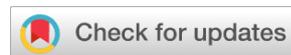


Оригинальное исследование  
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-573>



## Исследование тропизма и биораспределения рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа *in vitro* и *in vivo*

Вавилова И.В.<sup>✉</sup>, Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Попова О.,  
Воронина Д.В., Голдовская П.П., Зрелкин Д.И., Джаруллаева А.Ш.,  
Должикова И.В., Щепляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

### Аннотация

**Введение.** Рекомбинантные аденовирусы (rAd) широко используются для разработки вакцин против ряда инфекционных заболеваний. Несмотря на большое количество клинических исследований, на сегодняшний день только несколько серотипов аденовирусов человека (5-й и 26-й серотипы) и обезьян (изолят Y25) на постоянной основе применяются для создания вакцинных препаратов. Различные серотипы rAd отличаются тропностью к клеткам, что играет ключевую роль в их способности к индукции иммунного ответа.

**Цель работы** — изучить клеточный тропизм *in vitro* и биораспределение *in vivo* rAd обезьян 25-го серотипа (SAd25) в сравнении с аденовирусами человека 5-го и 26-го серотипов.

**Материалы и методы.** Эффективность трансдукции *in vitro* оценивали на 15 клеточных линиях с использованием rAd, экспрессирующих репортерный ген *EGFP*. Биораспределение и биолюминесцентную визуализацию *in vivo* оценивали на мышах BALB/c с использованием rAd, экспрессирующих репортерный ген люциферазы. Острую токсичность SAd25 оценивали на мышах и крысах при внутримышечном и внутривенном введении.

**Результаты.** SAd25 эффективно трансдуцирует всю панель клеточных линий, при этом обнаружена более высокая тропность к клеткам глиобластомы человека (GL-6) по сравнению с двумя другими исследованными rAd. В экспериментах *in vivo* показано, что rAd в основном локализуется в месте введения, экспрессия трансгена сохраняется в течение 21 дня. В экспериментах по оценке острой токсичности SAd25 животные хорошо переносили введение препарата, гибель животных не зафиксирована, токсические эффекты не обнаружены.

**Заключение.** Новая платформа на основе SAd25 не уступает уже существующим и хорошо зарекомендовавшим себя системам доставки на основе аденовирусов человека 5-го и 26-го серотипов. Благодаря высокому уровню трансдукции и благоприятному профилю безопасности SAd25 может предложить ряд преимуществ для разработки вакцин против новых инфекционных заболеваний.

**Ключевые слова:** аденовирусный вектор, аденовирус человека, аденовирус обезьян, тропизм, биораспределение, острая токсичность

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 30 от 28.10.2022).

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка технологической платформы для создания рекомбинантных, в том числе живых вакцин для профилактики инфекционных болезней».

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Вавилова И.В., Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Зрелкин Д.И., Джаруллаева А.Ш., Должикова И.В., Щепляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Исследование тропизма и биораспределения рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа *in vitro* и *in vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):594–605.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-573>  
EDN: <https://www.eLibrary.ru/aspimgu>

## ***In vitro* and *in vivo* tropism and biodistribution of recombinant simian adenovirus type 25**

Irina V. Vavilova<sup>✉</sup>, Tatiana A. Ozharovskaia, Olga V. Zubkova, Olga Popova, Daria V. Voronina, Polina P. Goldovskaya, Denis I. Zrelkin, Alina Sh. Dzhарullaeva, Inna V. Dolzhikova, Dmitry V. Shcheblyakov, Denis Yu. Logunov, Alexander L. Gintzburg

Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

### **Abstract**

**Introduction.** Recombinant adenoviruses are widely used in the development of vaccines for a variety of infectious diseases. Despite numerous clinical studies, only a few types of human (types 5 and 26) and simian (isolate Y25) adenoviruses are currently used to produce vaccine formulations. Different types of adenoviruses vary in their cellular tropism, which plays a key role in their ability to elicit an immune response.

The **aim** of this study was to investigate the cellular tropism of the simian adenovirus type 25 *in vitro* and its biodistribution *in vivo* in comparison with human adenoviruses types 5 and 26.

**Materials and methods.** The efficiency of *in vitro* transduction was evaluated on 15 different cell lines using recombinant adenovirus vectors expressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) reporter gene. *In vivo* biodistribution and bioluminescence imaging were evaluated in BALB/c mice after administration of recombinant adenoviral vectors encoding the luciferase reporter gene. The acute toxicity of a recombinant simian adenovirus type 25 vector was assessed in mice and rats following intramuscular or intravenous administration.

**Results.** Recombinant simian adenovirus effectively transduces a wide range of cells. At the same time, a higher tropism to human glioblastoma cells (GL-6) was found compared to the other two studied adenoviruses. *In vivo* experiments have shown that recombinant adenoviruses are mainly localized at the injection site, and transgene expression persists for 21 days. Acute toxicity studies demonstrated that simian adenovirus type 25 vector was well-tolerated, with no animal deaths or detectable toxic effects.

**Conclusion.** The new platform based on the recombinant simian adenovirus type 25 is not inferior to the existing and well-established delivery systems based on human adenovirus types 5 and 26. Due to its high level of gene transfer and favorable safety profile, the use of the simian adenovirus type 25 in medicine has the potential to offer many benefits for the development of vaccines against future infectious diseases.

**Keywords:** adenovirus vector, human adenovirus, simian adenovirus, tropism, biodistribution, acute toxicity

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Committee on Biomedical Ethics of the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia (protocol No. 30, October 28, 2022).

**Funding source.** The study was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation "Development of a technological platform for the creation of recombinant, including live vaccines for the prevention of infectious diseases".

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Vavilova I.V., Ozharovskaia T.A., Zubkova O.V., Popova O., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Zrelkin D.I., Dzhарullaeva A.Sh., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Yu., Gintzburg A.L. *In vitro* and *in vivo* tropism and biodistribution of recombinant simian adenovirus type 25. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):594–605.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-573>

EDN: <https://www.elibrary.ru/aspmgu>

### **Введение**

Аденовирусы (Ad) — это безоболочечные ДНК-содержащие вирусы икосаэдрической формы. Семейство *Adenoviridae* состоит из 6 родов, среди которых вирусы рода *Mastadenovirus*, инфицирующие млекопитающих, в том числе человека [1]. Ad человека разделяют на 7 видов (*Mastadenovirus adami*, *Mastadenovirus blackbeardi*, *Mastadenovirus*

*caesari*, *Mastadenovirus dominans*, *Mastadenovirus exoticum*, *Mastadenovirus faecale*, *Mastadenovirus russelli*) в зависимости от их морфологических, вирусологических, серологических и генетических характеристик. Давно и широко изучены фундаментальные биологические свойства Ad вида *Mastadenovirus caesari* (ранее аденовирусы человека подгруппы C), что сделало их популярными объ-

ектами для разработки векторных систем доставки чужеродной генетической информации *in vivo* и *in vitro* [2, 3].

