

Семенова Анастасия Викторовна

**КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ
ТРАНСГЕНЫ РЕПОРТЕРНЫХ, ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ И ОНКТОКСИЧЕСКИХ
БЕЛКОВ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2020

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный
руководитель:**

Кочнева Галина Вадимовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

**Официальные
оппоненты:**

Шестопалов Александр Михайлович, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)

Дымова Майя Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории Биотехнологии ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России» (ФНКЦ ФМБА России)

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в _____ ч на заседании диссертационного совета Д. 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.М. Зубавичене

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Проблема профилактики и терапии онкологических заболеваний является одной из наиболее актуальных биомедицинских проблем во всем мире. Несмотря на внушительный арсенал противоопухолевых препаратов и методов терапии, продолжительность жизни пациентов увеличивается незначительно, и главной причиной смертности остается метастатический рост опухолей. В связи с этим актуальны разработки улучшенных методов лечения.

При создании новых противоопухолевых препаратов очень важно, чтобы они обладали высокоизбирательными онколитическими свойствами, что способствовало бы распознаванию и уничтожению только раковых и метастатических клеток, а также высвобождению опухолеассоциированных антигенов и презентации их иммунной системе хозяина. На роль таких агентов практически идеально подходят непатогенные или аттенуированные природные и рекомбинантные вирусы, имеющие механизмы распознавания раковых клеток, обладающие избирательным цитолитическим потенциалом и, возможно, экспрессирующие гены иммунологически активных и других белков, специфически усиливающих их противоопухолевую активность.

В настоящее время наряду с другими вирусными семействами значительное внимание уделяется использованию потенциальных возможностей вирусов семейства *Poxviridae* в борьбе с онкологическими заболеваниями. Это объясняется природной онкоселективностью этих вирусов, хорошей изученностью генома, возможностью его генно-инженерной модификации, широким спектром чувствительных клеток, автономной цитоплазматической репликацией, низкой скоростью спонтанного мутирования [Torres-Domínguez et al., 2019].

Работы по созданию онколитических вирусов ведутся с несколькими представителями семейства *Poxviridae*, в том числе с вирусом осповакцины (*vaccinia virus*, VACV), который имеет длительную и очень успешную историю медицинского применения в качестве вакцины против натуральной оспы. В лаборатории вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора часть исследований проводится с использованием российского штамма Л-ИВП вируса осповакцины, который широко применялся для вакцинации населения против натуральной оспы и обладает высокой природной онкоселективностью [Shvalov et al., 2016; Zonov et al., 2016]. Штамм Л-ИВП является репликативно-компетентным в отношении клеток человека, поэтому существующий риск развития осложнений при использовании данного штамма для противоопухолевой терапии определяет необходимость его аттенуации (ослабления). Аттенуация может достигаться удалением одного или нескольких генов факторов вирулентности VACV (например, гена вирусного ростового фактора (VGF) или тимидинкиназы (ТК)).

Также перспективным считается подход, основанный на использовании высокоаттенуированных репликативно-дефектных штаммов в качестве вектора для создания онколитических вариантов VACV [Guse et al., 2011]. Наиболее известным среди таких штаммов является MVA (*modified vaccinia virus Ankara*), полученный путем многократного пассирования исходного штамма Ankara на первичных фибробластах куриных эмбрионов [Volz et al., 2017]. Геномные исследования показали, что, вследствие пассажей, вирус потерял около 15% своего генома

и способность реплицироваться в нормальных клетках млекопитающих. Однако малигнизация клеток млекопитающих, включая клетки человека, способствует повышению их чувствительности к MVA.

Для усиления противоопухолевых свойств аттенуированных вариантов VACV используют способность вируса нести протяженные встройки чужеродного генетического материала (трансгенов). В настоящее время известно значительное число трансгенов, которые показали свою эффективность при экспрессии в VACV. Это гены цитокинов и других иммуномодуляторов и иммуностимуляторов [Kim et al., 2006; Kim et al., 2007; Thorne et al., 2007; Кочнева Г.В. и др., 2012]; ингибиторов ангиогенеза [Guse et al., 2010; Tysome et al., 2011]; ферментов, превращающих внутри опухоли нетоксичные предшественники в их цитотоксические производные [Chalikonda et al., 2008; McCart et al., 2000]; онкотоксических белков [García et al., 2010; Kochneva et al., 2014].

В данной работе использовались следующие варианты трансгенов и кодируемых ими белков:

1) Онкотоксический **белок NS1** (первый неструктурный белок парвовируса крыс Н-1). NS1 является главным фактором, ответственным за онколитическую активность парвовируса Н-1, на основе которого был создан препарат ParvOryx (Oryx GmbH & Co, KG Industry, Германия) для лечения опухолей мозга человека [Geletneky et al., 2017]. Белок NS1 способен вызвать гибель опухолевых клеток различными способами. Он нарушает процессы репликации и транскрипции, связываясь в ядре с белками, которые регулируют эти процессы. В цитоплазме данный белок вызывает деполяризацию мембраны митохондрий, что приводит к высвобождению активных форм кислорода, способствует реорганизации и разрушению белков цитоскелета (тропомиозина, актина и виментина) [Nuesch et al., 2012].

2) Зелёный флуоресцентный **белок GFP2**. Встройка белков такого типа позволяет проводить диагностику локализации опухоли, а также вести мониторинг эффективности терапии в реальном времени [Haddad et al., 2014].

3) Онкотоксический **белок лактапин**. Является фрагментом каппа-казеина молока человека (23-134 а.о.) и специфически индуцирует апоптоз клеток рака молочной железы человека *in vitro* и *in vivo* [Koval et al., 2014].

4) **Цитокин ГМ-КСФ**. Адьювантные свойства ГМ-КСФ хорошо известны и широко используются при создании различных протективных и терапевтических вакцин. ГМ-КСФ эффективно стимулирует противоопухолевый иммунный ответ в комбинации с клеточными, вирусными и ДНК-вакцинными препаратами. Показано, что ГМ-КСФ усиливает индукцию первичного иммунного ответа за счет активации и рекрутирования (chemo-attraction) антиген-презентирующих клеток [Hoeller et al., 2016].

Цель исследования:

Конструирование рекомбинантных вариантов аттенуированных штаммов VACV, несущих трансгены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков и изучение их онколитических свойств с целью создания терапевтических противоопухолевых вакцин.

Задачи исследования:

1) Сконструировать и сравнить противоопухолевые эффекты двух рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, экспрессирующих трансген онкотоксического белка NS1 парвовируса крыс Н-1: на основе штамма Л-ИВП вируса осповакцины, аттенуированного путем

удаления гена вирулентности VGF, и на основе высокоаттенуированного репликативно-дефектного штамма MVA.

2) Сконструировать рекомбинантный вариант вируса на основе штамма Л-ИБП с делециями двух генов вирулентности – VGF и ТК и встройкой репортерного трансгена GFP2 и исследовать его диссеминацию в органы мышей, в том числе динамику накопления в опухоли и модельном метастазе.

3) Сконструировать двойной рекомбинантный штамм Л-ИБП с удалением генов вирулентности VGF и ТК и встройкой трансгенов противоопухолевого белка лактапина и ГМ-КСФ, оценить его противоопухолевые свойства *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость

В работе впервые показано, что встройка трансгенов белка NS1 парвовируса крыс Н-1 и фрагмента каппа-казеина человека лактапина в геном VACV приводит к значимому усилению его онколитической активности.

Впервые проведено прямое сравнение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов VACV на основе репликативно-компетентного штамма Л-ИБП и репликативно-дефектного штамма MVA, несущих встройку одинакового трансгена NS1. Показано, что при одинаковой онколитической активности *in vitro*, репликативно-компетентный штамм имеет значимо большую активность *in vivo* и может рассматриваться в качестве перспективного средства для лечения глиобластомы человека (Патент РФ № 2692628).

Впервые сконструирован двойной рекомбинантный вариант VACV, несущий встройку трансгенов ГМ-КСФ человека и белка лактапина. Показано, что данный рекомбинантный вариант VV-GMCSF-Lact обладает высокой онколитической активностью в отношении широкого спектра клеток опухолей молочной железы человека. На модели ксенографтов наиболее агрессивной эстроген-независимой аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 показан значимый противоопухолевый эффект штамма VV-GMCSF-Lact как при внутриопухолевом, так и при системном введении. На модели сингенной устойчивой к циклофосфамиду лимфосаркомы RLS впервые продемонстрировано, что экспрессия трансгена лактапина в составе генома VACV обеспечивает онколитическую активность вируса в отношении устойчивых к химиотерапии опухолей.

Штамм VV-GMCSF-Lact является перспективным противоопухолевым препаратом (Патент РФ № 2604187), и в 2019 году были успешно закончены его доклинические исследования как первого в России лекарственно средства для виротерапии злокачественных новообразований молочной железы (ГК № 14.N08.11.0189).

Положения, выносимые на защиту:

1) Рекомбинантный штамм VV-NS1-dGF, сконструированный на основе репликативно-компетентного штамма Л-ИБП, обладает более высоким противоопухолевым потенциалом в сравнении со штаммом MVA-NS1, сконструированным на основе репликативно-дефектного штамма MVA, и может рассматриваться в качестве перспективного препарата для лечения опухолей мозга человека.

2) На примере рекомбинанта VVdGF-GFP2 показано, что аттенуированный вариант вируса на основе штамма Л-ИВП с делециями двух генов вирулентности – VGF и ТК способен адресно накапливаться и разрушать ткань первичного опухолевого узла, а также обладает отчетливым антиметастатическим действием.

3) Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact содержащий встройки трансгенов ГМ-КСФ и лактапина в районе делеций вирусных генов ТК и VGF, обладает высоким онколитическим потенциалом и может рассматриваться как перспективный препарат для лечения рака молочной железы человека.

Публикации и апробация результатов:

Результаты работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино 2014 г.), XII Международная конференция студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск 2015 г.), 53-я Международная научная студенческая конференция МНСК (Новосибирск, 2015 г.), VII Российский симпозиум "Белки и пептиды" (Новосибирск, 2015 г.), II Международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов Open Bio (Научоград Кольцово, 2015 г.), III Международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов Open Bio (Научоград Кольцово 2016 г.), IV Международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов Open Bio (Научоград Кольцово 2017 г.) Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2017 г.), Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2019 г.) IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 2019 г.).

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, из которых 3 опубликованы в журналах списка, рекомендованного ВАК Минобразования и науки РФ, одна статья в международном журнале *Oncotarget*, получено 2 патента РФ.

Структура и объем диссертации:

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 121 странице, включает 33 рисунка, 4 таблицы. Список литературы включает 226 источников.

