



Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2

Файзулов Е.Б.¹, Корчевая Е.Р.¹, Грачева А.В.¹, Самойликов Р.В.¹, Смирнова Д.И.¹, Соколова О.С.², Глухов Г.С.², Моисеенко А.В.², Ленева И.А.¹, Нагиева Ф.Г.¹, Свитич О.А.^{1,3}, Зверев В.В.^{1,3}

¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Россия;

²Московский государственный университет имени Ломоносова, Россия;

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Россия

Аннотация

Введение. В связи с появлением новых эпидемиологически значимых вариантов SARS-CoV-2 актуальной является разработка живой вакцины, способной обеспечить защиту против широкого спектра антигенных вариантов вируса. **Целью** исследования являлись получение и биологическая характеристика аттенуированных путём холодовой адаптации вариантов SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka и его варианты культивировали в клетках Vero и Calu-3. Количественное определение вируса проводили путём титрования в клетках Vero и методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Вирионы SARS-CoV-2 характеризовали методом трансмиссионной электронной микроскопии. Геномные последовательности вируса определяли методом нанопорового секвенирования. Аттенуационный (*att*) фенотип вариантов SARS-CoV-2 определяли на животной модели COVID-19 на сирийских хомяках.

Результаты. В результате длительного пассирования штамма Dubrovka в культуре клеток Vero при постепенно понижаемой до 23°C температуре и последующего клонирования получены холодоадаптированные (*ca*, *cold-adapted*) варианты SARS-CoV-2 Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2. В геномах *ca*-вариантов обнаружено до 20 нуклеотидных и 18 аминокислотных замен. *Ca*-варианты, в отличие от родоначального штамма Dubrovka, эффективно размножались при 23°C, а вариант Dubrovka-*ca*-D2 имел температурочувствительный (*ts*) фенотип (не размножился при температуре 39°C). *Ca*-варианты вируса плохо размножались при температуре 37°C в культуре клеток лёгких человека Calu-3, что, наряду с *ts*-фенотипом, может быть маркером аттенуации вируса по отношению к человеку. При интраназальном заражении сирийских хомяков *ca*-варианты вируса проявили аттенуационный фенотип — не приводили к снижению аппетита, вялости, сонливости, не замедляли прироста массы тела, значительно медленнее размножались в лёгких и мозге по сравнению с вирулентным штаммом Dubrovka.

Заключение. Полученные в настоящей работе аттенуированные *ca*-варианты SARS-CoV-2 Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 представляют интерес для дальнейшего исследования в качестве кандидатных вакцинных штаммов для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, холодоадаптированный вирус, аттенуированный вирус, вакцинный штамм

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 Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 2 от 24.05.2021).

Благодарность. Электронную микроскопию выполняли на уникальной научной установке «Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия» МГУ имени М.В. Ломоносова.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60079 и с использованием научного оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021). Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Для цитирования: Файзулов Е.Б., Корчевая Е.Р., Грачева А.В., Самойликов Р.В., Смирнова Д.И., Соколова О.С., Глухов Г.С., Моисеенко А.В., Ленева И.А., Нагиева Ф.Г., Свитич О.А., Зверев В.В. Биологическая характеристика холодоадаптированных вариантов коронавируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(4):397–409. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-280>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-280>

Biological characterization of cold-adapted SARS-CoV-2 variants

Evgeny B. Faizuloev¹✉, Ekaterina R. Korchevaya¹, Anastasiia V. Gracheva¹, Roman V. Samoilikov¹, Daria I. Smirnova¹, Olga S. Sokolova², Grigory S. Glukhov², Andrey V. Moiseenko², Irina A. Leneva¹, Firaya G. Nagieva¹, Oksana A. Svitich^{1,3}, Vitaly V. Zverev^{1,3}

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The emergence of new epidemiologically significant variants of SARS-CoV-2 has shifted emphasis to development of a live vaccine, which would be able to provide protection against a wide range of antigenic variants of the virus. The **aim** of the study was to obtain SARS-CoV-2 variants attenuated through cold adaptation and to provide their biological characterization.

Materials and methods. The Dubrovka laboratory strain of SARS-CoV-2 and its variants were cultured on Vero and Calu-3 cells. The virus quantification was performed by virus titration in Vero cells and by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. SARS-CoV-2 virions were analyzed using transmission electron microscopy. Genome sequences of the virus were identified by nanopore sequencing. The attenuation (*att*) phenotype of SARS-CoV-2 variants was identified using Syrian hamsters as an animal model for COVID-19.

Results. Cold-adapted (*ca*) SARS-CoV-2 variants – Dubrovka-*ca*-B4 and Dubrovka-*ca*-D2 were produced by continued passaging of the Dubrovka strain in the Vero cell culture at the temperature being gradually decreased to 23°C and by subsequent cloning. Up to 20 nucleotide substitutions and 18 amino acid substitutions were detected in genomes of *ca*-variants. *Ca*-variants, as distinct from the parent Dubrovka strain, actively replicated at 23°C, while the Dubrovka-*ca*-D2 variant had a temperature-sensitive (*ts*) phenotype (did not replicate at 39°C). *Ca*-variants of the virus replicated poorly at 37°C in the Calu-3 human lung cell culture, which, along with the *ts*-phenotype, can be a marker of virus attenuation for humans. In the intranasally infected Syrian hamsters, *ca*-variants of the virus demonstrated an attenuation phenotype: they did not cause loss of appetite, fatigue, drowsiness, did not slow down weight gain, replicating much more slowly in the lungs and brain compared to the virulent Dubrovka strain.

Conclusion. The obtained attenuated SARS-CoV-2 *ca*-variants, Dubrovka-*ca*-B4 and Dubrovka-*ca*-D2, should be studied further as candidate vaccine strains for a live attenuated vaccine against COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, cold-adapted virus, attenuated virus, vaccine strain

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 Ethics Committee of the I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Protocol No. 2, May 24, 2021).

Acknowledgements. The electron microscopy was performed using the unique three-dimensional electron microscopy and spectroscopy equipment at the Lomonosov Moscow State University.

Funding source. The study was performed with financial support from the Russian Foundation for Basic Research as part of scientific project No. 20-04-60079. The scientific equipment was provided by the Resource Sharing Center of the Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; the project was funded by the Ministry of Education and Science of Russia (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28/7/2021). This study was not supported by any external sources of funding.

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

For citation: Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Gracheva A.V., Samoilikov R.V., Smirnova D.I., Sokolova O.S., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Leneva I.A., Nagieva F.G., Svitich O.A., Zverev V.V. Biological characterization of cold-adapted SARS-CoV-2 variants. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(4):397–409. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-280>

Введение

Вакцинопрофилактика является наиболее эффективным подходом к снижению заболеваемости и смертности от COVID-19. Для специфической профилактики новой коронавирусной инфекции широко применяются вакцины, основанные на вирусных векторах, самореплицирующихся РНК, рекомби-

нантных и нативных вирусных антигенах [1–5]. Эти платформы позволяют быстро разрабатывать вакцины, способные давать протективный иммунный ответ. Основными недостатками таких вакцин является относительно малая продолжительность иммунного ответа, неполный набор вирусных антигенов, быстрое появление ускользающих от

поствакцинального иммунитета вирусов-мутантов, высокая себестоимость производства. Несмотря на беспрецедентные противоэпидемические мероприятия и широкое применение вакцин против COVID-19, пандемическое распространение коронавируса SARS-CoV-2 продолжается даже в странах с широким охватом вакцинацией¹. Регулярно регистрируется появление новых штаммов SARS-CoV-2, отличающихся повышенной эпидемиологической значимостью [6–8]. Так, с августа по ноябрь 2021 г. вариант вируса Delta B.1.617.2, пришедший на смену вариантам Alpha, Beta и Gamma, в общемировой структуре заболеваемости занимал не менее 95% [9]. Вариант Delta обладает повышенной контагиозностью и хуже нейтрализуется антисыворотками, полученными от реконвалесцентов COVID-19, вызванной другими вариантами вируса [10–12]. В начале ноября 2021 г. начал быстро распространяться по всему миру вариант SARS-CoV-2 Omicron B.1.1.529, который уже к февралю 2022 г. занял доминирующую позицию, составляя более 95% всех охарактеризованных секвенированием штаммов². Вариант Omicron имеет несколько делеций в геноме и более 30 аминокислотных замен в S-белке, которые привели к повышению аффинности связывания вируса с ACE2-рецептором и, как следствие, повышенной контагиозности и способности ускользать от нейтрализующих антител [13–18]. Так, в работе J. Bowen и соавт. [14] выявлена пониженная нейтрализующая активность сывороток крови как переболевших людей, так и привитых различными вакцинами против COVID-19: mRNA-1273 («Moderna»), BNT162b2 («Pfizer/BioNTech»), COVID-19 Vaccine AstraZeneca («AstraZeneca»), «Спутник V» (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), Novavax COVID-19 vaccine («Novavax»), BBIP-CorV («Sinopharm»), Ad26.COV2.S («Johnson&Johnson») по отношению к двум линиям Omicron — BA.1 и BA.2. Для варианта Omicron также отмечается снижение нейтрализующей активности сывороток людей, перенёсших инфекцию, вызванную другими вариантами вируса [15]. Нейтрализующая активность сывороток людей, привитых вакциной CoronaVac («Sinovac Biotech Ltd.»), была значительно снижена либо отсутствовала полностью в отношении варианта Omicron [13, 16]. Моноклональные антитела, которые широко используются в терапии COVID-19, менее эффективны в отношении варианта Omicron [17, 18].

