

ПОЛУЧЕНИЕ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРИОНОВ И НАПРАВЛЯЮЩИМ СИНТЕЗОМ GM-CSF КАК ПЕРСПЕКТИВНОЙ ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Щелкунов С.Н., Максюттов Р.А.,
Гаврилова Е.В.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. На современном этапе развития науки проблема лечения онкологических заболеваний не теряет своей актуальности. В настоящее время становится все более очевидным, что монотерапия с помощью любого метода лечения не является столь же эффективной, как применение комбинированной терапии. Это обуславливает появление работ, посвященных совершенствованию уже существующих методов лечения и разработке новых, среди которых онколитическая иммунотерапия является одной из наиболее стремительно развивающихся. Благодаря современным методам генетической инженерии, открываются новые возможности использования онколитических вирусов в комбинированной терапии рака, что обусловлено их способностью, помимо прямого цитодеструктивного действия, влиять как на чувствительность опухолевых клеток к терапевтическому воздействию, так и на организм в целом, обеспечивая преодоление механизмов, обеспечивающих иммунорезистентность опухоли. Данная работа посвящена получению рекомбинантного вируса осповакцины, являющегося перспективной основой для создания противоопухолевых препаратов. При помощи генно-инженерных методов произведены модификации вирусного генома: в область гена, кодирующего вирусную тимидинкиназу, произведена встройка гена, кодирующего гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека, вирусный ген A34R, кодирующий мембранный гликопротеин, заменен на ген A34R с двумя нуклеотидными заменами, приводящими к аминокислотным заменам D110N и K151E и обуславливающими увеличение доли внеклеточных оболочечных вирионов при репродукции вируса. Кроме того, были изучены свойства полученного вируса в экспериментах *in vitro*: показаны продукция гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, отсутствие влияния проведенных модификаций вирусного генома на репродуктивные свойства вируса, усиленная способность вируса образовывать внеклеточные оболочечные вирионы.

Ключевые слова: вирус осповакцины, внеклеточные оболочечные формы вируса, рак, онколитический вирус, иммунотерапия, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

Адрес для переписки:

Трегубчак Татьяна Владимировна
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово.
Тел.: 8 (383) 363-47-00 (доб. 23-09).
E-mail: tregubchak_tv@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Tregubchak Tatyana V.
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo.
Phone: 7 (383) 363-47-00 (add. 2309).
E-mail: tregubchak_tv@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

Т.В. Бауэр, Т.В. Трегубчак, С.Н. Щелкунов,
Р.А. Максюттов, Е.В. Гаврилова «Получение вируса
осповакцины с повышенной продукцией внеклеточных
оболочечных вирионов и направляющим синтезом
GM-CSF как перспективной основы для создания
противоопухолевых препаратов» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 371-378.
doi: 10.15789/1563-0625-OVV-1594

© Бауэр Т.В. и соавт., 2020

For citation:

T.V. Bauer, T.V. Tregubchak, S.N. Shchelkunov,
R.A. Maksyutov, E.V. Gavrilova "Obtaining vaccinia virus
with increased production of extracellular enveloped virions
and directing GM-CSF synthesis as a promising basis for
development of antitumor drug", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2,
pp. 371-378. doi: 10.15789/1563-0625-OVV-1594

DOI: 10.15789/1563-0625-OVV-1594

OBTAINING VACCINIA VIRUS WITH INCREASED PRODUCTION OF EXTRACELLULAR ENVELOPED VIRIONS AND DIRECTING GM-CSF SYNTHESIS AS A PROMISING BASIS FOR DEVELOPMENT OF ANTITUMOR DRUG

