы [8–17]. Как сила промотора, так и определяемая промотором динамика экспрессии трансгена могут влиять на иммунный ответ [15, 18–22], поэтому при разработке вакцин на основе MVA важно иметь в арсенале как можно больше промоторов с разными характеристиками. Векторы, использованные в клинических испытаниях, чаще всего содержали природный промотор p7.5 [17, 21]. Также часто используют модифицированный промотор mH5 и природный p11 [21]. Представляют интерес новые эффективные промоторы для экспрессии антигена в MVA, такие как синтетический промотор pLEO160 и природный промотор p13.5. Следует отметить, что эти промоторы ранее не сравнивали как между собой, так и с давно известными промоторами p11, mH5 и p7.5. Поэтому цель работы состояла в изучении экспрессии трансгена, интегрированного в разные межгенные локусы, и в сравнении динамики экспрессии трансгена в зависимости от используемого промотора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные клетки, клеточные культуры. В работе использовали штамм *Escherichia coli* DH5a (“Gibco-BRL”, США), линии клеток HEK293FT почки эмбриона человека (“ATCC”, CRL-11268) и ВНК-21 фибробластов сирийского хомячка (“ATCC”, CCL-10). Клетки HEK293FT и ВНК-21 культивировали

в стандартной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, “HyClone”, США), 4 mM L-глутамин (“Gibco”, США), 1 mM пируват натрия (“Gibco”), 0.01 M HEPES (“Gibco”) 0.1 mM заменимые аминокислоты MEM NEAA ×100 (“Gibco”). Клетки инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂.

Конструирование челночных-векторов с геном 7.5k2 для рекомбинации в различные локусы MVA. Фрагмент ДНК, содержащий последовательность гена 7.5k2, получали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы ранее полученный вектор pShuttle tk-p7.5k2 [23] и добавляя необходимые сайты рестрикции. ПЦР-фрагмент p7.5k2 амплифицировали с праймерами tgcaCATATGccccgtagtgcca и tgcaCTGCAGgtac cttattagtggatgggtg и вставляли по сайтам Nde/PstI в плазмиду pShuttle-F13LrevGOI с получением плазмиды pShuttleF13L-p7.5k2 [24]. pShuttleD4R-7.5k2 получали путем рестрикции плазмид pShuttle tk-p7.5k2 и pShuttleD4RrevGOI по сайтам BamHI/KpnI с последующим лигированием по соответствующим сайтам.

pShuttle007/008-7.5k2 конструировали, используя несколько фрагментов. Фрагменты, соответствующие левому (длинному и короткому) и правому плечам гомологии генов 007/008, получали путем амплификации MVA дикого типа с праймерами gtcaGAGCTCttacatttttttctact gtttagtcgc и agcatATCGATgtatctatcgttttgagtaaacaa ctc, gtcaGTTAACaaaatagaaacatataatggctatatacact и gtcaGGATCCgtatctatcgttttgagtaaacaa; ctgaCTCGAGtttggtttattggattcgtgtaac и ctgaGGGCCctggagaatttcattgttcagga и обрабатывали рестриктазами SacI/ClaI, HpaI/BamHI, XhoI/ApaI соответственно. RFP-маркер с промотором p11 был вырезан из плазмиды pShuttle-D4Rdel [24] по сайтам ClaI/HpaI. Фрагмент p7.5k2 получен из плазмиды pShuttle-tk-p7.5k2 рестрикцией по сайтам BamHI/XhoI. Полученные фрагменты одновременно вставляли в плазмиду pShuttleD4R-p7.5k2, обработанную рестриктазами SacI/ApaI.

Для получения pShuttle136/137-p7.5k2 из плазмиды pShuttle-tk-p7.5k2 по сайтам SpeI/SalI вырезали фрагмент p7.5k2 и вставляли в вектор pShuttle-136/137, описанный в [25].

Конструирование челночных векторов с различными промоторами. Последовательности промоторов с сайтами BamHI и NheI на 5'- и 3'-концах (табл. 1) синтезированы компанией “Synbio Technologies” (Янчжоу, Китай). Ген *EGFP* амплифицировали с помощью праймеров gctagcggccaccatggtagcgaagggcgagga и gaattcATAAA AATTATAGCGTAATATTAGACATGATATAAAA Atcattactgtacagctcgtccatgccgaga, используя плаз-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности промоторов

| Промотор | Нуклеотидная последовательность | Размер, п.н. |
|----------|--|--------------|
| p11 | caatcaccactttcatattagaatatatgtatgtaaaaatatagtagaattcattttgttttttctatgctataaata | 81 |
| pLEO160 | ttttatttttttttggaaataaaatccggtaaaattgaaaaatatacactaattagcgtcttgttcagacgcaagcctgaac-cctgcgttcgatattgataacgttgatccggcgatctcccaacctagagcatctcgctagttcgagttcgatctgctattctac-caatccgaatgactgtccattacatctagctcgag | 210 |
| p13.5 | ttgctctgtgactagagactttagttaaggctactgtaaaaatagaactataatcatataatagtgtaggttgtagtagggctactc-gtattaattttattgttaaactgtccttaagtcttattaat | 131 |
| p7.5 | gacatctatatactatagtaataccaactcaagactacgaaactgatacaatctcttatcatgtgggtaattgttctcgatgct-gatagccatagcccggtagttgcatatacaaaactgatcactaattccaaccacccactttttatagtaagtttttcac-ccataaataataatacaataaatttctcgtaaaagttagaaaatattctaatatttgcacggtaagggaagtagaatcata-aagaacagt | 266 |
| mH5 | aaaaattgaaaataaatacaaaaggttcttgagggttggttaaattgaaagcgagaataatcataaataa | 71 |