К настоящему времени достигнуты значительные успехи в использовании Ad в качестве векторных вакцин [3–6]. В течение последних 10 лет в России были одобрены и зарегистрированы вакцины для профилактики болезни, вызванной вирусом Эбола, и коронавирусной инфекции COVID-19 [7, 8]. Опыт вакцинации во время пандемии COVID-19 доказал безопасность и эффективность векторных вакцин на основе Ad. Для проведения масштабной вакцинации использовали 3 Ad-платформы: на основе Ad человека 5-го (Ad5), 26-го серотипов (Ad26) и Ad шимпанзе (изолят Y25) [5, 7, 9]. Несмотря на большое количество клинических исследований, только несколько серотипов Ad человека и шимпанзе (Ad6, Ad35, ChAd63, ChAd3) были изучены в качестве основы для векторных вакцин [10]. Разные серотипы обладают различными характеристиками в клеточном тропизме, что может играть ключевую роль в индукции иммунного ответа, влияя на экспрессию и распределение целевого антигена [11]. Ключевыми характеристиками при выборе альтернативных серотипов являются низкая серопревалентность в человеческой популяции и способность вызывать высокий уровень специфических иммунных реакций на целевой антиген.

Ранее нами была разработана технологическая платформа на основе Ad обезьян 25-го серотипа (SAd25) [12]. **Целью** данного исследования было сравнение тропизма Ad5 и Ad26 и SAd25 *in vitro* и *in vivo*.

## Материалы и методы

### Клеточные линии

В экспериментах использовали 15 клеточных линий разного происхождения:

1) клетки человека: HEK 293 (клетки почки эмбриона, трансформированные E1-областью Ad5), H292 (клетки мукоэпидермоидной карциномы лёгкого), H460 (клетки крупноклеточной карциномы лёгкого), H1299 (клетки немелкоклеточного рака лёгкого), A549 (клетки аденокарциномы лёгкого), A431 (клетки эпидермоидной карциномы), GL-6 (клетки глиобластомы), ЛЭЧ-Т (клетки лёгкого эмбриона), HeLa (клетки карциномы шейки матки);

2) клетки обезьян: две линии клеток почки зелёной мартышки (CV-1 и Vero E6);

3) клетки мышей: L929 (клетки фибробластов) и ЭПНТ-5 (клетки глиобластомы);

4) клетки хомячков: СНО (клетки яичника китайского хомячка) и ВНК-21 (клетки почки новорождённого сирийского хомячка).

### Рекомбинантные аденовирусы

Рекомбинантные Ad5- и Ad26-векторы, несущие репортерный ген усиленного зелёного флуоресцентного белка EGFP (rAd5-EGFP и rAd26-EGFP), ген люциферазы (rAd5-Luc, rAd26-Luc), получены ранее [7, 12, 13]. Для клонирования гена люциферазы или гена гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 в геном rSAd25 использовали методику, описанную ранее [12]. pArms-SAd25-Luc или pArms-SAd25-S-CoV2, несущие экспрессионные кассеты с репортерным геном или антигеном, линеаризовали и соединяли с pSAd25-EGFP, содержащей  $\Delta E1/\Delta E3$  геном. После электропорации в клетках *Escherichia coli* BJ5183 в результате гомологичной рекомбинации получили pSAd25-Luc или pSAd25-S-CoV2, кодирующие  $\Delta E1/\Delta E3$  геном SAd25 с экспрессионной кассетой. rAd оживляли и наращивали в клетках HEK 293.

### Лабораторные животные

Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта РФ (ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»), а используемые методики одобрены комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 30 от 28.10.2022). Шестинедельные самки мышей BALB/c (18–20 г) получены из Пущинского питомника (Россия; аккредитован Международной ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными). Аутбредные (беспородные) мыши и крысы получены из филиала «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России. Животные имели свободный доступ к воде и стандартному корму для грызунов.

### Определение инфекционного титра аденовирусов

Количество инфекционных Ad-частиц определяли методом титрования по конечной точке наличия цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток HEK 293. Клетки рассевали на 96-луночные планшеты в количестве  $3 \times 10^4$  клеток на лунку. Затем вносили последовательные 10-кратные разведения вируса в 8 повторах. Планшеты инкубировали 12–14 сут, результат учитывали визуально по наличию ЦПД. Расчёт титра вируса проводили по формуле Риды–Менча и выражали в ТЦД<sub>50</sub>/мл [14].

### Определение репликации аденовирусов

Для исследования кинетики репликации Ad культуру клеток HEK 293 рассевали на 96-луночные планшеты в количестве  $3 \times 10^4$  клеток на лунку. Далее клетки инфицировали препаратами rAd5-EGFP, rAd26-EGFP и rSAd25-EGFP в дозе 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/клетку. Культуральные планшеты инкубировали 6–7 дней при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Учёт результатов

проводили с помощью автоматического микроскопа «Lionheart FX Automated Microscope» («BioTek Instruments Inc.»).

#### *Трансдукция клеточных линий рекомбинантными аденовирусами*

За 2–3 ч до трансдукции клетки рассеивали на 48-луночные планшеты в количестве  $10^5$  клеток/луночку. Далее клетки трансдуцировали препаратами rAd5-EGFP, rAd26-EGFP и rSAd25-EGFP в дозе 1 ТЦД<sub>50</sub>/клетку. Культуральные планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Интенсивность флуоресценции измеряли на гибридном мультифункциональном ридере «Synergy H1» («BioTek Instruments Inc.») с помощью программного обеспечения «Gen5 Microplate Reader» и «Imager Software».

#### *Введение рекомбинантных аденовирусов животным*

Для исследования биораспределения rAd вводили однократно внутримышечно в дозе  $10^{10}$  или  $10^{11}$  вирусных частиц (в.ч.) на животное ( $n = 3$ ). Контрольной группе животных вводили стерильный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) («Панэко»). Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 30 от 28.10.2022).

#### *Определение ДНК аденовирусов в органах и тканях животных*

Через 24 ч после введения rAd проводили эвтаназию животных. Отбирали органы, взвешивали и гомогенизировали в ФСБ. ДНК выделяли при помощи набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» («Promega»). Вирусную ДНК определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на амплификаторе «CFX 96» («Bio-Rad»): праймеры (5'-GGCGGCTGGCGGTAGA-3' и 5'-GCAACATCTGGAACCGCG-3'), смесь qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). За начальной стадией денатурации (5 мин при 95°C) следовали 40 циклов по 15 с при 95°C, 30 с при 61°C и 30 с при 72°C. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «Bio-Rad CFX Manager».

#### *Биолюминесцентная визуализация in vivo*

Люциферин («Promega»; 2,5 мг/животное) вводили в ФСБ и вводили мышам внутрибрюшинно на 1, 3, 7, 14 и 21-й дни после введения rAd. Животных анестезировали изофлураном («Piramal Critical Care») в течение 5–10 мин, после чего проводили визуализацию биолюминесценции на приборе «IVIS Lumina Series II» («Caliper»). Время экспозиции было скорректировано, чтобы избежать пере-сыщения пикселей, а измерения потока были преобразованы в фотоны в секунду для сравнительной оценки люминесценции в разные моменты времени.

