На правах рукописи

Осипов Иван Дмитриевич

ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕЛОМЕРАЗА-СПЕЦИФИЧНОГО АДЕНОВИРУСА СЕРОТИПА 6, УСИЛЕННОГО ГЕНОМ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ГМ-КСФ

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск — 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Научный руководитель:	Нетёсов Сергей Викторович – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»
Официальные оппоненты:	Кулигина Елена Владимировна, к.б.н. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии.
	Таранин Александр Владимирович, д.б.н. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», заведующий лабораторией иммуногенетики
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ)»

Защита состоится «26» сентября 2025 г. в 9:00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 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, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

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

Автореферат разослан «____» _____2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент Ильичёва Т.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ко второй половине XX века было описано несколько десятков случаев спонтанной регрессии опухолей у пациентов после перенесенной вирусной инфекции. Наиболее часто цитируется случай, произошедший еще в конце XIX века, когда американский врач Джордж Док наблюдал временную ремиссию лейкемии после перенесенного гриппа у 42-летней женщины. Это произошло за 37 лет до того, как была установлена вирусная природа гриппа. В 1950 - 1970-е годы были начаты и проведены десятки клинических исследований эффективности вирусов в лечении онкозаболеваний. Для этого использовались представители различных вирусных семейств, включая энтеровирусы, вакцинные штаммы флавивирусов, парамиксовирусы и аденовирусы. Несмотря на наблюдаемую в ряде случаев противоопухолевую эффективность, побочные эффекты вирусной терапии не позволяли дать этим препаратам статус широкого клинического применения.

Сегодня молекулярные процессы, протекающие в ходе вирусной инфекции, подробно изучены, и поэтому вирусные векторы активно применяются в генной инженерии и генной терапии, в том числе как противоопухолевые средства. В 2003 году Китайская Народная Республика стала первой страной, одобрившей использование вирусной генной терапии опухолей в клинической практике. Препарат Гендицин (Gendicine), разработанный компанией ShenZhen SiBiono Gene Tech Co., представляет собой нерепликативный аденовирусный вектор, экспрессирующий человеческий p53. Спустя два года разрешение получил другой противоопухолевый препарат на основе аденовируса, Онкорин (Oncorine), селективно реплицирующийся в опухолевых клетках. В 2015 г. впервые управлением по контролю пищевых продуктов и лекарств (FDA) США был одобрен онколитический препарат Имлигик (Imlygic), разработанный на основе герпес-вируса, для лечения злокачественной меланомы. В 2021 году в Японии для лечения злокачественной глиомы был одобрен онколитический препарат Делитакт (Delytact), основой которого также является герпес-вирус. В 2022 году FDA США был одобрен препарат Адстиладрин (Adstiladrin) на основе нереплицирующегося аденовируса, для лечения рака мочевого пузыря.

В данный момент разработки и исследования онколитических вирусов активно развиваются, ведутся клинические испытания препаратов на основе вирусов различных семейств, и наиболее часто используемым семейством является *Adenoviridae*. Согласно ресурсу clinicaltrials.gov, из 110 ведущихся клинических испытаний онколитических вирусов, на аденовирусы приходится 31% исследований. Аденовирусы обладают несколькими достоинствами, привлекающими исследователей при разработке терапевтических средств. Во-первых, жизненный цикл аденовируса не включает интеграции его генома в человеческие хромосомы, что практически исключает инсерционный мутагенез. Во-вторых, аденовирусы, как правило, слабо патогенны для человека. В-третьих, они способны инфицировать широкий спектр клеток. В-четвертых, они обладают большим геномом, позволяющим встраивать в него различные, в том числе протяженные трансгены. В-пятых, аденовирусы являются хорошо исследованным объектом, генно-инженерные методы модификации аденовируса серотипа 5, а также протоколы его наработки хорошо отработаны за последние десятилетия.

При конструировании онколитических вирусов для терапии злокачественных новообразований вирусы модифицируют таким образом, чтобы их репликация происходила преимущественно в опухолевых клетках. Одним из способов аттенуации является встройка опухолеспецифичных промоторов, например, промотора теломеразы человека, для контроля экспрессии жизненно важного для аденовирусов гена E1A. Также, при разработке лекарственных средств противоопухолевые свойства вирусов усиливают трансгенами, например, генами различных цитокинов, стимулирующих противоопухолевый иммунный ответ. Одним из наиболее распространенных является ген человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), способного усиливать врожденный иммунный ответ и стимулировать презентацию опухолевых неоантигенов.

Большинство онколитических аденовирусов создано на основе аденовируса серотипа 5 (Ad5), однако широко распространенный предсуществующий иммунитет к аденовирусу этого серотипа ограничивает эффективность разработанных препаратов. Одним из лучших кандидатов на роль «альтернативного» по отношению к Ad5 является аденовирус серотипа 6 (Ad6). Оба серотипа являются родственными и имеют

схожие биологические свойства, при этом иммунитет к Ad6 менее распространен в человеческой популяции.

Однако подходы к конструированию рекомбинантных аденовирусов на основе отличных от Ad5 серотипов ещё недостаточно разработаны. Поэтому актуальными задачами являются поиск подходов к получению онколитических штаммов аденовируса серотипа 6 и создание на их основе противоопухолевых лекарственных средств.

Цель работы: Создание рекомбинантного условно-реплицирующегося варианта аденовируса серотипа 6, содержащего встройки промотора гена теломеразы человека hTERT и гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (ГМ-КСФ), и оценка его противоопухолевой эффективности.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить онколитические свойства аденовируса Ad6 дикого типа в сравнении с наиболее часто применяемым аденовирусом серотипа 5 (Ad5) *in vitro* и *in vivo*
2. Разработать новый эффективный способ получения рекомбинантных аденовирусов на основе Ad6 и получить рекомбинантный Ad6 со встройками промотора гена теломеразы человека вместо промотора гена E1A и гена человеческого ГМ-КСФ в ген E3 вируса (Ad6-hT-GM).
3. Оценить способность полученного рекомбинантного вируса продуцировать биологически активный трансгенный ГМ-КСФ.
4. Оценить опухолевую селективность полученного рекомбинантного вируса.
5. Оценить противоопухолевую эффективность рекомбинантного вируса.

Научная новизна:

В рамках представленной работы была впервые изучена противоопухолевая активность Ad6 в отношении глиобластомы человека в экспериментах *in vitro* и на животной модели *in vivo*. Было показано, что Ad6 обладает онколитическим эффектом,

схожим с таковым для Ad5, наиболее широко применяемого для конструирования онколитических аденовирусов. На основе метода рекомбинации *in vitro* был разработан новый способ получения рекомбинантных штаммов Ad6, позволяющий вносить модификации в гены E1A и E3, наиболее часто модифицируемые при конструировании онколитических аденовирусов. Разработанным способом был впервые получен рекомбинантный аденовирус Ad6-hT-GM, обладающий селективностью в отношении hTERT-положительных клеток, а также экспрессирующий ген человеческого ГМ-КСФ. Показана противоопухолевая активность нового рекомбинантного аденовируса.

Степень внедрения в практику:

Рекомбинантный штамм аденовируса серотипа 6 Ad6-hT-GM защищен патентом RU2753742C1, заявка на изобретение №2020134158, приоритет от 16.10.2020 (в формуле изобретения штамм обозначен как Ad6-hTERT-GMCSF). На основе штамма Ad6-hT-GM сконструирован штамм Ad6/3-hT-GM, содержащий дополнительную модификацию в гене белка файбер, обеспечивающую изменение спектра опухолевых мишеней. Доклинические испытания лекарственного препарата, созданного на основе штамма Ad6/3-hT-GM, проводятся в научных учреждениях ФМБА России. Вектор Ad6/3-hT-GM защищен патентом RU2814581C1, заявка на изобретение №2023108841/10(019059), приоритет от 07.04.2023 (в формуле изобретения штамм обозначен как Ad6/3-hTERT-GMCSF).

