

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.21:578.28: 615.371

А.А. ГРАЖДАНЦЕВА^{1,2}, Г.Ф. СИВОЛОВОВА^{1,2}, А.В. ТКАЧЕВА^{1,2}, И.П. ГИЛЕВА¹, Е.В. КУЛИГИНА²,
В.А. РИХТЕР², Г.В. КОЧНЕВА^{1,2,*}

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, Кольцово, 630559

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090

e-mail: g.v.kochneva@yandex.ru

Высокоэффективная продукция биологически активного секретлируемого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека рекомбинантным вирусом осповакцины

Получен штамм рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-S1/3, содержащий встройку полноразмерной копии ДНК матричной РНК гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) человека в структурной части гена вирусной тимидинкиназы. Экспрессия гена ГМ-КСФ в составе рекомбинантного вируса осуществляется под контролем природного промотора р7.5К вируса осповакцины с образованием секретлируемой зрелой формы белка с молекулярной массой 32 кДа. Биологическую активность ГМ-КСФ оценивали по стимуляции пролиферации цитокин-зависимых клеток эритролейкоза человека *TF-1*. Уровень секреции биологически активного ГМ-КСФ человека в системе рекомбинантный вирус осповакцины — клетки млекопитающих составил 1–40 мкг/мл культуральной среды. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-S1/3 может быть использован в качестве продуцента зрелой гликозилированной формы ГМ-КСФ человека, а также в качестве вектора для конструирования онколитических вирусов и поливалентных вакцинных препаратов.

Ключевые слова: ГМ-КСФ человека, клетки эритролейкоза человека *TF-1*, оценка стимуляции пролиферации клеток ХТТ, рекомбинантный вирус осповакцины, штамм Л-ИВП.

Важным цитокином, вовлеченным в миелопоэз и формирование клеток иммунной системы, является фактор, стимулирующий образование гранулоцитов и макрофагов из плюрипотентных клеток — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор. ГМ-КСФ не только

стимулирует пролиферацию и созревание миелоидных клеток-предшественников, но также усиливает различные функции зрелых эффекторных клеток: повышает способность нейтрофилов, макрофагов и эозинофилов к фагоцитозу и разрушению микроорганизмов [1, 2] и увеличивает антители

Гражданцева Антонина Анатольевна, Сиволобова Галина Филипповна, Ткачева Анастасия Викторовна, Гилева Ирина Павловна, Кулигина Елена Владимировна, Рихтер Владимир Александрович, Кочнева Галина Вадимовна.

Список сокращений: а.к. — аминокислот; БОЕ — бляшкообразующая единица; ВОВ — вирус осповакцины; ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ОП — оптическая плотность; п.н. — пар нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ХТТ — 2,3-бис (2-метокси-4-нитро-5-сульфо-фенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид; BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fhsophat) — 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат; NBT — nitro blue tetrazolium; PMS — феназинметасульфат; TBS — физиологический раствор с трис-буфером.

* Автор для переписки.

лозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток [3]. Показана эффективность использования ГМ-КСФ при химиотерапии для снижения тяжести нейтропении [4].

Ген ГМ-КСФ широко используется в качестве трансгена при конструировании рекомбинантных онколитических вирусов [5]. В частности, ген ГМ-КСФ человека был встроен в геном двух штаммов вируса осповакцины (ВОВ) — WR (JX-963) [6] и Wyeth (JX-594) [7] — в район гена вирусной тимидинкиназы под контролем синтетического ранне-позднего промотора ВОВ [8]. Эти штаммы в настоящее время успешно проходят клинические испытания в качестве противоопухолевых препаратов [7, 9]. Однако оба эти штамма имеют ряд недостатков.

Штамм JX-963 создан на основе нейропатогенного для мышей штамма WR ВОВ, и хотя этот штамм обладает высокой онколитической активностью, он не может рассматриваться в качестве основы безопасного лекарственного препарата из-за высокой вероятности постинъекционных осложнений. В литературе отсутствуют данные по уровню продукции ГМ-КСФ с использованием данного рекомбинантного штамма.

Штамм JX-594 создан на основе штамма Wyeth ВОВ, который не использовался в России в качестве противооспенной вакцины, а уровень продукции ГМ-КСФ под контролем синтетического промотора в составе рекомбинантного штамма JX-594 очень низок — 20—40 пг на 1 мл культуральной среды при инфекции клеток с множественностью 0,1 БОЕ/кл [4]. Кроме гена ГМ-КСФ штамм JX-594 несет в составе генома крупный (свыше 3000 п.н.) фрагмент бактериальной ДНК (ген β -галактозидазы *E. coli*) в непосредственной близости от гена ГМ-КСФ, который может дестабилизировать структуру всего района встройки и экспрессия которого под контролем высокоэффективного промотора ВОВ р7.5К может негативно сказаться на жизнедеятельности клетки.

ВОВ имеет длительную и успешную историю медицинского применения в качестве живой вакцины при искоренении оспы на земном шаре [10]. В разных странах для вакцинации против оспы использовали разные штаммы ВОВ. Одним из штаммов, который применяли в России, является Л-ИВП, биовариант штамма Листер (Lister) [11]. Для предотвращения возможных поствакцинальных осложнений разработан целый ряд аттенуированных вариантов ВОВ с делециями участков генома, ответственных за вирулентность [12]. Ген тимидинкиназы (*tk*) является фактором вирулентности ВОВ, инактивация которого приводит

к существенной аттенуации вируса *in vivo* [13]. Этот район генома широко используется для встройки чужеродных генов (трансгенов) с целью получения бивалентных вакцин (гены протективно значимых белков возбудителей вирусных и бактериальных заболеваний [14]) или онколитических препаратов (гены иммуностимулирующих, цитотоксических и других белков [5]). Рекомбинантные штаммы ВОВ также могут использоваться в качестве продуцентов белков, требующих посттрансляционной модификации [15]. Экспрессию генов таких белков целесообразно проводить под контролем ранне-поздних промоторов ВОВ, которые обеспечивают конститутивный синтез белков на протяжении всего цикла инфекции.