Личный вклад автора:

Все эксперименты по конструированию, анализу структуры и иммунохимических свойств рекомбинантных вариантов VACV проведены лично автором с использованием базовых векторных плазмид, полученных ранее к.х.н. Сиволобовой Г.Ф. Нарботка и очистка вирусных штаммов, исследование цитотоксических свойств на опухолевых и нормальных клеточных культурах человека, *in vivo* эксперименты на мышцах линии Nu/Nu проведены лично автором под руководством к.б.н. Гражданцевой А.А. Цитометрия клеток и работа с лабораторными животными линий SCID и CBA/CaOlaHsd проведены совместно с к.б.н. Коваль О.А. ИХБФМ СО РАН и сотрудниками ЦКП «SPF – виварий» ИЦиГ СО РАН под руководством к.б.н. Завьялова Е.Л. Статистический анализ выполнен совместно с к.ф.-м.н. Шваловым А.Н. Общее руководство работой осуществлялось д.б.н. Кочневой Г.В.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Конструирование и изучение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов вируса осповакцины VV-NS1-dGF и MVA-NS1, экспрессирующих трансген онкотоксического белка NS1 парвовируса крыс Н-1.

Все рекомбинантные варианты VACV были сконструированы путем рекомбинации между гомологичными последовательностями вирусной ДНК и интеграционных плазмид. В состав интеграционных плазмид входит целевой ген, экспрессия которого определяется специфическим для VACV промотором, а также последовательности ДНК вируса, фланкирующие экспрессионную кассету, что определяет район вирусного генома, где будет проходить гомологичная рекомбинация.

Для получения рекомбинантных вариантов Л-ИВП и MVA со встройкой трансгена NS1 были сконструированы интеграционные плазмиды pGEM-Puro-NS1-Flag и pDel2-NSI-Flag-Pat. Плазмида pGEM-Puro-NS1-Flag позволяет встраивать трансген NS1 в район делеции гена VGF штамма Л-ИВП, а плазмида pDel2-NSI-Flag-Pat – в район делеции II генома MVA [Hausmann et al., 2011]. Рекомбинанты получали методом временной доминантной селекции с использованием в качестве маркера гена устойчивости к пуромицину [Kochneva et al., 2013]. Схематическое изображение геномов рекомбинантных вариантов представлено на рис. 1А. Правильность структуры районов встройки вирусного генома подтверждали методом ПЦР (рис. 1Б) с последующим секвенированием районов встройки.

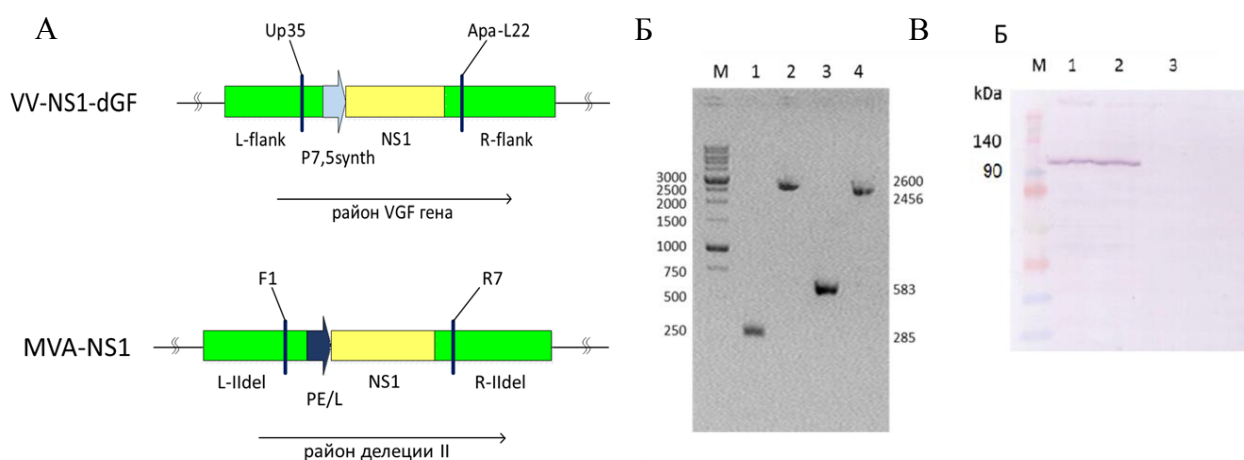


Рисунок 1. Анализ рекомбинантных вариантов VACV. А – схема структуры рекомбинантных вариантов VV-NS1-dGF и MVA-NS1 с указанием позиций праймеров, использованных в ПЦР-анализе рекомбинантных вирусных ДНК. В – ПЦР-анализ рекомбинантных вариантов с использованием пар праймеров F1–R7 (дорожки 1, 2) и Up35–ApaL22 (дорожки 3,4). М – маркер молекулярного веса, 1 - исходный штамм MVA - 285 п.н., 2 –рекомбинант MVA-NS1 - 2600 п.н., 3 - ДНК исходного штамма Л-ИВП - 583 п.н., 4 –рекомбинант NS1 VV-NS1-dGF – 2456 п.н. С – Вестерн-блот анализ с использованием коммерческих антител на эпитоп FLAG, введенный в С-конец рекомбинантного белка NS1. 1 – 4 – лизаты клеток, инфицированные: 1 – VV-NS1-dGF; 2 – MVA-NS1; 3 – ЛИВП; 4 – MVA.

Экспрессию трансгена NS1 в составе рекомбинантов анализировали методом Вестерн-блот (рис. 1В). В лизатах клеток, инфицированных рекомбинантными вариантами VV-NS1-dGF и MVA-NS1, выявляется белок с молекулярной массой около 100 кДа. По данным литературы в

инфицированных парвовирусом H-1 клетках регистрируется две формы белка NS1 – с молекулярной массой 84 кДа и 100 кДа [Rhode et al., 1989]. Увеличение молекулярного веса обуславливается разной степенью фосфорилирования белка. Таким образом, сконструированные нами рекомбинантные штаммы VACV экспрессируют белок NS1 в форме, наиболее близкой к его природной полноразмерной модификации.

Исследование онколитической активности штамма MVA-NS1 в сравнении с исходным штаммом MVA проводили на панели опухолевых клеток человека разного тканевого и органного происхождения методом фотометрии с использованием реагента ХТТ (рис. 2). В работе использовали пять линий опухолевых клеток человека: гепатомы Huh-7.5; рака шейки матки C33A; аденокарциномы молочной железы MCF-7; глиобластомы U87MG и эпидермоидной карциномы A431. Результаты показали, что рекомбинант MVA-NS1 имеет достоверно ($P < 0,05$) большую цитотоксическую активность для клеток глиобластомы человека U87MG по сравнению с исходным родительским штаммом. Для остальных опухолевых клеток онколитическая активность рекомбинантного и исходного вируса не отличается.

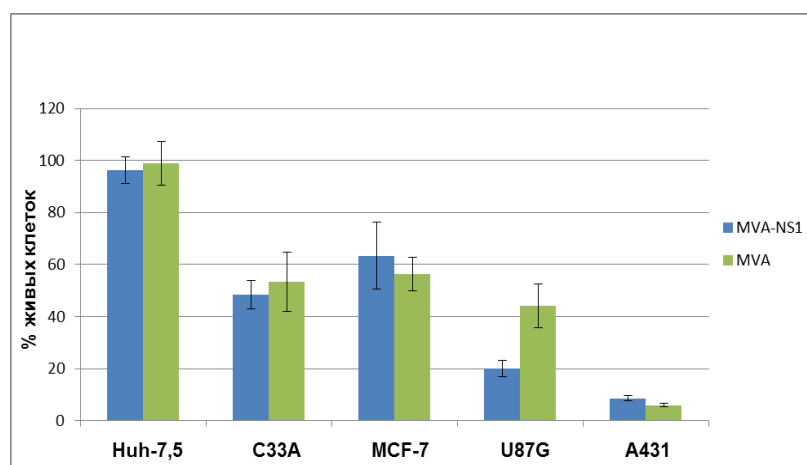
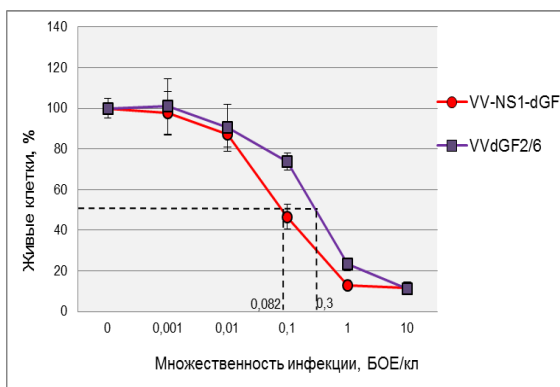


Рисунок 2. Онколитическая активность рекомбинантного варианта MVA-NS1 и исходного штамма MVA в опухолевых клетках человека различного генеза при множественности инфекции 1 БОЕ/кл. Представлены результаты трёх независимых экспериментов.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, что парвовирус крыс H-1 высокочувствителен к клеткам опухолей мозга человека [Geletneky et al, 2012] и главным фактором, ответственным за онколитическую активность парвовирусов, является белок NS1 [Geletneky et al., 2017].

Сравнительный анализ онколитических свойств *in vitro* штаммов MVA-NS1 и VV-NS1-dGF проводили на наиболее чувствительной к штамму MVA-NS1 культуре клеток глиобластомы человека U87MG (рис. 3). В качестве группы сравнения использовали аналогичные рекомбинантам штаммы VACV, не содержащие вставку гена NS1, т.е. штамм MVA и ранее полученный рекомбинантный штамм Л-ИБП с делецией гена VGF (VVdGF2/6 [Kochneva et al., 2013]), соответственно.

А



Б

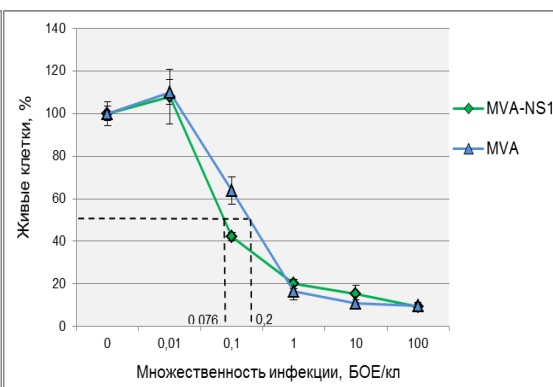


Рисунок 3: Сравнительный анализ цитотоксического эффекта рекомбинантных вариантов: А – штамм Л-ИБП и Б – штамм MVA на культуре опухолевых клеток U87MG, ХТТ-тест. Пунктиром указаны дозы вирусов, вызывающие 50%-ное снижение жизнеспособности клеток - ЦТД₅₀.