Личный вклад:

Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Исследование онколитической активности вирусов Ad5, Ad6, Ad6-hT-GM *in vivo* проводилось совместно с д.б.н., зав. лабораторией Кочневой Г.В. и к.б.н, с.н.с. Гражданцевой А.А. (Лаборатория вирусных гепатитов ФГБНУ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), к.б.н, с.н.с. Долговой Е.В. и м.н.с. Риттер Г.С. (Лаборатория индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН), к.б.н., н.с. Нуштаевой А.А. и

к.б.н., н.с. Троицкой О.С. (Лаборатория биотехнологии и Лаборатория геномного редактирования ИХБФМ СО РАН).

Изучение биологической активности ГМ-КСФ на клетках TF-1 (человек, эритролейкемия) проводилось д.б.н., зав. лабораторией Кочневой Г.В. и к.б.н, с.н.с. Гражданцевой А.А. (Лаборатория вирусных гепатитов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Положения, выносимые на защиту:

1. Цитотоксическая и противоопухолевая активность аденовируса серотипа 6 (Ad6) в отношении глиобластомы человека не уступает таковой аденовируса серотипа 5 (Ad5)

2. Разработан новый способ получения рекомбинантных штаммов Ad6 при помощи сборки *in vitro*, позволяющий проводить модификации генов E1A и E3 Ad6.

3. Разработанным способом получен рекомбинантный штамм Ad6-hT-GM со встройкой промотора гена теломеразы человека вместо нативного промотора E1A, а также встройкой гена ГМ-КСФ человека в ген E3 аденовируса.

4. Ad6-hT-GM обладает избирательной цитотоксической активностью в отношении теломераза-положительных опухолевых клеток и обеспечивает наработку биологически активного ГМ-КСФ в инфицированных клетках.

5. Онколитическая активность Ad6-hT-GM в отношении опухолей человека не уступает таковой природного варианта Ad6 на модели иммунодефицитных мышей

Публикации и апробация результатов. По результатам исследования опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, результаты также были представлены на следующих конференциях: Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва 2018), мультиконференция «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019), 57-ая Международная Научная Студенческая Конференция (Новосибирск, 2019), 3-я международная конференция „Smart Bio“ (Каунас, Литва, 2019), международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов „OpenBio“ (Кольцово, 2020), Конференция Американского Сообщества Генной и Клеточной Терапии (Онлайн-формат, США,

2021), международной конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022).

Получен патент РФ RU2753742C1 «Рекомбинантный штамм Ad6-hTERT-GMCSF, содержащий встройку промотора теломеразы человека hTERT, а также гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, обладающий избирательной цитолитической активностью против теломераза-положительных опухолевых клеток и экспрессирующий активный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор», приоритет от 16.10.2020 г.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка используемой литературы, приложения. Работа изложена на 153 страницах, включает 30 рисунков, 4 таблицы и 17 приложений. Список литературы содержит 241 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Изучение онколитического потенциала Ad6 дикого типа

Перед конструированием рекомбинантного онколитического вируса на основе Ad6 была изучена противоопухолевая активность природного варианта. Хотя онколитическая активность

1.1 Оценка онколитического эффекта природного варианта Ad6 против клеток глиомы in vitro

Для сравнения онколитической активности природных вариантов Ad6 и Ad5 в отношении глиобластомы человека *in vitro* использовали клеточные линии U87MG и U251MG. Клетки высевали на 96-луночный планшет, а затем заражали вирусами с MOI (множественность инфекции) от 0.1 до 10000 ТЦПД50/клетку, к контрольным клеткам вместо вируса добавляли соответствующий объем буфера хранения. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи XTT-теста спустя 72 часа после заражения (рис. 1). Литический эффект Ad6 оказался схож с таковым для Ad5: оба серотипа вируса достоверно снижали жизнеспособность опухолевых клеток обеих линий ($p<0.0001$) начиная с MOI = 10 ТЦПД50/клетку, при этом жизнеспособность клеток U251MG, инфицированных Ad6, также достоверно отличалась ($p<0.05$) от жизнеспособности контрольных клеток U251MG при MOI = 1 ТЦПД50/клетку ($p<0.001$), в то время как для Ad5 достоверная разница была достигнута при MOI = 10 ТЦПД50/клетку.

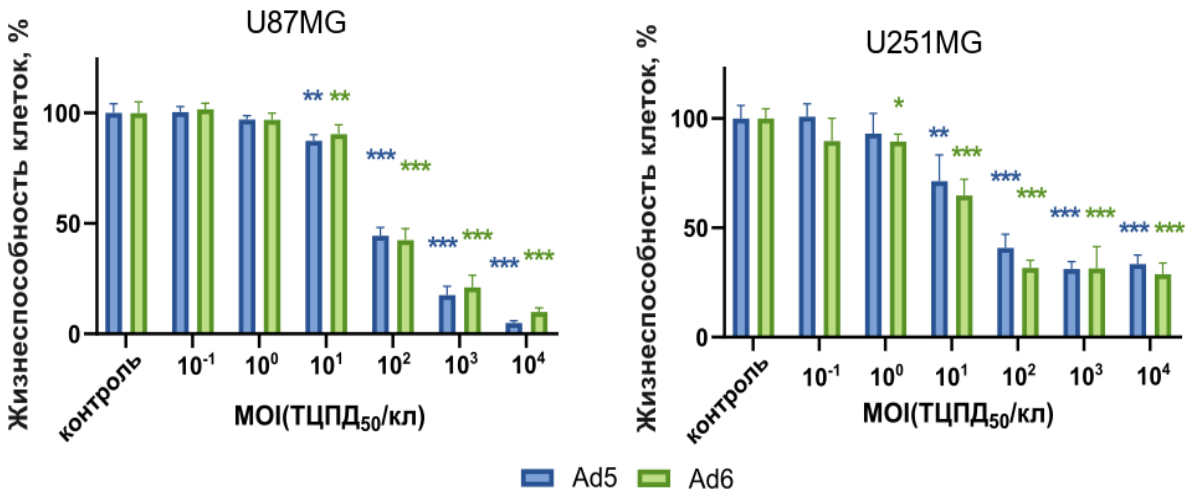

Рисунок 1 — Цитотоксичность аденовирусов серотипа 5 (Ad5) и серотипа 6 (Ad6) в отношении культур клеток глиобластомы человека U87MG (А) и U251MG (Б). Приведены средние значения ± стандартное отклонение (n=6) при различных MOI. Статистическую значимость отличий от контроля определяли дисперсионным анализом с апостериорным попарным тестом Даннета, синим обозначены достоверные отличия в жизнеспособности контрольных клеток от клеток, обработанных Ad5, зеленым — то же самое для контрольных клеток и Ad6 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

1.2 Оценка онколитического эффекта природного варианта Ad6 против глиобластомы in vivo

Для оценки противоопухолевой эффективности природных вариантов аденовирусов 5 и 6 серотипов использовали клетки глиобластомы U87MG, подкожно трансплантированные иммунодефицитным мышам линии SCID. Первый эксперимент был проведен на мышах с опухолями малого размера, средний размер опухолей на момент начала терапии составлял около 60 мм3. Вирусы вводили экспериментальным животным внутриопухолево в дозе 10^9 ТЦПД50, курсом из трех инъекций с интервалом между инъекциями два дня. Животные контрольной группы получали буфер хранения по той же схеме. Эксперимент завершили на 32 день. Объемы ксенографтов у мышей, получивших инъекции Ad5, были достоверно меньше ($p<0.05$), чем у контрольных мышей, начиная с 10 дня эксперимента (рис. 2А), в то время как у мышей, получавших Ad6, размеры опухолей имели достоверно меньший объем на 22 день эксперимента. Стоит отметить, что у некоторых животных (n=2 для каждой группы, получавшей вирус) к концу терапии опухоли не пальпировались. Достоверных

отличий между группами мышей, получавших вирусы, не обнаруживалось ни в один из дней эксперимента, поэтому противоопухолевый эффект вирусов обоих серотипов в отношении опухолей малого размера можно считать схожим.