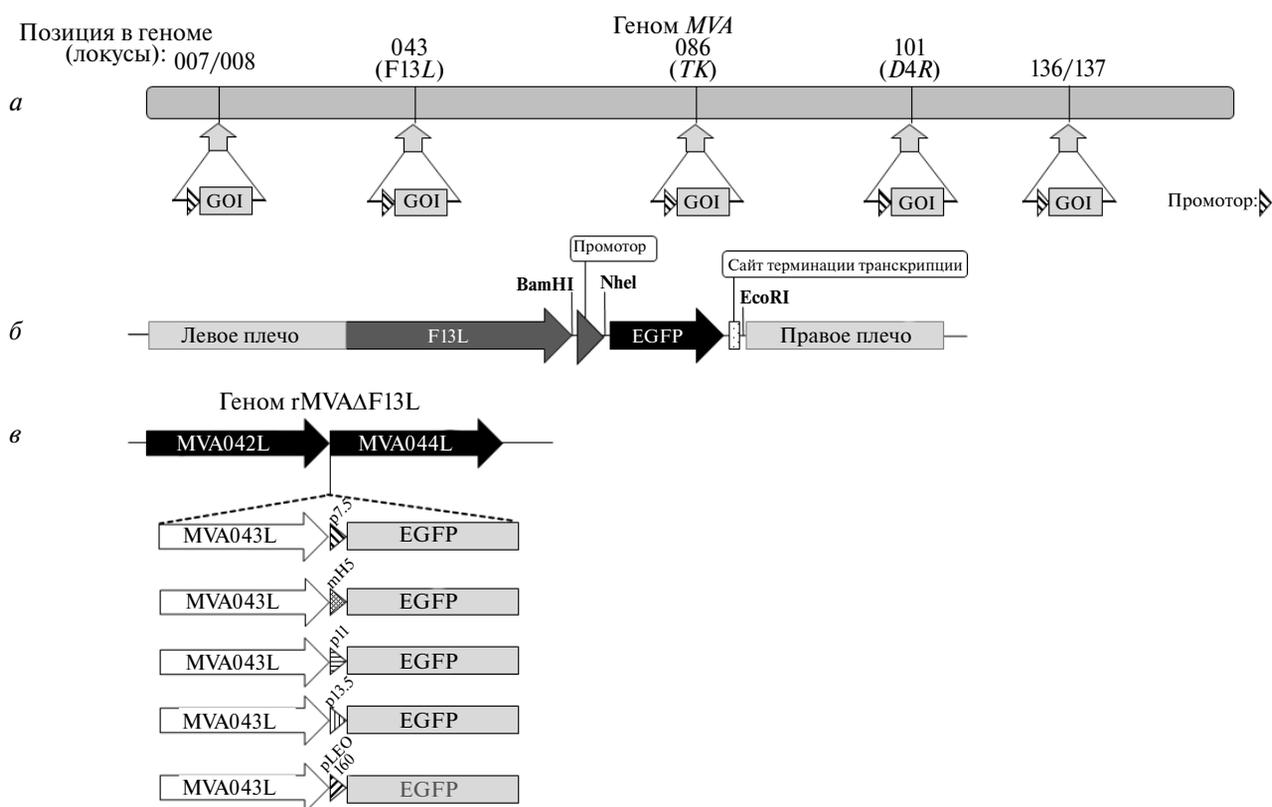


Рис. 1. *а* – Схема расположения локусов 007/008, F13L, TK, D4R, 136/137 в геноме MVA. GOI – анализируемый ген. *б* – Схема челночного вектора для F13L-системы селекции. Левое плечо – левое плечо гомологии с локусом F13L. Промотор – место расположения одного из пяти промоторов (p7.5; mH5; p13.5; p11; pLEO160). EGFP – последовательность, кодирующая белок EGFP. Сайт терминции транскрипции. Правое плечо – правое плечо гомологии с локусом F13L; показаны сайты рестрикции BamHI, NheI и EcoRI. *в* – Схема встраивания челночных векторов в локус F13L вектора gMVAΔF13L.

миду К-(EGFP) [26]. Фрагмент одного из промоторов, обработанный рестриктазами BamHI и NheI, и фрагмент гена EGFP, обработанный рестриктазами NheI и EcoRI, одновременно встраивали в плазмиду pShuttle-F13LrevGOI [24]

по сайтам BamHI и EcoRI (рис. 1б). Всего получено пять конструкций: F13L-p7.5-EGFP, F13L-mH5-EGFP, F13L-p13.5-EGFP, F13L-p11-EGFP и F13L-pLEO160-EGFP. Общая схема этих конструкций представлена на рис. 1в.

Плазмидную ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* и выделяли с помощью набора Plasmid Mini Kit (“QIAGEN”, Германия) в стерильных условиях. Корректность конструкции подтверждали секвенированием по Сэнгеру с использованием секвенатора ABI PRISM 3500 (“Applied Biosystems”, США).

Получение рекомбинантного MVA. Рекомбинантные вирусы MVA (гMVA) созданы путем гомологичной рекомбинации [27]. Слитый монослой клеток ВНК-21 либо ВНК-21-D4R (для рекомбинации в локус D4R), выращенных в шестилуночной планшете, инфицировали MVA (для рекомбинации в локус 136/137, tk либо 007/008), гMVAΔD4R (для рекомбинации в локус D4R) либо гMVAΔF13L (для рекомбинации в локус F13L) при 0.05 БОЕ/клетку. Через 90 мин после заражения среду заменяли 2 мл свежей среды DMEM с добавлением 2% FBS, клетки трансфицировали 3 мкг ДНК соответствующего плазмидного челночного вектора с использованием реагента FuGENE HD (“Promega”, США). Клетки инкубировали в течение 48 ч, собирали и лизировали тремя циклами замораживания/оттаивания. Лизаты для последующего их заражения обрабатывали ультразвуком.

Серийное пассирование вируса (селекция F13L). Монослой клеток ВНК-21, выращенный в 6-луночной планшете, инфицировали 100 мкл вируса, полученного после рекомбинации, добавляя его в суммарном объеме 2 мл среды на лунку. Клетки инкубировали в течение 48 ч, затем собирали вместе с культуральной жидкостью и лизировали тремя циклами замораживания/оттаивания. Полученную суспензию, содержащую вирус, использовали для следующего пассажа в количестве 50 мкл суспензии на лунку. Процедуру повторяли до получения вирусной суспензии, не содержащей примесей родительского вируса [24].