Целью нашей работы было создание универсального рекомбинантного штамма ВОВ на основе российского вакцинного штамма Л-ИВП, эффективно продуцирующего секретлируемую зрелую форму ГМ-КСФ человека и пригодного для конструирования на его основе онколитических вирусов и поливалентных вакцин.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы. В работе использовали комплект реагентов для экстракции вирусной ДНК из лизатов клеток АмплиПрайм ДНК-сорб-В («ИнтерЛабСервис»); набор EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) для очистки плазмидной ДНК; реагент Lipofectamine™ LTX Plus (Invitrogen) для трансфекции ДНК в клетки. Олигонуклеотиды были синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Клетки и вирусы. Клетки почки африканской зеленой мартышки *CV-1*, почки сирийского хомячка *BHK-F* и дефектные по тимидинкиназе клетки остеосаркомы человека *H143TK⁻* выращивали на среде DMEM (Invitrogen). Диплоидные клетки легкого эмбриона человека *ЛЭЧ-240* выращивали на среде F-12 (Invitrogen). Клетки эритролейкоза человека *TF-1* культивировали на среде RPMI (Invitrogen). Во всех случаях в ростовую среду добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). Клетки выращивали в культуральной пластиковой посуде (Greiner) в атмосфере 5% CO₂ при 37°. ВОВ, штамм Л-ИВП, был получен из Государственной коллекции Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Полная нуклеотидная последовательность генома этого штамма депонирована в GenBank под номером KP233807. Вирус аккумулировали, очищали и концентрировали, как описано ранее [13]. Титр вируса определяли

методом бляшек на монослой клеток *CV-1*, окрашенном фиксирующим раствором кристаллического фиолетового (2 г/л кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich), 50 мл/л формальдегида (Carl Roth, Германия), 100 мл/л этанола (Кемеровская фармацевтическая фабрика) в воде). Титр выражали в числе БОЕ в 1 мл суспензии.

Трансфекция клеток *CV-1* плазмидной ДНК и получение рекомбинантного штамма ВОВ. Для проведения трансфекции ДНК плазмиды рXJP5.2-GMCSF была препаративно получена в клетках *E. coli* и выделена из 250 мл среды Лурия—Бертани с использованием набора EndoFree Plasmid Maxi Kit. Трансфекцию проводили на 90%-ном монослое клеток *CV-1*, выращенном в шестилуночных планшетах (CELLSTAR, Greiner). Клетки инфицировали вирусом осповакцины с множественностью 0,05 БОЕ/кл и через 1 ч инкубации при 37° добавляли смесь плазмидной ДНК (5 мкг), липофектамина (20 мкл) и реагента Plus в соответствии с рекомендацией производителя в 1 мл среды Opti-MEM (Invitrogen). Через 1 ч инкубации при 37° в лунки добавляли по 2 мл среды Opti-MEM и инкубировали при 37° в атмосфере 5% CO₂ еще 24—36 ч до развития цитопатического эффекта. Материал трижды замораживали—оттаивали и обрабатывали ультразвуком для получения гомогенной вирусной суспензии. Далее проводили селекцию рекомбинантов путем двукратного пассирования на монослой клеток *H143TK*⁻ с добавлением бромдезоксигуанидина (Sigma) в концентрации 25 мкг/мл среды DMEM. Вирус клонировали методом бляшек под твердым агаровым покрытием и анализировали на наличие вставки гена ГМ-КСФ человека методом ПЦР с использованием праймеров:

TKVVsense: 5'-CGATGTTCTTCGCAGATGAT,

TK2 internal antisense: 5'-TTCTGTGAGCG-TATGGCAAA,

GMCSF antisense: 5'-GGGCTAAAGTTCTC-TGGAGG.

Отобранный рекомбинантный вариант дважды реклонировали, чтобы избавиться от следовых количеств исходного вируса, накапливали на монослой клеток *CV-1* и очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (25—40%). Очищенный рекомбинантный штамм с титром 10⁹ БОЕ/мл хранили в расфасованном виде при -80°. Штамм депонирован в Государственной коллекции Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером V-631.

Оценка продукции ГМ-КСФ человека рекомбинантным штаммом ВОВ. Монослой клеток *CV-1* (90% поверхности), выращенный в культуральном матрасе объемом 650 мл, инфицировали рекомбинантным штаммом ВОВ или исходным штаммом Л-ИВП с множественностью 1 БОЕ/кл и инкубировали 24 ч при 37° в атмосфере 5% CO₂. Затем клетки разрушали лизирующим буфером (50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 5 мМ MgCl₂ (proteases inhibitor cocktail)) в объеме 7 мл, проводили 3 раунда замораживания—оттаивания и трехкратную обработку ультразвуком (20 с при 200—300 Вт с охлаждением в течение 10 с после каждой обработки), центрифугировали при 22000 g 30 мин при 4°; супернатант анализировали с помощью вестерн-блоттинга, используя в качестве первичных антител кроличьи поликлональные антитела (rabbit anti-human GM-CSF polyclonal antibody, PerroTech). В качестве вторичных антител использовали антитела к иммуноглобулину G кролика (anti-rabbit IgG, whole molecule, alkaline phosphatase conjugate, Sigma). Электрофоретическое разделение белков проводили в камере Mini-Protein 3 Cell (BioRad) в 5%-ном концентрирующем и 14%-ном разделяющем акриламидном геле. Перенос белков с геля осуществляли в камере MiniTrans-Blot Cell (BioRad) на мембрану PVDF (размер пор 0,2 мкм) в течение 1 ч 20 мин. Мембрану промывали, блокировали 5%-ным раствором молока (Fluka) и инкубировали с первичными антителами (0,2 мкг/мл TBS, рН 7,4 с 0,1% твина-20 и 5% молока) 16 ч при 4°. Затем проводили связывание с вторичными антителами в рабочем разведении 1:5000 в TBS, рН 7,4, с 0,1% твина-20 и 5% молока в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве субстрата использовали BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) и NBT (NitroBluetetrazolium) (Sigma-Aldrich). Реакцию останавливали промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Анализ биологической активности продукта гена ГМ-КСФ человека, экспрессированного в составе рекомбинантного вируса осповакцины. Биологическую активность ГМ-КСФ человека, секретируемого из клеток *VHK-F* и *ЛЭЧ-240*, инфицированных рекомбинантным ВОВ, оценивали по уровню стимуляции пролиферации клеток эритролейкоза человека *TF-1*. Данный тест основан на способности клеток линии *TF-1* пролиферировать только в присутствии ГМ-КСФ (ГМ-КСФ-зависимость), которую оценивали с помощью микрометода на 96-луночных культуральных планшетах (CELLSTAR, Greiner) с использованием реагента ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфо-

фенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид, Sigma) [16, 17]. Метод использует способность митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый ХТТ в формазан, кристаллизующийся внутри клетки. Перевод формазана в раствор с помощью феназинметасульфата (PMS) (Fluka) и последующая фотометрия позволяли точно соотнести изменение оптической плотности (ОП) раствора с изменением количества жизнеспособных клеток. Мы оценивали стимуляцию пролиферативной активности культуральной среды через 48 ч после заражения клеток рекомбинантным или контрольным (штамм Л-ИВП) ВОВ с множественностью 0,5 БОЕ/кл. Перед использованием культуральную среду осветляли центрифугированием 10 мин при 2800 g. В качестве референсного использовали очищенный и охарактеризованный препарат рекомбинантного ГМ-КСФ, полученного в клетках *E. coli* [18, 19]. Для проведения эксперимента в среде RPMI (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hy Clone™, Южная Америка) готовили 2-кратные разведения культуральной среды, полученной после отделения инфицированных рекомбинантным ВОВ клеток, в диапазоне 1:125—1:40000 или рекомбинантного белка ГМ-КСФ до конечных концентраций 1 нг/мл; 2; 4 и 8 нг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду клеток, инфицированных исходным штаммом ВОВ Л-ИВП. В лунки 96-луночного планшета вносили 50 мкл вышеуказанных разведений или контрольных образцов и добавляли 50 мкл суспензии клеток *TF-1* в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки по $2 \cdot 10^4$ кл/лунку. Планшеты помещали в термостат при температуре 37°, 5%-ном содержании CO₂, влажности 85% и инкубировали 72 ч. После инкубации в каждую тестируемую лунку добавляли смесь 50 мкл реагента ХТТ + PMS; реагент получали добавлением к рабочему раствору с содержанием ХТТ 1 мг/мл 1,25 мМ раствора PMS из расчета на 1 мл ХТТ 20 мкл PMS. Планшет инкубировали еще 4 ч и определяли ОП_{490/620} на планшетном спектрофотометре SpectraCount (Packard). Значение для каждой точки получали в пяти повторностях, определяли среднее и дисперсию для различных концентраций культуральной среды и очищенного рекомбинантного белка ГМ-КСФ, после чего строили гистограмму зависимости ОП от разведения КЖ и концентрации ГМ-КСФ. Стимуляцию пролиферации клеток *TF-1* рассчитывали в процентах от контроля. За 100% принимали количество живых клеток в отрицательном контроле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание рекомбинантного штамма ВОВ

Рекомбинантный штамм ВОВ (VV-GMCSF-S1/3) был получен путем гомологичной рекомбинации между ДНК ВОВ штамма Л-ИВП и плазмидной ДНК рХJP5.2-GMCSF (рис. 1) в цитоплазме клеток *CV-1* [14]. Плаزمида рХJP5.2-GMCSF обеспечивает встройку трансгенов в район гена вирусной тимидинкиназы за счет наличия в ней фрагмента ДНК ВОВ, соответствующего позициям нуклеотидов 80682—81277 генома штамма Л-ИВП (GenBank, Accession KP233807), разделенного на левый (595 п.н., позиции 80682—81277) и правый (933 п.н., позиции 81307—82251) концевые участки с делецией величиной 30 п.н. в центре *tk*-гена. В район делеции был встроено оперон, состоящий из гена ГМ-КСФ человека под контролем природного промотора ВОВ р7.5K (276 п.н.) [20]. Ген ГМ-КСФ представляет собой полноразмерную ДНК-копию (кДНК) матричной РНК ГМ-КСФ человека, выделенную из полученной нами кДНК-библиотеки и соответствующую структуре, депонированной в GenBank (Accession NM_000758.3). В результате двойного кроссинговера по гомологичным участкам плазмидной и вирусной ДНК получают рекомбинантные варианты, которые имеют фенотип ТК⁻ и способны расти в клетках с аналогичным фенотипом (Н143ТК⁻) в присутствии в среде ингибитора репликации ДНК бромдезоксипридина (см. раздел «Условия эксперимента»).

Наличие в геноме рекомбинантных вариантов встройки гена ГМ-КСФ человека подтверждали с помощью метода ПЦР (рис. 2) с использованием трех праймеров (позиции праймеров указаны на рис. 1). Праймер ТКVVsense (см. раздел «Условия эксперимента») расположен на вирусном геноме слева от фланкирующей последовательности плазмиды рХJP5.2-GMCSF и «привязывает» встройку гена ГМ-КСФ непосредственно к вирусной ДНК (см. рис. 1). Праймер ТК2 internal antisense лежит внутри правого фланкирующего фрагмента вирусного генома, который является общим для плазмиды и вирусной ДНК (см. рис. 1). С использованием пары праймеров ТКVVsense Ч ТК2 internal antisense при наличии встройки гена ГМ-КСФ с вирусной ДНК амплифицируется фрагмент 2092 п.н., а при отсутствии встройки — фрагмент 748 п.н. (см. рис. 2, дорожки 2 и 1, соответственно). При использовании пары праймеров ТКVVsense × GMCSF antisense амплификация

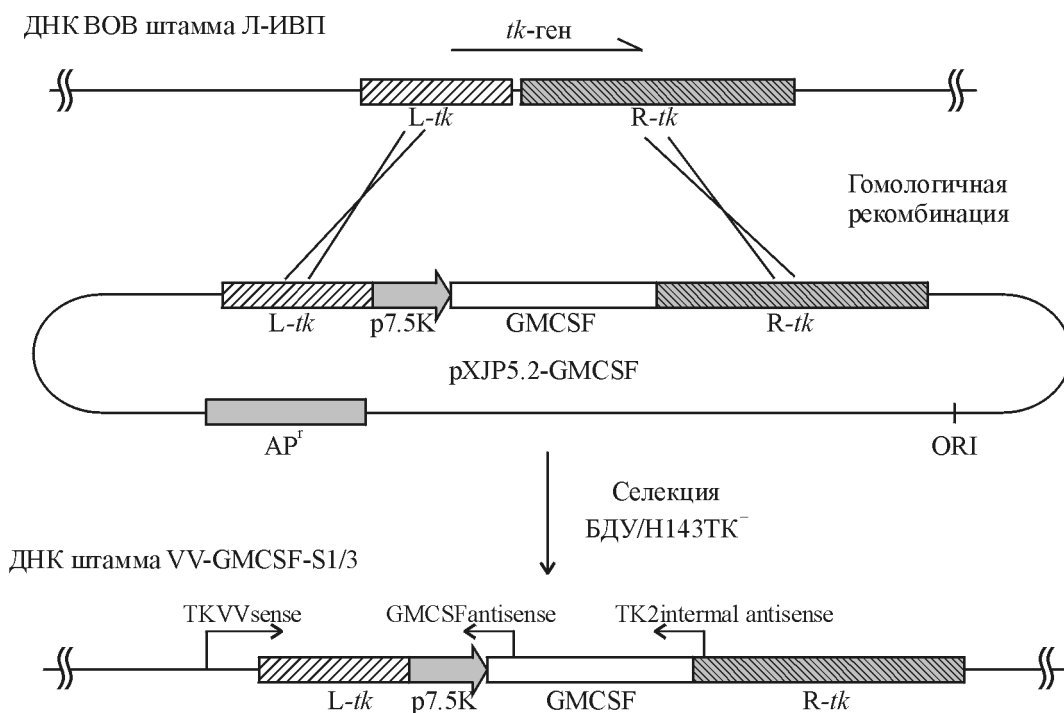


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантного штамма VV-GMCSF-S1/3 путем гомологичной рекомбинации ДНК ВОВ и ДНК плазмиды pXJP5.2-GMCSF, в которой расположены следующие последовательности: *L-tk* — левый фланкирующий участок встройки, включающий 244 п.н. N-концевой части *tk*-гена; *p7.5K* — природный ранне-поздний промотор ВОВ; GMCSF — ДНК-копия матричной РНК ГМ-КСФ человека; *R-tk* — правый фланкирующий участок встройки, включающий 257 п.н. С-концевой части *tk*-гена; *AP^r* — ген устойчивости к ампициллину; *ORI* — область начала репликации. Скрещенные линии указывают участки кроссинговера

происходит только с рекомбинантной вирусной ДНК, поскольку праймер GMCSF antisense лежит внутри гена ГМ-КСФ; при наличии встройки размер амплифицированного фрагмента составляет 1018 п.н., в случае вируса дикого типа — 0 (см. рис. 2, дорожки 4 и 3, соответственно).

Оценка продукции ГМ-КСФ человека рекомбинантным штаммом ВОВ VV-GMCSF-S1/3

ГМ-КСФ человека синтезируется в виде белка-предшественника (144 а.к.) с последующим от-

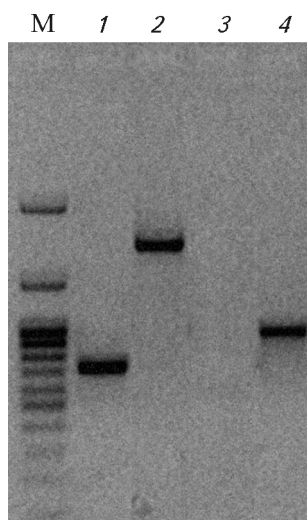


Рис. 2. Подтверждение структуры ДНК рекомбинантного штамма VV-GMCSF-S1/3 методом ПЦР. Электрофоретический анализ в 1%-ной агарозе ПЦР-фрагментов, амплифицированных на вирусной ДНК с использованием двух пар праймеров: дорожки 1, 2 — TKVVsense × TK2 internal antisense; дорожки 3, 4 — TKVVsense × GM-CSF antisense (позиции праймеров указаны на рис. 1); М — маркеры молекулярной массы М28 (НПО «СибЭнзим», Россия, 3000 п.н., 1500, 1000, 900, 800, 700 и 100 п.н.); дорожка 1 — Л-ИВП, фрагмент 748 п.н. (отсутствие встройки гена ГМ-КСФ); дорожка 2 — рекомбиант VV-GMCSF-S1/3, фрагмент 2092 п.н. (наличие встройки гена ГМ-КСФ); дорожка 3 — Л-ИВП, амплификации не происходит, так как последовательность, комплементарная праймеру GM-CSF antisense, отсутствует; дорожка 4 — рекомбиант VV-GMCSF-S1/3, фрагмент 1018 п.н. (наличие встройки гена ГМ-КСФ)

щеплением сигнального пептида (17 а.к.), т.е. зрелый полипептид содержит 127 а.к. (14,4 кДа). Показано существование 16 различных изоформ ГМ-КСФ человека, продуцируемого в клетках эукариот. Эти изоформы, имеющие различный характер гликозилирования, обуславливают гетерогенность природного ГМ-КСФ и разброс значений молекулярной массы от 14,4 до 32 кДа [21].

Экспрессию гена ГМ-КСФ человека подтверждали вестерн-блот-анализом культуральной среды и лизатов клеток *CV-1*, инфицированных рекомбинантным штаммом VV-GMCSF-S1/3 (рис. 3). Как следует из рис. 3, б, ГМ-КСФ выявляется только в культуральной среде и лизатах клеток *CV-1*, инфицированных рекомбинантным штаммом VV-GMCSF-S1/3. В клетках, инфицированных исходным штаммом Л-ИВП, ГМ-КСФ не выявляется. В культуральной среде представлена секретированная форма ГМ-КСФ с большой молекулярной массой вследствие более полного гликозилирования (см. рис. 3, дорожка 1, 25—32 кДа), в отличие от внутриклеточного ГМ-КСФ, выявленного в лизатах клеток, где представлен широкий диапазон изоформ ГМ-КСФ (см. рис. 3, дорожка 3, 18—32 кДа). В качестве положительного контро-

ля использовали негликозилированную форму ГМ-КСФ, полученную в клетках *E. coli* (см. рис. 3, дорожка 5, 14,4 кДа).

Биологическая активность секретируемого рекомбинантного ГМ-КСФ

Биологическую активность зрелой формы рекомбинантного ГМ-КСФ, секретируемой в культуральную среду инфицированных рекомбинантным штаммом ВОВ клеток, оценивали с помощью культуры клеток эритролейкоза человека *TF-1*, которая является ГМ-КСФ-зависимой и пролиферирует только в присутствии ГМ-КСФ и ряда других цитокинов человека. Для количественной оценки в качестве референсного белка использовали рекомбинантный ГМ-КСФ, экспрессированный в системе *E. coli*. Эксперименты проводили в широком диапазоне концентраций калибровочного белка на двух культурах — человека (*ЛЭЧ-240*) и животного (*ВНК-Ф*). На рис. 4 представлены результаты соотношения пролиферативной активности разведений культуральной среды и концентраций прокариотического ГМ-КСФ. Как следует

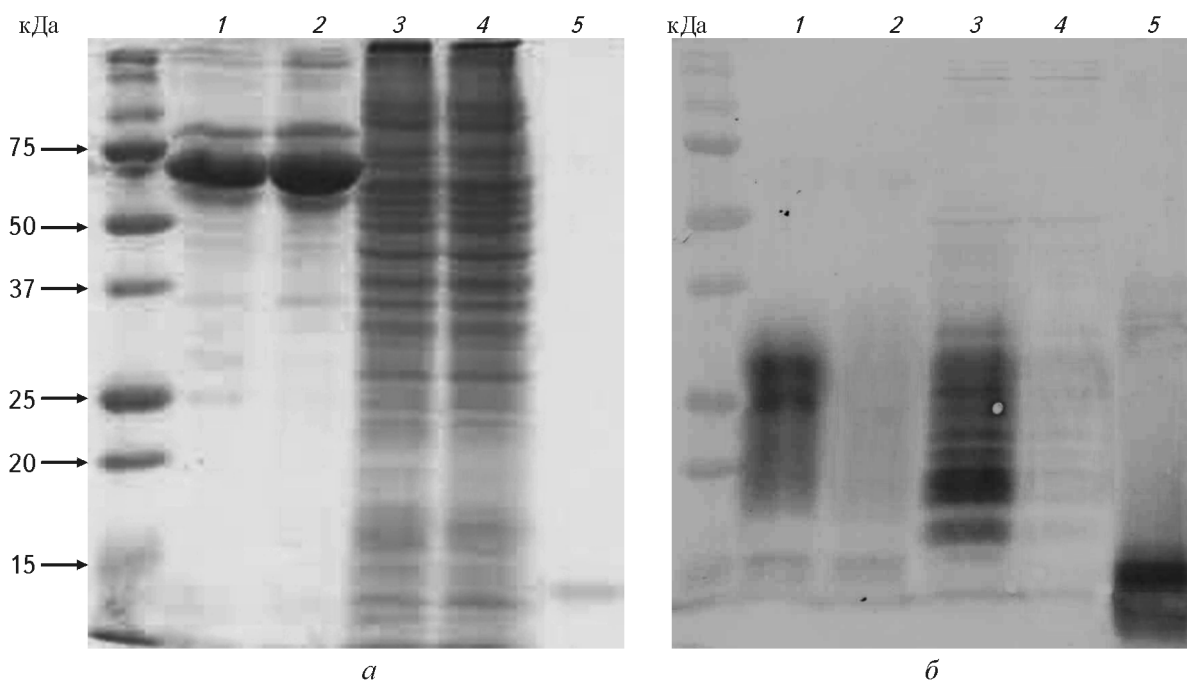


Рис. 3. Анализ экспрессии гена ГМ-КСФ человека в составе рекомбинантного ВОВ VV-GMCSF-S1/3. Электрофоретическая (а) и результаты вестерн-блотинга (б): размер негликозилированного зрелого ГМ-КСФ человека — 14,4 кДа; дорожка 1 — культуральная среда клеток *CV-1*, инфицированных рекомбинантным вирусом VV-GMCSF-S1/3, 48 ч инкубации; 2 — контроль, культуральная среда клеток *CV-1*, инфицированных Л-ИВП, 48 ч инкубации; 3 — лизат клеток *CV-1*, инфицированных рекомбинантным вирусом VV-GMCSF-S1/3, 48 ч инкубации; 4 — контроль, лизат клеток *CV-1*, инфицированных Л-ИВП, 48 ч инкубации; 5 — негликозилированный ГМ-КСФ человека, полученный в клетках *E. coli*; М — контроль молекулярной массы (BioRad, Dual Color, Precision Plus Protein Standards)

из рис. 4, пролиферативная активность культуральной среды зависит от типа клеток, инфицированных VV-GMCSF-S1/3, и может варьировать в широких пределах. Так, при использовании кле-

ток ЛЭЧ-240 2-кратный пролиферативный эффект (200 %) достигается при разведении культуральной среды 1:600, что соответствует концентрации ГМ-КСФ 1,2 мкг/мл по калибровочной кри-

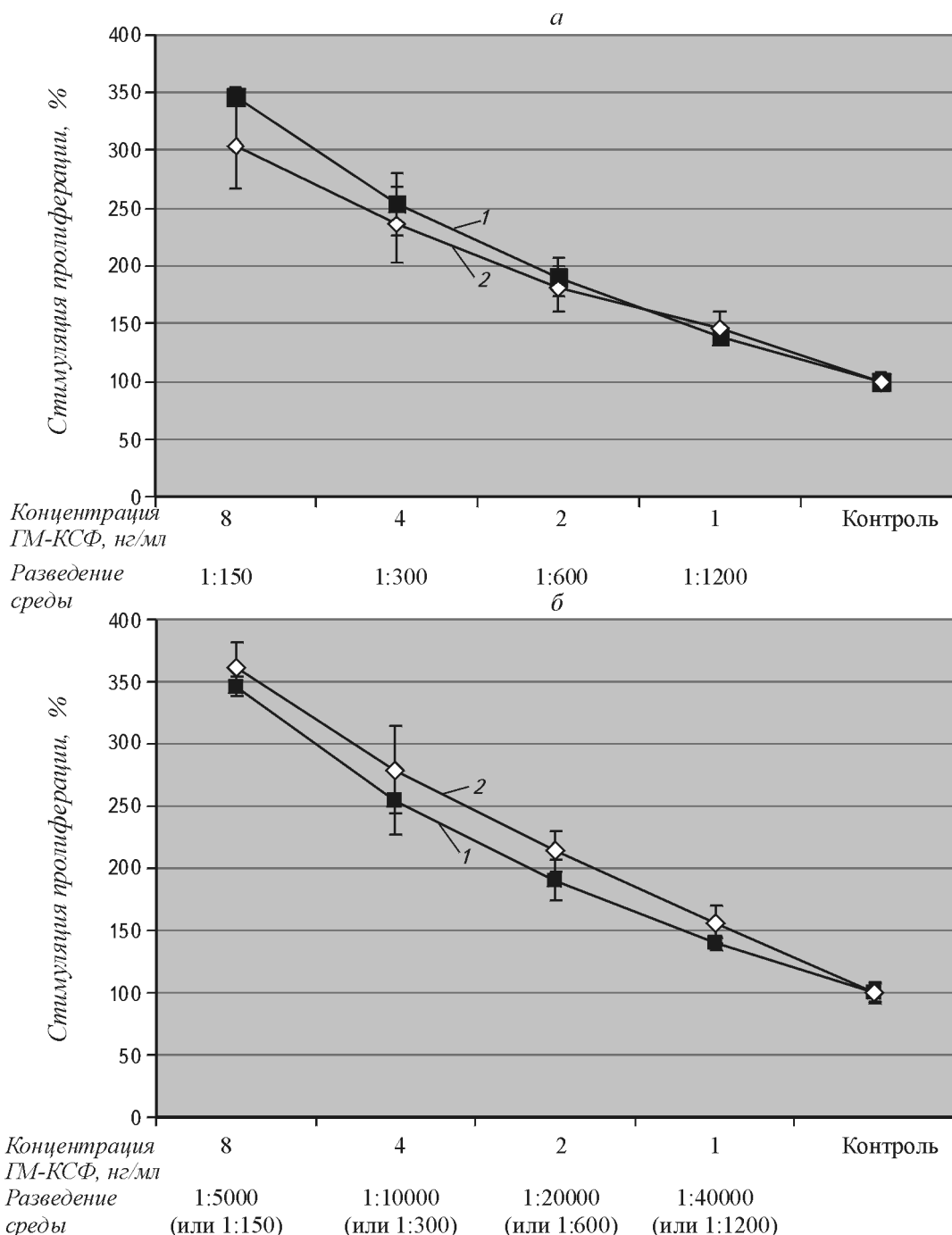


Рис. 4. Анализ биологической активности ГМ-КСФ человека, полученного в результате экспрессии в составе рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-S1/3, на двух культурах клеток: *а* — легкие эмбриона человека (ЛЭЧ-240); *б* — почка однодневного сирийского хомячка (ВНК-*F*) (см. раздел «Условия эксперимента»). За 100% принимали количество живых клеток, выращенных в необработанной среде и при добавлении неразведенной среды культивирования клеток ЛЭЧ-240 или ВНК-*F*, инфицированных вирусом дикого типа Л-ИВП (отрицательный контроль): 1 — концентрация рекомбинантного ГМ-КСФ; 2 — разведение культуральной среды клеток ЛЭЧ-240 (*а*) и ВНК-*F* (*б*), соответственно, инфицированных рекомбинантным вирусом VV-GMCSF-S1/3

вой ($2 \text{ нг/мл} \cdot 600 = 1,2 \text{ мкг/мл}$). При использовании клеток *BHK-F* аналогичный эффект достигается при разведении культуральной среды 1:20000, что соответствует концентрации ГМ-КСФ 40 мкг/мл ($2 \text{ нг/мл} \cdot 20000 = 40 \text{ мкг/мл}$). Важно отметить, что белок в культуральной среде находится в биологически активном состоянии, а его высокая концентрация позволяет рассматривать данную систему экспрессии VV-GMCSF-S1/3—эукариотические клетки (например, *BHK-F*) в качестве перспективного источника зрелой гликозилированной формы ГМ-КСФ человека.

Полученный нами штамм VV-GMCSF-S1/3 как платформа для конструирования противоопухолевых и вакцинных препаратов обладает рядом преимуществ по сравнению с ранее описанными в литературе векторными системами на основе аденовируса [22], герпесвируса [23] и других штаммов ВОВ [7, 24]. Штамм VV-GMCSF-S1/3 создан на базе отечественного штамма Л-ИВП, который хорошо известен российским медикам, что облегчает внедрение в медицинскую практику его дериватов. Этот штамм, как и все штаммы ВОВ, реплицируется в цитоплазме инфицированных клеток в автономных образованиях — вирусных фабриках, не контактирует с клеточным генетическим материалом, не встраивается в хромосомы, не имеет онкогенного потенциала и способен индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [25]. Встройка гена ГМ-КСФ с одновременной инактивацией гена тимидинкиназы обеспечивает дополнительную аттенуацию и иммуногенность вируса. В связи с искоренением натуральной оспы на земном шаре и прекращением с 1980 г. вакцинации с использованием ВОВ [10] большинство людей в настоящее время не имеют антител к вирусам группы оспы, что существенно увеличивает целесообразность и эффективность внедрения улучшенных вариантов ВОВ в качестве противоопухолевых и поливакцинных препаратов.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014—2020 годы», Соглашение № 14.604.21.0057 от 27 июня 2014 г. (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0057).

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Геномика» СО РАН (Институт химической биологии и фундаментальной медицины).

Получено 1.09.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Weisbart, R.H.* Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator / R.H. Weisbart, D.W. Golde, S.C. Clark, G.G. Wong, J.C. Gasson // *Nature*. — 1985. — V. 314. — P. 361—363.
2. *Fleischmann, J.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils / J. Fleischmann, D.W. Golde, R.H. Weisbart, J.C. Gasson // *Blood*. — 1986. — V. 68. — N. 3. — P. 708—711.
3. *Kushner, B.H.* GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma / B.H. Kushner, N.K. Cheung // *Blood*. — 1989. — V. 73. — N. 7. — P. 1936—1941.
4. *Kim, J.H.* Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF / J. H. Kim, J. Y. Oh, B. H. Park, D. E. Lee, J. S. Kim, H. E. Park, M. S. Roh, J. E. Je, J. H. Yoon, S. H. Thorne, D. Kim T. H. Hwang // *Mol. Therapy*. — 2006. — V. 14. — P. 361—370.
5. *Кочнева Г.В.* Онколитические поксвирусы / Г.В. Кочнева, Г.Ф. Сиволобова, К.В. Юдина, И.В. Бабкин, П.М. Чумаков, С.В. Негесов // *Мол. генетика, микробиол. вирусол.* — 2012. — №1. — С. 8—15.
6. *Thorne, S.H.* Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963 / S.H. Thorne, T.H. Hwang, W.E. O'Gorman, D.L. Bartlett, S. Sei, F. Kanji, C. Brown, J. Werier, J. Cho, D. Lee, Y. Wang, J. Bell, D.H. Kim // *J. Clin. Invest.* — 2007. — V. 117. — P. 3350—3358.
7. *Kirn, D.* Oncolytic vaccinia virus cancer therapy // U.S. Patent. №2010/0303714 A1. 2010.
8. *Merchinsky, M.* Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors / M. Merchinsky, D. Eckert, E. Smith, M. Zauderer // *Virology*. — 1997. — V. 238. — P.444—451.
9. *Breitbach, C.* Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans / C.J. Breitbach, J. Burke, D. Jonker, J. Stephenson, A.R. Haas, L.Q. M. Chow, J. Nieva, T. Hwang, A. Moon, R. Patt, A. Pelusio, F. Le Boeuf, J. Burns, L. Evgin, N. De Silva, S. Cvancic, T. Robertson, J. Je, Y. Lee, K. Parato, J. Diallo, A. Fenster, M. Daneshmand, J.C. Bell, D.H. Kim // *Nature*. — 2011. — V. 477. — P. 99—102.
10. КАК ЭТО БЫЛО: программа глобальной ликвидации оспы в воспоминаниях ее участников [Под ред. С.С. Маренниковой]. — Новосибирск: ЦЭРИС, 2011. — С. 276.
11. *Маренникова С.С., Щелкунов С.Н.* Патогенные для человека ортопоксвирусы. — М.: КМК Scientific Press Ltd, 1998. — С.386.
12. *Максютов Р.А.* Разработка современных противооспепных вакцин / Р.А. Максютов, Е. В. Гаврилова, С. Н. Щелкунов // *Вопр. вирусол.* — 2011. — Т. 56. — № 6. — С. 4—8.
13. *Серпинский О.И.* Конструирование рекомбинантных вариантов ортопоксвирусов путем встройки чужеродных генов в межгенный промежуток вирусного генома / О.И.

- Серпинский, Г.В. Кочнева, И.Х. Урманов, Г.Ф. Сиволобова, Е.И. Рябчикова // Мол. биол. — 1996. — Т.30. — С. 1064—1073.
14. *Щелкунов С.Н.* Генетическая инженерия. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. — С. 399.
 15. *Bleckwenn, N.A.* Exploring vaccinia virus as a tool for large-scale recombinant protein expression / N.A. Bleckwenn, W.E. Bentley, J. Shiloach // *Biotechnol. Prog.* — 2003, — V. 19. — С. 130—136.
 16. *Monks, A.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines / A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M.Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd // *J. Nat. Cancer Institute.* — 1991. — V. 83. — N. 11. — P. 757—766.
 17. *Scudiere, D.A.* Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines / D.A. Scudiere, R.H. Shoemaker, K.D. Paul, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D. Seniff, M.R. Boyd // *Cancer Res.* — 1988. — V. 48. — P. 4827—4833.
 18. *Гилева И.П., Бондарь Т.С., Коробко В.Г., Кравченко В.В., Сандахчиев Л.С.* Рекомбинантная плазмидная ДНК р280GM, кодирующая полипептид со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, и штамм *E.coli* SG20050/p280GM — продуцент полипептида со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека // Патент РФ №2091488, С 12 №1/21. 1997.
 19. *Топоркова Л.Б.* Изучение *in vitro* биологических свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора / Л. Б. Топоркова, И. А. Орловская, С. В. Сенников, Л. В. Сахно, Ю. Н. Козлова, Л. Р. Лебедев, И. П. Гилева // *Иммунология.* — 2009. — № 4. — С. 203—205.
 20. *Cochran, M.A.* In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals / M.A. Cochran, C. Puckett, B. Moss // *J. Virol.* — 1985. — V. 54. — N. 1. — P. 30—37.
 21. *Forno, G.* N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line / G. Forno, B.M. Fogolin, M. Oggero, R. Kratje, M. Etcheverrigaray, H.S. Conradt, M. Nimtz // *Eur. J. Biochem.* — 2004. — V. 271. — P. 907—919.
 22. *Cerullo, V.* Oncolytic Adenovirus Coding for Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Induces Antitumoral Immunity in Cancer Patients / V. Cerullo, S. Pesonen, I. Diaconu, S. Escutenaire, P.T. Arstila, M. Ugolini, P. Nokisalmi, M. Raki, L. Laasonen, M. Särkioja, M. Rajacki, L. Kangasniemi, K. Guse, A. Helminen, L. Ahtiainen, A. Ristimäki, A. Räisänen-Sokolowski, E. Haavisto, M. Oksanen, E. Karli, A. Karioja-Kallio, S.L. Holm, M. Kouri, T. Joensuu, A. Kanerva, A. Hemminki // *Cancer Res.* — 2010. — V. 70. — P. 4297—4309.
 23. *Manservigi, R.* HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy / R.Manservigi, R. Argnani, P. Marconi // *The Open Virol. J.* — 2010. — V. 4. — P.123—156.
 24. *Marchesi, V.* Immunotherapy: Oncolytic vaccinia virus shows promise in liver cancer // *Nature Reviews Clinical Oncology.* — 2013. — V. 10. — P. 182—195.
 25. *Damon, I.* Poxviridae: Fields Virology. 5th ed. [Eds. D.M. Knipe, P.M. Howley]. —Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. — P. 2948—2974.
- A.A. GRAZHDANTSEVA^{1,2}, G.F. SIVOLOBOVA^{1,2},
A.V. TKACHEVA^{1,2}, I.P. GILEVA¹, E.V. KULIGINA²,
V.A. RIKHTER², and G.V. KOCHNEVA^{1,2,*}
- ¹The State Research Center for Virology and Biotechnology *Vektor*, 630559, Novosibirskaya oblast, Kol'tsovo Russia
- ²The Institute for Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russ. Acad. Sci., Siberian branch, 630090, Novosibirsk Russia
- e-mail:* g.v.kochneva@yandex.ru

High-Effective Production of Biologically Active Secreted Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor by Recombinant Vaccinia Virus

A recombinant vaccinia virus strain VV-GMCSF-S1/3 that contains an insertion of a full-length DNA copy of messenger RNA of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the structural part of the viral thymidine kinase gene has been obtained. The expression of the GM-CSF gene as a part of the recombinant virus is under the control of the native vaccinia virus promoter p7.5K and results in the production of the mature form of the secreted protein with a molecular mass of 32 kDa. The biological activity of the GM-CSF was evaluated from the stimulation of the cytokine-dependent human erythroleukemia TF-1 cell proliferation. The level of the secretion of the biologically active human GM-CSF in the recombinant vaccinia virus/ mammalian cells system was 1—40 µg/ml of culture medium. The recombinant strain of VV-GMCSF-S1/3 can be used as a producer of the glycosylated mature form of human GM-CSF, as well as a vector for the construction of oncolytic viruses and multivalent vaccine preparations.

Key words: cell proliferation assay XTT, human erythroleukemia TF-1 cells, GM-CSF, recombinant vaccinia virus, strain L-IVP.

* Author for correspondence.