Во втором эксперименте инъекцию вируса в дозе 10^9 ТЦПД50 на животное провели троекратно (0, 3 и 7 дни) после того, как опухоли достигли среднего объема 400 мм3. Такой объем опухоли был выбран, чтобы оценить эффективность вируса на более поздних стадиях развития злокачественного новообразования. Эксперимент был завершен на 14 день. Торможение роста опухоли при применении Ad5 фиксировали, начиная с 4го дня после инъекции, в то время как достоверные отличия группы мышей при применении Ad6 от контрольной группы были отмечены только на 11 день эксперимента (рис. 2Б). Стоит отметить, что отчасти средний размер опухолей на 4 день в группе Ad6 был повышен всего из-за одной мыши, размер опухоли которой на 4 день эксперимента практически достиг 2000 мм3, однако на 7 день ее размер уменьшился более чем в 2 раза (рис. 2В), что свидетельствует о высокой противоопухолевой эффективности Ad6.

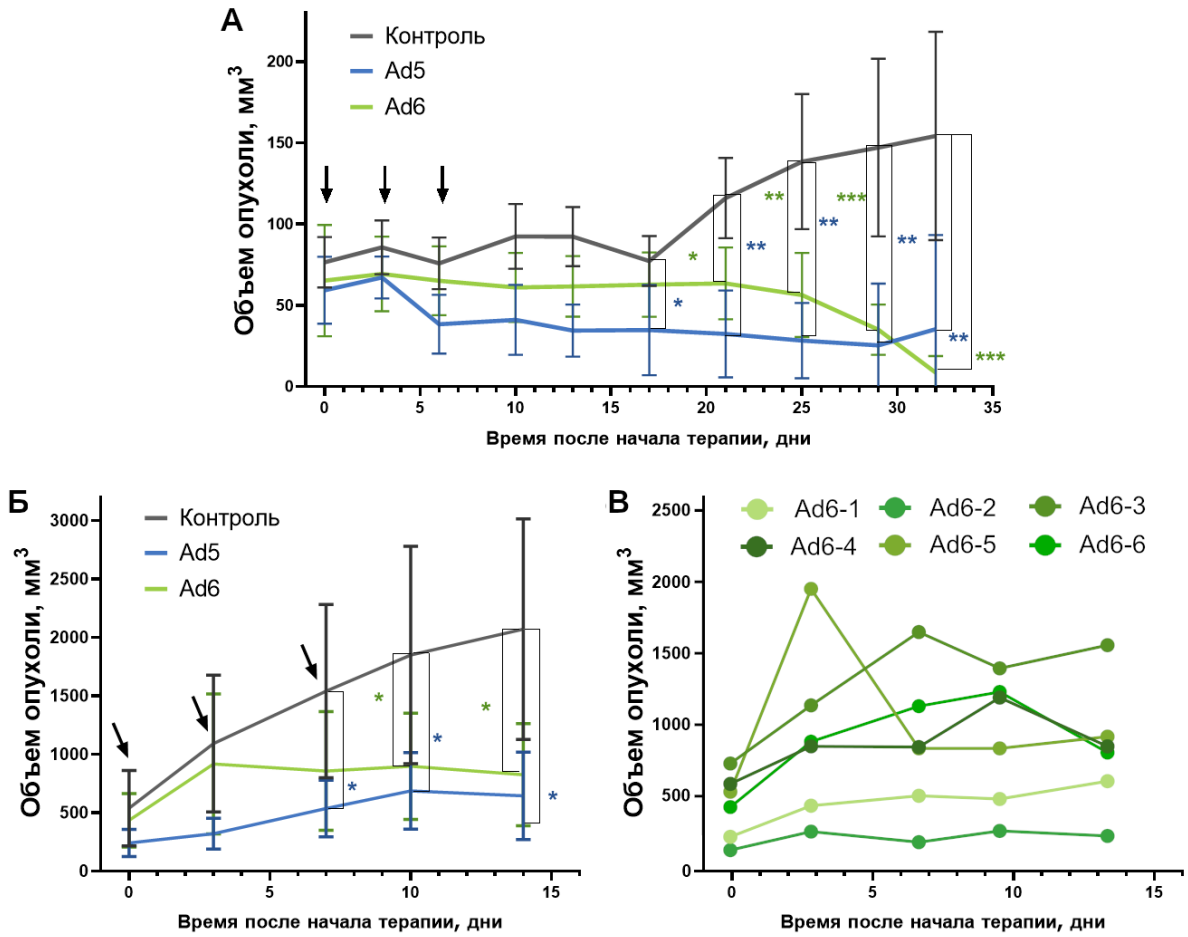

Рисунок 2 – А. Противоопухолевый эффект Ad5 и Ad6 дикого типа в отношении подкожных ксенографтов U87MG малого размера. Б. Противоопухолевый эффект Ad5 и Ad6 дикого типа в отношении подкожных ксенографтов U87MG большого размера. Дни инъекций Ad5, Ad6 или буфера хранения обозначены стрелками. Приведены значения среднего размера опухоли ± стандартное отклонение. Статистическую значимость межгрупповых различий определяли при помощи дисперсионного анализа с апостериорным попарным тестом Тьюки. *p < 0.05; **p < 0.01, синим обозначены достоверные отличия в размерах опухолей группы мышей, которым вводили Ad5, от контрольной группы, зеленым — мышей, которым вводили Ad6, от контрольной группы. В. Индивидуальные объемы опухолей мышей, которым вводили Ad6.

2. Конструирование рекомбинантного аденовируса Ad6-hT-GM

Одной из причин широкого распространения Ad5 как вектора является доступность способов модификации его генома. коммерчески доступная система AdEasy была разработана для получения нереплицирующихся аденовирусных векторов, но во многих лабораториях была также адаптирована для получения реплицирующихся онколитических вирусов. Подобных широко распространенных систем или стандартных методов не существует для иных серотипов, поэтому было необходимо разработать способ конструирования рекомбинантных Ad6

самостоятельно. Наиболее часто при разработке онколитических препаратов модифицируются гены E1A и E3 генома аденовируса. Продукты гена E1A отвечают за запуск репликативного цикла вируса, а значит его модификацией возможно обеспечить специфичность вирусной инфекции. Продукты E3 отвечают за избегание иммунитета хозяина и не являются жизненно необходимыми, поэтому вместо них осуществляют встройку трансгенов. Последовательность генома Ad6 содержит всего 6 уникальных сайтов гидролиза эндонуклеазами рестрикции, но 1 из них (ClaI) расположена внутри гена E1A (ClaI), а другая (PacI) - перед геном E3. Это свойство позволило нам создать способ модификации генома Ad6. Для этого на основе pBR322 получают шаттл-плазмиду, содержащую модифицированный фрагмент генома Ad6 от левого ITR до сайта гидролиза ClaI, а также фрагмент генома Ad6 от сайта гидролиза PacI до правого ITR. При этом фрагменты генома фланкированы сайтами гидролиза эндонуклеазы рестрикции AsiSI, для которой отсутствуют сайты гидролиза в геноме Ad6. Результирующая шаттл-плазмида обладает размером приблизительно 15 тысяч пар нуклеотидов. Далее возможно провести рекомбинацию между геномной ДНК Ad6, гидролизованной эндонуклеазами рестрикции ClaI и PacI, и линеаризованной шаттл-плазмидой, при этом будет получена полногеномная плазмида, то есть плазмида, содержащая полный геном вируса, а также интересующие модификации генов E1A и E3. Таким способом был получен аденовирус Ad6-hT-GM, содержащий промотор теломеразы человека вместо нативного промотора E1A, а также ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) человека вместо открытых рамок трансляции 6.7k и gp19k гена E3 вируса (рис. 3). Для этого в плазмиду pBR322 последовательно были встроены фрагменты геномной ДНК аденовируса: 1) 1-1773 п.н. с участком 340-559 п.н., замененным на последовательность промотора теломеразы человека, (pBRAd1) 2) 27576-28565 п.н. (pBRAd2), 3) ген ГМ-КСФ человека (pBRAd3), 4) 29269-35759 п.н. (pBRAd4), 5) 1774-27575 п.н. (полногеномная плазмида pAd6-hTERT-GMCSF). Затем из этой плазмиды была вырезана копия геномной ДНК Ad6 с внесенными модификациями, которой затем трансфицировали клетки Ad293 для “оживления” вируса. В результате был получен вирус Ad6-hT-GM.

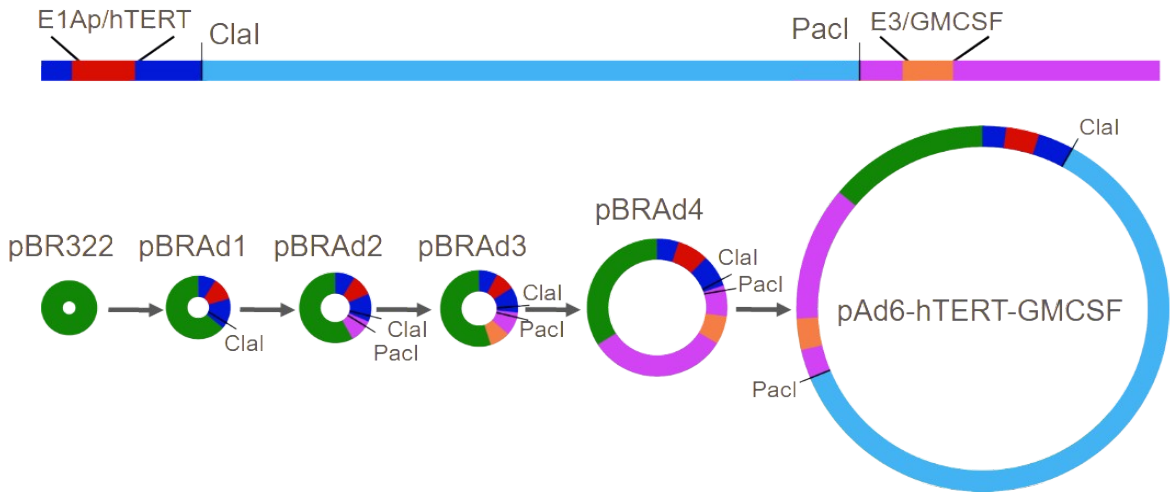

Рисунок 3 – Схема конструирования полногеномной плазмиды. В плазмиду pBR322 осуществлялась последовательная встройка фрагментов геномной ДНК аденовируса серотипа 6, синим обозначен фрагмент 1-1773 п.н., голубым - 1774-27575, фиолетовым - 27576-35759, красным — район промотора E1A, замененный последовательностью промотора hTERT, оранжевым — открытые рамки трансляции E3-6.7k/gp19k, замененные последовательностью гена ГМ-КСФ человека.

3. Изучение свойств рекомбинантного вируса Ad6-hT-GM

3.1 Оценка репликативной активности Ad6-hT-GM

Было оценено влияние внесенных модификаций на репликацию аденовируса *in vitro*. Опухолевые клетки MDA-MB-231, U87MG и A549 инфицировали Ad6 и Ad6-hT-GM с MOI = 100 вч/клетку, клетки здоровых фибробластов сгиба локтя инфицировали Ad6 и Ad6-hT-GM с MOI = 10000 вч/клетку, а затем при помощи ПЦР оценивали количество копий генома вируса спустя 8, 16, 24, 32, 48 и 72 часа (рис. 4). В клетках здоровых фибробластов сгиба локтя спустя 24 и 32 часа после инфицирования наблюдалось сниженное количество копий вирусного генома Ad6-hT-GM по сравнению с природным вариантом Ad6. Спустя 48 часов количество копий геномов вирусов Ad6 и Ad6-hT-GM в клетках сравнялось, однако спустя 72 часа количество копий генома Ad6 снова было достоверно выше, чем количество копий генома Ad6-hT-GM в инфицированных клетках здоровых фибробластов человека.

В опухолевых клетках U87MG также наблюдалась задержка репликации Ad6-hT-GM по сравнению с Ad6 дикого типа спустя 32 часа после заражения, но при этом в

более поздних временных точках отличия не обнаруживались. Также не было выявлено снижения количества копий Ad6-hT-GM в клетках A549 и MDA-MB-231.

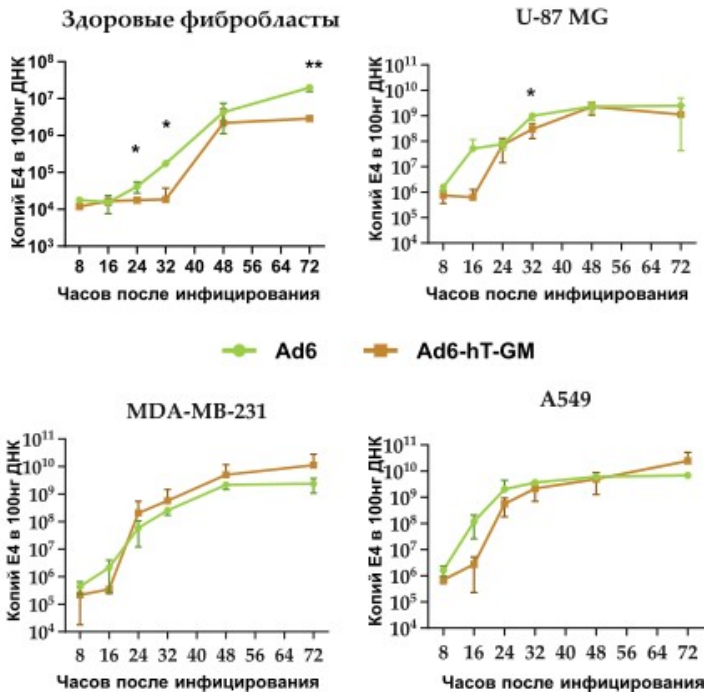

Рисунок 4 – Влияние внесенных модификаций на вирусную репликацию в различных клеточных линиях человека. Клетки MDA-MB-231, U87MG и A549 заражали Ad6 и Ad6-hT-GM с MOI = 100 вч/клетку, клетки здоровых фибробластов заражали с MOI = 10000 вч/клетку, количество копий генома вируса оценивали в различных временных точках после инфицирования при помощи количественной ПЦР, используя праймеры на область E4 вирусного генома. Представлено среднее ± стандартное отклонение (n = 3) на логарифмической шкале. Достоверность отличий оценивалась при помощи дисперсионного анализа с апостериорным попарным тестом Тьюки. * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ обозначают достоверные отличия между количеством копий генома Ad6-hT-GM и Ad6 в клетках.

Промотор гена hTERT является опухоль-специфическим промотором, что объясняет торможение репликации Ad6-hT-GM в здоровых фибробластах. В других исследованиях активность теломеразы в клетках U87MG *in vitro* не обнаруживалась, в отличие от клеток MDA-MB-231 и A549, что также объясняет торможение репликации в данной линии клеток. Исходя из этого можно заключить, что встройка промотора hTERT обеспечивает опухолеспецифичную репликацию вируса.

3.2 Цитотоксическая активность Ad6-hT-GM в отношении здоровых клеток и опухолевых клеток с низким уровнем hTERT in vitro

Затем оценивали цитотоксический эффект Ad6-hT-GM и Ad6 дикого типа на панели клеток: здоровые фибробласты сгиба локтя, Wi-38 (человек, здоровые легочные фибробласты) и Saos-2 (остеосаркома, человек). Клетки здоровых фибробластов сгиба локтя были инфицированы Ad6 и Ad6-hT-GM с MOI от 10 до 10000 вч/клетку, клетки Wi-38 с MOI от 10 до 1000 вч/клетку, клетки Saos-2 с MOI от 1 до 100 вч/клетку. Спустя 8 дней после инфицирования оценивали жизнеспособность клеток при помощи XTT-теста относительно неинфицированных клеток (рис. 5).

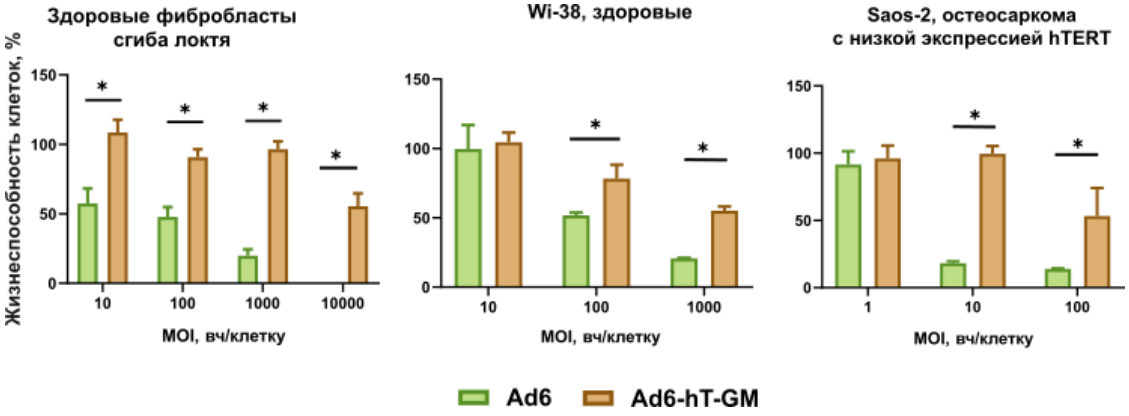

Рисунок 5 – Оценка жизнеспособности клеток при помощи XTT-теста на 8 день после инфицирования Ad6 и Ad6-hT-GM с разными MOI. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 3). Достоверность различий жизнеспособности определялась при помощи дисперсионного анализа с апостериорным попарным t-тестом Стьюдента. * $p < 0.001$.

В отношении всех трех типов клеток Ad6-hT-GM проявлял существенно меньшую цитотоксичность, чем Ad6 дикого типа, начиная с MOI 10 вч/клетку. Линия клеток остеосаркомы Saos-2 обладает особым, альтернативным механизмом удлинения теломерных концов, не требующим участия теломеразы, и поэтому клетки SaOS-2 имеют сниженную теломеразную активность. В здоровых клетках активность теломеразы также снижена.

Поскольку аденовирус со встройкой промотора теломеразы человека обладает меньшей цитотоксичностью и репликативной активностью в клетках, где активность теломеразы снижена, можно утверждать о повышенной опухолевой специфичности Ad6-hT-GM.

3.3. Оценка уровня ГМ-КСФ, а также его биологической активности, в среде клеток, инфицированных Ad6-hT-GM

Биологическую активность ГМ-КСФ, секретируемого в культуральную среду клетками A549, зараженными Ad6-hT-GM, исследовали на клетках линии TF-1 (рис. 6А). Клетки TF-1 являются клетками эритролейкемии, и их пролиферация зависит от наличия человеческого ГМ-КСФ или ИЛ-3 в среде. Культуральную среду клеток A549, инфицированных Ad6-hT-GM, фильтровали, чтобы очистить секретированный ГМ-КСФ от вируса, затем проводили четырехкратные разведения отфильтрованной среды и добавляли ее к TF-1. Жизнеспособность клеток TF-1 по отношению к клеткам без добавления среды от зараженных клеток A549 оценивали при помощи XTT-теста.

После этого оценивали кинетику секреции ГМ-КСФ инфицированными вирусом клетками A549 в среду (множественность MOI = 100 вч/клетку (рис. 6Б)). Зараженные клетки инкубировали со свежей средой в течение 1 часа, а затем среду собирали и измеряли количество ГМ-КСФ при помощи ИФА. Секреция ГМ-КСФ начиналась между 8 и 16 часами после инфицирования и снижалась после 32 часов, что соответствует началу лизиса клетки.

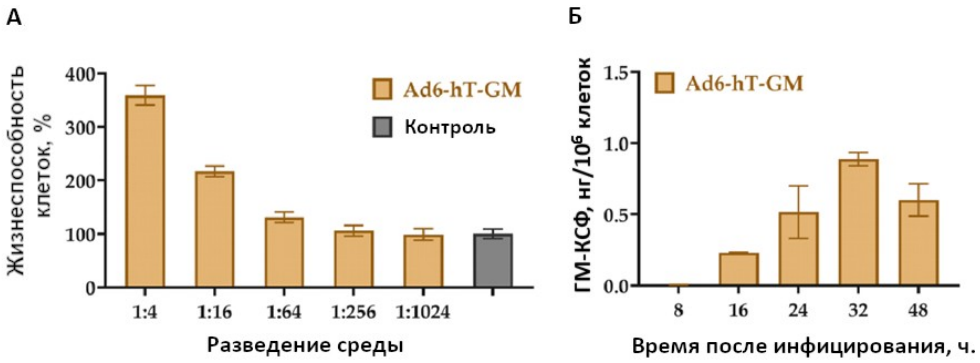

Рисунок 6 – Биологическая активность и уровень ГМ-КСФ в среде клеток, инфицированных Ad6-hT-GM. А – Жизнеспособность клеток TF-1, обработанных супернатантом среды клеток A549, инфицированных Ad6-hT-GM (MOI = 100 вч/клетку). Супернатант собирали спустя 48 часов после инфицирования A549. Супернатант от неинфицированных клеток использовали в качестве контроля. Жизнеспособность клеток TF-1 определяли XTT-тестом спустя 72 ч после добавления супернатанта. Жизнеспособность контрольных клеток принимали за 100%. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 3). Б – Динамика секреции ГМ-КСФ клетками A549, инфицированными Ad6-hT-GM с MOI = 100 вч/клетку. В разных временных точках культуральную среду в лунках обновляли и инкубировали в свежей среде в течение 1 часа. Далее среду собирали и определяли в образцах концентрацию ГМ-КСФ методом ИФА. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 3).

Таким образом, рекомбинантный аденовирус Ad6-hT-GM способен производить функциональный ГМ-КСФ в зараженных клетках.

3.4 Цитотоскическая активность Ad5, Ad6 и Ad6-hT-GM в отношении опухолевых клеток in vitro

Оценивали цитотоксический эффект рекомбинантного вируса Ad6-hT-GM и природных вариантов Ad5 и Ad6 на панели опухолевых клеток человека различного тканевого происхождения: A549 (карцинома легкого), MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы, трижды негативный фенотип) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы, гормонзависимая), U87MG и U251MG (глиобластома) и HepG2 (гепатокарцинома) (рис. 7). Динамика вирусной цитотоксичности оценивалась на тех же клеточных линиях, для этого их инфицировали с MOI 100 вч/клетку, а затем каждые 48 часов оценивали их жизнеспособность относительно жизнеспособности не инфицированных клеток при помощи XTT-теста. Цитотоксическая активность рекомбинанта Ad6-hT-GM была схожей с таковой для вирусов дикого типа.