Как следует из рис. 3, встройка трансгена NS1 значительно усиливает цитотоксическую активность штаммов MVA-NS1 и VV-NS1-dGF в отношении клеток глиобластомы ($P < 0,05$) по сравнению с контрольными штаммами. При этом значения ЦТД₅₀ как для исходного штамма MVA (0,2 БОЕ/клетка), так и для его рекомбинантного варианта MVA-NS1 (0,076 БОЕ/клетка), хотя и значительно отличаются между собой ($P < 0,05$), не отличаются от аналогичных значений вариантов литического штамма Л-ИБП: VVdGF2/6 (0,3 БОЕ/клетка) и VV-NS1-dGF (0,082 БОЕ/клетка). Это свидетельствует о высокой чувствительности клеток глиобластомы U87MG к литическому действию VACV со встройкой трансгена NS1 независимо от уровня аттенуации исходного штамма вируса. Однако в экспериментах *in vivo*, где U87MG клетки представлены не в виде хорошо доступного для вируса монослоя, а в виде опухолеподобных ксенографтов с многослойной плотной массой клеток, были выявлены отличия между штаммами MVA-NS1 и VV-NS1-dGF.

Как видно из графика, приведенного на рис. 4, однократное введение в район опухоли рекомбинантного штамма MVA-NS1 приводит к полному торможению роста ксенографтов. Введение же штамма VV-NS1-dGF в той же самой дозе приводит не только к торможению роста, но и к значимому уменьшению размеров ксенографтов.

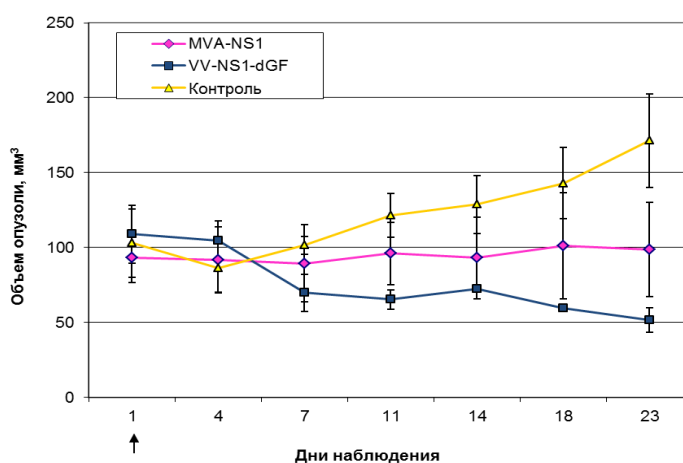


Рисунок 4. Ингибирование роста ксенографтов глиобластомы человека U87MG рекомбинантными штаммами VV-NS1-dGF и MVA-NS1. Стрелкой указана точка введения вируса и начала измерения ксенографтов (1 сутки). Различия между всеми группами достоверны на 23 сутки эксперимента при уровне значимости $p < 0,05$.

Сравнительная противоопухолевая активность штаммов MVA-NS1 и VV-NS1-dGF была также оценена на модели ортотопической ксенотрансплантации клеток U87MG мышам линии SCID [Zavjalov et al., 2016]. Эта модель более приближена к клинической картине заболевания, чем подкожные ксенотрансплантаты клеток U87MG, описанные выше. Мы использовали системное введение рекомбинантных вирусов. Такой путь введения препаратов наиболее предпочтителен при опухолях головного мозга, поскольку в большинстве случаев при этой патологии прямое внутриопухолевое введение невозможно. Инфицирование проводили трехкратно с интервалом 3 дня, начиная с 24 суток после инокуляции клеток. В эксперимент были отобраны животные с детектируемыми опухолями объемом 5 мм³ и более (средний объем составил 5,7 мм³). С помощью метода МРТ контролировали наличие опухолей и их размер (рис. 5).

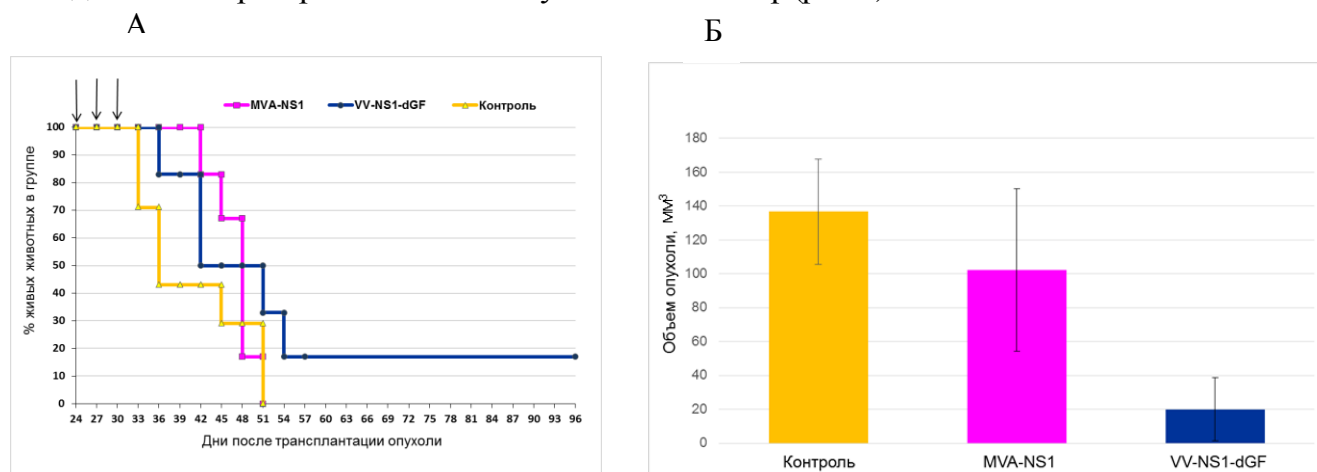


Рисунок 5. Эффект системного введения рекомбинантных штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1 на выживаемость (А) и ингибирование роста внутримозговых ксенографтов глиобластомы человека U87MG (Б), привитых мышам линии SCID.

Как следует из рисунка 5А, наилучший эффект наблюдается в группе мышей, леченных штаммом VV-NS1-dGF. В этой группе 33% мышей оставались живы вплоть до 51 суток эксперимента. К этому времени все животные контрольной группы и группы мышей, леченных штаммом MVA-NS1, погибли. На 36 сутки после инокуляции клеток U87MG, когда в контрольной группе гибель составила более 50%, были проведены измерения объема опухолей мозга у мышей всех групп (рис. 5Б). Из рисунка 5Б следует, что объем опухолей у мышей, которым был введен штамм VV-NS1-dGF, значительно отличается от контроля ($P=0,037$). Лечение глиобластомы штаммом MVA-NS1 не приводило к значимому эффекту, хотя положительная тенденция по уменьшению объема опухоли и увеличению продолжительности жизни мышей на временном отрезке после трехкратного введения вируса и до гибели животных (36-51 дни) в группе «MVA-NS1» по сравнению с группой «контроль» наблюдается (рис.5А).

Из полученных на данном этапе данных следует, что рекомбинант VV-NS1-dGF обладает значимо большей противоопухолевой активностью, поэтому создание противоопухолевых препаратов целесообразно проводить на основе литически активного (вирулентного) штамма Л-ИБП VACV. Полученный на данном этапе штамм VV-NS1-dGF может рассматриваться в качестве перспективного препарата для лечения опухолей мозга человека (Патент РФ № 2692628).

Конструирование рекомбинантного штамма VVdGF-GFP2, оценка его диссеминации и динамики накопления в опухоли и модельном метастазе эпидермоидной карциномы A431

Для дополнительной аттенуации литически активного (вирулентного) штамма Л-ИВП мы ввели делецию ТК-гена, который также как ген VGF является фактором вирулентности VACV. Показано, что подавление ТК и VGF генов VACV приводит к практически полному отсутствию репликации вируса в неделящихся клетках, при этом эффективность разрушения раковых клеток такими двойными мутантами не отличается от исходного штамма [McCart et al., 2007]. Для визуализации селективного накопления вируса в опухоли и метастазах в район делеции ТК-гена был введен репортерный трансген зеленого флюоресцентного белка GFP2. Полученный рекомбинант обозначили VVdGF-GFP2.

Рекомбинантный штамм VVdGF-GFP2 был получен методом гомологичной рекомбинации между ДНК ранее полученного штамма VVdGF2/6 с делецией гена VGF [Kochneva et al., 2013] и ДНК интеграционной плазмиды pXJP5.2-GFP2 в цитоплазме клеток CV-1. Последующее селективное накопление рекомбинантных вариантов вируса проводили в клетках H143TK- с добавлением в культуральную среду бромдезоксисуридина.

Структура рекомбинантного варианта VVdGF-GFP2 с указанием позиций праймеров схематически представлена на рисунке 6А. Вирусные клоны анализировали методом ПЦР (рис. 6Б). Экспрессию гена GFP2 оценивали путем сканирования бляшек на монослое клеток CV-1, инфицированных VVdGF-GFP2. Свечение клеток (рис. 6В) подтверждает, что вирус реплицируется и экспрессирует, встроенный в него трансген GFP2.

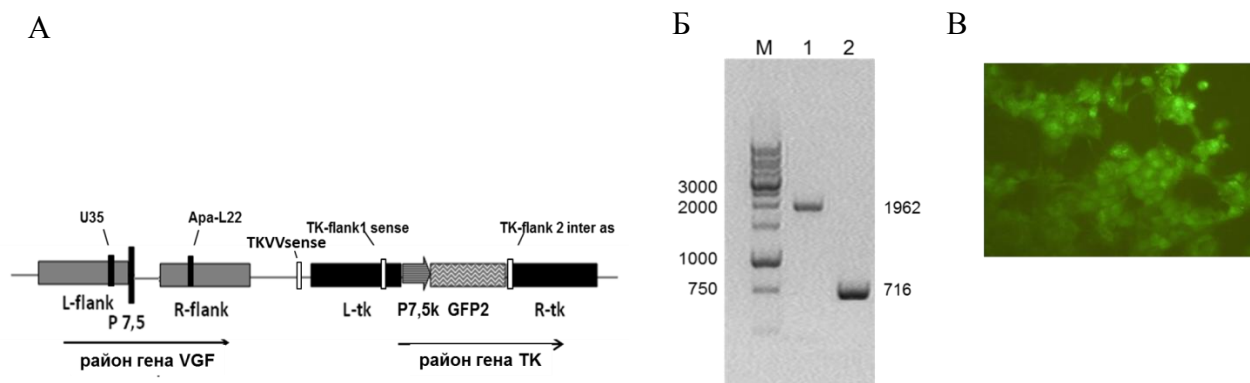


Рисунок 6. А – схема структуры рекомбинантного варианта VVdGF-GFP2 с указанием позиций праймеров. Б – ПЦР-анализ рекомбинантных вариантов с использованием пары праймеров TKVVsense и TK-flank 2 inter as. М – маркер молекулярного веса, 1 – рекомбинант VVdGF-GFP2 – 1962 п.н., 2 – исходный штамм Л-ИВП – 716 п.н. В – оценка экспрессии GFP2 методом флуоресцентной микроскопии, 20х увеличение.