Данные люминесцентного изображения анализировали с использованием программного обеспечения «Living Image v. 4.2».

#### *Методы оценки острой токсичности*

В эксперименте по изучению токсичности оценивали влияние rSAd25-S-CoV2 на состояние экспериментальных животных (мышей и крыс) при внутримышечном (для мышей и крыс) и внутривенном (для мышей) введении. Для каждого способа введения были сформированы 4 группы аутобредных мышей обоего пола (по 10 самок и 10 самцов в группе), которым вводили rAd в разных дозах ( $10^9$ ,  $10^{10}$  и  $10^{11}$  в.ч./животное). Контрольной группе вводили ФСБ. Формировали 3 группы крыс (по 10 самок и 10 самцов в группе), которым вводили rAd в разных дозах ( $10^{10}$  и  $10^{11}$  в.ч./животное). Контрольной группе вводили ФСБ. После однократного введения препарата за животными наблюдали в течение 14 дней, ежедневно проводя клинический осмотр. Фиксировали параметры функционального состояния, внешний вид, физиологические функции. На 0, 7 и 14-й дни производили взвешивание. На 14-й день животных подвергали эвтаназии и проводили полную некропсию. При некропии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями, а также скелетно-мышечную систему.

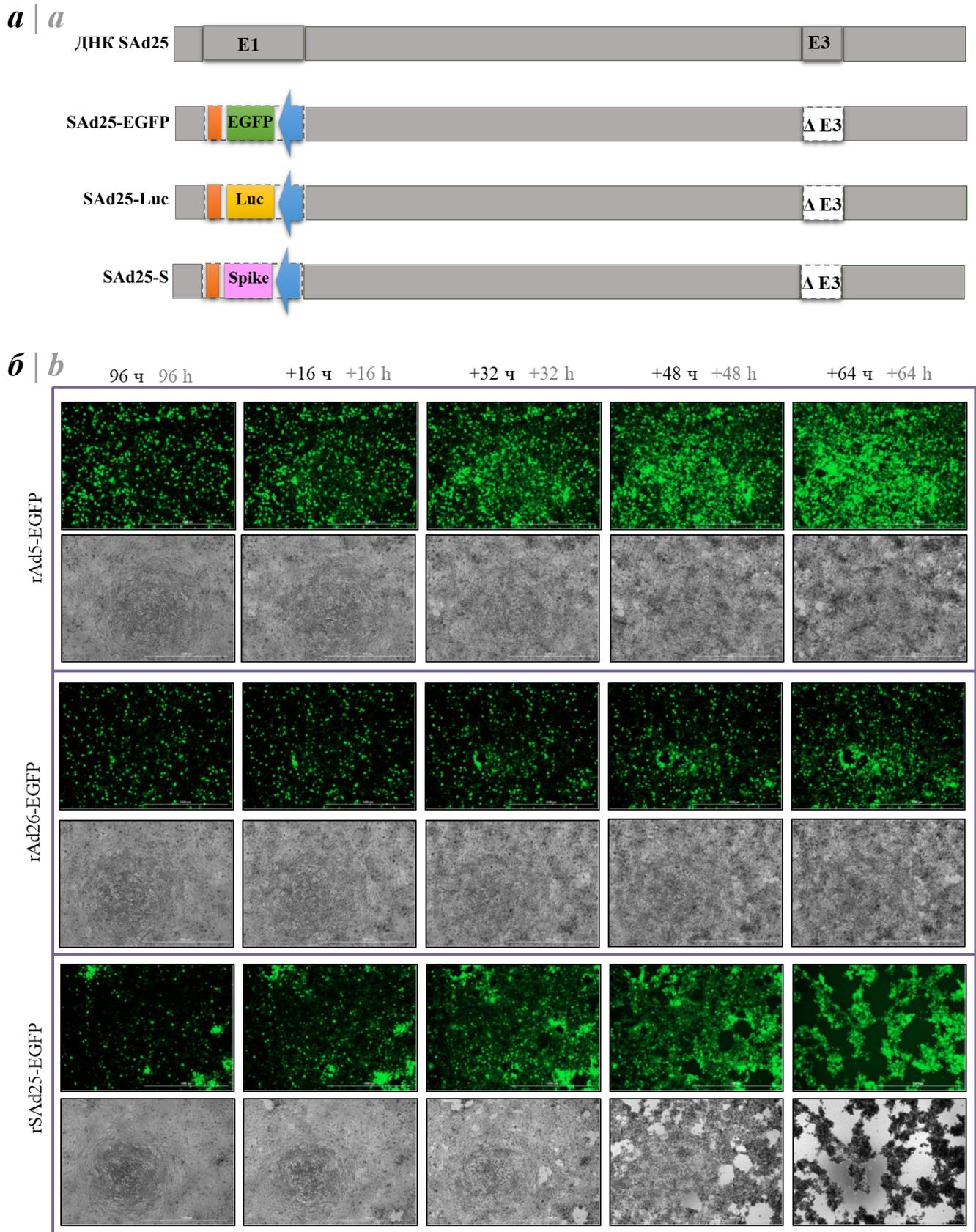
#### *Статистический анализ*

Обработку данных проводили с использованием компьютерных программ «GraphPad 8.0» («GraphPad Software») и «Excel» («Microsoft»). Для количественных результатов рассчитывали среднее арифметическое, среднее геометрическое, стандартную ошибку среднего, стандартное отклонение. При анализе данных несвязанных выборок использовали критерий Стьюдента, критерий Манна–Уитни или критерий Краскела–Уоллиса. Априорный уровень значимости принимали равным  $\alpha = 0,05$ . Различия считали статистически достоверными при достигнутом уровне значимости  $p < \alpha$ .

## **Результаты**

### *Конструирование рекомбинантных векторов на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа*

Рекомбинантный репликативно-дефектный вектор на основе SAd25 с репортерным геном EGFP (rSAd25-EGFP) получен ранее [12]. Аналогичным образом были получены рекомбинантные векторы, несущие ген люциферазы (rSAd25-Luc) и ген S-белка коронавируса SARS-CoV-2 (rSAd25-S-CoV2) (рис. 1, а).



**Рис. 1.** Схематическое изображение геномов рекомбинантных SAd25 (а) и сравнение эффективности репродукции rSAd25-EGFP, rAd5-EGFP и rAd26-EGFP в HEK 293 (б).

**Fig. 1.** Schematic representation of the recombinant SAd25 genomes (a) and comparison of the reproduction efficiency of rSAd25-EGFP, rAd5-EGFP and rAd26-EGFP in HEK 293 (b).