Селекция рекомбинантных MVA путем выделения бляшек (для интеграции в локусы tk, D4R, 136/137 и 007/008). Слитый монослой клеток ВНК-21 или ВНК-21-D4R, выращенных в 6-луночной планшете, инфицировали серийными разведениями лизатов, полученных из клеток после проведения рекомбинации, или из отдельных бляшек, полученных на предыдущем раунде селекции. Через 90 мин после заражения среду заменяли 2 мл свежей среды DMEM с добавлением 2% FBS и 1% низкоплавкой агарозы. Через 48 ч после заражения с помощью флуоресцентной микроскопии (Olympus IX53, Япония, фильтры флуорофора RFP или GFP, ×100) отмечали бляшки с маркерным геном RFP или GFP, входящим в состав челночного вектора. Содержимое отмеченных бляшек собирали пипеткой через агарозное покрытие [24, 25].

Выделение вирусной ДНК и ПЦР. Вирусную ДНК выделяли с использованием набора “АмплиТест РИБО-преп” (ФГБУ ЦСП ФМБА России) согласно рекомендациям производителя. Отсутствие MVA дикого типа в рекомбинантном вирусе проверяли с помощью ПЦР-анализа с использованием пар праймеров, соответствующих каждому локусу интеграции, ранее описанных в работе [24, 25]. В случае локуса 007/008 использовали праймеры ttatacgggtatgttgtaaccgac и cgggtgaaaccaaatgtcca.

Амплификация MVA и определение титров вирусов. Вирус амплифицировали при множественности инфицирования (MOI) 0.05 согласно [28]. Титр вируса определяли с использованием клеточных линий ВНК-21/ВНК-21-D4R и ранее описанного метода TCID50 [27].

Трансдукция клеток НЕК293FT гMVA и анализ синтеза EGFP с помощью проточной цитофлуориметрии. Клетки НЕК293FT в количестве 5×10^5 инфицировали вирусами гMVA-promoter-EGFP при MOI = 10 в стандартной среде DMEM, содержащей 2% FBS (“HyClone”), 4 mM L-глутамин, 1 mM пируват натрия, 0.01 M HEPES, 0.1 mM раствор заменимых аминокислот MEM NEAA ×100 (все реактивы “Gibco”). Через 1.5 ч после инфекции среду с вирусом заменяли на свежую. Клетки собирали с помощью трипсина через 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 и 30 ч после заражения, промывали в фосфатно-солевом буфере. Процент EGFP+ клеток и интенсивность флуоресценции определяли с помощью проточного цитофлуориметра NovoCyte Quanteon (“Agilent Technologies”, США). Результаты измерений обрабатывали с помощью программного обеспечения NovoExpress 1.4.1 (“Agilent Technologies”).

Стратегия гейтирования на примере гMVA-p7.5-EGFP представлена на рис. 2. На первом этапе анализа отсеивали дебрис и выделяли популяцию одиночных клеток на диаграмме FSC-A/FSC-H. Затем выделяли популяцию жизнеспособных клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния (диаграмма SSC-H/FSC-H). В популяции жизнеспособных клеток определяли содержание (%) EGFP-положительных (EGFP+) клеток, используя диаграмму FSC-H/EGFP-A. Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) популяции клеток EGFP+ (MFI_{egfp}) и всей популяции клеток (MFI_{total}). В обоих случаях среднюю интенсивность флуоресценции каждого гMVA в измеряемой временной точке нормировали на MFI_{total} того же гMVA в нулевой точке эксперимента.

Вестерн-блоттинг. Клетки НЕК293FT трансдуцировали вирусами MVA и гMVA при множественности инфекции MOI = 10 в течение 90 мин. Затем среду с вирусом заменяли на бессыво-

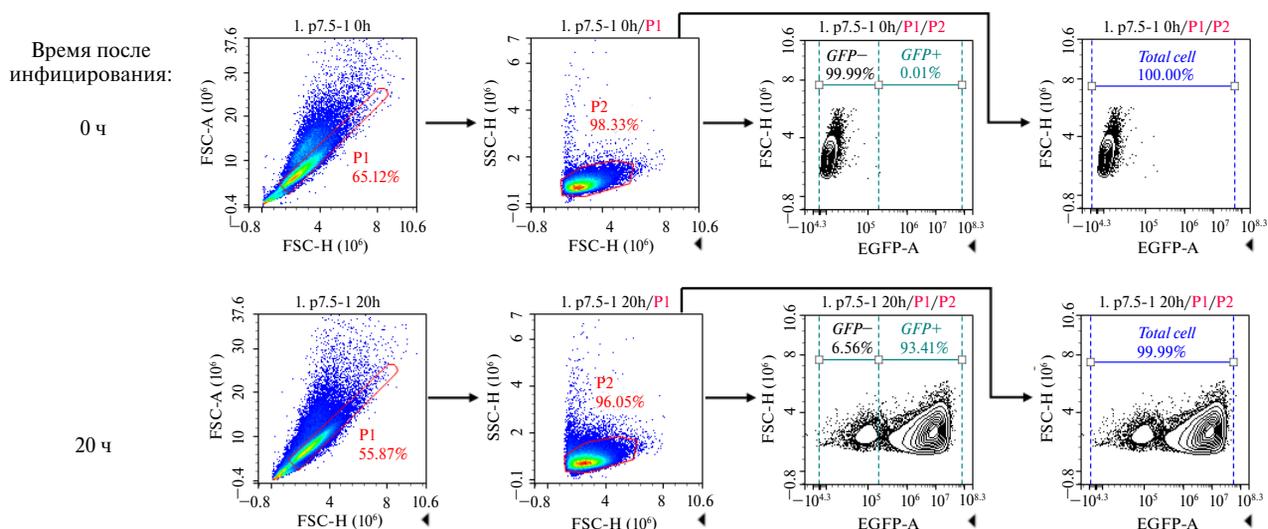


Рис. 2. Стратегия гейтирования для определения EGFP-положительных клеток среди клеток HEK293FT, трансдуцированных rMVA-p7.5-EGFP.