Очевидно, что исследования в области создания вакцин, отличающихся высокой протективной активностью в отношении широкого спектра антигенных вариантов SARS-CoV-2, остаются актуаль-

ными. К числу вакцин, способных обеспечить формирование иммунного ответа как к структурным, так и неструктурным вирусным белкам и активацию не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета, относятся живые вакцины. В многочисленных исследованиях доказано, что адаптация вирусов к росту при субоптимальной пониженной температуре приводит к появлению температурочувствительного (*ts*) фенотипа (снижение репликации при температуре 37°C или выше), который ассоциирован с аттенуацией вирулентности для нормального хозяина [19]. При этом полученный холодоадаптированный (*ca*, *cold-adapted*) аттенуированный вирус при иммунизации обеспечивает безопасную и эффективную защиту от заражения вирусом дикого типа [19]. В связи с этим целью настоящего исследования являлись получение и биологическая характеристика *ca*-вариантов коронавируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Вирус и культура клеток. В работе использован лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka (номер GenBank: MW514307.1) [20] и его варианты: Dubrovka-37, Dubrovka-ca, Dubrovka-ca-B4, Dubrovka-ca-D2 (номера GenBank: ON380441.1, ON040960.1, ON059701.1 и ON040961.1 соответственно). Культивирование вируса и экспериментальное заражение проводили на клетках эпителия почки африканской зелёной марышки Vero CCL81 (ATCC) (далее — клетки Vero) и клетках рака лёгких человека Calu-3 HTB-55 (ATCC) (далее — клетки Calu-3). Клетки культивировали при 37°C в питательной среде DMEM на основе буфера Эрла («ПанЭко») с добавлением 5% эмбриональной сыворотки коров («Gibco»), 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко»), 40 мкг/мл гентамицин («ПанЭко») в атмосфере 5% CO₂. Трёхдневный монослой клеток Vero или Calu-3 заражали вирусом SARS-CoV-2 при желаемой множественности заражения (MOI). Адсорбцию вируса проводили в CO₂-инкубаторе в течение 60 мин, затем добавляли поддерживающую среду (DMEM, 300 мкг/мл L-глутамин, 40 мкг/мл гентамицин) и инкубировали при 23–39°C в течение 3–8 сут (в зависимости от варианта вируса и цели эксперимента) в атмосфере 5% CO₂. Для исследования кинетики репродукции вируса культуральную жидкость ежедневно отбирали в течение 4–8 сут и хранили при –80°C до момента исследования методом титрования или количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Животные. В работе использовали 36 золотистых сирийских хомячков-самок массой 40–50 г (НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН). Животные были случайным образом рас-

¹ WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.
URL: <https://covid19.who.int/> (дата обращения: 13.05.2022).

² The GISAID Initiative.
URL: <https://www.gisaid.org/> (дата обращения: 13.05.2022).

Последовательности праймеров, зонда и олигонуклеотида, использованных в работе
Sequences of primers, probe, and oligonucleotide used in the tests

Название Name	Последовательность 5'-3' Sequence 5'-3'	Назначение Application	Источник Source
COVID-19-N-F	GCGTTCTTCGGAATGTGCG	Прямой праймер Forward primer	[22]
COVID-19-N-R	TTGGATCTTTGTCAATCAATTTG	Обратный праймер Reverse primer	
COVID-19-N-P	FAM-AACGTGGTTGACCTACACAGGT-BHQ1	Зонд Probe	
COVN-PC	GCGTTCTTCGGAATGTGCGCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAA CGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTTGGATGACAAAGATCCAA	Калибровочный образец Calibration sample	Собственный дизайн In-house design

пределены по 4 группам ($n = 9$), в том числе три группы для заражения вариантами SARS-CoV-2 и контрольная группа незаражённых животных. 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 Этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 2 от 24.05.2021).

Титрование вируса. Титр вируса SARS-CoV-2 определяли по конечной точке проявления цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток Vero. В лунки 96-луночного планшета вносили последовательные десятикратные разведения вируса в поддерживающей среде и инкубировали в течение 5 сут в атмосфере 5% CO₂ при 37°C (*са*-варианты — при 30°C). Учёт результатов титрования проводили визуально путём микроскопического исследования клеточного монослоя на наличие характерного ЦПД на 5-е сутки после заражения (округление и частичное открепление клеток от монослоя). Титр вируса рассчитывали по М. Ramakrishnan [21] и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

Количественное определение РНК вируса SARS-CoV-2. Выделение вирусной РНК проводили двумя методами: коммерческим набором реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала «МагноПрайм ЮНИ» («НекстБио») в соответствии с инструкцией производителя либо с помощью реагента Triton X-100. Для выделения вирусной РНК с помощью реагента Triton X-100 к 100 мкл вирусосодержащей культуральной жидкости добавляли 10 мкл 4,5% раствора Triton X-100, полученную смесь перемешивали и замораживали. После размораживания образец перемешивали, разбавляли водой без РНКаз в 10 раз и незамедлительно использовали в реакции ОТ-ПЦР-РВ (при расчёте концентрации вирусной РНК применяли поправочный коэффициент 10).

Для выявления вирусной РНК в реакции ОТ-ПЦР-РВ были использованы праймеры и зонд к гену нуклеокапсида N вируса SARS-CoV-2: COVID-19-

N-F, COVID-19-N-R, COVID-19-N-P (таблица) [22]. Для постановки реакции ОТ-ПЦР-РВ использовали набор реагентов «2,5× реакционная смесь для ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой» и обратную транскриптазу MMLV («Синтол»). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала по 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда, Taq ДНК-полимеразу, 30 ед. обратной транскриптазы. Температурно-временной режим: 45°C — 10 мин (1 цикл); 95°C — 5 мин (1 цикл); 95°C — 5 с, 55°C — 45 с (45 циклов). Реакцию проводили в амплификаторе «DTprime» («ДНК-технология»). Все праймеры и зонды синтезированы в «Синтол». Для построения калибровочного графика использовали образцы, полученные в результате последовательных десятикратных разведений синтетического олигонуклеотида COVN-PC (таблица) с известной концентрацией.

Секвенирование генома коронавирусов. Для получения пула ампликонов для последующего полногеномного секвенирования использовали набор NEBNext® ARTIC SARS-CoV-2 для подготовки библиотек (Oxford Nanopore Technologies) («New England Biolabs»). Данный набор разработан для проведения полногеномного секвенирования SARS-CoV-2 на основе протокола «SARS-CoV-2 McGill Nanopore sequencing protocol SuperScript IV_42C_ArticV3» [23]. Для подготовки полученного пула использовали наборы Ligation Sequencing kit 1D и Native Barcoding Kit 1D («Oxford Nanopore Technologies»). Секвенирование проводили в проточной ячейке Flow Cell R9.4 с использованием программного обеспечения «MinKNOW» («Oxford Nanopore Technologies»). Сборку генома осуществляли в программе «Minimap2 v. 2.24»³.