Bauer T.V., Tregubchak T.V., Shchelkunov S.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The problems of oncological disease treatment are considered relevant and timely issues of the current research programs. Since monotherapy is increasingly clear to be less effective than combination therapy, the novel studies seek for advancement of current treatments and development of new ones employing oncolytic immunotherapy being among the most rapidly evolving approaches. Modern genetic engineering techniques enable new applications of oncolytic viruses in the frames of combined cancer therapy. These applications are feasible, due to the abilities of oncolytic viruses to destruct tumor cells, like as by changing susceptibility of cancer cells to anti-tumor drug, and upon the whole body, thus overcoming the mechanisms conferring immunoresistance of tumor cells. In the present work, we have developed a recombinant vaccinia virus which is a promising platform for designing the antitumor drugs. The following modifications of viral genome were made by means of genetic engineering: gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor was inserted into the region of viral thymidine kinase gene; viral A34R gene encoding a membrane glycoprotein, was replaced by A34R gene with two nucleotide substitutions resulting into D110N and K151E mutations which cause increased proportion of extracellular enveloped virions during the virus reproduction. Some properties of the recombinant virus were studied *in vitro*. The virus was shown to produce granulocyte-macrophage colony stimulating factor, and high numbers of extracellular enveloped virions. The genome modifications had no effect upon viral replication.

Keywords: vaccinia virus, extracellular envelope form, cancer, oncolytic virus, immunotherapy, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10101).

Введение

Стремительное развитие иммунологии и экспериментальной иммунотерапии позволило применять новые подходы в лечении злокачественных новообразований, основанные на принципах стимуляции гуморального и клеточного противоопухолевого иммунитета [12]. Наряду с цитокинами, дендритными клетками, полиэпитопными ДНК-вакцинами и моноклональными антителами, активно проводят исследования в области создания онколитических препаратов на основе вирусов [8]. Преимущество последних заключается в возможности адресной доставки терапевтических генетических конструкций в клеточные компартменты и способности стимулировать иммунную систему организма-хозяина.

Одним из перспективных направлений онколитической иммунотерапии является разработка препаратов на основе вируса осповакцины (ВОВ), который интересен в первую очередь

тем, что репликация его двухцепочечного ДНК-гена происходит в цитоплазме клетки, что исключает возможность рекомбинации между вирусным и клеточным геномами. Кроме того, ВОВ в ходе жизненного цикла способен формировать различные по антигенным свойствам вирионы. Основные виды инфекционных вирусных частиц ВОВ: внутриклеточный зрелый вирус (IMV – internal mature virus) и внеклеточный покрытый оболочкой вирус (EEV – external enveloped virus). Последний наиболее интересен при создании препарата, направленного на борьбу со злокачественными новообразованиями, поскольку EEV-вирионы способны обеспечить большую эффективность распространения вируса в межклеточном пространстве и по кровеносному руслу в целом, так как обладают низкой иммуногенностью. Штаммы ВОВ различаются по эффективности формирования EEV (например, штамм ВОВ IND-J продуцирует в 40 раз больше EEV по сравнению со штаммом WR). Данное различие обусловлено аминокислотными заменами K151E и D110N в составе мембранного гликопротеина A34 [2]. Введение таких замен

в аминокислотную последовательность белка А34 может усилить онколитический потенциал ВОВ относительно первичных опухолей и метастазов, а также частично решить проблему снижения эффективности терапии онколитическим вирусом, обусловленной иммунными реакциями организма при длительном или повторном применении препарата.

Кроме того, ранее было показано, что создание онколитических вирусов на основе ВОВ, экспрессирующих иммуностимулирующие и противораковые терапевтические молекулы, является перспективным направлением в области терапии онкологических заболеваний [17]. Большое количество публикаций посвящено изучению онколитического потенциала штаммов ВОВ с нарушенными генами, кодирующими тимидинкиназу и вирусный фактор роста. Еще одним распространенным для онколитических разработок явлением служит инсерция в состав вирусного генома гена, продуктом которого является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), используемый для активации естественного противоопухолевого иммунитета организма [7].

Таким образом, получение ВОВ с повышенной продукцией внеклеточных оболочечных вирионов, в геном которого произведена встройка гена, кодирующего GM-CSF, позволит создать перспективный вирус-основу для получения эффективных противоопухолевых препаратов, поскольку высокая емкость вирусного ДНК-генома позволяет производить встройку генов, кодирующих терапевтические факторы различной направленности, обеспечивающих стимуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов относительно опухолевых антигенов, активацию апоптоза, ингибирование молекул контрольных точек.