роточную OptiMEM (“Gibco”, “Thermo Fisher Scientific”, США). Через 24 ч клетки собирали, трижды промывали фосфатно-солевым буфером Дульбекко без кальция и магния (“Gibco”, “Thermo Fisher Scientific”), ресуспендировали в буфере для лизиса RIPA (50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата Na, 0.1% SDS) и разрушали ультразвуком. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (15000 g , 15 мин, 4°C). Супернатант собирали и концентрировали с помощью центрифужного концентрата Amicon Ultra-0.5 с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа. Образцы инкубировали при 70°C в течение 10 мин с буфером NuPAGE™ LDS (“Invitrogen”, США) с добавлением 2.5% бета-меркаптоэтанола. Белковый маркер PageRuler plus (“Thermo Scientific”) и образцы наносили на 12%-ный ПААГ. После электрофореза в денатурирующих условиях белки переносили на мембрану Immun-Blot LF PVDF (“BioRad”, США). Мембраны инкубировали в блокирующем фосфатно-солевом буфере, содержащем 5% ECL Prime Blocking Agent (“Cytiva”, США) и 0.1% Tween 20, затем инкубировали в течение ночи при +4°C с антителами к 6×His-Tag (HIS.H8-HRP, “Invitrogen”) в разведении 1 : 20000, либо с антителами к бета-актину (AC-15-HRP, “Abcam”, Великобритания) в разведении 1 : 50000. Затем мембраны отмывали 3 раза в фосфатно-солевом буфере с 0.1% Tween 20. Иммуные комплексы на мембране детектировали с помощью реагента Clarity Western ECL Substrate (“BioRad”) в соответствии с рекомендациями производителя и визуализировали с помощью рентгеновской пленки (“Fuji Film”, Япония).

Статистическая обработка данных. Средние значения и стандартное отклонение рассчиты-

вали с помощью программы Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, США). Данные обрабатывали с использованием программы Statistica 8.0. Различия между группами считали статистически значимыми, если параметр p не превышал 0.05 по U-критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия полипептидного антигена k2 при его интеграции в разные локусы MVA

Для интеграции трансгена мы выбрали в геноме MVA пять локусов (F13L, D4R, 007/008, 136/137 и tk), уже использованных ранее [7, 24, 29–31]. Схема расположения этих локусов в геноме MVA представлена на рис. 1а. Локусы F13L и D4R интересны тем, что для них созданы специальные системы селекции, облегчающие и ускоряющие получение рекомбинантных MVA [24]. В этих случаях трансген встраивается в специально сконструированный вирусный штамм с делецией либо гена *F13L* (MVA Δ F13L), либо гена *D4R* (MVA Δ D4R). Эти делеции нарушают нормальную репликацию вируса. Восстановление репликативных свойств происходит в тот момент, когда вместе с введением чужеродного трансгена доставляется и делетированный ген, что позволяет легко отбирать рекомбинантный вирус по скорости роста. Интеграция в локусы 007/008 и 136/137 предполагает встраивание трансгена в пространство между генами *MVA007* и *MVA008*, или между генами *MVA136* и *MVA137*. Пятый локус – это локус гена тимидинкиназы (tk-локус), один из первых локусов, использованных для получения rMVA [31].

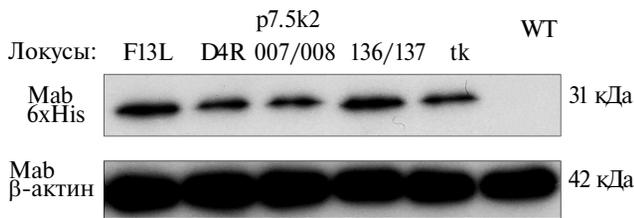


Рис. 3. Вестерн-блот-анализ синтеза полипептида k2 в клетках HEK293FT, инфицированных гMVA-F13L-k2, гMVA-D4R-k2, гMVA-007/008-k2, гMVA-136/137-k2, гMVA-tk-k2 или MVA дикого типа (WT). WT использовали в качестве отрицательного контроля для клеток, инфицированных гMVA. Масса полипептида k2 – 31 кДа.

Встраивание в tk-локус приводит к замещению гена тимидинкиназы трансгеном, однако это не влияет на скорость роста MVA в перmissive клеточной культуре.

В качестве трансгена мы использован ген k2, кодирующий полипептид, содержащий эпитопы белков вируса гриппа [23]. Для изучения влияния локуса интеграции на экспрессию гена k2, регулируемую промотором p7.5, получены пять гMVA, содержащих кассету p7.5k2 в локусах tk, F13L, D4R, 007/008 и 136/137 (гMVA-tk-k2, гMVA-F13L-k2, гMVA-D4R-k2, гMVA-007/008-k2, гMVA-136/137-k2).

Клетки HEK293FT заражали полученными рекомбинантными вирусами, после чего оценивали синтез полипептида с помощью вестерн-блотинга.

Проведенный анализ не выявил статистически значимых различий в уровне экспрессии между образцами (рис. 3). Сделан вывод, что все изученные локусы могут быть использованы для интеграции трансгенов и их успешной экспрессии.

Использование нескольких локусов для экспрессии различных трансгенов в одном MVA-векторе позволяет доставлять несколько антигенов сразу, что, в свою очередь, может стимулировать комплексный иммунный ответ и повышать эффективность вакцин. Помимо антигенов, в локусы можно встраивать гены, кодирующие цитокины (такие как IL-12, Flt3), способные усиливать иммуногенность, будучи молекулярными адъювантами (или генетическими адъювантами) [32–35].

Динамика синтеза белка EGFP в зависимости от промотора

Нами получены пять рекомбинантных MVA-векторов, содержащих ген EGFP под контролем разных поксвирусных промоторов: p7.5,