Для оценки эффективности репродукции рекомбинантного вектора на основе Ad обезьян в пермиссивной культуре использовали rSAd25-EGFP, несущий ген репортерного флуоресцентного белка. В качестве векторов сравнения служили rAd5-EGFP и rAd26-EGFP с аналогичным трансгеном. Клетки HEK 293 инфицировали исследуемыми Ad из расчёта приблизительно 1 инфекционная частица на 100 клеток. Визуальную оценку результатов проводили начиная с 96 ч после трансдукции каждые 16 ч (рис. 1, б).

Через 96 ч наблюдали интенсивную флуоресценцию, индуцируемую рекомбинантными вирусными векторами. При этом, в отличие от векторов сравнения, только в лунках с rSAd25-EGFP детектировали формирование флуоресцентных фокусов, что свидетельствует о более высокой скорости накопления вирусного потомства в заражённых клетках. С течением времени фокусы увеличивались в размере, что приводило к лизису клеточного монослоя и ярко выраженному цитопатическому действию. Таким образом, вектор rSAd25 обладает литическим потенциалом, репликация приводит к значительно большему повреждению клеток в сравнении с rAd5 и rAd26.

#### Исследование тропизма rSAd25-EGFP in vitro

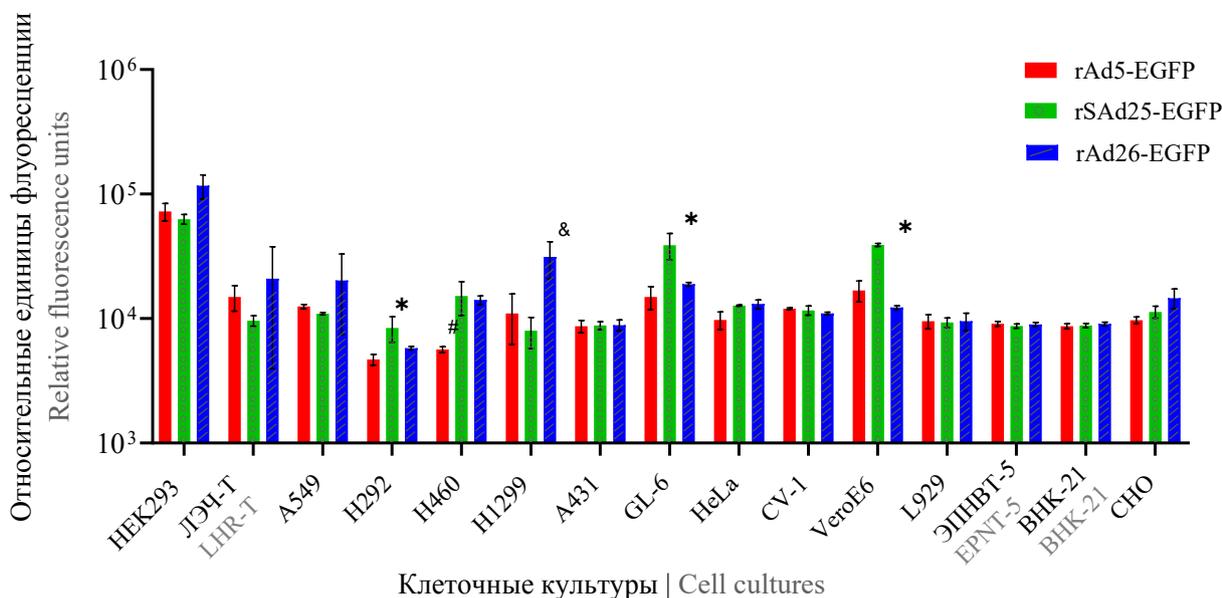
Для определения тропизма rSAd25 была исследована эффективность трансдукции различных типов клеток (человека, хомячка, обезьяны, мыши) по сравнению с широко используемыми векторами rAd5 и rAd26. Используемые репликативно-дефек-

тные векторы содержали ген *EGFP* под контролем промотора цитомегаловируса, что обеспечивает аналогичные уровни экспрессии после трансдукции. Все клеточные линии были трансформированы rSAd25-EGFP, rAd5-EGFP и rAd26-EGFP в дозе 1 ТЦД<sub>50</sub>/клетку. Указанная доза вируса, с одной стороны, не обладает цитотоксичностью, а с другой — позволяет рассчитывать на то, что каждая клетка будет содержать примерно только 1 в.ч. Трансдукция более высокой дозой приводит к заражению одной клетки несколькими вирусными частицами, и, следовательно, экспрессия трансгена не линейна. Эффективность трансдукции оценивали по уровню флуоресценции EGFP в клетках и выражали в относительных единицах. Итоговое значение определяли путём вычитания уровня флуоресценции интактных клеток из уровня флуоресценции трансдуцированных (рис. 2).

Экспрессия EGFP была обнаружена во всех используемых типах клеток. Трансдукция клеток обезьян Vero E6 отличалась при использовании различных Ad-векторов. Наибольший уровень экспрессии EGFP в клетках Vero E6 наблюдали для rSAd25-EGFP.

В клетки хомячка (ВНК-21, СНО) и мыши (L929, ЭПНТ-6) исследованные Ad проникали с сопоставимой эффективностью.

Тропизм rSAd25-EGFP, rAd5-EGFP и rAd26-EGFP отличался в клетках человека. SAd25-EGFP с большей эффективностью проникал в клетки глиобластомы человека GL-6. Уровень флуоресценции



**Рис. 2.** Тропизм rAd5-EGFP, rAd26-EGFP и rSAd25-EGFP к различным культурам клеток млекопитающих.

\* — статистически достоверная разница с rSAd25-EGFP; & — статистически достоверная разница с rAd26-EGFP; # — статистически достоверная разница с rAd5-EGFP.

**Fig. 2.** Tropism of rAd5-EGFP, rAd26-EGFP and rSAd25-EGFP to different mammalian cell cultures.

\* — statistically significant difference with rSAd25-EGFP; & — statistically significant difference with rAd26-EGFP; # — statistically significant difference with rAd5-EGFP.

rAd25-EGFP в клетках карциномы лёгкого человека H292 и H460 был достоверно выше, чем для rAd5-EGFP. При этом в другой линии клеток карциномы лёгкого (H1299) преимущество показал rAd26-EGFP.

### Оценка биораспределения рекомбинантных аденовирусов *in vivo*

Особенности биораспределения rAd5-EGFP, rAd26-EGFP и rAd25-EGFP изучали в экспериментах на мышах линии BALB/c двумя методами: по определению вирусных геномов и по экспрессии трансгена. Через 24 ч после внутримышечного введения rAd в дозе  $10^{10}$  в.ч. анализировали количество копий генома Ad в тканях и органах с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (рис. 3).

Среди 14 отобранных органов и тканей вирусную ДНК в основном обнаруживали в образцах мышц, взятых из места введения. При этом количество копий ДНК rAd25-EGFP в мышцах было значительно больше, чем ДНК rAd26-EGFP и rAd5-EGFP соответственно. Помимо места инъекции, небольшое количество геномов rAd5 было обнаружено в нижних лимфатических узлах, а также в крови (rAd25 и rAd5).