Материалы и методы

Получение рекомбинантного ВОВ_ТК(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E)

В качестве основы для получения рекомбинантного ВОВ использовали клонированный вариант вируса штамм ЛИВП из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. При помощи метода временной доминантной селекции проводили последовательные модификации вирусного генома [10]. На первом этапе работы осуществляли встройку гена, кодирующего GM-CSF, в район вирусного гена, кодирующего тимидинкиназу. Для этого использовали полученную ранее плазмиду интеграции рΔТК/GMCSF(+) [13]. Далее проводили заражение перевиваемой культуры клеток CV-1 (из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) клонированным вариантом ВОВ штамм ЛИВП с множественностью зара-

жения 1 БОЕ/клетка, через час после заражения проводили трансфекцию клеток плазмидой интеграции с помощью липофектамина (Invitrogen, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Затем проводили шесть последующих пассажей вируса на культуре клеток CV-1 в селективной питательной среде DMEM (Биолот, Россия) с 2% эмбриональной сывороткой коров (HyClone, США) в присутствии ксантина (250 мкг/мл), гипоксантина (15 мкг/мл) и микофеноловой кислоты (25 мкг/мл). После снятия селективного давления клонирование рекомбинантных ВОВ проводили методом бляшек на монослое клеток CV-1 под твердым агарозным покрытием. Выделение вирусной ДНК независимых клонов проводили с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) с последующим ПЦР-анализом с использованием специфичных праймеров для скрининга клонов по району генома, содержащего целевую последовательность. Правильность нуклеотидной последовательности встроенного в вирусный геном гена, кодирующего GM-CSF, подтверждали фрагментарным секвенированием на автоматическом секвенаторе 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием реагента BigDye-v.3.1 (Applied Biosystems, США). В полученном таким образом вирусе производили замену гена А34R на ген А34R с двумя нуклеотидными заменами, приводящими к аминокислотным заменам К151Е и D110N. Процесс получения идентичен вышеописанному, за исключением используемой плазмиды интеграции. Для конструирования плазмиды интеграции, предназначенной для замены гена А34R, методом ПЦР-мутационного получения фрагмента вирусного генома, длиной 915 п. н., содержащий ген А34R с нуклеотидными заменами и нуклеотидные последовательности, фланкирующие ген справа и слева. В качестве матрицы использовали ДНК исходного клонированного варианта ВОВ штамм ЛИВП и олигонуклеотидные праймеры:

A34R_L_upper 5' GAGCTCTTGACATTAAT
AAATGAAATCGC 3'

A34R_R_lower 5' AAGCTTGAATAGATAAAA
TGGCTGATGTTT 3'

A34R_L_110:D-N_lower 5' CATTTATATTGG
TCTTTTAAAC 3'

A34R_R_110:D-N_upper 5' AAGTTTAAAAAAG
ACCAATAATAAAT 3'

A34R_L_151:K-E_lower 5' TTACATACTGTTTC
AACCAGTTT 3'

A34R_R_110:K-E_upper 5' CTGGAAACTGG
TTGAAACAG 3'

Полученный ПЦР-фрагмент гидролизовали эндонуклеазами рестрикции и лигировали с плазмидным вектором рMGCgpt, содержащим доминантный селективный маркер [13], и про-

водили последующее подтверждение правильности нуклеотидных последовательностей секвенированием на автоматическом секвенаторе 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Оценка изменения уровня продукции внеклеточных оболочечных вирионов BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E)

Изучение уровня продукции внеклеточных оболочечных вирионов BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) проводили на 90% монослое клеток линий CV-1, полученном на 6-луночных планшетах. Монослой клеток CV-1 заражали исследуемым вирусом с множественностью заражения 10 БОЕ/клетка в трех повторах, после чего каждые 3 ч в течение 24 ч отбирали аликвоты надклеточной жидкости, а оставшиеся клетки вместе с надклеточной жидкостью подвергали трем циклам размораживания-оттаивания. После чего определяли титр вируса в надклеточной жидкости и в суспензии лизированных клеток. В качестве контроля для сравнения использовали вариант вируса, не содержащего аминокислотные замены в белке А34.

Оценка динамики роста рекомбинантного BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) *in vitro*

Изучение динамики роста рекомбинантного BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) проводили на 90% монослое клеток линий CV-1, полученном на 12-луночных планшетах. Инфицировали монослой клеток с множественностью заражения 0,1 БОЕ/клетка исследуемым вирусом в трех повторах и инкубировали 0, 24, 48 или 72 ч при 37 °С в условиях 5% CO₂. После трехкратного замораживания-оттаивания содержащие вирус препараты титровали методом бляшек в монослое клеток CV-1.