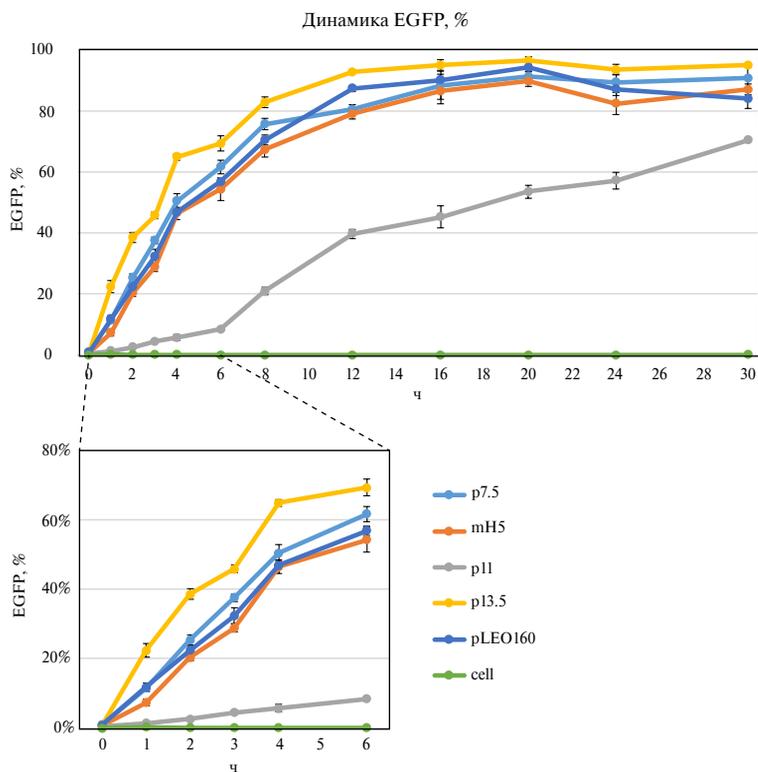
mH5, p13.5, p11 и pLEO160. В данном эксперименте использовали флуоресцентный белок, который позволяет количественно оценить уровень белка в клетках с помощью проточной цитометрии. Несложная процедура измерения на проточном цитометре позволяет анализировать много временных точек для оценки экспрессии в динамике. В каждом векторе кассета с геном EGFP была встроена в локус F13L. Мы выбрали метод селекции F13L, поскольку этот метод прост, удобен и позволяет быстро получить рекомбинантный вирус без трудоемкого выделения и анализа бляшек на этапах очистки [24]. Схема расположения гена флуоресцентного белка EGFP под контролем исследуемых промоторов в локусе F13L вектора MVA наглядно представлена на рис. 1в.

Для анализа активности промоторов p7.5, mH5, p13.5, p11 и pLEO160 клетки HEK293FT инфицировали соответствующими гMVA при MOI = 10. Через разные промежутки времени (от 0 до 30 ч) после трансдукции с помощью проточной цитометрии измеряли процент EGFP-положительных (EGFP+) клеток в культуре и среднюю интенсивность флуоресценции EGFP как в популяции клеток EGFP+, так и во всей популяции.

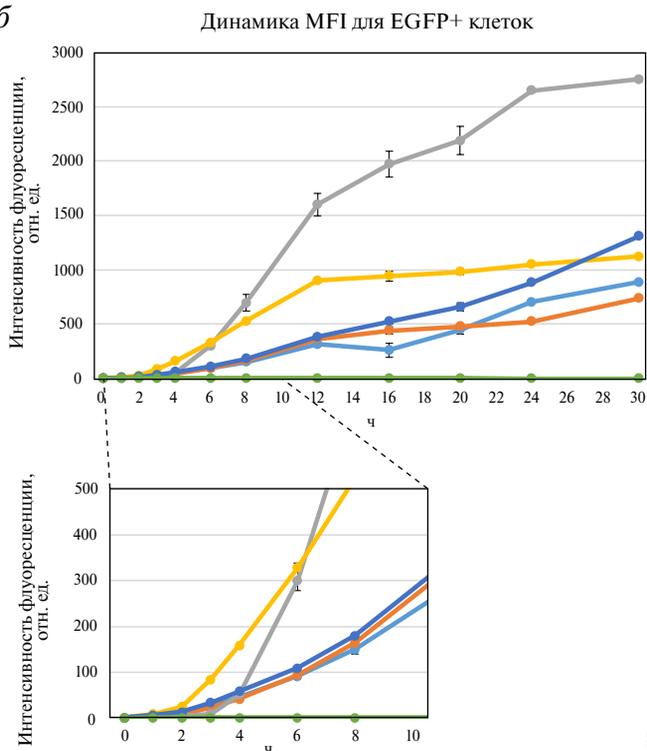
На рис. 4а представлена динамика изменения содержания (%) клеток, синтезирующих EGFP. При использовании всех промоторов, кроме p11, содержание клеток EGFP+ начинало расти уже через 1 ч после инфекции и достигало плато через 16–20 ч. В популяции клеток, инфицированных гMVA с p13.5-EGFP, доля EGFP+ клеток через 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 ч была значимо выше, чем в популяциях клеток, инфицированных другими гMVA. В клетках, инфицированных гMVA, содержащими кассеты pLEO160-EGFP, mH5-EGFP и p7.5-EGFP, наблюдалась одинаковая динамика роста EGFP+ клеток. В культурах, инфицированных гMVA с p11-EGFP, доля EGFP+ клеток увеличивалась значительно медленнее, чем в остальных культурах, и не достигала плато через 30 ч.

Для оценки продукции белка измеряли среднюю интенсивность флуоресценции в популяции клеток EGFP+ (MFI_{egfp} , рис. 4б). В данном случае MFI_{egfp} отражала среднее количество белка EGFP, накопленного в тех клетках, в которых уже начался синтез белка. Активное увеличение количества EGFP в клетках, инфицированных гMVA с p13.5-EGFP, наблюдали начиная с 2 ч после инфекции. Через 12 ч количество EGFP выходило на плато. Нарастание количества EGFP в клетках, инфицированных гMVA с pLEO160-EGFP, mH5-EGFP или p7.5-EGFP шло медленнее и количество EGFP продолжало увеличиваться вплоть до 30 ч после инфекции.

a



б



в

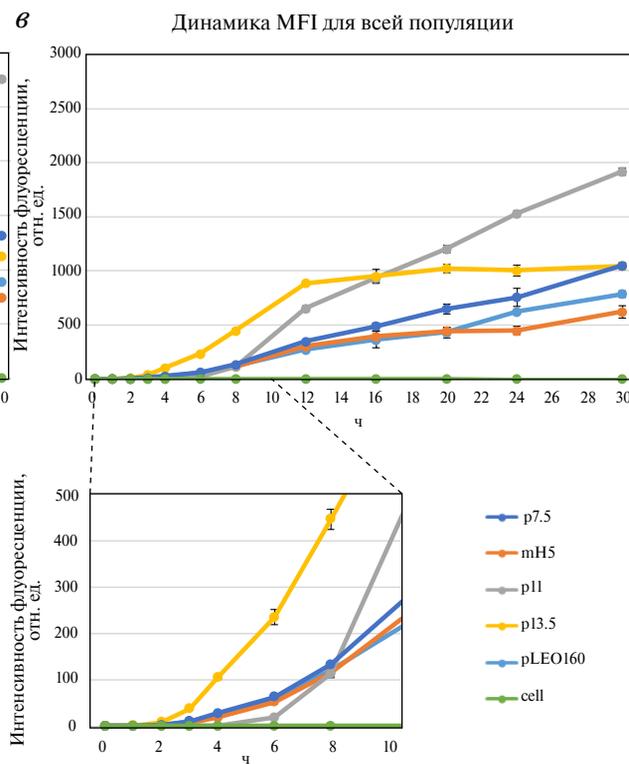


Рис. 4. *a* – Динамика синтеза EGFP под контролем различных промоторов. Содержание (%) EGFP+ клеток в динамике. *б–в* – Интенсивность флуоресценции в инфицированных клетках в популяции EGFP+ (*б*) и во всей популяции клеток (*в*), нормированная на MFI клеток в момент заражения каждым гМВА. Показаны средние значения и стандартные отклонения, вычисленные по результатам трех опытов.