Для биолюминесцентной визуализации использовали rAd, экспрессирующие ген люциферазы, которые вводили животным внутримышечно в дозе  $10^{11}$  в.ч. Для всех типов Ad биолюминесцентный сигнал был обнаружен только в месте инъекции (рис. 4). После однократного введения rAd5-Luc, rAd26-Luc или rAd25-Luc самую высокую экспрессию люциферазы детектировали через 1 сут

после введения (рис. 4, а). Наибольшая активность люциферазы наблюдалась у мышей, которым вводили rAd5-Luc, в то время как наименьшая активность — у группы мышей с rAd26-Luc. Активность люциферазы постепенно снижалась к 21-му дню для всех аденовирусов (рис. 4, б). При этом наименьшее падение уровня экспрессии трансгена (примерно в 100 раз) наблюдали у мышей, которым вводили rAd25-Luc. Для rAd5-Luc и rAd26-Luc активность люциферазы снизилась более чем в 250 и 400 раз соответственно (рис. 4, в).

### Изучение острой токсичности rAd25

Исследование острой токсичности rAd25, экспрессирующего целевой ген белка S вируса SARS-CoV-2 (rAd25-S-CoV2), проводили на мышах и крысах обоих полов при однократном внутримышечном или внутривенном введении. Использование rAd с целевым антигеном позволяет наиболее адекватно оценить токсичность как самого вектора, так и вставки.

Тестируемые животные (мыши и крысы) хорошо перенесли как внутримышечное, так и внутривенное введение Ad-препарата во всех дозах. За время наблюдения ни одно животное не пало, клинических признаков интоксикации не наблюдали. Интегральные показатели состояния животных не различались между опытными и контрольными группами. Отмечена положительная динамика изменения массы тела животных во всех группах (рис. 5).

При макроскопическом исследовании мышей не установлено влияния rAd25 на состояние вну-

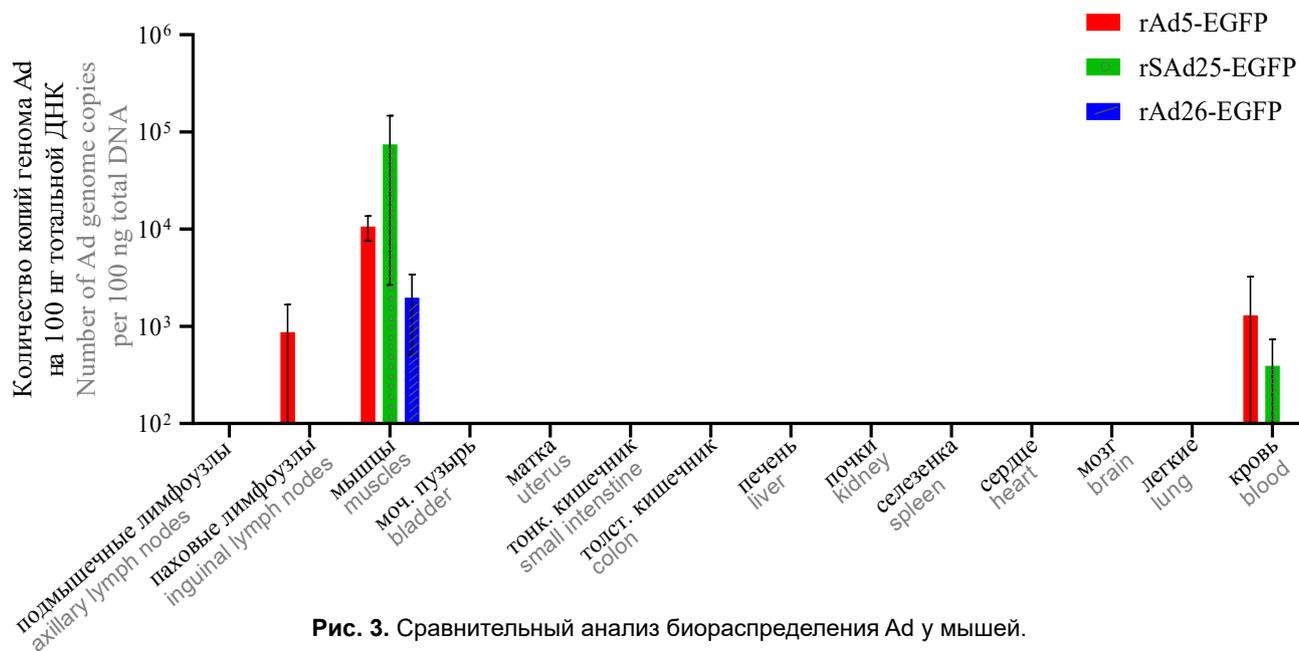
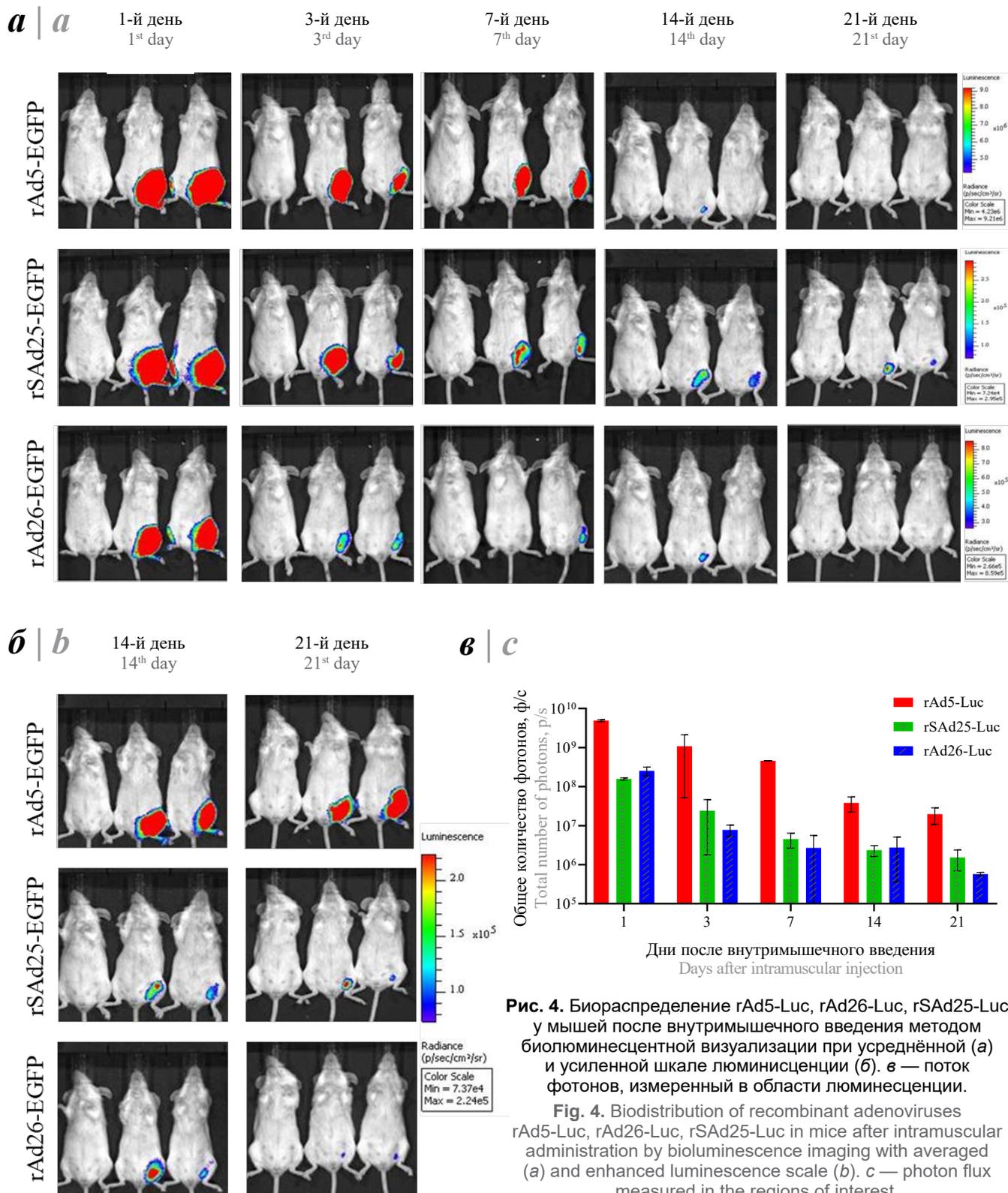


Рис. 3. Сравнительный анализ биораспределения Ad у мышей.

Каждый столбец представляет собой среднее количество геномов со стандартным отклонением.

Fig. 3. Comparative analysis of adenovirus biodistribution in mice.

Each column represents the average number of genomes with a standard deviation.

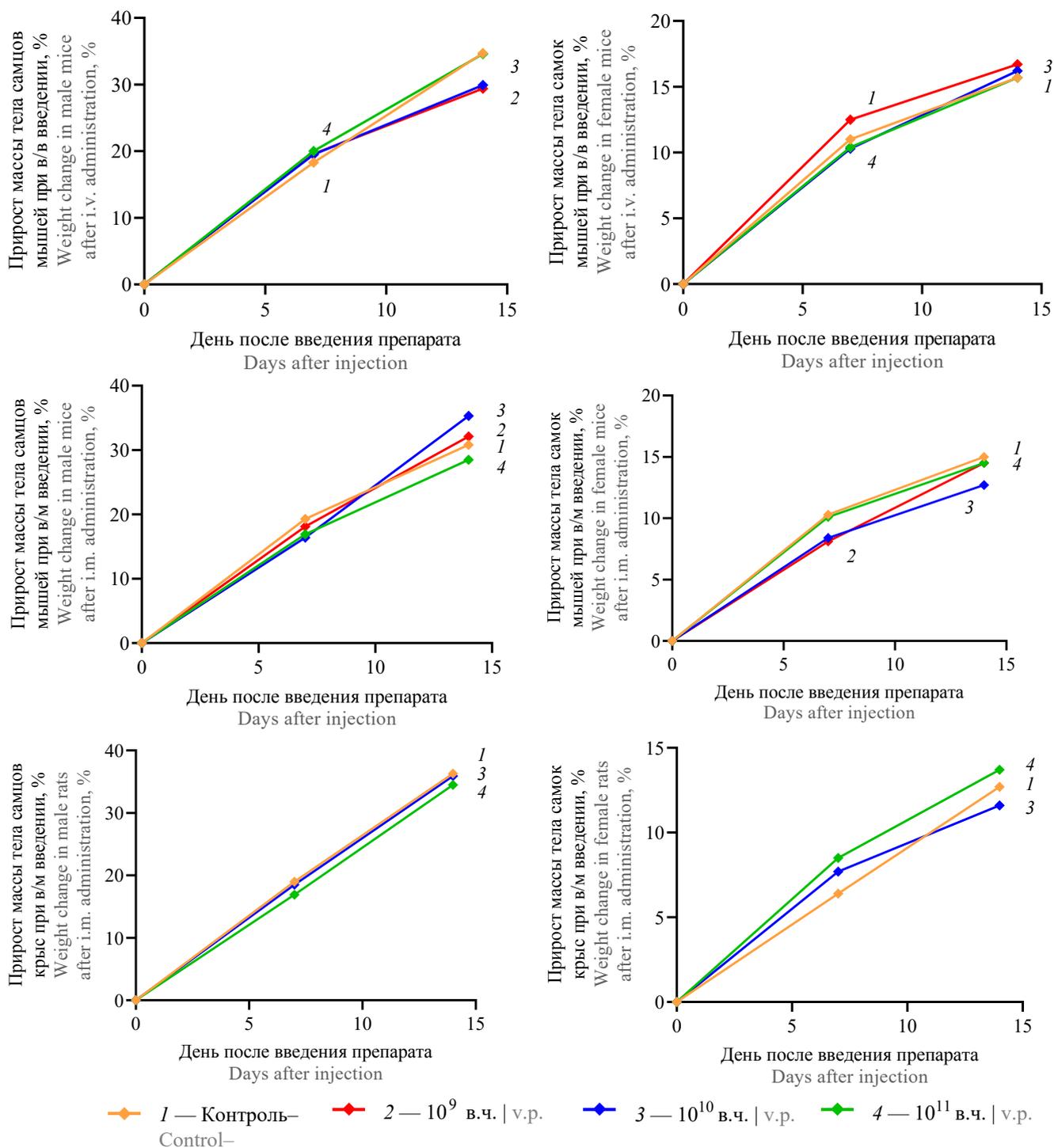


**Рис. 4.** Биораспределение rAd5-Luc, rAd26-Luc, rSAd25-Luc у мышей после внутримышечного введения методом биолуминесцентной визуализации при усреднённой (а) и усиленной шкале люминесценции (б). в — поток фотонов, измеренный в области люминесценции.

**Fig. 4.** Biodistribution of recombinant adenoviruses rAd5-Luc, rAd26-Luc, rSAd25-Luc in mice after intramuscular administration by bioluminescence imaging with averaged (a) and enhanced luminescence scale (b). c — photon flux measured in the regions of interest.

тренних органов; различий между контрольными и опытными группами не обнаружено. Макроскопическое исследование самцов крыс выявило различия между экспериментальной и контрольной группами. У 4 из 10 самцов крыс, которым вводили 10<sup>11</sup> в.ч., и у 2 из 10 самцов крыс, которым вводили

10<sup>10</sup> в.ч., наблюдали участки снижения воздушности тканей лёгкого (ателектазы) и очаги коагуляционного некроза с признаками организации. Важно отметить, что у исследуемых самок патоморфологических изменений лёгких не детектировали. Результаты макроскопического исследования других вну-



**Рис. 5.** Изучение острой токсичности rSAd25-S-CoV2 на мышях и крысах.

в/в — внутривенно; в/м — внутримышечно.

**Fig. 5.** Study of acute toxicity of rSAd25-S-CoV2 in mice and rats.

i.v. — intravenous; i.m. — intramuscular.

тренних органов крыс экспериментальных групп не отличались от таковых контрольной группы.

### Обсуждение

Векторы на основе Ad являются отличными инструментами для доставки чужеродной генетиче-

ской информации в клетки млекопитающих за счёт большой пакующей ёмкости и высоких функциональных титров. Ad-векторы широко применяются для разработки векторных вакцин и генотерапевтических препаратов. Однако их использование может быть ограничено в случаях, когда целевые клетки не

имеют рецепторов, участвующих в прикреплении и интернализации. При этом использование векторов на основе Ad альтернативных серотипов будет иметь значение только при высоком репродуктивном потенциале выбранного вектора.

Стандартной стратегией для получения рекомбинантных репликативно-дефектных Ad является удаление E1-области генома. Одним из важных аспектов успешной комплементации E1-делетированных Ad является функциональное взаимодействие белка E1B 55K (производимого транс-комплементарной клеточной линией) с белком E4 34K в геноме вируса. При этом разработка комплементарных линий клеток для разных серотипов репликативно-дефектных векторов является трудоёмким процессом. Поэтому наличие серотипов, не относящихся к Ad человека, способных реплицироваться в таких клетках, как HEK 293 (клетки человека, трансформированные E1-областью Ad5), является большим преимуществом. Несмотря на то что сходство последовательности между белками E1B 55K Ad5 и SAd25 составляет около 56%, rSAd25-EGFP был получен и накоплен в высоких титрах в культуре клеток HEK 293 без дополнительных модификаций вирусного генома. Полученные результаты значительно отличаются от данных других исследований, в которых показано, что для успешной репликации рекомбинантного вектора необходима замена открытой рамки считывания 6 в E4-области [15].

Характер экспрессии Ad-рецепторов на поверхности клеток (как первичных, так и вторичных) определяет тропизм вируса, который обуславливает спектр применения векторов. SAd25 в качестве первичного клеточного рецептора, как и большинство других серотипов Ad, использует CAR (coxsackie and adenovirus receptor) [16, 17]. Аминокислоты, участвующие во взаимодействии с CAR, находятся в петле AB knob-домена фибера. Ключевыми аминокислотами у Ad5 являются Ser408, Pro409, Lys417 и соответствующие аминокислоты у других серотипов: у Ad26 — Ser196, Pro197, Lys205, у SAd25 — Ser255, Pro256, Lys267 [17]. Последовательности фиберов Ad5 и SAd25 похожи на 63,9%, и неудивительно, что оба распознают один и тот же рецептор. В качестве вторичного рецептора для интернализации SAd25, как и Ad5 и Ad26, использует  $\alpha$ -интегрины за счёт наличия последовательности RGD (Arg-Glu-Asp) в основании пентона [18].

Чтобы лучше понять тропизм SAd25, мы проанализировали эффективность трансдукции SAd25 в сравнении с Ad5 и Ad26, используя репликативно-дефектные векторы, экспрессирующие EGFP (SAd25-EGFP, Ad5-EGFP, Ad26-EGFP). Результаты экспериментов показали, что SAd25 эффективно проникает во все исследуемые клеточные линии. Широкий профиль трансдукции объясняется его

взаимодействием с CAR и  $\alpha$ v-интегринами. Однако взаимодействие с этими рецепторами не является единственным фактором, определяющим клеточный тропизм вируса. На наблюдаемые различия в тропизме Ad подгрупп C, D и E может существенно влиять длина фибера, т. к. она является основным фактором, который определяет стратегию прикрепления Ad к клетке. Поэтому интересным аспектом нашего анализа была повышенная тропность SAd25 к клеткам нейробластомы человека. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы конкретно определить механизм проникновения вируса в эти клетки.

В проведённом исследовании показано биораспределение SAd25 по детекции вирусной ДНК в органах или тканях и экспрессии трансгена. Следует отметить, что эти два показателя не обязательно совпадают друг с другом по нескольким причинам: один и тот же промотор может иметь переменную активность в разных типах клеток; различные типы вирусов могут иметь разные судьбы после попадания в один и тот же тип клеток; деградировавший вирус в лизосоме больше не может экспрессировать трансген, но вирусная ДНК ещё обнаруживается.

Учитывая, что внутримышечный путь является наиболее часто используемой стратегией вакцинации, проведено сравнение векторов на основе разных типов Ad после однократного введения. Локальная экспрессия гена люциферазы продолжалась 3 нед и постепенно снижалась. Уровень экспрессии после введения rSAd25-Luc был ниже, чем после rAd5-Luc, но выше, чем после введения rAd26-Luc. Таким образом, полученные данные показали, что SAd25 может быть отличным вектором для разработки вакцин, наряду с Ad5 и Ad26.

Результаты определения острой токсичности продемонстрировали, что однократное внутримышечное или внутривенное введение SAd25 мышам в дозах, превышающих эквитерапевтическую дозу в 100 и 1000 раз, хорошо переносится животными. Гибель и клинические проявления токсических реакций не наблюдали. Однократное внутримышечное введение SAd25 крысам в диапазоне исследуемых доз не приводило к значимому токсическому действию. У некоторых самцов крыс были обнаружены патоморфологические изменения в лёгких, которые не сопровождалась клиническими проявлениями. Других токсических реакций не обнаружено. Не ясно, связаны ли эти изменения с введением Ad-вектора или вызваны другими факторами, а также являлись ли изменения временными или носили постоянный характер. Указанные факторы требуют дальнейшего изучения, в том числе проведения полного цикла доклинических исследований. В целом полученные данные согласуются с результатами, полученными для других векторов на основе различных Ad [19–21].

## Заключение

Новая платформа на основе SAd25 не уступает уже существующим и хорошо зарекомендовавшим себя платформам на основе Ad5 и Ad26. Учитывая актуальные вызовы, такие как появление новых вирусных инфекций, например пандемия COVID-19, и возвращение в популяцию известных патогенов, использование Ad обезьян может существенно ускорить процесс разработки и внедрения новых вакцин. В конечном итоге это будет способствовать улучшению здоровья населения как в России, так и за её пределами.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Benko M., Aoki K., Arnberg N., et al. ICTV virus taxonomy profile: adenoviridae 2022. *J. Gen. Virol.* 2022;103:001721. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721>
- Crystal R.G. Adenovirus: The first effective *in vivo* gene delivery vector. *Hum. Gene Ther.* 2014;25:3–11. DOI: <https://doi.org/10.1089/hum.2013.2527>
- Fougeroux C., Holst P.J. Future prospects for the development of cost-effective adenovirus vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:686. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18040686>
- Majhen D. Human adenovirus type 26 basic biology and its usage as vaccine vector. *Rev. Med. Virol.* 2022;32:e2338. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.2338>
- Patel R., Kaki M., Potluri V.S., et al. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022;18:2002083. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>
- Ledgerwood J.E., Sullivan N.J., Graham B.S. Chimpanzee adenovirus vector Ebola vaccine – preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 2015;373:776. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMc1505499>
- Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020;396(10255):887–97. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
- Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017;13(3):613–20. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1238535>
- Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2020;396(10249):479–88. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)
- Trivedi P.D., Byrne B.J., Corti M. Evolving horizons: adenovirus vectors' timeless influence on cancer, gene therapy and vaccines. *Viruses.* 2023;15(12):2378. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15122378>
- Marquez-Martinez S., Vijayan A., Khan S., Zahn R. Cell entry and innate sensing shape adaptive immune responses to adenovirus-based vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2023;80:102282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2023.102282>
- Ожаровская Т.А., Попова О., Зубкова О.В. и др. Разработка и характеристика векторной системы на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. *Вестник РГМУ.* 2023;(1):4–11. Ozharovskaja T.A., Popova O., Zubkova O.V., et al. Development and characterization of a vector system based on the simian adenovirus type 25. *Bulletin of RSMU.* 2023;(1):4–11. DOI: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2023.006>
- Logunov D.Y., Zubkova O.V., Karyagina-Zhulina A.S., et al. Identification of HI-like loop in CELO adenovirus fiber for incorporation of receptor binding motifs. *J. Virol.* 2007;81(18):9641–52. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00534-07>
- Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016;5(2):85–6. DOI: <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Lan W., Quan L., Li Y., et al. Isolation of novel simian adenoviruses from macaques for development of a vector for human gene therapy and vaccines. *J. Virol.* 2023;97(10):e0101423. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01014-23>
- Roelvink P.W., Lizonova A., Lee J.G., et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 1998;72(10):7909–15. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.72.10.7909-7915.1998>
- Law L.K., Davidson B.L. What does it take to bind CAR? *Mol. Ther.* 2005;12(4):599–609. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yth.2005.05.017>
- Zhang Y., Bergelson J.M. Adenovirus receptors. *Journal of Virology.* 2005;79(19):12125–31. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12125-12131.2005>
- Tandon M., Sharma A., Vemula S.V., et al. Sequential administration of bovine and human adenovirus vectors to overcome vector immunity in an immunocompetent mouse model of breast cancer. *Virus Res.* 2012;163(1):202–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.031>
- Lichtenstein D.L., Spencer J.F., Dronin K., et al. An acute toxicology study with INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, in mice and permissive Syrian hamsters; comparisons with wild-type Ad5 and a replication-defective adenovirus vector. *Cancer Gene Ther.* 2009;16(8):644–54. DOI: <https://doi.org/10.1038/cgt.2009.5>
- Hassan P.M., Ali T., Saber E., et al. Potency, toxicity and protection evaluation of PastoCoAd candidate vaccines: Novel pre-clinical mix and match rAd5 S, rAd5 RBD-N and SOBERANA dimeric-RBD protein. *Vaccine.* 2022;40(20):2856–68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.03.066>

### Информация об авторах

**Вавилова Ирина Викторовна**<sup>✉</sup> — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, [vavilovairinav@yandex.ru](mailto:vavilovairinav@yandex.ru), <https://orcid.org/0009-0008-6272-0368>

**Ожаровская Татьяна Андреевна** — к. б. н., с. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7147-1553>

**Зубкова Ольга Вадимовна** — к. б. н., в. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7893-8419>

**Попова Ольга** — м.н.с., лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3248-1227>

**Воронина Дарья Владимировна** — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6629-744X>

**Голдовская Полина Павловна** — лаборант-исследователь лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0000-1965-0482>

**Зрелкин Денис Игоревич** — м. н. с. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0899-8357>

**Джаруллаева Алина Шахмировна** — к. б. н., н. с. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1743-0798>

**Должикова Инна Вадимовна** — к. б. н., зав. лаб. государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

**Щебляков Дмитрий Викторович** — к. б. н., в. н. с., зав. лаб. иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

**Логунов Денис Юрьевич** — д. б. н., академик РАН, зав. лаб. клеточной микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

**Александр Леонидович Гинцбург** — д. б. н., академик РАН, профессор, директор НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

**Участие авторов:** Вавилова И.В. — проведение экспериментов, статистическая обработка данных, визуализация, написание и редактирование статьи; Ожаровская Т.А., Попова О. — проведение исследований, получение генно-инженерных конструкций; Зубкова О.В. — участие в формулировании концепции и плана экспериментов, редактирование текста статьи; Воронина Д.В. — проведение иммунологических исследований; Зрелкин Д.И. — проведение ПЦР-анализов и обработка данных; Голдовская П.П., Джаруллаева А.Ш. — комплекс работ по экспериментам с животными; Должикова И.В. — редактирование текста рукописи; Щебляков Д.В. — редактирование текста рукописи, концептуализация, руководство; Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. — руководство проектом госзадания, привлечение финансирования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.08.2024;  
принята к публикации 10.10.2024;  
опубликована 30.10.2024

### Information about the authors

**Irina V. Vavilova**<sup>✉</sup> — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, [vavilovairinav@yandex.ru](mailto:vavilovairinav@yandex.ru), <https://orcid.org/0009-0008-6272-0368>

**Tatiana A. Ozharovskaia** — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7147-1553>

**Olga V. Zubkova** — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7893-8419>

**Olga Popova** — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3248-1227>

**Daria V. Voronina** — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6629-744X>

**Polina P. Goldovskaya** — laboratory assistant researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0009-0000-1965-0482>

**Denis I. Zrelkin** — junior researcher, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0899-8357>

**Alina Sh. Dzharrullaeva** — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of cellular microbiology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1743-0798>

**Inna V. Dolzhikova** — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of the State Virus Collection, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

**Dmitry V. Shcheblyakov** — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of immunobiotechnology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

**Denis Yu. Logunov** — D. Sci. (Biol.), RAS Full Member, Head, Laboratory of cellular microbiology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

**Alexander L. Gintsburg** — D. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Director, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

**Author contribution:** Vavilova I.V. — experimental work, statistical data processing, visualization, writing and editing the article; Ozharovskaia T.A., Popova O. — research work, obtaining genetically engineered constructs; Zubkova O.V. — participation in the formulation of the concept and plan of experiments, editing the text of the article; Voronina D.V. — immunological studies; Zrelkin D.I. — PCR analysis and data processing; Goldovskaya P.P., Dzharrullaeva A.S. — a set of works on experiments on animals; Dolzhikova I.V. — editing the text of the article; Shcheblyakov D.V. — editing the manuscript, conceptualization, supervision; Logunov D.Y., Gintsburg A.L. — project management of the state task, funding acquisition. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 09.08.2024;  
accepted for publication 10.10.2024;  
published 30.10.2024