Оценка наличия продукции GM-CSF *in vitro* при заражении эукариотических клеток BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E)

Оценку наличия продукции GM-CSF при заражении эукариотических клеток BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) проводили на 90% монослое клеток линии CV-1, полученном на 6-луночных планшетах. Инфицировали монослой клеток с множественностью заражения 1 БОЕ/клетка исследуемым вирусом и инкубировали 24 или 48 ч при 37 °С в условиях 5% CO₂, после чего осаждали зараженные клетки центрифугированием при 800 g 5 мин. Лизировали клетки трехкратным замораживанием-оттаиванием и в буфере для нанесения образцов (50 mM Трис-НСl, pH 6,8; 4% додецилсульфат натрия; 0,2% бромфенолового синего; 20% глицерина; 0,2 M β-меркаптоэтанол) фракционировали в 12,5% ПААГ [5]. Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Schleicher &

Schuell Inc., США) осуществляли с помощью аппарата фирмы BioRad (США). Центры неспецифического связывания блокировали инкубацией нитроцеллюлозной мембраны в 0,5% растворе бычьего сывороточного альбумина в PBST. В качестве первичных антител использовали иммунную сыворотку, полученную иммунизацией кроликов GM-CSF. Конъюгат пероксидазы хрена с антителами козы против иммуноглобулинов кролика (BioRad, США) использовали в разведении 1:10000. Проявление иммунных комплексов проводили окрашиванием раствором 4-хлор-1-нафтола (Aldrich, США) в 0,1 M фосфатно-цитратном буфере pH 4,7 с концентрацией 500 мкг/мл, содержащем 0,0015% перекиси водорода.

Результаты

Получение вируса

При помощи вирусологических и генно-инженерных методов был получен рекомбинантный BOB, в геноме которого произведена замена гена А34R, кодирующего поверхностный гликопротеин, на ген А34R с двумя нуклеотидными заменами, приводящими к аминокислотным заменам D110N и K151E. Кроме того, в вирусе нарушен ген, кодирующий тимидинкиназу, в область которого произведена встройка гена, кодирующего GM-CSF (BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E)). Секвенирование нуклеотидных последовательностей вирусного генома в районе гена, кодирующего тимидинкиназу, и А34R подтвердило наличие проводимых модификаций в вирусном геноме и соответствие нуклеотидных последовательностей с теоретическими последовательностями.

Морфология бляшек

Показано, что при заражении культуры клеток CV-1, полученным рекомбинантным BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E), увеличивается количество бляшек, имеющих кометообразную форму (рис. 1), в отличие от BOB со встройкой гена, кодирующего GM-CSF, в область гена тимидинкиназы BOB_TK(-)_GM-CSF(+). Для каждого отдельного вируса анализировали морфологию всех бляшек, которые образовывались в результате вирусного заражения монослоя клеток CV-1 на 24-х лунках (6-луночные планшеты) с множественностью заражения 10 БОЕ/лунка. Доля кометообразных бляшек составила: 0,64±0,10 для BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) и 0,25±0,05 для BOB_TK(-)_GM-CSF(+). (результаты представлены как среднее значение ± средняя квадратичная ошибка). Таким образом, выявлено, что эффективность формирования кометообразных бляшек BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_

K151E) повысилась в 2,5 раза по сравнению с BOB_TK(-)_GM-CSF(+), не содержащим целевые аминокислотные замены в составе мембранного гликопротеина A34, что может свидетельствовать о повышении продукции EEV.

Уровень продукции внеклеточных оболочечных вирионов

Внеклеточные оболочечные формы вируса выходят из клетки до того, как произойдет лизис зараженной клетки и все антигенные формы вируса окажутся в межклеточном пространстве [2]. Результаты эксперимента по оценке уровня продукции внеклеточных оболочечных вирионов, отображенные на рисунке 2, свидетельствуют о том, что введение замен D110N, K151E в состав мембранного гликопротеина A34 BOB обеспечило более ранний выход EEV из клеток, а также повышение титра данных форм вируса. Следует отметить, что результаты 21 ч, 24 ч после заражения могут являться недостоверными, так как возможно, что уже происходил лизис исходно зараженных клеток и титр мог формироваться за счет остальных антигенных форм вирусных частиц.