В клетках, инфицированных гMVA p11-EGFP, накопление белка начиналось позже, но происходило быстрее. В результате, начиная с 8 ч после инфекции, количество EGFP в клетках EGFP+, инфицированных гMVA p11-EGFP, было выше, чем в клетках, инфицированных другими гMVA.

Кроме того, мы охарактеризовали динамику накопления белка EGFP, продуцируемого всей популяцией инфицированных клеток, измеряя среднюю интенсивность флуоресценции всей популяции клеток, MFI_{total} (Total cell, рис. 2, рис. 4в). Значение MFI_{total} показывает накопление антигена в культуре в целом и может более точно отражать динамику накопления антигена в организме после введения вектора. Надо отметить, что в ранее опубликованных работах при анализе поксвирусных промоторов использовали такие методы, как измерение активности люциферазы [36], бета-галактозидазы [37, 38], а также белковый дот-блот- [39] или вестерн-блот-анализ [40], в которых измеряют именно накопление белка во всей клеточной популяции.

В нашем случае принципиальное отличие динамики MFI_{total} от MFI_{egfp} выявлено только для гMVA-p11. При измерении MFI_{total} скорость накопления белка во всей популяции клеток была ниже, синтез не успевал выйти на плато через 30 ч. MFI_{total} можно грубо оценить как произведение MFI_{egfp} на долю клеток EGFP+ в популяции. Видно, что описанные различия между MFI_{total} и MFI_{egfp} для гMVA-p11 обусловлены медленным увеличением процента EGFP+ клеток в культуре (рис. 4а). Таким образом, наши эксперименты впервые показали, что профиль экспрессии гена, контролируемой промотором p11, имеет две особенности: одновременное начало синтеза белка в популяции клеток, инфицированных гMVA, и медленное увеличение количества EGFP в клетках.

Промоторы p7.5 и mH5 сравнивали и ранее. Так, показано [36, 39, 41], что у промотора mH5 активность выше, чем у p7.5, но величины активности в разных работах различались. В наших экспериментах не обнаружено различия между этими промоторами. Интерес представляет работа Dai L. [41], в которой сравнивали несколько промоторов, в том числе p7.5 и mH5, а для анализа силы промотора и времени экспрессии также использовали проточную цитометрию. В этой работе показана очень ранняя и высокая активность промотора mH5, которая в 4–8 раз превышала активность p7.5, что в корне отличается от наших данных. При детальном анализе мы обнаружили, что в данной работе использовали промоторы p7.5 и mH5, нуклеотидные последовательности которых отличались от последовательностей, использованных в нашей и в других работах. Различия можно видеть на рис. 5, где представлено выравнивание промоторов и их сравнение с исходными последовательностями в геноме вируса осповакцины. Не исключено, что эти различия могли влиять на работу промотора. Например, известно, что добавление спейсера с 3'-конца от промотора может приводить к усилению экспрессии [19]. На результаты анализа могло повлиять и использование другой клеточной линии [19].

Промоторы p13.5 и pLEO впервые описали в работах [13, 15]. В дальнейшем промотор LEO был усилен за счет добавления спейсера [19], последний вариант получил название pLEO160. Однако в этих работах не сравнивали промоторы p13.5 и pLEO с промоторами p11, p7.5 и mH5. Нами впервые проведено прямое сравнение pLEO160 с этими промоторами и показано, что профиль экспрессии гена под контролем промотора pLEO160 не отличался от профиля экспрессии гена, контролируемого промоторами p7.5 и mH5. Данные [13] свидетельствовали о том,

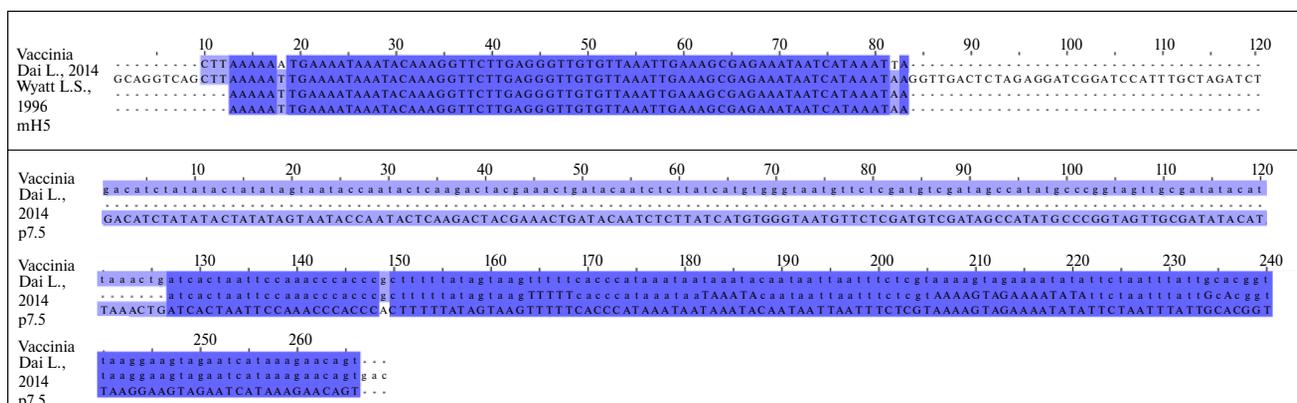


Рис. 5. Выравнивание промоторов p7.5 и mH5. Vaccinia – фрагмент геномной последовательности вируса осповакцины (GeneBank accession number NC_006998). Dai L., 2014 и Wyatt L.S., 1996 – последовательности промоторов, использованные в соответствующих публикациях.

что промотор p13.5 обеспечивает более раннюю экспрессию гена овальбумина, чем синтетические гибридные промоторы PrS5E и Pr4LS5E. Нами показано, что профиль экспрессии гена под контролем промотора p13.5 отличался от профиля экспрессии, направляемой промоторами pLEO160, p11, p7.5 и mH5. Промотор p13.5 обеспечивал самое раннее начало экспрессии белка из всех протестированных промоторов.

Проведенные нами исследования позволили дополнительно охарактеризовать несколько поксвирусных промоторов и локусов интеграции в геноме MVA, которые могут в разных комбинациях использоваться для создания мультивалентных вакцин на базе MVA. Дальнейшие исследования позволят оценить иммуногенность антигенов в зависимости от промотора при интеграции нескольких трансгенов в разные локусы и выбрать наиболее эффективные конструкции.

Работа выполнена без внешнего финансирования.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Orlova O.V., Glazkova D.V., Bogoslovskaya E.V., Shipulin G.A., Yudin S.M. (2022) Development of modified vaccinia virus Ankara-based vaccines: advantages and applications. *Vaccines*. **10**(9), 1516.
- Volz A., Sutter G. (2016) Modified vaccinia virus Ankara: history, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* **97**, 187–243.
- Rashidi A., La Rosa C., Curtsinger J., Cao Q., Zhou Q. (2022) CMV Triplex vaccine to enhance adaptive NK and T-cell reconstitution after autologous hematopoietic cell transplantation. *Transplant. Cell Ther.* **28**(6), 343.e1–343.e4.
- Manuel E., Wang Z., Li Z., La Rosa C., Zhou W., Diamond D.J. (2010) Intergenic region 3 of modified vaccinia Ankara is a functional site for insert gene expression and allows for potent antigen-specific immune responses. *Virology*. **403**(2), 155–162.
- Atukorale V.N., Weir J.P., Meseda C.A. (2020) Stability of the HSV-2 *US-6* gene in the del II, del III, CP77, and I8R-G1L sites in modified vaccinia virus Ankara after serial passage of recombinant vectors in cells. *Vaccines*. **8**(1), 137.
- Stittelaar K.J., Wyatt L.S., de Swart R.L., Vos H.W., Groen J. (2000) Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies. *J. Virol.* **74**(9), 4236–4243.
- Patent AU2007200016A1. (2027) Intergenic regions as novel sites for insertion of HIV DNA sequences in the genome of modified vaccinia virus Ankara. <https://patents.google.com/patent/AU2007200016A1/en>
- Weir J.P., Moss B. (1987) Determination of the promoter region of an early vaccinia virus gene encoding thymidine kinase. *Virology*. **158**(1), 206–210.
- Coupar B.E., Boyle D.B., Both G.W. (1987) Effect of *in vitro* mutations in a vaccinia virus early promoter region monitored by herpes simplex virus thymidine kinase expression in recombinant vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 2299–2309.
- Wittek R., Hänggi M., Hiller G. (1984) Mapping of a gene coding for a major late structural polypeptide on the vaccinia virus genome. *J. Virol.* **49**(2), 371–378.
- Mackett M., Smith G.L., Moss B. (1984) General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J. Virol.* **49**(3), 857–864.
- Wyatt L.S., Shors S.T., Murphy B.R., Moss B. (1996) Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine*. **14**(15), 1451–1458.
- Wennier S.T., Brinkmann K., Steinhäuser C., Mayländer N., Mnich C., Wielert U., Dirmeier U., Hausmann J., Chaplin P., Steigerwald R. (2013) A novel naturally occurring tandem promoter in modified vaccinia virus Ankara drives very early gene expression and potent immune responses. *PLoS One*. **8**(8), e73511.
- Lopera-Madrid J., Medina-Magües L.G., Gladue D.P., Borca M.V., Osorio J.E. (2021) Optimization in the expression of ASFV proteins for the development of subunit vaccines using poxviruses as delivery vectors. *Sci. Rep.* **11**(1), 23476.
- Di Pilato M., Mejías-Pérez E., Gómez C.E., Perdiguero B., Sorzano C.O., Esteban M. (2013) New vaccinia virus promoter as a potential candidate for future vaccines. *J. Gen. Virol.* **94**, 2771–2776.
- Sancho M.C., Schleich S., Griffiths G., Krijnse-Locker J. (2002) The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis. *J. Virol.* **76**(16), 8318–8334.
- Gilbert S.C. (2013) Clinical development of modified vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine*. **31**(39), 4241–4246.
- Baur K., Brinkmann K., Schweneker M., Pätzold J., Meisinger-Henschel C., Hermann J., Steigerwald R., Chaplin P., Suter M., Hausmann J. (2010) Immediate-early expression of a recombinant antigen by modified vaccinia virus ankara breaks the immunodominance of strong vector-specific B8R antigen in acute and memory CD8 T-cell responses. *J. Virol.* **84**(17), 8743–8752.