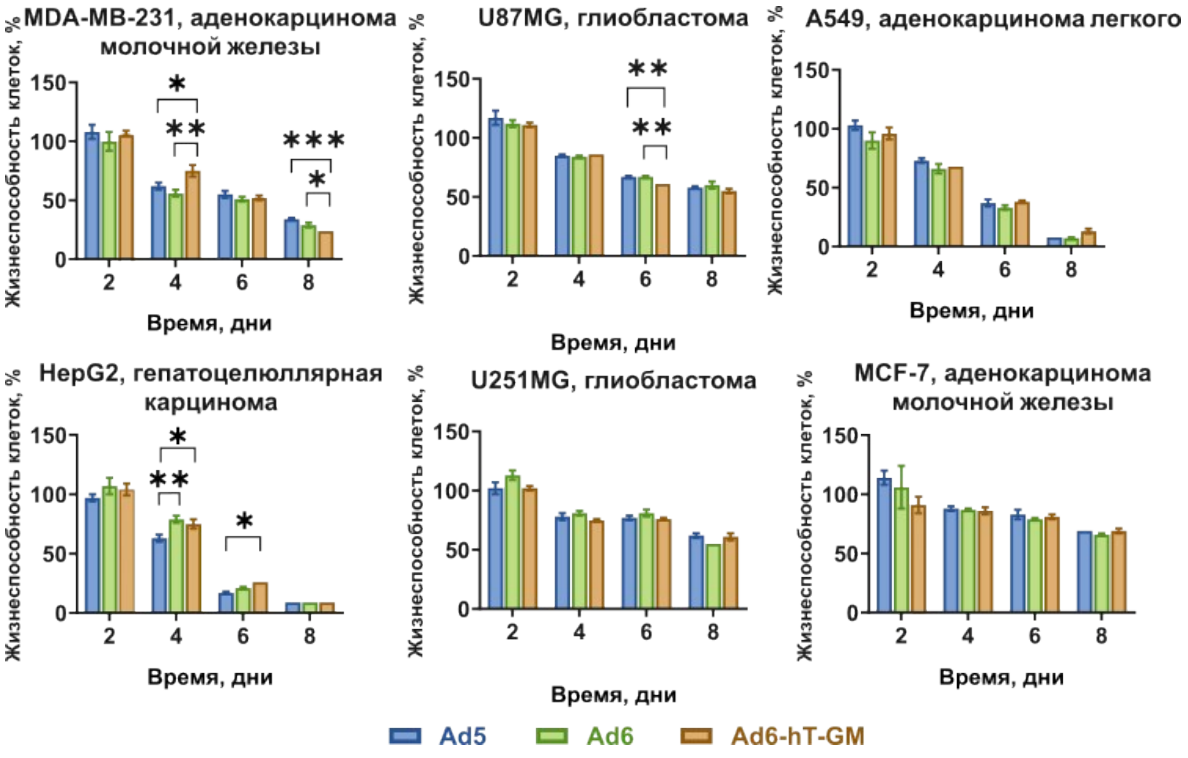

Рисунок 7 – Сравнение цитотоксической активности Ad6-hT-GM, Ad5 и Ad6 на клетках A549, MDA-MB-231, MCF-7, U87MG, U251MG и HepG2 *in vitro*. Жизнеспособность клеток оценивалась методом XTT-теста на 2, 4, 6 и 8 день после

инфицирования с MOI = 100 вч/клетку. Жизнеспособность контрольных клеток принимали за 100%. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 3). Достоверность различий жизнеспособности определяли при помощи дисперсионного анализа с апостериорным попарным тестом Тьюки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.5 Противоопухолевая активность Ad6-hT-GM in vivo

Для определения противоопухолевого потенциала Ad6-hT-GM и влияния опухолеспецифичного промотора и встроенного трансгена на литическую способность рекомбинантного вектора *in vivo*, исследовали активность вируса на мышах с подкожными ксенографтами MDA-MB-231 и U87MG. Иммунодефицитным мышам линии SCID подкожно трансплантировали опухолевые клетки, и когда опухоли достигали размеров 75 ± 15 мм^3, мышей каждой опухолевой модели делили на 3 группы. Затем мыши получали три внутриопухолевых инъекции Ad6-hT-GM, либо вируса дикого типа Ad6 в дозе 1×10^{10} вч/мышь, либо контрольного раствора (PBS) с интервалом в два дня (рис. 8 А, Б).

Отличие размеров опухолей в группе мышей, получавших Ad6-hT-GM, от размеров опухолей мышей контрольной группы было большим, чем отличие размеров опухолей мышей, получавших Ad6, и мышей контрольной группы, в обеих опухолевых моделях. На мышах с ксенографтами MDA-MB-231 достоверный эффект торможения роста опухоли вирусом Ad6-hT-GM был заметен на 10 день от начала лечения, природным Ad6 – на 17. На мышах с U87MG достоверный эффект торможения роста опухоли вирусом Ad6-hT-GM наблюдался с 21 дня, в то время как отличия размеров ксенографтов животных группы Ad6 от контрольной группы были достигнуты только в последний день эксперимента (27 день). Примечательно, что в последний день эксперимента на модели ксенографтов U87MG, степень достоверности отличий от контрольной группы для группы Ad6 была ниже ($p = 0.05$), чем для группы Ad6-hT-GM ($p = 0.007$), но не на модели MDA-MB-231 (рис. 8 В, Г). Хотя эффект торможения роста опухоли в группе мышей, получавших Ad6, был менее выраженным, достоверных отличий между вирусными группами не было.

Также было выявлено, что лечение Ad6-hT-GM достоверно увеличивает выживаемость мышей-опухоленосителей по сравнению с животными контрольной

группы в обеих опухолевых моделях (рис. 8 Д, Е). Выживаемость мышей, получавших Ad6-hT-GM, не отличается достоверно от выживаемости мышей, получавших Ad6.

Исходя из полученных данных возможно утверждать, что Ad6-hT-GM оказывает онкотоксическое действие на клетки опухолей MDA-MB-231 и U87MG и увеличивает выживаемость мышей-опухоленосителей. При этом противоопухолевая активность Ad6-hT-GM мало отличалась от таковой для природного Ad6. Оценить иммуномодулирующее действие рекомбинантного вируса на опухолях, трансплантированных иммунодефицитным мышам, не представляется возможным.

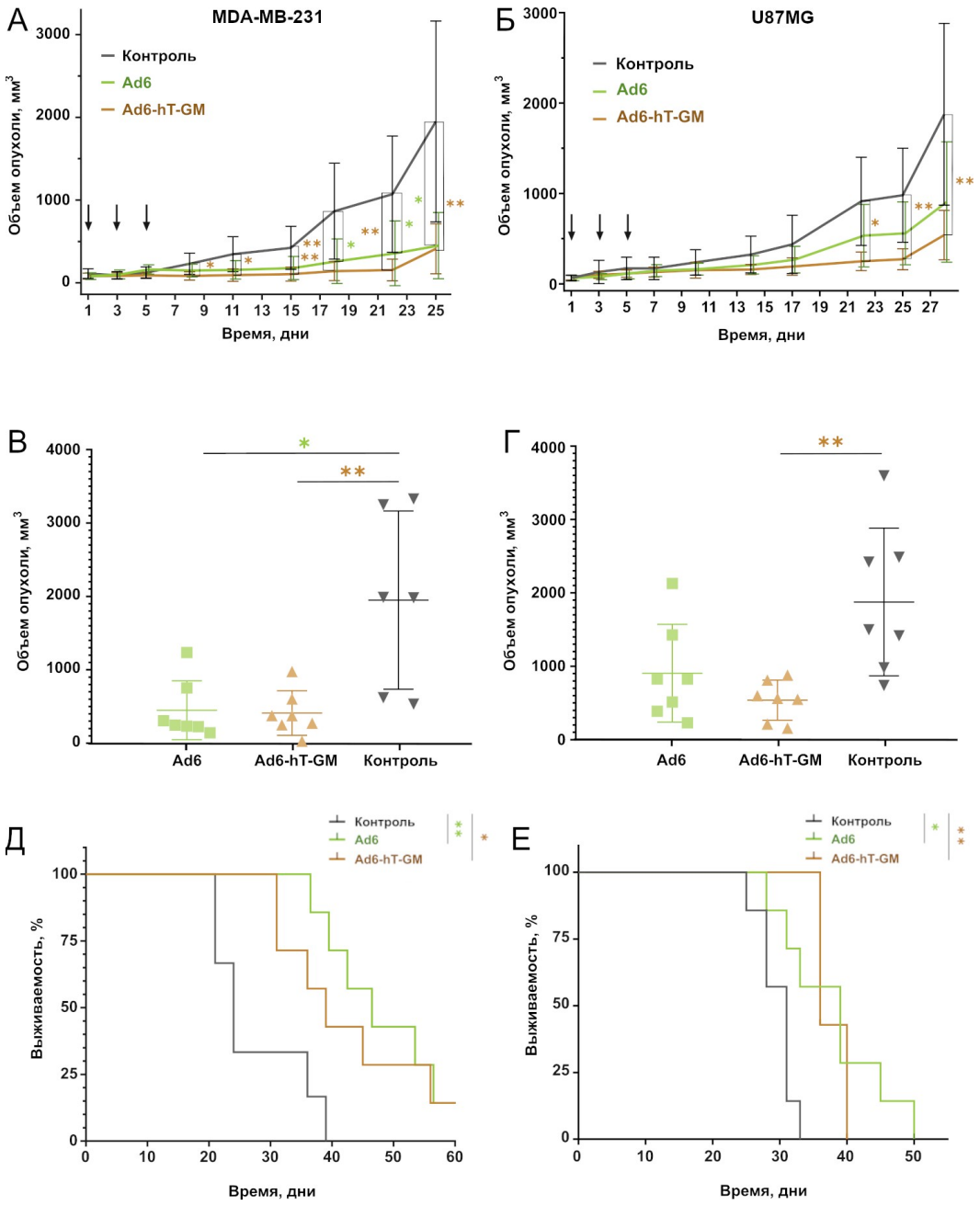

Рисунок 8 – Онколитический потенциал аденовирусов Ad6 и Ad6-hT-GM в отношении опухолей человека, подкожно трансплантированных мышам линии SCID. Животным внутриопухолево вводили вирусные препараты либо контрольный буфер на 0, 2 и 4 дни (обозначены стрелками). Динамика изменения объемов опухолей под действием вирусных препаратов: А – MDA-MB-231; Б – U87MG; (n = 6 - 7). Объемы опухолей в день окончания эксперимента: В – MDA-MB-231; Г – U87MG; Для определения достоверных отличий между группами применялся дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. Анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера для мышей с опухолями: Д – MDA-MB-231; Е – U87MG. Группы сравнивались логранговым критерием. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.6 Биораспределение Ad6-hT-GM и Ad6 при внутриопухолевом введении мышам-опухоленосителям

Ad5 традиционно считается гепатотоксичным в связи с тем, что при попадании в печень захватывается клетками Купфера, что приводит к воспалительной реакции и повреждению здоровых тканей. В то же время в статье Уолд и др. на пермиссивной модели для аденовирусов вида С (в сирийском хомячке) было выявлено, что Ad6 обладает гораздо большей гепатотоксичностью, поскольку способен миновать печеночные макрофаги и попадает в гепатоциты, где реплицируется и вызывает лизис тканей.

После выведения мышей с привитыми опухолями MDA-MB-231 из эксперимента, описанного в предыдущем разделе, отбирали образцы ткани опухоли, печени, легких и селезенки каждой мыши для того, чтобы оценить в них количество копий вирусных геномов (рис. 9). Поскольку введение вирусного препарата осуществлялось внутриопухолево, следует ожидать, что вирус будет обнаруживаться преимущественно в тканях опухоли. При этом стоит отметить, что мыши не являются пермиссивной моделью для человеческих аденовирусов, и по результатам таких исследований вирусная нагрузка может быть заниженной, поскольку не учитывает возможную репликацию вируса в органах. Тем не менее, такая оценка позволяет изучить захват вируса клетками ретикуло-эндотелиальной системы (моноцитарно-макрофагальной) и оценить накопление вирусов в органах и опухоли. Наличие вирусной ДНК в образцах органов определяли при помощи количественной ПЦР с использованием праймеров, специфичных к району Е4 вируса. Вирусная ДНК обнаруживалась во всех анализируемых органах, несмотря на то что вирус вводился внутриопухолево. Тем не менее, количество вирусной ДНК в опухоли было достоверно выше, чем в органах мышей обеих групп, в то время как содержание Ad6 и Ad6-hT-GM в опухолях не отличалось.

Несмотря на то, что внутриопухолевая инъекция аденовирусов более безопасна, чем внутривенная ввиду гепатотоксичности аденовирусов группы С, известно, что при внутриопухолевом введении вирус может выявляться в различных органах, хотя и в значимо меньших количествах по сравнению с опухолью. Можно предположить, что распространение вируса связано с высокой васкуляризацией опухолевой ткани.

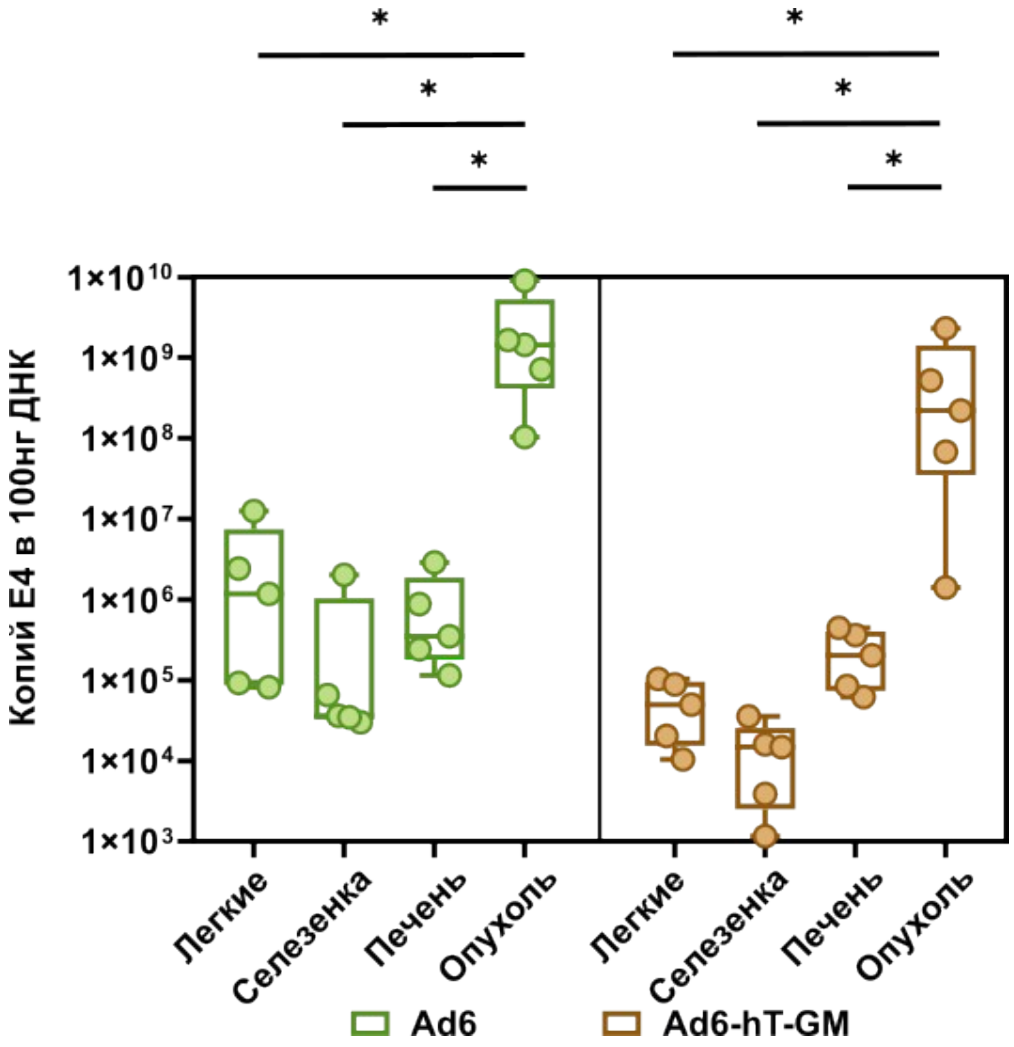

Рисунок 9 – Содержание геномной ДНК аденовирусов Ad6 и Ad6-hT-GM в органах и опухолях мышей с подкожно трансплантированной аденокарциномой MDA-MB-231. Данные представлены в виде ящика с усами с точками (n = 5). Достоверность различий в вирусной нагрузке между органами оценивалось при помощи дисперсионного анализа с апостериорным попарным тестом Тьюки. * $p < 0.01$

Детекция обоих вирусов в органах мышей, которым внутриопухолево вводили препараты, свидетельствует о способности вирусов распространяться системно, несмотря на его локальное введение. Мышиная модель не позволяет полноценно сравнивать безопасность Ad6-hT-GM с безопасностью природного Ad6, поскольку мыши не являются пермессивной моделью для аденовирусов. В то же время, для Ad6-hT-GM была показана сниженная цитотоксичность в отношении здоровых клеток человека и опухолевых клеток без активной теломеразы, а также показана сниженная

репликативная активность в клетках здоровых фибробластов сгиба локтя человека по сравнению с аденовирусом дикого типа. В совокупности со сниженной вирусной нагрузкой в органах мышей по сравнению с вирусной нагрузкой в опухоли, можно предполагать, что Ad6-hT-GM менее токсичен чем Ad6, и при этом обладает схожей с Ad6 противоопухолевой активностью на иммунодефицитных мышах.