Кроме того, показано, что общие титры (включают все антигенные формы вирионов) исследуемых вирусов значимо не отличаются (рис. 3).

Динамика роста вируса

Проведенный эксперимент не выявил значимых различий в ростовых характеристиках исследуемых рекомбинантных вариантов BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) в сравнении с исходным вариантом вируса в культуре клеток CV-1 (рис. 4).

Производство GM-CSF полученным рекомбинантным вирусом

При помощи вестерн-блот анализа показано, что белок детектируется на первые и вторые сутки после заражения в лизате клеток CV-1, зараженных BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E), отсутствует положительный сигнал в культуральной среде, также отсутствует сигнал в лизате клеток, зараженных исходным клоновым вариантом BOB, и в среде, в которой культивировались зараженные клетки.

Обсуждение

За последнее десятилетие появляется все больше работ, свидетельствующих о целесообразности использования онколитических вирусов в терапии опухолей, не чувствительных к традиционным методам лечения [3, 11, 15]. В связи с этим многие представители вирусных семейств рассматриваются в качестве потенциальных основ для создания онколитических препаратов [18]. Как правило, каждый из таких вирусов имеет свои преимущества и недостатки

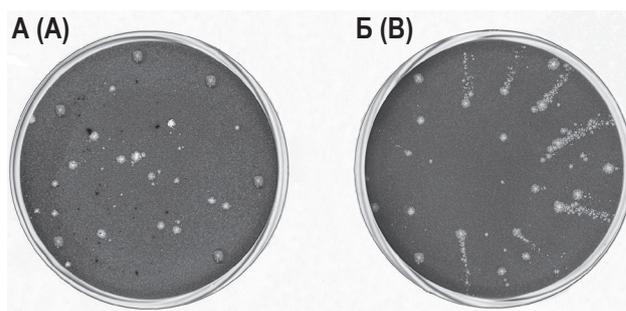


Рисунок 1. Морфология бляшек, образованных в результате заражения монослоя клеток CV-1 A) BOB_TK(-)_GM-CSF(+); Б) BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E)

Примечание. Монослой клеток окрашен кристалльвиолетом после 72 ч инкубации с вирусным материалом.

Figure 1. Morphology of plaques formed as a result of infection of the monolayer of cells CV-1 A) VACV_TK(-)_GM-CSF(+); B) VACV_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E)

Note. The monolayer of the cells is stained with crystal violet after 72 h of incubation with the viral material.

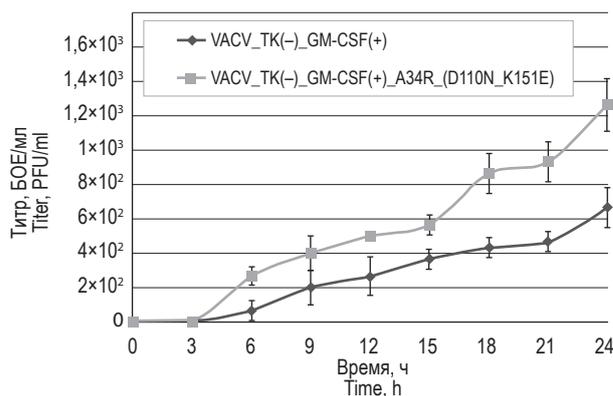


Рисунок 2. Динамика увеличения титра внеклеточных оболочечных форм вируса для BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) и BOB_TK(-)_GM-CSF(+) в надклеточной жидкости в зависимости от длительности инкубации после заражения культуры клеток CV-1 указанными вирусами

Figure 2. Dynamics of the titer increase of extracellular envelope forms of VACV_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) and VACV_TK(-)_GM-CSF(+) in the extracellular fluid depending on the duration of incubation after virus infection of the cell culture CV-1

в контексте применения такого препарата для человека.