Инактивация вируса SARS-CoV-2 ультрафиолетом (УФ). Культуральную жидкость из флаконов с клетками Vero собирали через 72 ч после заражения вирусом, осветляли центрифугированием при 4000 об/мин и титровали. Инактивацию вируса проводили путём обработки ультрафиолетовым светом ($\lambda = 253,7$ нм) бактерицидного облуча-

³ URL: <https://github.com/lh3/minimap2>

теля «TUV 30W/G30 T8» («Philips»). Чашку Петри диаметром 150 мм с вирусным материалом объёмом 50 мл помещали под лампу на расстоянии 30 см и облучали в течение 4 мин с трёхкратным перемешиванием жидкости через равные промежутки времени. Контроль инактивации вируса проводили путём 3 «слепых» пассажей облучённого вирусного материала на культуре клеток Vero, проводя мониторинг ЦПД и концентрации вирусной РНК на каждом пассажном уровне.

Оценка антигенных свойств SARS-CoV-2, инактивированного УФ. Разведения SARS-CoV-2, инактивированного УФ, анализировали в реакции иммунохроматографии с помощью набора реагентов «SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test» («SD Biosensor Inc.») согласно инструкции по применению.

Оценка *ts*-фенотипа *sa*-вариантов SARS-CoV-2. Клетки Vero заражали *sa*-вариантами SARS-CoV-2 и штаммом Dubrovka при MOI 0,001 и 0,00001 и инкубировали при 37°C и 39°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 сут. Ежедневно отбирали образец культуральной жидкости и хранили при –80°C до исследования. В отобранных образцах определяли титр вируса и концентрацию вирусной РНК. Разница в титре вируса или концентрации вирусной РНК по сравнению с заражением штаммом Dubrovka на 4,0 lg и более свидетельствовала о наличии у вируса *ts*-фенотипа.

Оценка аттенуационного (*att*) фенотипа *sa*-вариантов SARS-CoV-2. Сирийских хомяков заражали интраназально штаммом Dubrovka и *sa*-вариантами вируса в дозе 4,0 lg ТЦД₅₀ ($n = 9$ в каждой группе). Ежедневно оценивали состояние животных и каждые 2 сут проводили контроль массы тела. Через 4 сут после заражения по 4 хомяка из каждой группы гуманно умерщвляли, лёгкие и мозг извлекали, гомогенизировали и хранили при –80°C до исследования. У остальных животных продолжали контролировать состояние и массу тела до 8 сут после заражения. В гомогенатах органов определяли титр вируса и концентрацию вирусной РНК. Достоверная разница в массе тела титре вируса или концентрации вирусной РНК в лёгких и мозге по сравнению с заражением штаммом Dubrovka свидетельствовала о наличии у вируса *att*-фенотипа.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Образцы инактивированного УФ вирусного материала были нанесены на сетки для ТЭМ с углеродной подложкой («Ted Pella Carbon Type B», 300 mesh) и негативно контрастированы 1% уранилацетатом. Изображения ТЭМ были получены с помощью электронного микроскопа «JEM-2100» («Jeol») 200 кВ, оснащённого камерой «Gatan Orius SC200D» (2k × 2k).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения «Graphpad

Prism v.5.03». Достоверность разницы определяли согласно U-критерию Манна–Уитни с 95% доверительным интервалом.

Требования к безопасности работ. Все работы с вирусом SARS-CoV-2 проводили в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 в условиях лаборатории 3-го уровня биобезопасности.

Результаты

Получение холодаадаптированных вариантов SARS-CoV-2

В работе использован лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka, ранее охарактеризованный в НИИВС им. И.И. Мечникова. Штамм Dubrovka был получен летом 2020 г. путём изоляции в культуре клеток Vero из клинического образца пациента с подтверждённым диагнозом COVID-19. Идентификацию вируса проводили методами ОТ-ПЦР-РВ, реакции нейтрализации с сыворотками реконвалесцентов COVID-19 и полногеномного секвенирования (номер GenBank MW514307.1), показавших принадлежность изолята к виду *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (вирус SARS-CoV-2, клада GR по классификации GISAID, линия B.1.1.317 по классификации Pangolin) [20]. Особенностью штамма Dubrovka является 27 нт делеция в гене *S* (9 аминокислот с 68 по 76 а.о. — YMSLGPMVL) по сравнению с геном *S* штамма Wuhan-Hu-1 (номер GenBank NC_045512.2) [20]. Все варианты штамма Dubrovka, полученные в настоящем исследовании, сохраняли эту делецию.

С целью изучения адаптационных способностей SARS-CoV-2 проведено длительное пассирование штамма Dubrovka в культуре клеток Vero при постоянной температуре 37°C или постепенно понижаемой до 23°C температуре в течение 42 пассажей. Полученные варианты вируса были названы Dubrovka-37 и Dubrovka-ca (cold-adapted) соответственно (рис. 1). Получение варианта Dubrovka-ca проводили по следующей схеме: 10 пассажей при

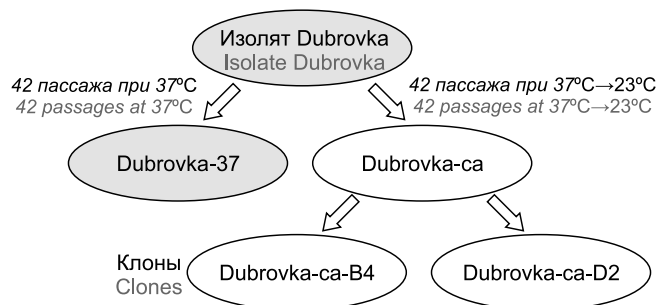


Рис. 1. Схема адаптации SARS-CoV-2 к культуре клеток Vero и выращиванию при пониженной температуре.

Fig. 1. The schematic diagram of SARS-CoV-2 adaptation to the Vero cell culture and growth at low temperature.

37°C, далее температуру культивирования понижали на 1°C через каждые 2 пассажа, заключительные 6 пассажей проводили при 23°C (всего 42 пассажа). Далее путём трёхкратного клонирования методом предельных разведений при 23°C на основе варианта Dubrovka-ca были получены два клона — В4 и D2 (далее — варианты Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2).

Для вариантов штамма Dubrovka: Dubrovka-37, Dubrovka-ca, Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 были определены полногеномные последовательности (номера GenBank ON380441.1, ON040960.1, ON059701.1 и ON040961.1 соответственно). Первичный анализ геномов разных вариантов штамма Dubrovka выявил много нуклеотидных замен, большинство из которых были несинонимичными (приводили к аминокислотной замене). В геноме варианта Dubrovka-37 в результате длительной адаптации к культуре клеток Vero при 37°C произошло 7 нуклеотидных замен, из которых 5 были несинонимичными. В геноме варианта Dubrovka-ca в результате холодовой адаптации в культуре клеток Vero произошло 17 нуклеотидных замен, из которых 16 замен были несинонимичными. Вместе с тем в геномах клонов ca-вариантов: Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 обнаружены 16 и 20 нуклеотидных замен, которые привели к 14 и 17 аминокислотным заменам соответственно. В гене *S* локализовано наибольшее число несинонимичных замен: 2 — в геноме Dubrovka-37, 5 — Dubrovka-ca, 6 — Dubrovka-ca-B4, 7 — Dubrovka-ca-D2. Примечательно, что в геноме варианта Dubrovka-ca-D2, обладающего *ts*-фенотипом, из 20 нуклеотидных замен 11 являются уникальными по отношению к Dubrovka-37, Dubrovka-ca и Dubrovka-ca-B4; из них 9 приводят к аминокислотным заменам.

Фенотипическая характеристика вариантов SARS-CoV-2

При пассировании в культуре клеток Vero при 37°C титр вируса возрастал (от 4,3 lg ТЦД₅₀/мл на 2-м пассаже до 9,0 lg ТЦД₅₀/мл на 30-м пассаже), а ЦПД становилось все более выраженным. Если при заражении вирусом 2-го пассажа выживаемость клеток Vero на 5-е сутки после инфицирования составляла 92%, то уже к 14-му пассажу достигала минимального уровня (2–4%) [20]. Сроки проявления ЦПД в процессе холодовой адаптации изменялись с 2–3 сут при 37°C до 5–7 сут после инфицирования при 23°C. При заражении вариантом Dubrovka-ca ЦПД проявлялось в нарушении целостности монослоя, появлении скоплений округлённых клеток без открепления клеток от поверхности флакона (рис. 2).

Вариант Dubrovka-ca при 23°C размножался значительно медленнее, чем родительский штамм Dubrovka при оптимальной для него температуре 37°C. В связи с этим клетки заражали большей дозой

варианта Dubrovka-ca и проводили более длительную инкубацию. Если пик репродукции штамма Dubrovka (17 пассаж) при 37°C (МОИ 0,00001) приходился на 2-е сутки, достигая 9,0 lg ТЦД₅₀/мл, то для варианта Dubrovka-ca при 23°C (МОИ 0,001) — на 7-е сутки, достигая 8,0 lg ТЦД₅₀/мл (рис. 3). Репродукция вируса сопровождалась накоплением в культуральной жидкости вирусной РНК (рис. 3).