Заключение

Аденовирусы являются наиболее часто используемыми векторами для онколитической терапии. Однако большая часть вирусных онколитиков получена на основе серотипа Ad5, обладающего повышенной серопревалентностью, снижающей эффективность онколитического препарата не только при системном, но и при внутриопухолевом введении. По этой причине разработчики противоопухолевых препаратов на основе аденовирусов все чаще обращаются к альтернативным серотипам, и одним из наиболее перспективных является Ad6. Оба серотипа относятся к аденовирусам вида C, но при этом Ad6 обладает заметно сниженной серопревалентностью по сравнению с Ad5. Ранее Ad6 уже предлагался в качестве основы для онколитических препаратов, и его природный вариант демонстрировал высокий онколитический эффект на мышиных моделях с привитыми опухолями молочной железы, яичника, почек и печени человека, однако до сих пор не испытывалась его активность на модели глиобластомы человека.

В рамках настоящей работы было показано, что активность Ad6 в отношении опухолевых клеток человека *in vitro*, а также ксенографтов глиобластомы человека, не уступает активности Ad5, а значит, Ad6 также является перспективной основой для конструирования онколитических рекомбинантов.

Исследователи других групп изучали онколитический эффект природного варианта Ad6, поскольку для этого серотипа отсутствуют стандартные, широко распространенные методы модификации. В рамках представляемой работы был предложен новый, упрощенный способ конструирования онколитического Ad6, основанный на рекомбинации *in vitro*. С применением этого метода был получен рекомбинантный аденовирус Ad6-hT-GM, содержащий встройку

опухолеспецифического промотора гена теломеразы человека hTERT для контроля вирусного гена E1A, ответственного за запуск вирусной репликации, а также встройку гена человеческого ГМ-КСФ вместо исходных нативных аденовирусных генов E3-6.7K и gp19K.

Инфицированные полученным рекомбинантным аденовирусом клетки секретируют человеческий ГМ-КСФ с подтвержденной биологической активностью. Ген данного цитокина ранее был встроен в геном первого одобренного FDA вирусного препарата Имлигик, и потенциально ГМ-КСФ способен усилить противоопухолевые свойства рекомбинантного аденовируса. Полученный в работе рекомбинантный штамм Ad6, как и природный вирус, поражает опухолевые клетки, но при этом обладает сниженной цитотоксичностью в отношении здоровых клеток, а также опухолевых клеток с низкой активностью теломеразы. Известно, что 90% опухолевых клеток обладают повышенной активностью теломеразы, поэтому возможно утверждать, что модифицированный вирус способен селективно уничтожать злокачественные клетки, не затрагивая при этом здоровые.

Ad6-hT-GM также проявил способность тормозить рост трансплантированных иммунодефицитным мышам ксенографтов опухолей человека: аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 и глиобластомы U87MG, и увеличивать выживаемость мышей-опухоленосителей. На иммунодефицитных мышах невозможно оценить вклад ГМ-КСФ в противоопухолевый эффект препарата, однако возможно оценить непосредственную литическую активность вируса. Как и ожидалось, она оказалась сопоставимой с таковой для природного Ad6.

Таким образом, Ad6-hT-GM обладает высокой противоопухолевой активностью в отношении опухолей MDA-MB-231 и U87-MG, подкожно трансплантированных иммунодефицитных мышам. Противоопухолевая активность Ad6-hT-GM достоверно не отличалась от таковой для природного варианта Ad6, но при этом рекомбинантный штамм менее токсичен для здоровых клеток. Также Ad6-hT-GM способен секретировать биологически активный ГМ-КСФ, применяющийся сегодня цитокин для лечения опухолей. В совокупности, полученные данные позволяют рассматривать Ad6-

hT-GM как перспективный штамм для разработки противоопухолевых лекарственных средств.

Выводы

1. Онколитическая активность природного варианта аденовируса серотипа 6 (Ad6) в отношении клеток глиобластомы человека *in vitro*, а также ксенографтов глиобластомы *in vivo*, не уступает таковой для аденовируса серотипа 5 (Ad5), который широко применяется для конструирования онколитических векторов. Ad6 является перпективной основой для разработки рекомбинантных штаммов с противоопухолевой активностью.

2. Разработан способ получения рекомбинантного онколитического штамма Ad6, основанный на сборке *in vitro*. С использованием разработанного способа сконструирован рекомбинантный вирус Ad6-hT-GM, несущий встройку промотора теломеразы человека вместо промотора вирусного гена E1A, а также встройку гена человеческого ГМ-КСФ в район гена E3.

3. Клетки A549, инфицированные Ad6-hT-GM, продуцируют биологически активный ГМ-КСФ человека.

4. Ad6-hT-GM обладает сниженной репликативной активностью и цитотоксичностью в отношении здоровых клеток человека, по сравнению с природным вариантом Ad6, что свидетельствует о его опухолевой селективности, а также о безопасности при применении в качестве противоопухолевого препарата.

5. В экспериментах *in vitro* цитотоксическая активность Ad6-hT-GM в отношении опухолевых клеток человека различного тканевого происхождения не уступает цитотоксической активности природного варианта Ad6. Ad6-hT-GM тормозит рост подкожных ксенографтов аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 и глиобластомы U87MG человека и достоверно увеличивает выживаемость мышей-опухоленосителей по сравнению с контрольной группой.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Romanenko, M.V., Dolgova, E.V., Osipov, I.D., Ritter, G.S., Sizova, M.S., Proskurina, A.S., Efremov, Y.R., Bayborodin, S.I., Potter, E.A., Taranov, O.S., Omigov, V.V., Kochneva, G.V., Grazhdantseva, A.A., Zavyalov, E.L., Razumov, I.A., Netesov, S.V., Bogachev, S.S. Oncolytic effect of adenoviruses serotypes 5 and 6 against U87 glioblastoma

cancer stem cells. Anticancer Research. – 2019. –V.39. #11. DOI: 10.21873/anticanres.13815.

2. Romanenko, M., Osipov, I., Netesov, S. V. & Davydova, J. Adenovirus type 6: Subtle structural distinctions from adenovirus type 5 result in essential differences in properties and perspectives for gene therapy // Pharmaceutics. – 2021. V. 13, T. 10, #1641

3. Ivan D. Osipov, Valeriia A. Vasikhovskaia, Daria S. Zabelina, Sergei S. Kutseikin, Antonina A. Grazhdantseva, Galina V. Kochneva, Julia Davydova, Sergey V. Netesov and Margarita V. Romanenko Development of Oncolytic Vectors Based on Human Adenovirus Type 6 for Cancer Treatment // Viruses. – 2023. V. 15. –P. 182. https://doi.org/10.3390/v15010182

4. Патент на изобретение «Рекомбинантный штамм Ad6-hTERT-GMCSF, содержащий встройку промотора теломеразы человека hTERT, а также гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, обладающий избирательной цитолитической активностью против теломераза-положительных опухолевых клеток и экспрессирующй активный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор». Приоритет №2020134158 от 16.10.2020. Авторы: Осипов И.Д., Сизова М.А., Романенко М.В., Куцейкин С.С., Нетесов С.В. Патент на изобретение 2753742 C1, 24.08.2021. Заявка № 2020134158 от 16.10.2020.