Одним из наиболее перспективных кандидатов на роль онколитического агента является BOB, поскольку он имеет ДНК-геном с высокой емкостью, что упрощает проведение генно-инженерных модификаций и позволяет в довольно короткие сроки получать рекомбинантные вари-

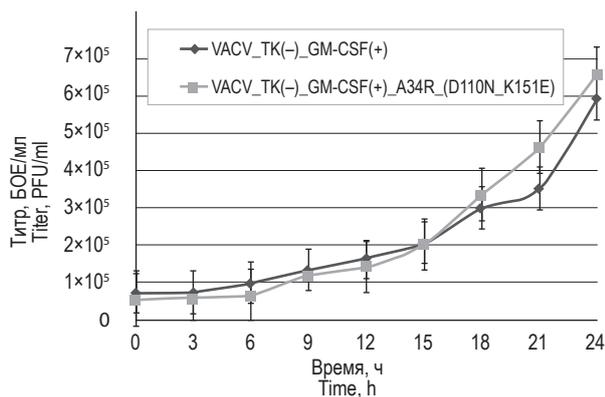


Рисунок 3. Динамика увеличения общего титра вируса (включает все антигенные формы) для BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) и BOB_TK(-)_GM-CSF(+) в зависимости от длительности инкубации после заражения культуры клеток CV-1 указанными вирусами

Figure 3. Dynamics of titer increase for VACV_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) and VACV_TK(-)_GM-CSF(+) depending on the duration of incubation after virus infection of the cell culture CV-1

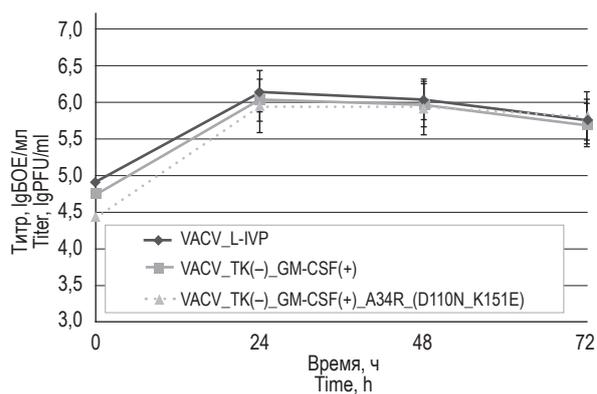


Рисунок 4. Динамика роста исходного клонированного варианта BOB и его рекомбинантных вариантов на культуре клеток CV-1

Figure 4. Growth dynamics of the initial clonal variant of VACV and its recombinants on the cell culture CV-1

анты вируса. Наиболее распространенными модификациями генома являются удаление генов, приводящих к преимущественной репликации вируса в делящихся клетках, и встраивание генов, обеспечивающих усиление иммуностимулирующих свойств вируса [14]. Указанный подход был реализован в данной работе. При помощи метода временной доминантной селекции был получен рекомбинантный вариант BOB, в геном которого произведена встройка гена, кодирующего GM-CSF. Данная модификация генома в первую очередь обусловлена тем, что эффективность онколитических вирусов частично определяется активацией иммунной системы против опухолевых клеток, что может быть дополнительно усилено путем встройки иммуностимулирующих молекул, таких как GM-CSF, который является эффективным стимулятором системного противоопухолевого иммунитета [9]. Стратегия введения в состав вирусного генома генов, кодирующих белки-иммуностимуляторы, широко применяется при разработке онколитических препаратов [6, 7]. Полученные нами результаты подтверждают наличие экспрессии GM-CSF созданным рекомбинантным вирусом осповакцины в системе *in vitro*. Подтвердить же терапевтическую эффективность GM-CSF возможно будет на следующих этапах работы на модельных животных с имплантированной опухолью. Следует отметить, что ген, кодирующий GM-CSF, встроено в геном BOB в область вирусного гена, кодирующего тимидинкиназу. Выбор данной области модификации вирусного генома основан на литературных данных, свидетельствующих о снижении виру-

лентности BOB и повышении избирательности репликации вируса в активно делящихся клетках, какими являются клетки опухолей. Репродукция BOB становится зависимой от активного синтеза нуклеотидов клеткой-хозяином, что является преимуществом таких вирусов как потенциальных основ для получения онколитических препаратов [1, 4].