Вариант Dubrovka-37 при 23°C не размножался в культуре клеток Vero, тогда как варианты Dubrovka-ca, Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 на 7-е сутки достигали титра 4,5–8,0 ТЦД₅₀/мл в зависимости от МОИ.

Методом иммунохроматографии во всех инактивированных УФ препаратах вируса — Dubrovka, Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 — был выявлен антиген SARS-CoV-2. Методом ТЭМ в этих же препаратах обнаружены вирусоподобные частицы с морфодиагностическими признаками коронавируса: вирионы имели округлую форму с характерными шипами 12–15 нм на оболочке (тримеры S-белка) (рис. 4). Диаметр вириона составлял 90–110 нм.

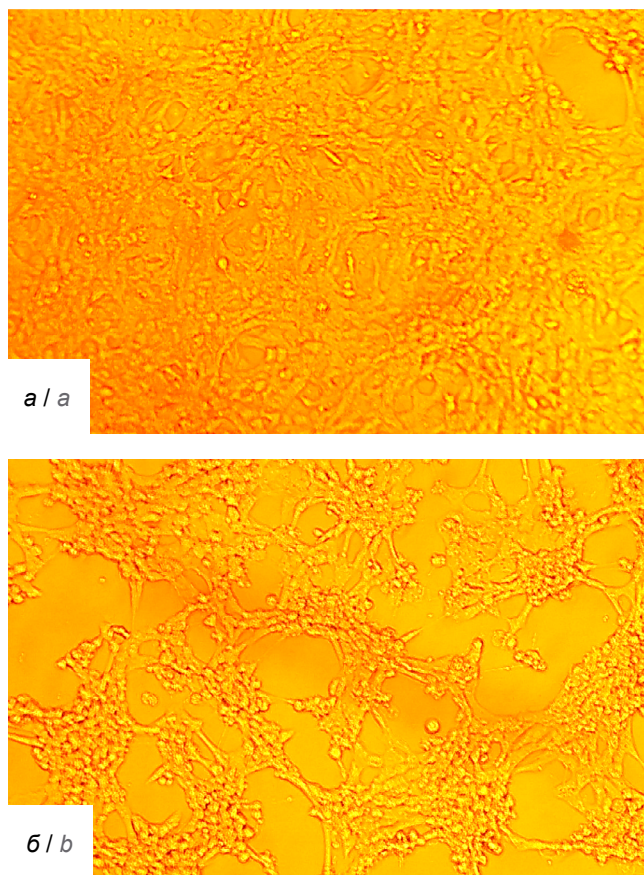


Рис. 2. Цитопатогенное действие штамма Dubrovka-ca в культуре клеток Vero при 23°C (7-е сутки после инфицирования).

a — незаражённые клетки; *б* — Dubrovka-ca. МОИ 0,001.

Fig. 2. Cytopathic effect of the Dubrovka-ca strain in the Vero cell culture at 23°C (the 7th day after the infection).

a — non-infected cells; *b* — Dubrovka-ca. MOI 0.001.

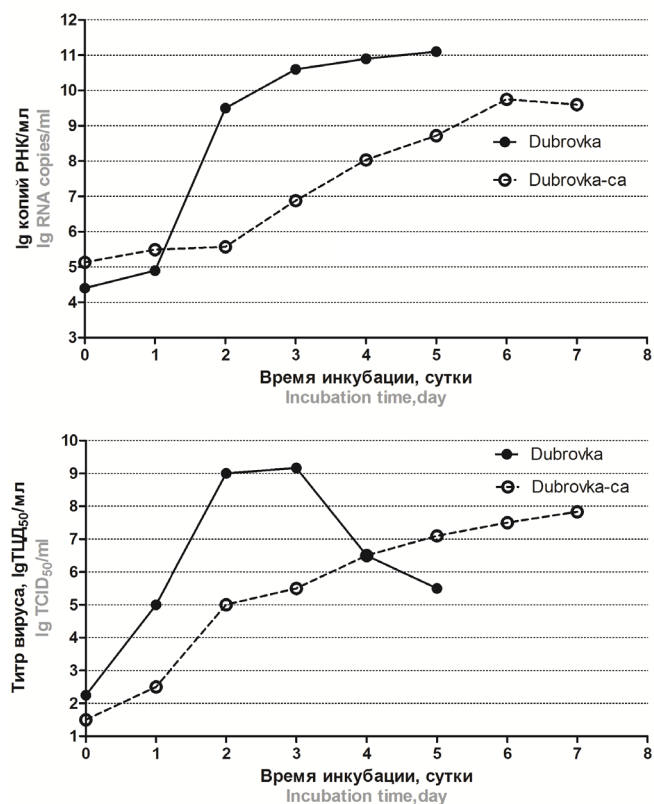


Рис. 3. Кинетика репродукции вируса и накопления вирусной РНК штамма Dubrovka (при 37°C) и варианта Dubrovka-ca (при 23°C) в культуре клеток Vero.

Приведены средние значения по результатам 2 независимых экспериментов. Заражение штаммом Dubrovka проводили при MOI 0,00001, вариантом Dubrovka-ca — при MOI 0,001.

Fig. 3. Kinetics of virus replication and viral RNA accumulation for the Dubrovka strain (at 37°C) and the Dubrovka-ca variant (at 23°C) in Vero cell culture.

The results of 2 independent tests are presented as mean values. The infection with the Dubrovka strain was performed at MOI 0.00001, the infection with the Dubrovka-ca variant — at MOI 0.001.

Форма и размер полученных вирусоподобных частиц хорошо согласуются с полученными ранее микрофотографиями вируса SARS-CoV-2 [5, 24].

Полученные клоны варианта Dubrovka-ca были исследованы на наличие температурочувствительного (*ts*) фенотипа, который заключается в неспособности вируса эффективно размножаться при 37°C или 39°C. Интенсивность репродукции клонов Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 (MOI 0,001) при температуре культивирования 37°C клеток Vero была высокой и достоверно не отличалась от штамма Dubrovka (рис. 5). При температуре культивирования 39°C вариант Dubrovka-ca-D2 не размножился (рис. 6), а концентрация вирусной РНК в культуральной жидкости была снижена на 4,0–6,0 lg по сравнению со штаммом Dubrovka и вариантом Dubrovka-ca-B4 (рис. 5). Таким образом, установлено, что вариант Dubrovka-ca-D2 обладает выраженным *ts*-фенотипом. У варианта Dubrovka-ca-B4 также выявлены признаки *ts*-фенотипа, но только при низкой MOI (0,00001) и температуре 39°C — на 3-и сутки разница в титре вируса со штаммом Dubrovka составляла 3,0 lg (рис. 6).

Варианты Dubrovka-37, Dubrovka-ca-B4, адаптированные на протяжении более 40 пассажей к культуре клеток почки обезьяны Vero, утратили способность размножаться в культуре клеток рака лёгких человека Calu-3. Вариант Dubrovka-ca-D2 в клетках Calu-3 размножился, но значительно медленнее штамма Dubrovka (рис. 7).

С целью выявления аттенуационного (*att*) фенотипа *ca*-вариантов SARS-CoV-2 был проведён эксперимент по интраназальному заражению хомяков. У хомяков, заражённых *ca*-вариантами вируса SARS-CoV-2, не наблюдались задержка прироста массы тела и изменения в поведении по сравнению с отрицательным контролем. Напротив, при зараже-

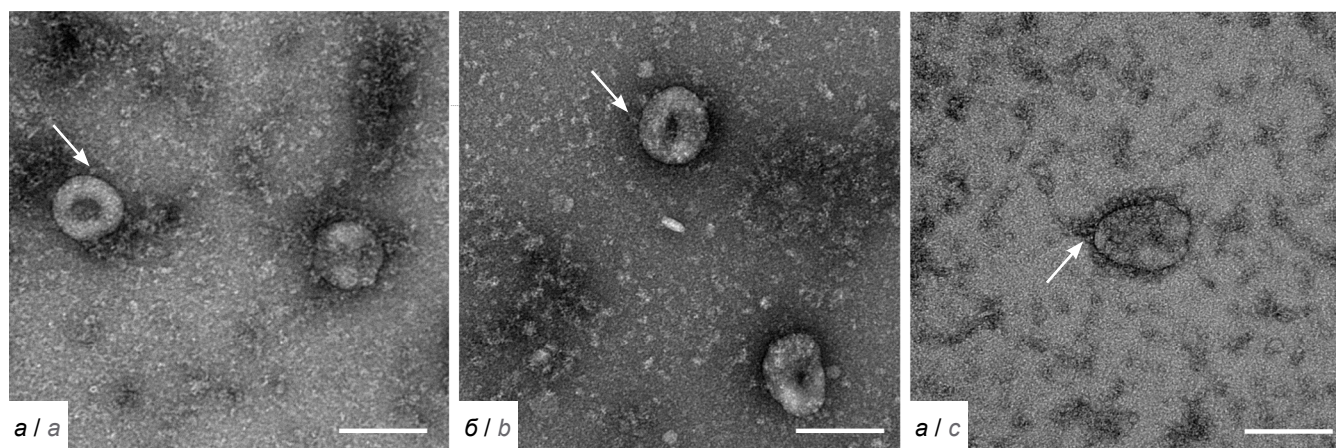


Рис. 4. Электронная микрофотография инактивированных УФ вариантов SARS-CoV-2.

а — Dubrovka; б — Dubrovka-ca-B4; в — Dubrovka-ca-D2. ТЭМ. Негативное контрастирование 1% уранилацетатом. Стрелками отмечены тримеры S-белка на поверхности коронавируса. Масштабный отрезок — 100 нм.

Fig. 4. Electron microphotography of UV inactivated variants of SARS-CoV-2.

а — Dubrovka; б — Dubrovka-ca-B4; в — Dubrovka-ca-D2. TEM. Negative contrasting with 1% uranyl acetate. The arrow shows S-protein trimers on the surface of the coronavirus. The scale bar — 100 nm.

нии вирулентным вирусом (штамм Dubrovka) отмечалась достоверная задержка в приросте массы тела, составившая на 2-е сутки после заражения 8,2%, на 4-е — 13,4%, на 6-е — 10,5% ($p < 0,05$), тогда как на 8-е сутки разница была недостоверной (рис. 8). У животных, зараженных вирулентным штаммом, на 2–6-е сутки также наблюдались снижение аппетита, вялость и сонливость.

В лёгких и мозге животных на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами вируса концентрация вирусной РНК была достоверно более низкой по сравнению с контрольной группой, заражённой вирулентным штаммом Dubrovka (рис. 9). Наименьшая концентрация вирусной РНК в органах наблюдалась при заражении вариантом Dubrovka-*ca*-D2: в лёгких — 6,5 lg копий РНК/мл, в мозге — 3,3 lg

копий РНК/мл, что на 1,6 и 3,2 lg соответственно ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$).

Титр вируса в гомогенатах лёгких животных на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами вируса составлял 5,0 lg ТЦД₅₀/мл, что на 1,2 lg ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$) (рис. 10). Инфекционный вирус в мозге на 4-е сутки после заражения *ca*-вариантами при титровании не обнаруживался, тогда как при заражении штаммом Dubrovka титр вируса в гомогенате мозга достигал 5,0 lg ТЦД₅₀/мл (рис. 10). Важно отметить, что при титровании вируса гомогенаты органов в разведениях 1 : 10 и 1 : 100 были токсичными для клеток, что затрудняло учёт вирусного ЦПД и снижало чувствительность титрования.

Обсуждение

Массовое применение живых вирусных вакцин, входящих в национальные календари иммунизации, позволило ликвидировать в глобальном масштабе натуральную оспу и поставить в развитых странах на грань исчезновения такие заболевания, как корь, краснуха, ветряная оспа, эпидемический паротит и полиомиелит [25]. Штаммы

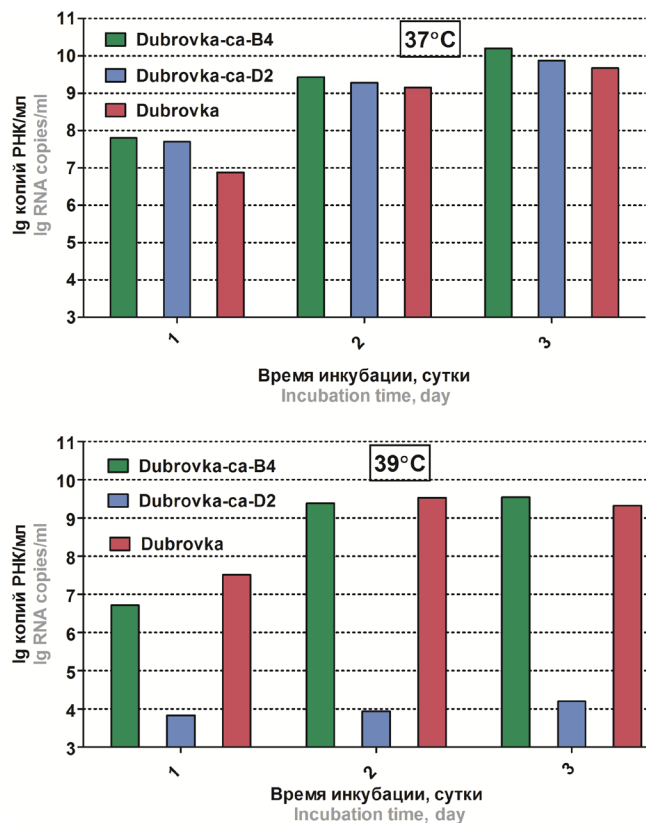


Рис. 5. Накопление вирусной РНК в культуре клеток Vero при заражении штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 при температуре культивирования 37°C или 39°C.

Клетки заражали при MOI = 0,001, ежедневно отбирали образец культуральной жидкости и определяли концентрацию вирусной РНК. Приведены средние значения по результатам 2 независимых экспериментов.

Fig. 5. Accumulation of the viral RNA in the Vero cell culture after the infection with the Dubrovka strain and Dubrovka-*ca*-B4 and Dubrovka-*ca*-D2 variants at the culture temperature of 37°C or 39°C.

The cells were infected at MOI = 0.001; samples of the culture liquid were collected daily, and the concentration of the viral RNA was measured. The results of 2 independent tests are presented as mean values.

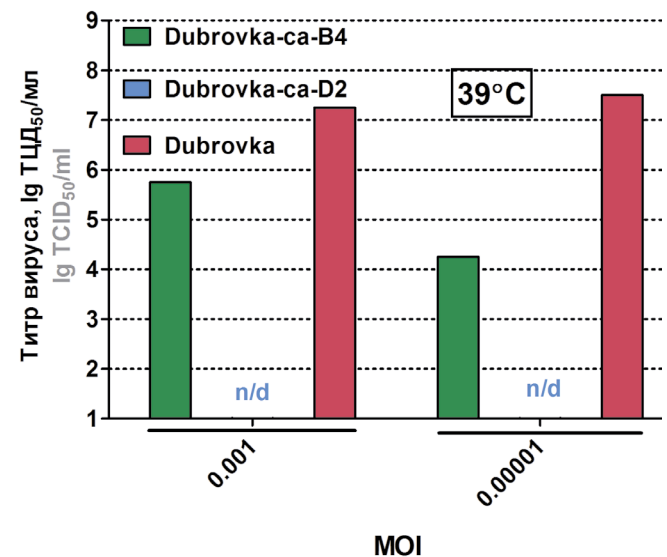


Рис. 6. Титр вируса на 3-и сутки после инфицирования культуры клеток Vero штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 при температуре культивирования 39°C и разной MOI.

Клетки заражали вариантами вируса и через 72 ч определяли титр вируса в культуральной жидкости. Приведены средние значения по результатам 2 независимых экспериментов. n/d — не обнаружено.

Fig. 6. The virus titer on the 3rd day after the Vero cell culture had been infected with the Dubrovka strain and Dubrovka-*ca*-B4 and Dubrovka-*ca*-D2 variants; at the culture temperature of 39°C and different MOI.

The cells were infected with virus variants, and the virus titer was measured in the culture liquid 72 hours after the infection. The results of 2 independent tests are presented as mean values. n/d — not detected.

вирусов, входящие в состав большинства живых вирусных вакцин, были получены при аттенуации диких вариантов соответствующих вирусов путём адаптации к выращиванию в условиях пониженной температуры и/или в клетках животных [25, 26]. В многочисленных исследованиях доказано, что вирусы человека и животных могут быть адаптированы к росту при субоптимальной пониженной тем-

пературе [19]. Почти во всех случаях наблюдалась корреляция между приобретением этими вирусами температурной чувствительности в культуре ткани и аттенуацией у нормального хозяина — животного или человека [19]. Экспериментально доказано, что путём холодной адаптации возможно получение аттенуированного вируса, который при иммунизации обеспечивает безопасную и эффективную

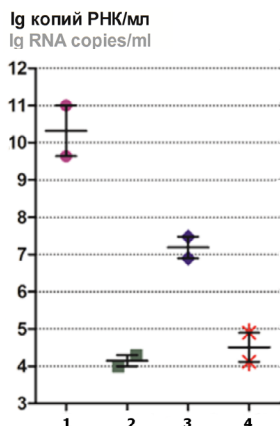


Рис. 7. Концентрация вирусной РНК в клетках Calu-3, заражённых вариантами SARS-CoV-2, на 3-и сутки после инфицирования при MOI 0,001.

1 — штамм Dubrovka (2-й пассаж); 2 — Dubrovka-ca-B4; 3 — Dubrovka-ca-D2; 4 — Dubrovka-37. Приведены средние значения по результатам 2 независимых экспериментов.

Fig. 7. Concentration of the viral RNA in Calu-3 cells infected with SARS-CoV-2 variants, the 3rd day after the infection, at MOI 0.001.

1 — Dubrovka strain (the 2nd passage); 2 — Dubrovka-ca-B4; 3 — Dubrovka-ca-D2; 4 — Dubrovka-37. The results of 2 independent tests are presented as mean values.

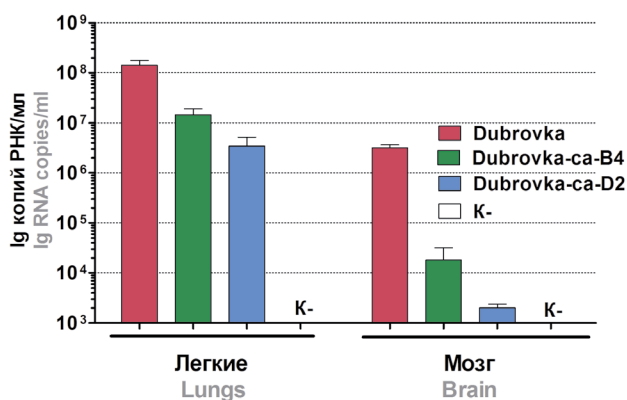


Рис. 9. Концентрация вирусной РНК в гомогенатах лёгких и мозга хомяков, заражённых интраназально штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2, на 4-е сутки после инфицирования.

$n = 4$ на группу. К- — незаражённые хомяки.

Fig. 9. Concentration of the viral RNA in lung and brain homogenates from hamsters infected intranasally with the Dubrovka strain and Dubrovka-ca-B4 and Dubrovka-ca-D2 variants, 4th day after the infection.

$n = 4$ per group. К- — non-infected hamsters.

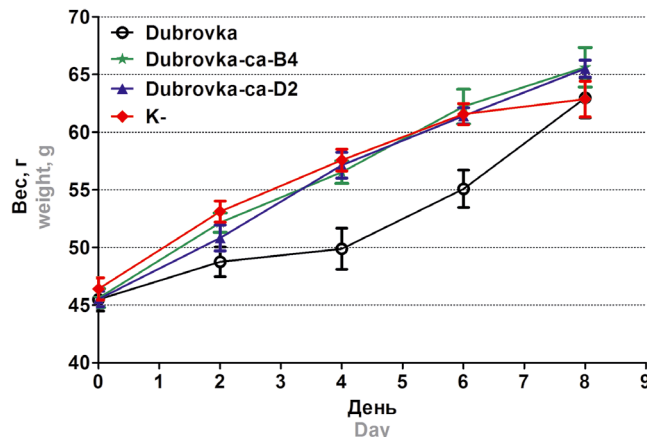


Рис. 8. Кинетика массы тела хомяков, заражённых интраназально штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2.

С 0-х по 4-е сутки — $n = 9$ на группу, с 6-х по 8-е сутки — $n = 5$ на группу. Доза заражения — 4,0 lg ТЦД₅₀.

К- — незаражённые хомяки.

Fig. 8. Kinetics of the weight of hamsters infected intranasally with the Dubrovka strain and Dubrovka-ca-B4 and Dubrovka-ca-D2 variants.

From the 0th to the 4th day — $n = 9$ per group; from the 6th to the 8th day — $n = 5$ per group. The infective dose — 4.0 lg TCID₅₀.

К- — non-infected hamsters.

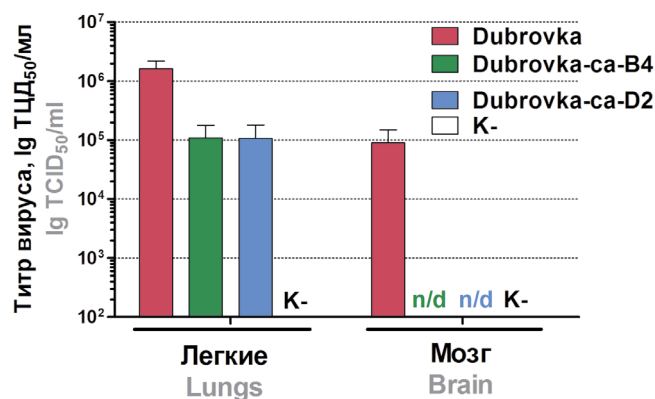


Рис. 10. Титр вируса в гомогенатах лёгких и мозга хомяков, заражённых интраназально штаммом Dubrovka и вариантами Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2, на 4-е сутки после инфицирования.

$n = 4$ на группу. К- — незаражённые хомяки.

Fig. 10. The virus titer in lung and brain homogenates from hamsters infected intranasally with the Dubrovka strain and Dubrovka-ca-B4 and Dubrovka-ca-D2 variants, the 4th day after the infection.

$n = 4$ per group. К- — non-infected hamsters.

защиту от заражения вирусом дикого типа [19]. Разработанные в СССР и США сезонные живые аттенуированные интраназальные гриппозные вакцины [27–29] выгодно отличаются от инактивированных вакцин тем, что индуцируют системный, мукозальный и клеточный иммунитет, обеспечивают широкую перекрёстную протективную активность и простоту введения. Применение живых вирусных вакцин обосновано не только их высокой иммунологической эффективностью, но и экономической целесообразностью, поскольку отличаются низкой себестоимостью производства [25].

В то же время, по данным ВОЗ на 13.05.2022, из 153 лицензированных и проходящих клинические испытания вакцин против COVID-19 только 2 (1,3%) вакцины созданы на основе живых аттенуированных штаммов: COVI-VAC (Codagenix/Serum Institute of India, Индия), MV-014-212 («Meissa Vaccines, Inc.», США)⁴. Обе вакцины являются интраназальными. Аттенуация использованных в этих вакцинах штаммов достигалась с применением технологии деоптимизации кодонов.

В нашем исследовании показана возможность адаптации SARS-CoV-2 к выращиванию при непермиссивной для дикого вируса температуре 23°C и получения *ts*-мутантов. Полученные *ca*-варианты вируса Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 имели значительные геномные отличия по сравнению с родоначальным штаммом Dubrovka, эффективно размножались при 23°C, но только вариант Dubrovka-*ca*-D2 имел *ts*-фенотип, т.е. не размножался при 39°C. Более того, адаптированные к культуре клеток почки обезьяны Vero клоны Dubrovka-*ca*-D2 и Dubrovka-*ca*-B4 достоверно медленнее дикого штамма размножались при 37°C в культуре клеток лёгких человека Calu-3, что наряду с *ts*-фенотипом может быть маркером аттенуации вируса по отношению к человеку. В связи с этим у нас были основания предполагать, что как обладающий *ts*-фенотипом клон Dubrovka-*ca*-D2, так и клон Dubrovka-*ca*-B4, не обладающий *ts*-фенотипом, имеют пониженную вирулентность, т.е. аттенуированы.

На животной модели COVID-19 в эксперименте на сирийских хомяках предположение об аттенуации *ca*-вариантов штамма Dubrovka нашло убедительное подтверждение. Заражение хомяков вариантами Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 не вызывало у них при интраназальном заражении снижения аппетита, вялости, сонливости и замедления прироста массы, в отличие от вирулентного штамма Dubrovka. В лёгких и головном мозге животных, заражённых *ca*-вариантами, концентрация

вирусной РНК и содержание инфекционного вируса были ниже на 1,2–3,3 lg по сравнению с вирулентным штаммом, причём наименьшая репродуктивная активность в условиях *in vivo* отмечалась у *ts*+-клона Dubrovka-*ca*-D2. Примечательно, что в мозге хомяков, заражённых *ca*-вариантами, инфекционный вирус выявлен не был, тогда как при заражении вирулентным штаммом Dubrovka титр вируса достигал 5,0 lg ТЦД₅₀/мл гомогената. С учетом известной нейровирулентности SARS-CoV-2 для человека, снижение репродуктивной активности *ca*-вариантов вируса в головном мозге хомяков при интраназальном введении уменьшает вероятность неврологических повреждений *in vivo* и является важным маркером аттенуации вируса. Таким образом, полученные *ca*-варианты Dubrovka-*ca*-B4 и Dubrovka-*ca*-D2 обладают выраженным *att*-фенотипом для сирийских хомяков и представляют интерес для дальнейшего исследования в качестве кандидатных вакцинных штаммов для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

Важно отметить, что аттенуационный фенотип *ca*-вариантов вируса был получен для сирийских хомяков и требует дальнейшего исследования на других моделях. Данные по вирулентности вируса, полученные на животных моделях, невозможно безоговорочно экстраполировать на человека. Доклинические испытания на модельных животных позволяют лишь приблизиться к пониманию безопасности клинического применения и восприимчивости человека по отношению к аттенуированному штамму вируса. Кроме того, серьёзным фактором риска применения живой аттенуированной вакцины является возможность реверсии вирулентности вакцинного штамма в результате точечных мутаций либо рекомбинаций. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования генетической стабильности *ca*-вариантов SARS-CoV-2 и связанной с ней стабильности *att*-фенотипа.

В научной литературе описано получение *ca*-штаммов SARS-CoV-2, обладающих *ts*-фенотипом, которые не только имели *att*-фенотип, но и при интраназальном введении были способны индуцировать у иммунизированных животных (сирийских хомяков или трансгенных мышей hACE-2 (K18-hACE2) протективный иммунный ответ против заражения вирулентным штаммом SARS-CoV-2 [30–32]. Для получения *ts*+ штаммов SARS-CoV-2 в указанных работах применяли различные подходы. В работе S. Seo и соавт. [30] применялся схожий с нашим исследованием подход — длительное пассирование при постепенном снижении температуры от 37°C до 22°C в клетках Vero. В работе S. Okamura и соавт. на основе клинического изолята SARS-CoV-2 была получена большая библиотека из 659 клонов со случайными мутациями, из которых были отобраны варианты, вызывавшие ЦПД в

⁴ R&D Blue Print. World Health Organization. COVID-19 vaccine tracker and landscape. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (дата обращения: 13.05.2022).

культуре клеток при 32°C, но не при 37°C [32]. Атенуация вируса при получении вакцинного штамма должна выдерживать баланс между ослаблением вирулентности и сохранением способности вызывать протективный иммунный ответ. В работах S. Seo и соавт. и S. Okamura и соавт. экспериментально доказана возможность сохранения протективной активности у аттенуированных *ts*-мутантов SARS-CoV-2 [30, 32]. В связи с этим дальнейшее исследование протективной активности полученных в настоящей работе вариантов Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 на животной модели COVID-19 представляет большой практический интерес.

Заключение

Полученные в настоящей работе аттенуированные *ca*-варианты SARS-CoV-2 Dubrovka-ca-B4 и Dubrovka-ca-D2 представляют интерес для дальнейшего исследования в качестве кандидатных вакцинных штаммов для создания живой аттенуированной вакцины против COVID-19.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Francis A.I., Ghany S., Gilkes T., Umakanthan S. Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. *Postgrad. Med. J.* 2022; 98(1159): 389–94. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140654>
- Marfe G., Perna S., Shukla A.K. Effectiveness of COVID-19 vaccines and their challenges (Review). *Exp. Ther. Med.* 2021; 22(6):1407. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10843>
- Marcelin J.R., Pettifor A., Janes H., Brown E.R., Kublin J.G., Stephenson K.E. COVID-19 vaccines and SARS-CoV-2 transmission in the era of new variants: A review and perspective. *Open Forum Infect. Dis.* 2022; 9(5): ofac124. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac124>
- Kandimalla R., Chakraborty P., Vallamkondu J., Chaudhary A., Samanta S., Reddy P.H., et al. Counting on COVID-19 vaccine: insights into the current strategies, progress and future challenges. *Biomedicines.* 2021; 9(11): 1740. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111740>
- Kozlovskaya L.I., Pinaeva A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 1790–806. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1971569>
- Gómez-Carballa A., Pardo-Seco J., Bello X., Martínón-Torres F., Salas A. Superspreading in the emergence of COVID-19 variants. *Trends Genet.* 2021; 37(12): 1069–80. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.09.003>
- Nikonova A.A., Faizuloev E.B., Gracheva A.V., Isakov I.Y., Zverev V.V. Genetic diversity and evolution of the biological features of the pandemic SARS-CoV-2. *Acta Naturae.* 2021; 13(3): 77–88. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11337>
- Choi J.Y., Smith D.M. SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Med. J.* 2021; 62(11): 961–8. <https://doi.org/10.3349/yjmj.2021.62.11.961>
- Mathieu E., Ritchie H., Ortiz-Ospina E., Roser M., Hasell J., Appel C., et al. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat. Hum. Behav.* 2021; 5(7): 947–53. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
- Dupont L., Snell L.B., Graham C., Seow J., Merrick B., Lechmere T., et al. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern. *Nat. Microbiol.* 2021; 6(11): 1433–42. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00974-0>
- Tao K., Tzou P.L., Nouhin J., Gupta R.K., de Oliveira T., Kosakovsky Pond S.L., et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat. Rev. Genet.* 2021; 22(12): 757–73. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>
- Saito A., Irie T., Suzuki R., Maemura T., Nasser H., Uriu K., et al. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature.* 2021; 602(7896): 300–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04266-9>
- Lu L., Mok B.W., Chen L.L., Chan J.M., Tsang O.T., Lam B.H., et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron variant by sera from BNT162b2 or Coronavac vaccine recipients. *Clin. Infect. Dis.* 2021; ciab1041. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1041>
- Bowen J.E., Sprouse K.R., Walls A.C., Mazzitelli I.G., et al. Omicron BA.1 and BA.2 neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of human vaccines. *bioRxiv.* 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.03.15.484542>
- Dejnirattisai W., Huo J., Zhou D., Zahradnik J., Supasa P., Liu C., et al. Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.03.471045>
- Wang Y., Ma Y., Xu Y., Liu J., Li X., Chen Y., et al. Resistance of SARS-CoV-2 Omicron variant to convalescent and CoronaVac vaccine plasma. *Emerg. Microbes Infect.* 2022; 11(1): 424–7. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2027219>
- Sheward D.J., Kim C., Ehling R.A., Pankow A., Dopico X.C., Martin D.P., et al. Variable loss of antibody potency against SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron). *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.19.473354>
- VanBlargan L.A., Errico J.M., Halfmann P.J., Zost S.J., Crowe J.E. Jr., Purcell L.A., et al. An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat. Med.* 2022; 28(3): 490–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01678-y>
- Maassab H.F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine.* 1985; 3(5): 355–69. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(85\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0264-410x(85)90124-0)
- Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И. и др. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2021; 98(3): 253–65. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>
- Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Reiling S.J., Chen S.H., Roy A.M., Quick J., Ragoussis I. SARS-CoV-2 McGill Nanopore sequencing protocol SuperScript IV_42C_ArticV3. Available at: <https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-mcgill-nanopore-sequencing-protocol-sup-q26g7b25klwz/v1>
- Liu C., Mendonça L., Yang Y., Gao Y., Shen C., Liu J., et al. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET. *Structure.* 2020; 28(11): 1218–24.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.10.001>
- Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* 2015; 479-480: 379–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>

26. Subbarao K. Live attenuated cold-adapted influenza vaccines. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2021; 11(9): a038653. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038653>
27. Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain. *Rev. Roum. Infarmacobiol.* 1965; 2(3): 179–86.
28. Ghendon Y.Z., Polezhaev F.I., Lisovskaya K.V., Medvedeva T.E., Alexandrova G.I., Klimov A.I. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants. *Infect. Immun.* 1984; 44: 730–3. <https://doi.org/10.1128/IAI.44.3.730-733.1984>
29. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 C. *Nature.* 1967; 213(5076): 612–4. <https://doi.org/10.1038/213612a0>
30. Seo S.H., Jang Y. Cold-adapted live attenuated SARS-Cov-2 vaccine completely protects human ACE2 transgenic mice from SARS-CoV-2 infection. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(4): 584. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040584>
31. Okamura S., Ebina H. Could live attenuated vaccines better control COVID-19? *Vaccine.* 2021; 39(39): 5719–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.018>
32. Okamura S., Kashiwabara A., Suzuki H., Ueno S., Miyazato P., Takekawa S., et al. Live attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate: Protective immunity without serious lung lesions in Syrian hamsters. *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.15.430863>

REFERENCES

1. Francis A.I., Ghany S., Gilkes T., Umakanthan S. Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. *Postgrad. Med. J.* 2022; 98(1159): 389–94. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140654>
2. Marfe G., Perna S., Shukla A.K. Effectiveness of COVID-19 vaccines and their challenges (Review). *Exp. Ther. Med.* 2021; 22(6):1407. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10843>
3. Marcelin J.R., Pettifor A., Janes H., Brown E.R., Kublin J.G., Stephenson K.E. COVID-19 vaccines and SARS-CoV-2 transmission in the era of new variants: A review and perspective. *Open Forum Infect. Dis.* 2022; 9(5): ofac124. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac124>
4. Kandimalla R., Chakraborty P., Vallamkondu J., Chaudhary A., Samanta S., Reddy P.H., et al. Counting on COVID-19 vaccine: insights into the current strategies, progress and future challenges. *Biomedicines.* 2021; 9(11): 1740. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111740>
5. Kozlovskaya L.I., Piniava A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 1790–806. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1971569>
6. Gómez-Carballeda A., Pardo-Seco J., Bello X., Martín-Torres F., Salas A. Superspreading in the emergence of COVID-19 variants. *Trends Genet.* 2021; 37(12): 1069–80. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.09.003>
7. Nikonova A.A., Faizuloev E.B., Gracheva A.V., Isakov I.Y., Zverev V.V. Genetic diversity and evolution of the biological features of the pandemic SARS-CoV-2. *Acta Naturae.* 2021; 13(3): 77–88. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11337>
8. Choi J.Y., Smith D.M. SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Med. J.* 2021; 62(11): 961–8. <https://doi.org/10.3349/yjm.2021.62.11.961>
9. Mathieu E., Ritchie H., Ortiz-Ospina E., Roser M., Hasell J., Appel C., et al. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat. Hum. Behav.* 2021; 5(7): 947–53. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
10. Dupont L., Snell L.B., Graham C., Seow J., Merrick B., Lechmere T., et al. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern. *Nat. Microbiol.* 2021; 6(11): 1433–42. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00974-0>
11. Tao K., Tzou P.L., Nouhin J., Gupta R.K., de Oliveira T., Kosakovsky Pond S.L., et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat. Rev. Genet.* 2021; 22(12): 757–73. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>
12. Saito A., Irie T., Suzuki R., Maemura T., Nasser H., Uriu K., et al. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature.* 2021; 602(7896): 300–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04266-9>
13. Lu L., Mok B.W., Chen L.L., Chan J.M., Tsang O.T., Lam B.H., et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron variant by sera from BNT162b2 or Coronavac vaccine recipients. *Clin. Infect. Dis.* 2021; ciab1041. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1041>
14. Bowen J.E., Sprouse K.R., Walls A.C., Mazzitelli I.G., et al. Omicron BA.1 and BA.2 neutralizing activity elicited by a comprehensive panel of human vaccines. *bioRxiv.* 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.03.15.484542>
15. Dejnirattisai W., Huo J., Zhou D., Zahradnik J., Supasa P., Liu C., et al. Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.03.471045>
16. Wang Y., Ma Y., Xu Y., Liu J., Li X., Chen Y., et al. Resistance of SARS-CoV-2 Omicron variant to convalescent and CoronaVac vaccine plasma. *Emerg. Microbes Infect.* 2022; 11(1): 424–7. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2027219>
17. Sheward D.J., Kim C., Ehling R.A., Pankow A., Dopico X.C., Martin D.P., et al. Variable loss of antibody potency against SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron). *bioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.19.473354>
18. VanBlargan L.A., Errico J.M., Halfmann P.J., Zost S.J., Crowe J.E. Jr., Purcell L.A., et al. An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat. Med.* 2022; 28(3): 490–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01678-y>
19. Maassab H.F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine.* 1985; 3(5): 355–69. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(85\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0264-410x(85)90124-0)
20. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., Borisova O.V., Petrusheva O.A., Smirnova D.I., et al. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2021; 98(3): 253–65. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>
21. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
22. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
23. Reiling S.J., Chen S.H., Roy A.M., Quick J., Ragoussis I. SARS-CoV-2 McGill Nanopore sequencing protocol SuperScript IV_42C_ArticV3. Available at: <https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-mcgill-nanopore-sequencing-protocol-suppq26g7b25klwz/v1>
24. Liu C., Mendonça L., Yang Y., Gao Y., Shen C., Liu J., et al. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET. *Structure.* 2020; 28(11): 1218–24.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.10.001>
25. Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* 2015; 479-480: 379–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>

26. Subbarao K. Live attenuated cold-adapted influenza vaccines. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2021; 11(9): a038653. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038653>
27. Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating cryophilic influenza strain. *Rev. Roum. Inframicrobiol.* 1965; 2(3): 179–86.
28. Ghendon Y.Z., Polezhaev F.I., Lisovskaya K.V., Medvedeva T.E., Alexandrova G.I., Klimov A.I. Recombinant cold-adapted attenuated influenza A vaccines for use in children: molecular genetic analysis of the cold-adapted donor and recombinants. *Infect. Immun.* 1984; 44: 730–3. <https://doi.org/10.1128/IAI.44.3.730-733.1984>
29. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 C. *Nature.* 1967; 213(5076): 612–4. <https://doi.org/10.1038/213612a0>

Информация об авторах

Файзулов Евгений Бахтиёрович[✉] — к.б.н., зав. лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, faizuloev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Корчевая Екатерина Романовна — м.н.с., лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Грачева Анастасия Вячеславовна — м.н.с., лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Самойликов Роман Владимирович — м.н.с., лаб. молекулярной иммунологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6405-1390>

Смирнова Дарья Ильинична — м.н.с., лаб. молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Соколова Ольга Сергеевна — д.б.н., профессор кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4678-232X>

Глухов Григорий Сергеевич — к.б.н., доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9540-8249>

Моисеенко Андрей Владимирович — ведущий инженер лаб. электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Ленева Ирина Анатольевна — д.б.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Нагиева Фирая Галиевна — д.м.н., доцент, зав. лаб. гибридных клеточных культур отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

Свитич Оксана Анатольевна — д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 19.05.2022;
принята к публикации 20.07.2022;
опубликована 30.08.2022

30. Seo S.H., Jang Y. Cold-adapted live attenuated SARS-CoV-2 vaccine completely protects human ACE2 transgenic mice from SARS-Cov-2 infection. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(4): 584. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040584>
31. Okamura S., Ebina H. Could live attenuated vaccines better control COVID-19? *Vaccine*. 2021; 39(39): 5719–26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.018>
32. Okamura S., Kashiwabara A., Suzuki H., Ueno S., Miyazato P., Takekawa S., et al. Live attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate: Protective immunity without serious lung lesions in Syrian hamsters. *bioRxiv*. 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.15.430863>

Information about the authors

Evgeny B. Faizuloev[✉] — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, faizuloev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Ekaterina R. Korchevaya — junior researcher, Laboratory of molecular virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Anastasiia V. Gracheva — junior researcher, Laboratory of molecular virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Roman V. Samoilkov — junior researcher, Laboratory of molecular virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6405-1390>

Daria I. Smirnova — junior researcher, Laboratory of molecular virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Olga S. Sokolova — D. Sci. (Biol.), Professor, Bioengineering department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4678-232X>

Grigory S. Glukhov — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Bioengineering department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9540-8249>

Andrey V. Moiseenko — leading engineer, Laboratory of electron microscopy, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Irina A. Leneva — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Firaya G. Nagieva — D. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Laboratory of hybrid cell cultures, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS, Head, Laboratory of molecular immunology, Director, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS, Scientific director, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 19.05.2022;
accepted for publication 20.07.2022;
published 30.08.2022