19. Pilato M.D., Sánchez-Sampedro L., Mejías-Pérez E., Sorzano C., Esteban M. (2015) Modification of promoter spacer length in vaccinia virus as a strategy to control the antigen expression. *J. Gen. Virol.* **96**(8), 2360–2371.
20. Pérez P., Marín M.Q., Lázaro-Frías A., Sorzano C.O., Di Pilato M., Gómez C.E., Esteban M., García-Arriaza J. (2019) An MVA vector expressing HIV-1 envelope under the control of a potent vaccinia virus promoter as a promising strategy in HIV/AIDS vaccine design. *Vaccines.* **7**(4), 208.
21. Alharbi N.K. (2019) Poxviral promoters for improving the immunogenicity of MVA delivered vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* **15**, 203–209.
22. Wyatt L.S., Earl P.L., Vogt J., Eller L.A., Chandran D., Liu J., Robinson H.L., Moss B. (2008) Correlation of immunogenicities and *in vitro* expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. *Vaccine.* **26**(4), 486–493.
23. Mintaev R.R., Glazkova D.V., Orlova O.V., Bogoslovskaya E.V., Shipulin G.A. (2022) Development of a universal epitope-based influenza vaccine and evaluation of its effectiveness in mice. *Vaccines.* **10**(4), 534.
24. Antoshkina I.V., Glazkova D.V., Urusov F.A., Bogoslovskaya E.V., Shipulin G.A. (2022) Comparison of recombinant MVA selection methods based on *F13L*, *D4R* and *K1L* genes. *Viruses.* **4**(3), 528.
25. Mintaev R.R., Glazkova D.V., Orlova O.V., Ignatyev G.M., Oksanich A.S., Shipulin G.A., Bogoslovskaya E.V. (2023) Development of MVA-d34 tetravalent dengue vaccine: design and immunogenicity. *Vaccines.* **11**(4), 831.
26. Orlova O.V., Glazkova D.V., Mintaev R.R., Tsyganova G.M., Urusov F.A., Shipulin G.A., Bogoslovskaya E.V. (2023) Comparative evaluation of the activity of various lentiviral vectors containing three anti-HIV genes. *Microorganisms.* **11**(4), 1053.
27. Staib C., Drexler I., Sutter G. (2004) Construction and isolation of recombinant MVA. *Meth. Mol. Biol.* **269**, 77–100.
28. Kremer M., Volz A., Kreijtz J., Fux R., Lehmann M.H., Sutter G. (2012) Easy and efficient protocols for working with recombinant vaccinia virus MVA. *Meth. Mol. Biol.* **890**, 59–92.
29. Sánchez-Puig J., Blasco R. (2005) Isolation of vaccinia MVA recombinants using the viral *F13L* gene as the selective marker. *Biotechniques.* **39**(5), 665–666.
30. Ricci P.S., Schäfer B., Kreil T.R., Falkner F.G., Holzer G.W. (2011) Selection of recombinant MVA by rescue of the essential *D4R* gene. *J. Virol.* **12**(8), 529.
31. Scheiflinger F., Falkner F.G., Dorner F. (1996) Evaluation of the thymidine kinase (tk) locus as an insertion site in the highly attenuated vaccinia MVA strain. *Arch. Virol.* **141**(3–4), 663–669.
32. Hessel A., Savidis-Dacho H., Coulibaly S., Portsmouth D., Kreil T.R., Crowe B.A., Schwendinger M.G., Pilz A., Barrett P.N., Falkner F.G., Schäfer B. (2014) MVA vectors expressing conserved influenza proteins protect mice against lethal challenge with H5N1, H9N2 and H7N1 viruses. *PLoS One.* **9**(2), e88340.
33. Sabbaghi A., Ghaemi A. (2021) Molecular adjuvants for DNA vaccines: application, design, preparation, and formulation. *Meth. Mol. Biol.* **2197**, 87–112.
34. Morelli M.P., Zajac M.P., Pellegrini J.M., Amiano N.O., Tateosian N.L., Calamante G., Gherardi M.M., García V.E. (2020) IL-12 DNA displays efficient adjuvant effects improving immunogenicity of Ag85A in DNA Prime/MVA boost immunizations. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 581812.
35. Kreiter S., Diken M., Selmi A., Petschenka J., Türeci O., Sahin U. (2016) FLT3 ligand as a molecular adjuvant for naked RNA vaccines. *Meth. Mol. Biol.* **1428**, 163–175.
36. Orubu T., Alharbi N.K., Lambe T., Gilbert S.C., Cottingham M.G. (2012) Expression and cellular immunogenicity of a transgenic antigen driven by endogenous poxviral early promoters at their authentic loci in MVA. *PLoS One.* **7**, e40167.
37. Davison A.J., Moss B. (1989) Structure of vaccinia virus early promoters. *J. Mol. Biol.* **210**, 749–769.
38. Staib C., Drexler I., Ohlmann M., Wintersperger S., Erfle V., Sutter G. (2000) Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara. *BioTechniques.* **28**, 1137–1148.
39. Hall Y.H.J. (2016) Promoter and leader sequence effects on immunological potency of recombinant modified vaccinia virus Ankara delivering tuberculosis antigens. *PhD thesis. The Open University.* <https://oro.open.ac.uk/61260/1/13834601.pdf>
40. Müller K. (2018) Characterization of vaccinia virus MVA candidate vaccines mutated in viral genes modulating inflammasome activation. Ludwig Maximilian Univ. Munich. Munich. <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/22017/>
41. Dai L. (2014) Generation, characterization and application of a novel BAC system for MVA mutagenesis to investigate the function of vaccinia virus immune modulatory gene *N1L*. Technical Univ. Munich. Munich. <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1191773/1191773.pdf>

Dynamics of Transgene Expression in the MVA Vaccine Vector under the Control of the p11, p13.5, pLEO160, p7.5 and mH5 Promoters, Independence of the Transgene Expression Level from the Insertion Locus

© 2025 O. V. Orlova^{1,*}, D. V. Glazkova¹, O. N. Sidorova¹, F. A. Urusov^{1,2}, G. A. Shipulin¹, E. V. Bogoslovskaya¹

¹Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119992 Russia

²Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, 105275 Russia

*e-mail: oorlova@cspmz.ru

The modified vaccinia virus Ankara (MVA), characterized by high immunogenicity and proven safety, is considered a promising vector for vaccine development. An undeniable advantage of the MVA vector is its high capacity and the ability to incorporate several transgenes into different loci of the viral genome, enabling the creation of multivalent vaccines that encode multiple antigens simultaneously. This study examined the expression of a transgene encoding influenza virus protein epitopes after its integration into five loci of the MVA genome. The results demonstrated that the level of transgene expression is independent of the integration locus. Additionally, the dynamics of the expression of a reporter gene encoding Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) were determined under the control of the vaccinia virus promoters p11, p13.5, pLEO160, p7.5, and mH5 upon insertion of the expression cassette into the *F13L* gene locus of MVA. The highest expression level, though with a delayed onset of protein synthesis, was achieved with the late promoter p11. Using the p13.5 promoter resulted in earlier synthesis of EGFP in cells and higher gene expression levels compared to the promoters pLEO160, p7.5, and mH5, which provided similar levels and dynamics of reporter gene expression. These findings may be useful for developing multi-antigenic MVA-vectorized vaccines.

Keywords: modified vaccinia virus Ankara (MVA), genomic loci, poxvirus promoters, vector vaccine, p11, p13.5, pLEO160, p7.5, mH5