В полученном нами вирусе BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E), помимо встройки гена, кодирующего GM-CSF, при одновременном нарушении вирусного гена, кодирующего тимидинкиназу, произведена замена гена A34R на ген A34R с двумя нуклеотидными заменами. Из опубликованных данных известно, что существует несколько видов инфекционных вирусных частиц BOB, которые отличаются по антигенным свойствам. Внутриклеточный зрелый вирус (IMV – internal mature virus) покрыт липопротеиновой двухслойной мембраной, окружающей плотный кор. Внутриклеточный зрелый вирус (IMV) образуется в вирусной фабрике из незрелого вируса (IV – immature virus). IMV представляет большинство инфекционного потомства и способен двигаться по микротрубочкам, покрываясь двойным слоем внутриклеточных мембран, полученных из ранних эндосом или транс-сети аппарата Гольджи, чтобы сформировать внутриклеточный вирус, покрытый оболочкой (IEV – intracellular enveloped virus). IEV затем передвигается к клеточной поверхности по микротрубочкам. Вирионы, удерживаемые на поверхности клетки, называют связанным с клеткой оболочечным вирусом (CEV – cell-

associated enveloped virus), а освобожденные вирионы – внеклеточным оболочечным вирусом (EEV – external enveloped virus). CEV индуцирует образование актиновых филаментов, которые обуславливают отделение EEV от клетки и имеют важное значение для распространения вируса [16]. Известно, что EEV-форма BOB обладает низкой иммуногенностью и обеспечивает эффективный транспорт вируса в тканях инфицируемого организма. Эффективность формирования EEV различается не только между видами, входящими в состав семейства Poxviridae, но и между разными штаммами вируса одного вида. Показано, что штамм IHD-J BOB производит в 40 раз большее количество EEV-форм вируса, чем штамм WR BOB, что обусловлено различием в 151-ом и 110-ом аминокислотных остатках мембранного гликопротеина A34 этих двух штаммов (белок A34 BOB штамма IHD-J содержит глутаминовую кислоту (151) и глутамин (110), белок A34 штамма WR – лизин (151), аспарагиновую кислоту (110)) [2]. Аминокислотная последовательность белка A34 используемого в работе штамма ЛИВП и штамма WR совпадают. Поэтому при помощи метода временной доминантной селекции в вирусе BOB_TK(-)_GM-CSF(+) была произведена замена гена A34R на ген A34R с двумя нуклеотидными заменами с целью усиления эффективности образования EEV-форм вируса. В результате было показано, что введение указанных замен привело к увеличению количества кометообразных бляшек, образующихся при заражении культуры клеток CV-1 полученным вирусом BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E), что является фенотипическим признаком, характерным для EEV-форм вируса.

Происходит более ранний выход EEV из клеток и повышение уровня образования именно EEV, при этом введенные замены не оказывают влияния на продукцию вируса в целом. Кроме того, показано, что все проведенные модификации вирусного генома не оказывают влияния на ростовые характеристики вируса на культуре клеток CV-1. Данная культура является высокочувствительной для BOB, поэтому сохранение ростовых характеристик вируса на данной культуре позволит в дальнейшем использовать ее для наработки потенциального онколитического препарата.

Стратегия получения BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(D110N_K151E) основана на внесении в выбранный клоновый вариант вируса модификаций, которые уже широко используются при разработке онколитических препаратов, с целью создания основы для дальнейшего усиления онколитического потенциала вируса. Увеличение эффективности образования EEV-форм вируса позволит эффективнее распространяться вирусу по организму, достигая метастазов, и позволит снизить уровень иммунного ответа на вирус; удаление гена, кодирующего тимидинкиназу, – снизить уровень репликации вируса в неделящихся клетках; встраивание гена, кодирующего GM-CSF, – усилить иммуностимулирующие свойства вируса.

Полученные в данной работе результаты в экспериментах *in vitro* свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения созданного кандидата онколитического BOB в экспериментах *in vivo* и о перспективности его использования в качестве основы для создания других вирусов, специфично направленных на лечение конкретных видов рака.