В качестве модели опухоли и метастаза использовали два удаленных друг от друга ксенографта эпидермоидной карциномы человека A431, трансплантированных подкожно мышам линии Nu/Nu в правый и левый бок. При таком способе трансплантации карцинома A431 развивается только в месте прививки у мышей и при введении вируса в один ксенографт («опухоль»), второй

можно рассматривать как «метастаз» и использовать для оценки адресности распространения и онколитической активности вируса.

Вirus вводили однократно в один из ксенографтов, который моделировал опухоль. На рисунке 7А представлена динамика накопления рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 в тканях опухоли и метастаза, а также в органах мышей. Вирус регистрируется в крови через двое суток после инфицирования в небольшом титре (10^2 БОЕ/мл). В кровяное русло вирус, по-видимому, попадает вследствие повреждения тканей при уколе. Присутствие вируса в крови практически сразу после его введения в опухоль указывает на возможность его системного распространения по организму мыши. Спустя 48 часов после инфицирования вирус выявляется в неинфицированном метастазе, а уже через 4 суток титр вируса в метастазе составляет 10^8 БОЕ/мл. Вирус также обнаруживается в селезенке, легких, печени и почках через 2-12 суток после инфицирования, однако, к 14-м суткам вирус регистрируется только в ксенографтах A431 и сохраняется там до 35-х суток (период наблюдения). Вторичной вирусемии не наблюдается в течение всего периода исследования, что, очевидно, связано с низким уровнем репликации аттенуированного штамма VVdGF-GFP2 и быстрым клиренсом вируса из органов мышей, а также с его строгой внутриопухолевой локализацией.

Строгая внутриопухолевая локализация вируса подтверждается также анализом мышей в Multispectral Imaging system, в котором выявлено интенсивное свечение, индуцированное экспрессируемым в составе вируса GFP2, в районе опухоли и метастаза (рис. 7Б и В).

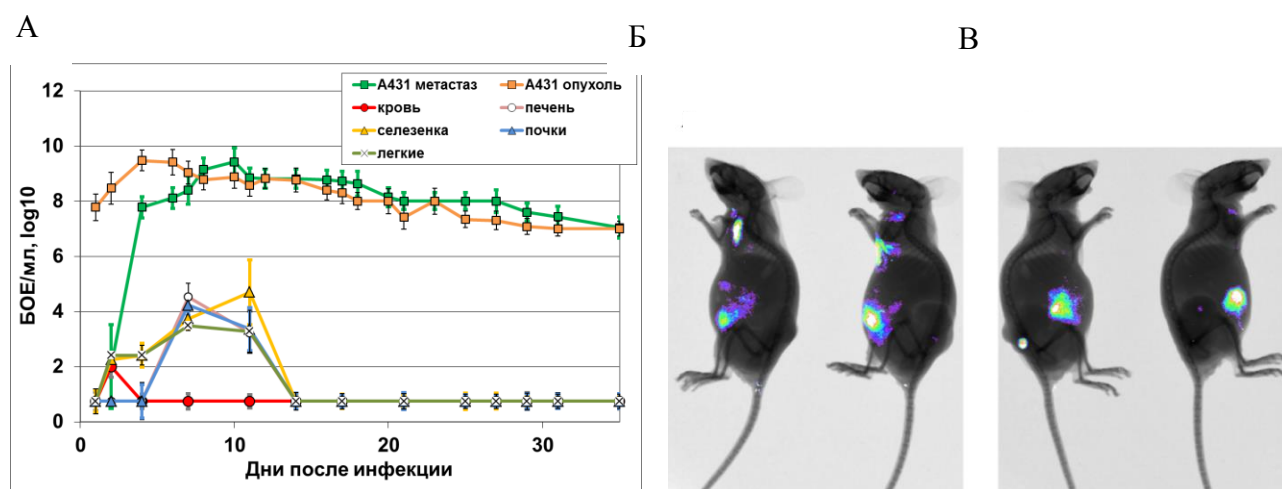


Рисунок 7. А – Динамика накопления рекомбинантного штамма VVdGF-GFP2 в опухоли, метастазе, крови и органах мышей линии Nu/Nu при интратуморальном введении. Нижняя линия указывает предел чувствительности метода (около 10 БОЕ/мл). Б и В – УФО-изображения мышей, полученные с помощью прибора Multispectral Imaging System через 12 суток после инфицирования. Б – инфицированные вирусом VVdGF-GFP2 опухоли. В – неинфицированные метастазы.

Результаты измерения объема опухоли и метастаза, представленные на рис. 8, показывают, что вирус VVdGF-GFP2 вызывает значимое уменьшение размеров опухоли и метастаза, начиная с 22 суток после инфицирования в сравнении с контролем ($P < 0,05$). При этом динамика роста опухоли и метастаза несколько различается. Так, опухоль после небольшого увеличения в течение 7-и суток стабилизируется в объеме на протяжении остального периода наблюдения (35 суток), в то время как метастаз продолжает увеличиваться до 17-х суток, после чего отмечается уменьшение объема. К

окончанию эксперимента размер ксенографтов контрольных мышей в 10 раз превышал аналогичный параметр леченных (5000 мм^3 против 500 мм^3) (рис.8).

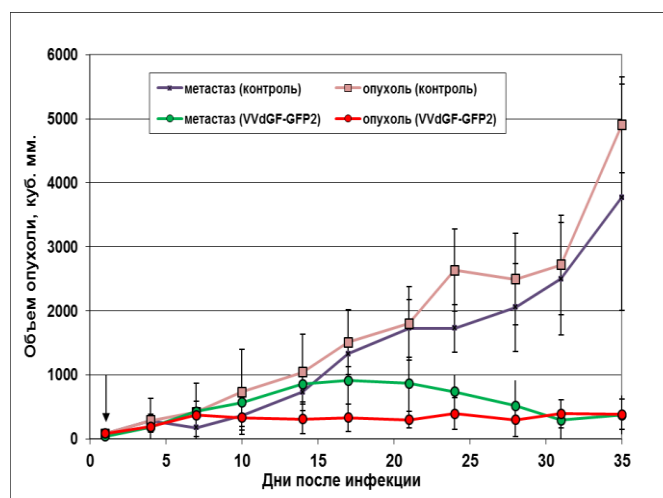


Рисунок 8. Динамика изменения объема ксенографтов карциномы человека A431. Стрелкой указана точка начала измерения (1 сут).

Таким образом, на втором этапе работы мы показали, что рекомбинантный вариант российского штамма Л-ИБП VACV с делециями двух генов вирулентности (ТК и VGF) и встройкой белка GFP2 обладает способностью даже при локальном введении быстро распространяться по организму, инфицировать отдалённые опухолевые узлы (метастазы) и лизировать их.

Конструирование двойного рекомбинантного штамма Л-ИБП с удалением генов вирулентности и встройкой трансгенов лактапина и ГМ-КСФ, оценка его противоопухолевых свойств *in vitro* и *in vivo*

Поскольку литического потенциала штамма Л-ИБП VACV с двойной делецией генов тимидинкиназы и ростового фактора может быть недостаточно для искоренения солидных опухолей и множественного метастазирования, необходима встройка дополнительных трансгенов, усиливающих противоопухолевые свойства вируса. С этой целью мы использовали уникальную разработку сотрудников лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН – противоопухолевый пептид лактапин [Патент РФ № 2317304. 2008]. Лактапин является фрагментом каппа-казеина молока человека, который специфически индуцирует апоптоз клеток рака молочной железы человека. Из мирового опыта также известно, что встройка трансгенов цитокинов в геномы онколитических вирусов способствует усилению противоопухолевого иммунитета [Haddad et al., 2017]. Наиболее успешным в этом отношении является трансген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [Breitbach et al., 2015; Rehman et al., 2016].

Встройку трансгенов лактапина и ГМ-КСФ в геном штамма Л-ИБП проводили последовательно. Сначала был сконструирован рекомбинантный штамм VV-GMCSF-S1/3, содержащий встройку полноразмерной кДНК матричной РНК ГМ-КСФ человека размером 850 п.н. (GenBank Acc. NM_000758.4) в центральной части гена ТК с одновременной его инактивацией (рис. 9А). Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-S1/3 был получен в результате двойного кроссингвера по гомологичным участкам ДНК интеграционной плазмиды рXJP5.2-GMCSF и штамма Л-ИБП с

последующей селекцией рекомбинантов в клетках H143TK- с добавлением в культуральную среду бромдезоксимуридина. Наличие в геноме встройки гена ГМ-КСФ человека подтверждали методом ПЦР (рис. 9Б) и последующим секвенированием модифицированного района. Экспрессию трансгена ГМ-КСФ под контролем природного промотора VACV P7.5k [Cochran M.A. et al., 1985] подтверждали методом вестерн-блот (рис. 9В). Поскольку ГМ-КСФ содержит лидерную последовательность, он выявляется как в лизатах, так и в культуральной среде клеток, инфицированных рекомбинантным штаммом VV-GMCSF-S1/3. Известно существование 16-ти изоформ ГМ-КСФ человека, продуцируемого в клетках эукариот, что обуславливается различным уровнем гликозилирования белка [Forno G. et al., 2004]. Этот эффект наблюдается и в наших экспериментах. В культуральной среде молекулярный вес мажорной фракции ГМ-КСФ составляет 25-32 кДа вследствие более полного гликозилирования секретированной формы белка (рис. 9В, дорожка 1), в то время как основная масса внутриклеточного ГМ-КСФ варьирует в пределах 18-32 кДа (рис. 9В, дорожка 3).

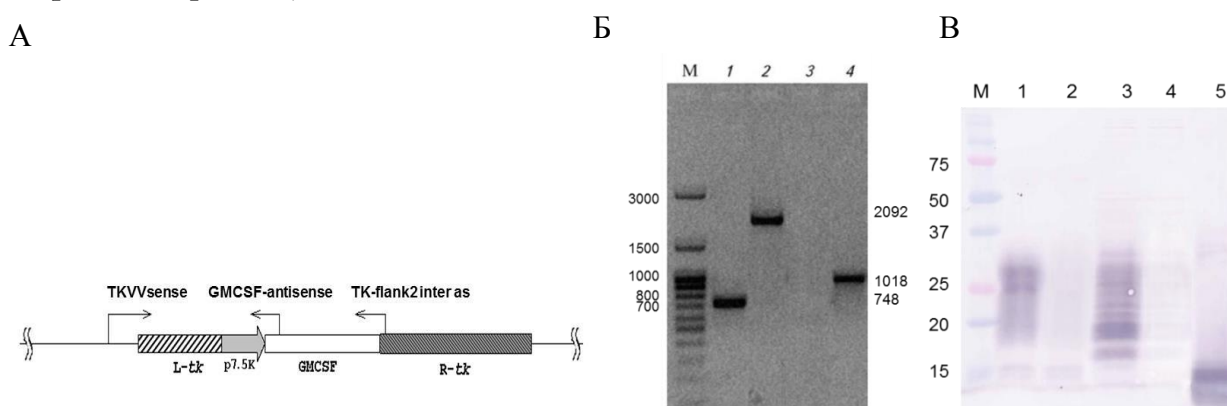


Рисунок 9. А – Схема структуры рекомбинантного варианта VV-GMCSF-S1/3 с указанием позиций праймеров. Б – ПЦР-анализ ДНК VV-GMCSF-S1/3 и исходного штамма Л-ИВП с использованием пар праймеров TK-flank1 sense и TK-flank 2 inter as (дорожки 1, 2) и TK-flank1 sense и GMCSF-antisense (дорожки 3,4). М – маркер молекулярного веса, 1 и 3 –Л-ИВП – 748 п.н и 0 п.н.; 2 и 4 – рекомбинант VV-GMCSF-S1/3 – 2092 п.н и 1018 п.н. В – Вестерн-блот с использованием rabbit polyclonal anti-GM-CSF (PeproTech, Франция): культуральная среда клеток CV-1, инфицированных 1 – VV-GMCSF-S1/3, 2 – Л-ИВП; лизаты клеток CV-1, инфицированных 3 – VV-GMCSF-S1/3, 4 –Л-ИВП; 5 – положительный контроль, негликозилированный ГМ-КСФ из E.coli – 14,4 кДа.

Биологическую активность ГМ-КСФ человека, секретируемого в культуральную среду CV-1 клеток, инфицированных рекомбинантом VV-GMCSF-S1/3, оценивали по уровню стимуляции цитокин-зависимой пролиферации клеток эритролейкоза человека TF-1. Для построения калибровочной кривой использовали очищенный и охарактеризованный препарат рекомбинантного ГМ-КСФ, полученного в клетках *E.coli* [Гилева И.П. и др., 2018] (рис. 10). Как следует из рис. 10, двухкратный пролиферативный эффект (200%) в отношении клеток TF-1 достигается при разведении культуральной среды 1:2000, что соответствует концентрации ГМ-КСФ 2 нг/мл по калибровочной кривой. Это свидетельствует о том, что сконструированный штамм VV-GMCSF-S1/3 продуцирует секретируемый биологически активный ГМ-КСФ человека в клетках млекопитающих на уровне 4 мкг на мл культуральной среды.

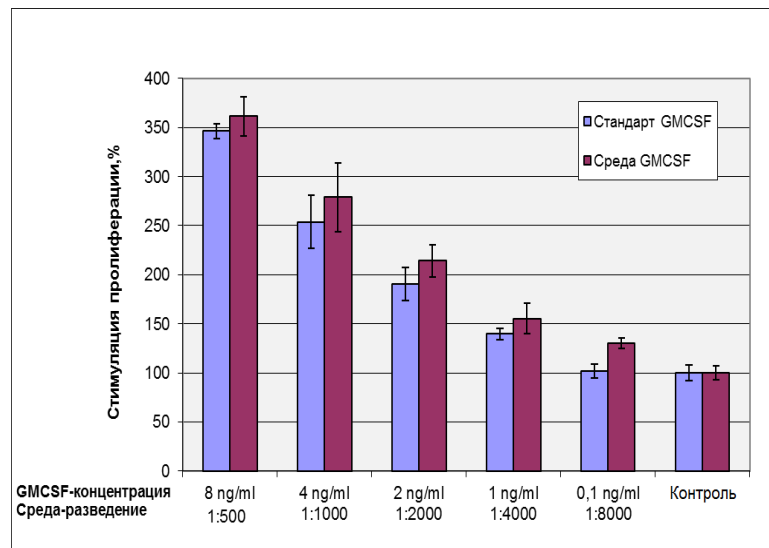


Рисунок 10. Анализ биологической активности ГМ-КСФ человека, экспрессированного в составе VV-GMCSF-S1/3. Ось Y – % стимуляции пролиферации цитокин-зависимых клеток TF-1. За 100% принимали количество живых клеток, выращенных в среде без ГМ-КСФ (отрицательный контроль). Ось X – концентрация референсного препарата ГМ-КСФ (калибровка) или разведение культуральной среды клеток, инфицированных рекомбинантом VV-GMCSF-S1/3.

Штамм VV-GMCSF-S1/3 был использован далее в качестве реципиента для введения дополнительного трансгена лактапина в район делеции гена VGF. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact (рис. 11) был получен по методу временной доминантной селекции с использованием интеграционной плазмиды pVGF-FR2-PE/L-Pat. Для корректного сравнительного изучения онкотоксических свойств лактапина, экспрессированного в составе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact, необходимо было сконструировать рекомбинантный вариант вируса VV-GMCSF-dGF (рис. 11), который, так же, как и рекомбинант с лактапином, содержал встройку трансгена ГМ-КСФ в районе делеции гена ТК вируса, но имел дополнительно делецию гена VGF без встройки трансгена лактапина. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-dGF был также получен методом временной доминантной селекции с использованием в качестве реципиента штамма VV-GMCSF-S1/3 и интеграционной плазмиды pVGF-PE/L-Pat.

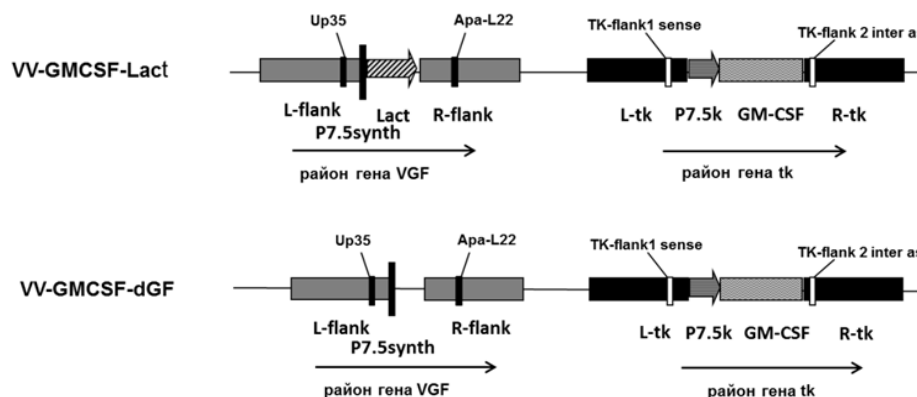


Рисунок 11. Схема структуры рекомбинантных штаммов VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF с указанием позиций праймеров, использованных в ПЦР-анализе рекомбинантных вирусных ДНК.

Соответствие структур рекомбинантных штаммов VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Lact подтверждали методом ПЦР (рис. 12А) с последующим секвенированием модифицированных районов генома штамма Л-ИВП. Экспрессию трансгенов ГМ-КСФ и лактаптина подтверждали методом вестерн-блот, анализируя культуральную среду (ГМ-КСФ) или лизаты клеток CV-1 (лактаптин), инфицированных рекомбинантными штаммами. Из рисунка 12Б следует, что штаммы VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Lact экспрессируют зрелую секретированную форму ГМ-КСФ аналогично использованному для их конструирования штамму-реципиенту VV-GMCSF-S1/3 (рис. 9В). Лактаптин в составе рекомбинантного штамма не имеет лидерной последовательности и не секретируется в культуральную среду, поэтому выявляется только в лизатах инфицированных рекомбинантом VV-GMCSF-Lact клеток (рис. 12В).

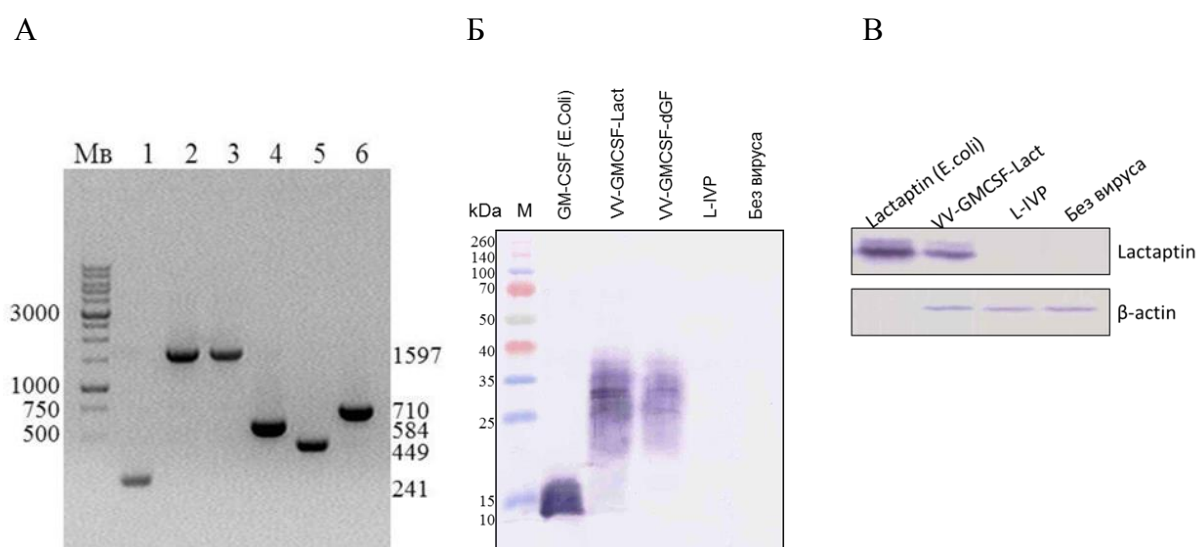


Рисунок 12. Электрофореграмма ПЦР-фрагментов, полученных с использованием пар праймеров TK-flank1 sense x TK-flank 2 inter as (дорожки 1-3) и праймеров Up35 x Apa-L22 (дорожки 4-6), Мв – контроль длин фрагментов. Дорожки 1 и 4 – штамм Л-ИВП – 241 п.н и 584 п.н.; 2 и 5 – VV-GMCSF-dGF – 1597 п.н и 449 п.н.; 3 и 6 – VV-GMCSF-Lact – 1597 п.н и 710 п.н.. Б. – Вестерн-блот анализ экспрессии гена ГМ-КСФ (проведён аналогично описанному на рис. 9В). М – маркер молекулярного веса белков. В. – Вестерн-блот анализ экспрессии гена лактаптина в составе VV-GMCSF-Lact.

Нами было также показано, что ГМ-КСФ, секретируемый в культуральную среду клеток CV-1, инфицированных рекомбинантными штаммами VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Lact, сохраняет биологическую активность родительского штамма VV-GMCSF-S1/3 на уровне 4 мкг на мл культуральной среды.

Для исследования онколитической активности вируса VV-GMCSF-Lact в сравнении с контрольным типом вируса VV-GMCSF-dGF было использовано 5 линий опухолевых клеток человека разного генеза: BT-549, MDA-MB-231 – карцинома молочной железы; A-549 – карцинома легкого; H1299 – мелкоклеточный рак легкого; U87MG – эпителиальная глиобластома. Как следует из рис. 13А, экспрессия гена лактаптина значительно увеличивает цитотоксическую активность рекомбинантного вируса не только в клетках рака молочной железы MDA-MB-231 и BT-549, но также в клетках рака легкого и мозга ($P < 0,05$). Важно также отметить, что клетки карциномы молочной железы особенно чувствительны к обоим рекомбинантным вариантам VACV.

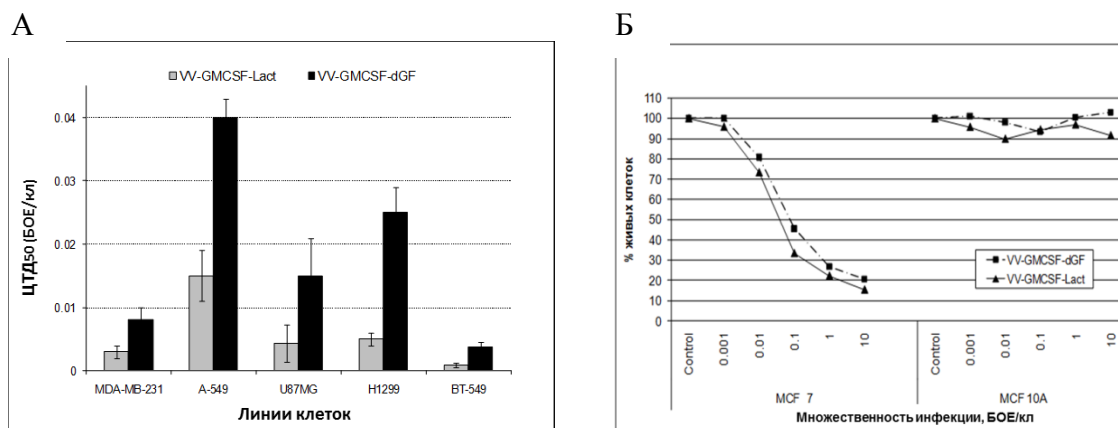


Рисунок 13. А – Сравнительная онколитическая активность VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF в раковых клетках человека различного генеза. Б – Цитотоксическая активность рекомбинантных штаммов VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF в отношении двух культур клеток (нормальной и раковой) эпителия молочной железы. ХТТ-тест.

Онкоселективность полученных рекомбинантных вариантов VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF была проверена на паре культур клеток (нормальной и раковой) эпителия молочной железы: MCF 10A – нормальные клетки эпителия молочной железы; MCF7 – эпителиальные клетки аденокарциномы молочной железы (рис. 13Б). С увеличением множественности инфекции процент живых клеток MCF 10A уменьшается незначительно, в то время как клетки аденокарциномы молочной железы практически полностью лизируются при увеличении множественности инфекции до 10 БОЕ/клетка. Индекс онкоселективности для контрольного штамма VV-GMCSF-dGF составил больше 100 в паре культур клеток раковая/нормальная (MCF7/MCF 10A), а рекомбинант со встройкой гена лактапина показал достоверно большую онкоселективность с индексом > 200 (табл. 1).

Таблица 1. Онкоселективность рекомбинантных штаммов вируса осповакцины.

Культура клеток	ЦТД ₅₀ , БОЕ/клетка	
	VV-GMCSF-Lact	VV-GMCSF-dGF
MCF10A	>10	>10
MCF7	0,049**	0,085**
Индекс онкоселективности*	>200	>100

* Индекс онкоселективности рассчитывали как отношение ЦТД₅₀ в нормальных клетках к ЦТД₅₀ в раковых клетках для каждого вирусного штамма.

** Различия достоверны при P<0,05.

Ранее было показано, что лактапин индуцирует апоптоз в клетках рака молочной железы [Koval et al., 2014]. В то же время известно, что основным типом гибели клеток вследствие инфекции вирусом осповакцины является программируемый некроз [Whilding et al., 2013]. В связи с этим представляло интерес оценить соотношение этих типов гибели для клеток рака молочной железы (апоптоз и некроз) при инфекции рекомбинантным штаммом VACV, продуцирующим лактапин. Для изучения процессов апоптоза в клетках MDA-MB-231, инфицированных рекомбинантными вирусами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF, использовали метод проточной цитометрии в системе Annexin V-FITC/йодид пропидия (PI). Оба рекомбинанта были неспособны индуцировать значительный уровень клеточной смерти после 8 часов вирусной инфекции. Соотношение ранних

апоптотических и вторичных некротических клеток (рисунок 14А, Q4 и Q2 квадрант, соответственно) было одинаковым для обеих доз рекомбинантных вирусов. При инкубации в течение 48 часов выявились различия между вирусами. Мы наблюдали, что скорость апоптоза клеток, обработанных вирусом, резко возросла по сравнению с необработанными клетками, и что штамм VV-GMCSF-Lact вызывал более обширную гибель клеток, чем штамм VV-GMCSF-dGF, при обеих проанализированных дозах (0,05 БОЕ/кл и 0,5 БОЕ/кл). Поскольку в процессе апоптоза происходит нарушение целостности цитоплазматической мембраны, такие клетки легко подвергаются вторичному некрозу (фаза, которая следует за апоптозом *in vitro*) [Vernes et al., 2000].

Для оценки этого процесса мы анализировали обобщенную Annexin V+ популяцию клеток (рис.14Б), и оказалось, что эта популяция значимо больше в клетках, инфицированных штаммом VV-GMCSF-Lact через 48 часов после инфекции. Очевидно, что это связано с увеличением популяции вторичных некротических клеток (Annexin-V+/PI+) в процессе инфекции штаммом VV-GMCSF-Lact, поскольку ранние апоптотические популяции (Annexin-V+/PI-) для обоих штаммов отличались незначительно (рисунок 14Б, 8 часов). Вполне вероятно, что экспрессия лактапина в обработанных клетках усиливает апоптоз и, как следствие, способствует прогрессированию апоптотических клеток во вторичные некротические клетки.

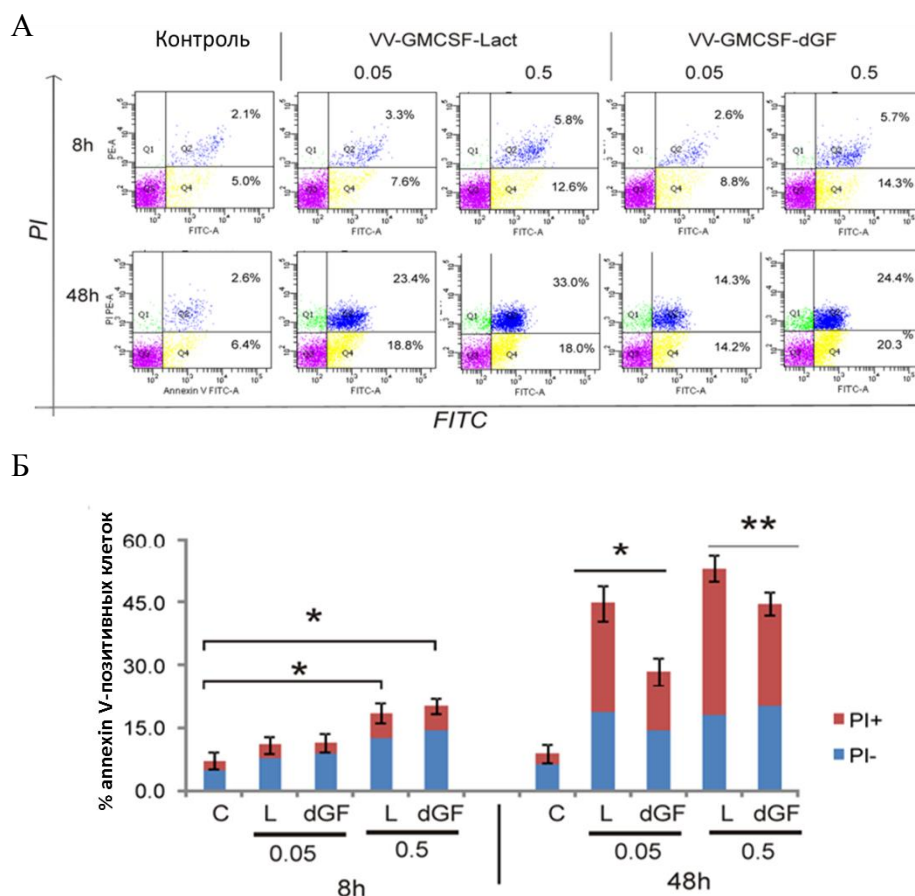


Рисунок 14. Особенности апоптоза клеток рака молочной железы MDA-MB-231 при инфекции рекомбинантными штаммами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF. Клетки инфицировали вирусами в дозе 0,05 и 0,5 БОЕ/клетка (Контроль – неинфицированные клетки) и инкубировали 8 и 48 часов. А – представлены результаты одного из 3-х проведённых экспериментов. Б – диаграмма, суммирующая данные трёх независимых экспериментов (* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$). С – контроль, dGF – рекомбинант VV-GMCSF-dGF, L – рекомбинант VV-GMCSF-Lact.

Ранее было показано, что лактаптин индуцирует апоптоз раковых клеток *in vitro* через активацию эффекторных каспаз 3 и 7 [Koval et al., 2015]. Мы предположили, что экспрессия трансгена лактапина в составе генома VACV может также приводить к активации эффекторных каспаз. Методом проточной цитометрии мы провели анализ активации каспаз 3 и 7 в клетках MDA-MB-231, инфицированных рекомбинантными штаммами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF (табл. 2). Оказалось, что популяция клеток с активированными каспазами 3 и 7 увеличивается с повышением дозы вируса для обоих рекомбинантов, но процент клеток с активированными каспазами был значимо выше, когда клетки инфицировали VV-GMCSF-Lact.

Таблица 2. Активация каспаз рекомбинантными VACV в клетках рака молочной железы MDA-MB-231.

Титр вируса БОЕ/клетка	Время, часы	Активированные каспазы (%)*	
		VV-GMCSF-dGF	VV-GMCSF-Lact
0,05	12	0,2 ± 0,17	1,8 ± 0,9
	24	6,6 ± 2,1**	14,8 ± 1,8**
	36	27,4 ± 3,5**	37,3 ± 2,3**
0,5	12	3,0 ± 1,1	5,8 ± 1,7
	24	16,5 ± 2,4**	21,3 ± 1,8**
	36	31,9 ± 2,8	35,1 ± 3,1

*Процент клеток с активированными каспазами -3 и -7 был рассчитан как разница между FAM-окрашенными инфицированными и неинфицированными клетками. Данные представлены как среднее арифметическое по трём экспериментам ± стандартное отклонение.

** Различия между группами статистически достоверны при $P < 0.05$.

Онколитическую активность *in vivo* рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact оценивали на мышах линии SCID. Мышей с ксенографтами опухоли молочной железы человека MDA-MB-231 двукратно внутривенно инфицировали рекомбинантными вирусами. Динамика ингибирования опухолевого роста была одинаковой для VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF вплоть до 42 дня после первой инфекции, но после 42 дня VV-GMCSF-Lact ингибировал опухолевый рост в большей степени (рис. 15А). К концу эксперимента на 74 сутки индекс торможения опухолевого роста (ТРО) составлял 81% и 42% для VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF, соответственно. Вес опухолей, выделенных после финальной эвтаназии мышей, также значимо отличался между рекомбинантами (рис. 15Б). В случае штамма VV-GMCSF-Lact опухоли представляли собой небольшие узелки фиброзной ткани.

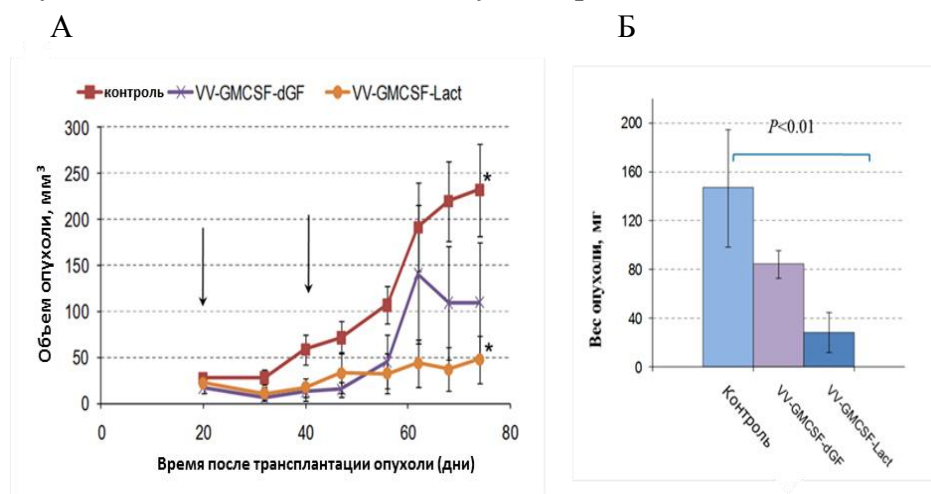


Рисунок 15. Ингибирование роста ксенографтов опухоли молочной железы MDA-MB-231 штаммами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF. А – динамика изменения объема ксенографтов. * – различия достоверны при $P < 0,01$. Б – вес опухолей на 74 сутки.

Мы также показали, что штамм VV-GMCSF-Lact может быть эффективен при лечении лекарственно-устойчивых опухолей. В качестве модели использовали иммунокомпетентных мышей CBA/LacSto с трансплантированными в мышцу ноги опухолевыми клетками устойчивой к циклофосамиду лимфосаркомы RLS. Вирус вводили однократно, внутриопухолево. В качестве контрольного лекарства использовали циклофосфамид. На 17 день эксперимента детектировали супрессию роста опухоли рекомбинантными штаммами, которая была значимо выше в случае штамма VV-GMCSF-Lact (индекс TPO 93%) по сравнению с VV-GMCSF-dGF (индекс TPO 36%) (рис. 16А). Рост опухолей, леченных циклофосфамидом, не отличался от контрольной группы. Для изучения влияния виротерапии на выживаемость мышей с ксенографтами лекарственно устойчивой лимфосаркомы RLS, мы продолжали наблюдать за мышами в течение 85 суток после трансплантации опухолей. Все мыши в группе контроля и в группе мышей, леченных циклофосфамидом, погибли к 24 дню эксперимента, в то время как 80% мышей, получивших лечение вирусом VV-GMCSF-Lact, были живы вплоть до 85 дня эксперимента (рис. 16Б).

Для сравнения терапевтического эффекта внутривенного и внутриопухолевого введения штамма VV-GMCSF-Lact, вирус вводили внутривенно мышам с опухолями RLS на 8 и 14 день после трансплантации опухолевых клеток. Ингибирование роста опухоли составило 70% при лечении штаммом VV-GMCSF-Lact, при этом рост опухолей в контрольной группе и группе мышей, леченных циклофосфамидом, не отличался друг от друга (рис. 16В). Внутривенное введение штамма VV-GMCSF-Lact также существенно увеличивало выживаемость мышей (рис. 16Г).

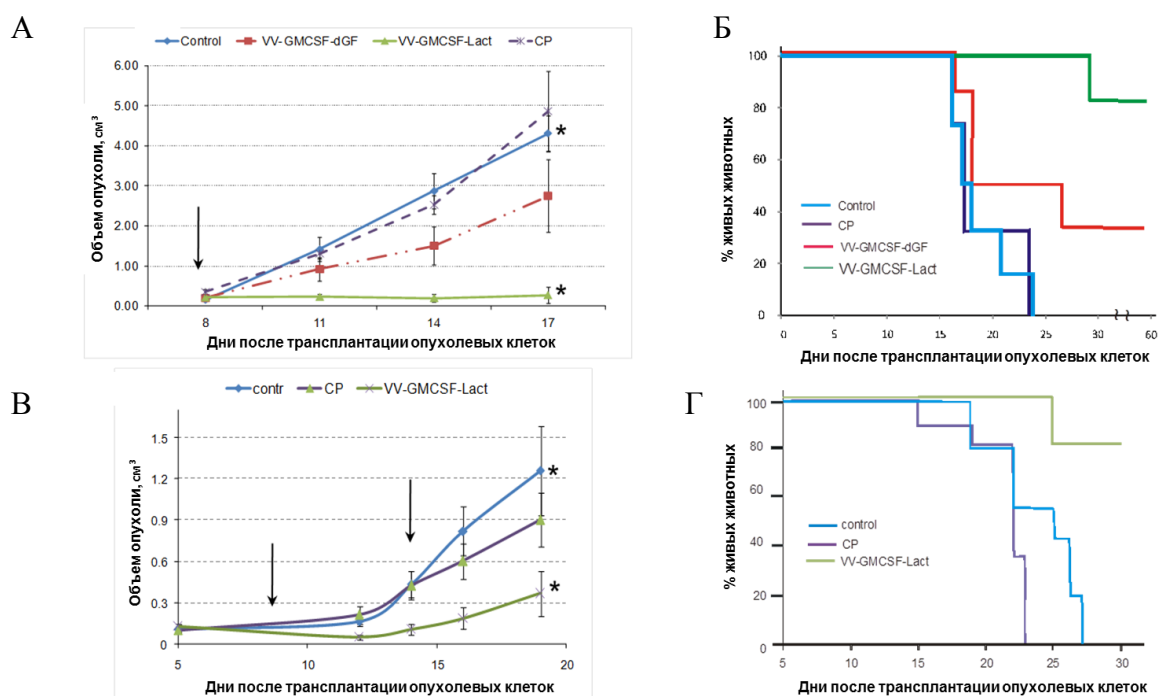


Рисунок 16. Штамм VV-GMCSF-Lact увеличивает продолжительность жизни мышей и подавляет рост сингенной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS. А, Б – внутриопухолевое введение вирусов; В, Г – внутривенное введение вируса и циклофосфамида. CP – циклофосфамид. * различия достоверны при $P < 0.01$.

Таким образом, мы показали, что внутривенные инъекции штамма VV-GMCSF-Lact эффективны против RLS-лимфосаркомы у иммунокомпетентных мышей. Это важный вывод, потому что системное введение позволяет вирусу распространяться к отдаленным опухолям или метастазам

во время лечения пациентов с поздними стадиями рака. Тем не менее, одна внутриопухолевая инъекция VV-GMCSF-Lact проявляет больший эффект, чем две внутривенные инъекции, с точки зрения ингибирования роста опухоли, а также продления выживаемости мышей.

Заключение

Синтетический ген NS1 парвовируса крыс H-1 был использован нами в качестве трансгена для встройки в геном двух аттенуированных штаммов VACV, VV-NS1-dGF и MVA-NS1, с целью усиления их противоопухолевой активности. Рекомбинант VV-NS1-dGF сконструирован на основе репликативно-компетентного для клеток млекопитающих штамма Л-ИБП, имеет делецию гена VGF (фактор вирулентности) и на месте этой делеции – встройку трансгена белка NS1. В качестве исходного для конструирования рекомбинанта MVA-NS1 был взят высокоаттенуированный репликативно-дефектный для клеток млекопитающих штамм MVA, в геном которого в район делеции П мы встроили аналогичный трансген белка NS1. Оба рекомбинантных штамма VACV эффективно экспрессируют белок NS1 в клетках глиобластомы человека U87MG.

Встройка трансгена NS1 значительно усиливает литическую активность VACV в отношении клеток глиобластомы человека U87MG *in vitro*, при этом литическая активность вариантов штамма MVA (MVA-NS1 и контроль MVA) не отличалась от соответствующих показателей вариантов вирусов на основе более вирулентного штамма Л-ИБП (VV-NS1-dGF и контрольный вирус VVdGF2/6).

Однако, было показано, что рекомбинантный штамм VV-NS1-dGF более эффективно разрушает подкожные ксенографты клеток U87MG у мышей линии Nu/Nu по сравнению со штаммом MVA-NS1 при однократном введении вирусов в район опухоли. Противоопухолевой активности штамма MVA-NS1 достаточно только для торможения роста опухоли, но недостаточно для ее деструкции. Введение же штамма VV-NS1-dGF приводит к значимому уменьшению размеров ксенографтов и, в конечном счете, к полной их деструкции.

Исследование противоопухолевых свойств рекомбинантных штаммов в ортотопической модели глиобластомы U87MG продемонстрировало увеличение продолжительности жизни мышей и значимое уменьшение объема опухолей при лечении штаммом VV-NS1-dGF. Виротерапию проводили для мышей с установившимися ксенотрансплантатами, средний объем которых к этому времени составлял, в среднем, 5,7 мм³. Такой подход моделирует опухоли мозга человека достаточно поздних стадий, на которых чаще всего заболевание и выявляется. Важно отметить, что в данном случае использовалось системное введение вируса, что наиболее предпочтительно для терапии труднодоступных опухолей мозга. Считается, что вирус осповакцины вследствие своего большого размера не преодолевает гемато-энцефалический барьер [Kaufman et al., 2015]. Однако аномальная структура и повышенная проницаемость сосудов опухолей [Bock et al., 2011] снимает эти ограничения и обеспечивает дополнительную онкоселективность вируса осповакцины.

Полученные результаты показали, что рекомбинант VV-NS1-dGF, сконструированный на основе репликативно-компетентного штамма Л-ИБП, обладает более высоким противоопухолевым потенциалом в сравнении со штаммом MVA-NS1, сконструированным на основе репликативно-дефектного штамма MVA, и может рассматриваться в качестве перспективного препарата для лечения опухолей мозга человека.

Из первого этапа работы мы сделали вывод, что онколитические варианты VACV предпочтительно получать на основе аттенуированного штамма Л-ИВП. Для дополнительной аттенуации литически активного (вирулентного) штамма Л-ИВП мы ввели делецию ТК-гена, который также как ген VGF является фактором вирулентности VACV. Кроме того, для визуализации селективного накопления вируса в опухоли и метастазах в район делеции ТК-гена был введен репортерный трансген зеленого флюоресцентного белка GFP2. Полученный рекомбинант обозначили VVdGF-GFP2.

Изучение диссеминации рекомбинанта VVdGF-GFP2 в организме иммунодефицитных мышей при интратуморальном введении показало, что он проникает в нормальные органы и ткани, однако накапливается в них в очень маленькой концентрации (10^{24} БОЕ/мл) и быстро элиминируется. В то же время на примере двух удаленно расположенных модельных ксенографтов карциномы человека A431 (опухоль и метастаз), привитых мышам Nu/Nu, мы показали, что рекомбинант VVdGF-GFP2 даже при однократном локальном введении не только способен адресно накапливаться и разрушать ткань первичного опухолевого узла, но также обладает отчетливым антиметастатическим действием.

На следующем этапе мы провели дальнейшую модификацию двойного делеционного варианта штамма Л-ИВП, «вооружив» его встройкой трансгенов противоопухолевого цитокина ГМ-КСФ и онкотоксического пептида лактапина, который специфически индуцирует апоптоз клеток рака молочной железы человека.

Был создан двойной рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact, содержащий встройки трансгенов ГМ-КСФ и лактапина в районе делеций вирусных генов ТК и VGF, соответственно. В экспериментах *in vitro* выяснилось, что экспрессия гена лактапина значительно увеличивает цитотоксическую активность рекомбинантного вируса не только в клетках рака молочной железы MDA-MB-231 и BT-549, но также в клетках рака легкого H1299 и в клетках мозга U87MG. Однако наиболее чувствительными к литическому действию VV-GMCSF-Lact остаются все же клетки карциномы молочной железы. Индекс онкоселективности штамма VV-GMCSF-Lact составляет больше 200 в паре культур клеток раковая/нормальная эпителии молочной железы (MCF7/MCF 10A).

Методом проточной цитометрии мы показали, что штамм VV-GMCSF-Lact индуцирует апоптоз раковых клеток молочной железы. При этом происходит активация эффекторных каспаз 3 и 7 и интернализация фосфатидилсерина на поверхность инфицированных клеток. Запуск апоптоза связан с экспрессией трансгена лактапина и обуславливает ускорение гибели раковых клеток за счёт нарушения целостности цитоплазматической мембраны и последующего некроза.

Рекомбинант VV-GMCSF-Lact ингибирует рост ксенографтов опухоли молочной железы человека MDA-MB-231, привитых мышам линии SCID. Важно отметить, что в данном случае использовалось системное введение вируса, что предпочтительно при сложной и труднодоступной локализации опухоли. Индекс ТРО в конечной точке эксперимента (74 сутки) составил 82%. Штамм VV-GMCSF-Lact также увеличивает продолжительность жизни мышей и подавляет рост сингенной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS при системном и внутриопухолевом введении.

Из представленных в диссертации данных следует, что двойной рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact может рассматриваться в качестве перспективного противоопухолевого препарата. В 2019 году были успешно закончены его доклинические исследования как первого в России

лекарственно средства для виротерапии злокачественных новообразований молочной железы (ГК № 14.N08.11.0189).

Выводы

1) Сконструированы рекомбинантные варианты вируса осповакцины VV-NS1-dGF и MVA-NS1, экспрессирующие трансген онкотоксического белка NS1 парвовируса крыс H-1. VV-NS1-dGF сконструирован на основе штамма Л-ИБП, аттенуированного путем удаления гена вирулентности VGF. MVA-NS1 сконструирован на основе высокоаттенуированного штамма MVA, репликативно-дефектного в отношении клеток млекопитающих.

2) Рекомбинантный вариант VV-NS1-dGF значительно эффективнее разрушает подкожные и ортотопические ксенографты клеток глиобластомы человека U87MG, привитых иммунодефицитным мышам, по сравнению с рекомбинантом MVA-NS1 при внутриопухолевом и системном введении.

3) На основе штамма Л-ИБП сконструирован рекомбинантный вариант VVdGF-GFP2 с делециями двух генов вирулентности – VGF и ТК и встройкой репортерного трансгена GFP2, что позволило инструментально подтвердить адресное накопление вируса в клетках опухолевого узла и метастаза на модели искусственного метастазирования с использованием двух удаленных ксенографтов карциномы человека A431. Однократное введение вируса в ксенографт, имитирующий первичный опухолевый узел, обеспечивало его быстрое проникновение (на 2-е сутки) в удаленный ксенографт, имитирующий метастаз, и полную деструкцию обоих ксенографтов к 20-м суткам после начала лечения.

4) С использованием аттенуированного штамма Л-ИБП с делециями генов VGF и ТК сконструирован рекомбинантный вариант VV-GMCSF-Lact, экспрессирующий трансгены цитокина ГМ-КСФ человека и онкотоксического пептида лактапина. VV-GMCSF-Lact продуцирует секретлируемую форму биологически активного ГМ-КСФ человека в клетках млекопитающих на уровне 4 мкг на мл культуральной среды.

5) Экспрессия трансгена лактапина в составе генома VV-GMCSF-Lact индуцирует апоптоз и значительно усиливает цитотоксическую активность вируса в клетках рака молочной железы человека, при этом индекс онкоселективности штамма VV-GMCSF-Lact составляет больше 200 в паре культур клеток раковая/нормальная эпителии молочной железы MCF7/MCF 10A.

6) Штамм VV-GMCSF-Lact эффективно ингибирует не только рост ксенографтов опухоли молочной железы человека MDA-MB-231 в аллогенной иммунодефицитной модели, но также и рост сингенной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS у иммунокомпетентных животных (индекс торможения роста опухолей составляет 82-93%).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные статьи:

1. **Ткачёва А.В.**, Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Шевелев О.Б., Разумов И.А., Завьялов Е.Л., Локтев В.Б., Кочнева Г.В. Таргетная терапия глиобластомы человека с использованием онколитического потенциала парвовируса и аттенуированных штаммов вируса осповакцины. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2019 – Т. 37– №2. – С. 83-91

2. Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., **Tkacheva A.V.**, Shvalov A.N., Unusova A.Yu., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. A model of the artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for examination of the oncolytic activity of vaccinia virus. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2016, Vol. 6, No. 4, pp. 469-476.
3. Grazhdantseva, A.A., Sivolobova, G.F., **Tkacheva, A.V.**, Gileva, I.P., Kuligina, E.V., Rikhter, V.A., Kochneva, G.V. Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus. Applied Biochemistry and Microbiology, 2016, Vol. 52, No. 7, pp. 685–691.
4. Kochneva G., Sivolobova G., **Tkacheva A.**, Grazhdantseva A., Troitskaya O., Nushtaeva A., Tkachenko A., Kuligina E., Richter V., Koval O. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. Oncotarget, 2016, Vol.7, No. 45, pp. 74171-74188.

Патенты:

1. Кочнева Г.В., Сиволобова Г. Ф., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., **Ткачева А.В.**, Кулигина Е.В., Коваль О.А., Рихтер В.А. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, обладающий онколитической активностью и продуцирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека и онкотоксический белок лактаптин. // Патент РФ. – 2016 – № 2604187 – Бюл. № 34.
2. **Ткачева А.В.**, Сиволобова Г.Ф., Локтев В.Б., Гражданцева А.А., Кочнева Г.В. Рекомбинантный штамм VV-NS1-dGF вируса осповакцины, продуцирующий белок NS1 парвовируса Н-1 и обладающий онколитической активностью в отношении глиобластомы человека. // Патент РФ. – 2019 – № 2692628 – Бюл. №18.

Тезисы:

1. **Ткачёва А.В.** Конструирование онколитического рекомбинантного штамма MVA вируса осповакцины со встройкой гена апоптоз-индуцирующего белка NS1 парвовируса. Материалы 52-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2014: Биология/Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2014. – с.195.
2. **Ткачёва А.В.** Создание онколитического рекомбинантного штамма MVA вируса осповакцины, экспрессирующего ген белка NS1 парвовируса . БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых. Пуцино, 21 - 25 апреля 2014 г. – с. 282-283.
3. **Ткачёва А.В.** Анализ онколитических свойств рекомбинантного штамма MVA вируса осповакцины, экспрессирующего ген белка NS1 парвовируса. Перспективы развития фундаментальных наук: сборник трудов XII Международной конференции студентов и молодых ученых. Томск, 21–24 апреля 2015. – с.1556.
4. **Ткачёва А.В.** Получение и изучение онколитических свойств рекомбинантного штамма MVA вируса осповакцины со встройкой гена апоптоз-индуцирующего белка NS1. Материалы 53-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2015: Биология/Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2015. – с.166.
5. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., **Ткачева А.В.**, Юнусова А.Ю., Кулигина Е.В., Рихтер В.А. Конструирование двойных рекомбинантных вариантов вируса осповакцины,

продуцирующих ГМ-КСФ и лактаптин, - первый шаг в создании нового противоопухолевого препарата. Материалы VII Российского симпозиума "Белки и пептиды", Новосибирск, 12-17 июля 2015. – с. 374.

6. **Ткачева А.В.**, Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Кочнева Г.В. Анализ онколитических свойств рекомбинантного штамма MVA вируса осповакцины, экспрессирующего ген белка NS1 парвовируса. Сборник тезисов II международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов Open Bio, Научоград Кольцово, 1 октября 2015. – с. 150-153.

7. **Ткачева А.В.**, Коваль О.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Кочнева Г.В., Рихтер В.А. Онколитический потенциал рекомбинантных штаммов вируса осповакцины, продуцирующих ГМ-КСФ и лактаптин. Сборник тезисов III международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, Научоград Кольцово 2016, – с. 101-106.

8. **Ткачева А.В.**, Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Коваль О.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А. Анализ онколитических свойств рекомбинантного штамма вируса осповакцины, продуцирующего секретируемый химерный белок ГМ-КСФ/лактаптин. Сборник тезисов IV международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, Научоград Кольцово 2017. – с. 332.

9. Юнусова А.Ю., **Ткачева А.В.**, Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И. Противоопухолевый эффект рекомбинантных штаммов вируса осповакцины MVA и Л-ИВП, несущих вставку гена онкотоксического белка NS1. Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего», Новосибирск, 24-26 июля 2017 г. – с. 115.

10. **Ткачёва А. В.**, Гражданцева А. А., Зайнутдинов С. С., Кочнева Г. В. Аттenuированный рекомбинантный штамм вируса осповакцины, продуцирующий ГМ-КСФ человека, как платформа для создания противоопухолевых вакцин. Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», г. Москва, 25-27 февраля 2019. – с. 307.

11. **А.В. Ткачёва**, Г.Ф. Сиволобова, А.А. Гражданцева, Г.В. Кочнева. Противоопухолевые свойства секретируемых белков-иммуномодуляторов, экспрессирующихся в составе вируса осповакцины. Сборник трудов IX Российского симпозиума «Белки и пептиды», г. Дагомыс, 1–6 октября 2019. – С.183.