Список литературы / References

1. Autio K., Knuutila A., Kipar A., Pesonen S., Guse K., Parviainen S., Rajamäki M., Laitinen-Vapaavuori O., Vähä-Koskela M., Kanerva A., Hemminki A. Safety and biodistribution of a double-deleted oncolytic vaccinia virus encoding CD40 ligand in laboratory Beagles. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2014, Vol. 1, 14002. doi: 10.1038/mt.2014.2.
2. Blasco R., Sisler J. R., Moss B. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *Virology*, 1993, Vol. 67, no. 6, pp. 3319-3325.
3. Bourke M.G., Salwa S., Harrington K.J., Kucharczyk M.J., Forde P.F., de Kruijf M., Soden D., Tangney M., Collins J.K., O'Sullivan G.C. The emerging role of viruses in the treatment of solid tumours. *Cancer Treat. Rev.*, 2011, Vol. 37, no. 8, pp. 618-632.
4. Buller R.M., Smith G.L., Cremer K., Notkins A.L., Moss B. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature*, 1985, Vol. 317, no. 6040, pp. 813-815.
5. Burnette W.N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphatepolyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 1981, Vol. 112, no. 2, pp. 195-203.
6. Cush S.S., Reynoso G.V., Kamenyeva O., Bennink J.R., Yewdell J.W., Hickman H.D. Locally produced IL-10 limits cutaneous vaccinia virus spread. *PLoS Pathog.*, 2016, Vol. 12, no. 3, e1005493. doi: 10.1371/journal.ppat.1005493.
7. de Vries C.R., Monken C.E., Lattime E.C. The addition of recombinant vaccinia HER2/neu to oncolytic vaccinia – GM-CSF given into the tumor microenvironment overcomes MDSC-mediated immune escape and systemic anergy. *Cancer Gene Ther.*, 2015, Vol. 22, no. 3, pp. 154-162.

8. di Tucci C., Schiavi M.C., Faiano P., d’Oria O., Prata G., Sciuga V., Giannini A., Palaia I., Muzii L., Benedetti Panici P. Therapeutic vaccines and immune checkpoints inhibition options for gynecological cancers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2018, Vol. 128, pp. 30-42.
9. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., Mulligan R.C. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, Vol. 90, no. 8, pp. 3539-3543.
10. Falkner F.G., Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.*, 1990, Vol. 64, no. 6, pp. 3108-3111.
11. Goncharova E.P., Ruzhenkova J.S., Petrov I.S., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A. Oncolytic virus efficiency inhibited growth of tumour cells with multiple drug resistant phenotype *in vivo* and *in vitro*. *J. Transl. Med.*, 2016, Vol. 14, no. 1, 241. doi: 10.1186/s12967-016-1002-x.
12. Gopalakrishnan V., Helmink B.A., Spencer C.N., Reuben A., Wargo J.A. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell*, 2018, Vol. 33, no. 4, pp. 570-580.
13. Maksyutov R.A., Tregubchak T.V., Denisova N.I., Maksyutov A.Z., Gavrilova E.V. Gene-armed oncolytic poxvirus against cancer. *Acad. J. Cancer Res.*, 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 45-49.
14. Russell L., Peng K.W. The emerging role of oncolytic virus therapy against cancer. *Chin. Clin. Oncol.*, 2018, Vol. 7, no. 2, p. 16.
15. Russell S.J., Peng K.W., Bell J.C. Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.*, 2012, Vol. 30, no. 7, pp. 658-670.
16. Smith G.L., Vanderplassen A., Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.*, 2002, Vol. 83, no. 12, pp. 2915-2931.
17. Tim Martin N., Cameron Bell J. Oncolytic virus combination therapy: Killing one bird with two stones. *Mol. Ther.*, 2018, Vol. 26, no. 6, pp. 1414-1422.
18. Vaha-Koskela M.J., Heikkila J.E., Hinkkanen A.E. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett.*, 2007, Vol. 254, no. 2, pp. 178-216.

Авторы:

Бауэр Т.В. — стажер-исследователь ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Трегубчак Т.В. — научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Щелкунов С.Н. — д.б.н., профессор, заведующий отделом ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Максютов Р.А. — д.б.н., генеральный директор ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Гаврилова Е.В. — к.б.н., заместитель генерального директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Bauer T.V., Research Intern, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Tregubchak T.V., Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Shchelkunov S.N., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Department, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Maksyutov R.A., PhD, MD (Biology), General Director, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Gavrilova E.V., PhD (Biology), Director General Deputy for Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation