

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ  
АСПЕКТЫ ВИРУСОЛОГИИ

УДК 577.21;575.113.082.261:579.23

БАКУЛОВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ  
БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2011 г. С. Н. Белжеларская

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию и принята к печати 15.07.2010 г.

Векторы на основе бакуловирусов широко используются для получения гетерологичных белков в культурах клеток насекомых и млекопитающих. Современные бакуловирусные системы позволяют экспрессировать в одной инфицированной клетке насекомого одновременно несколько генов и получать мультимерные белки, функционально близкие природному аналогу. Рекombинантные вирусы, содержащие промоторы, активные в клетках млекопитающих, используются для доставки и экспрессии генов в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo*. Дальнейшее совершенствование системы на основе бакуловирусов для использования в клетках-мишенях разного типа может открыть дополнительные возможности применения этой экспрессионной системы. В обзоре рассматривается применение модифицированных бакуловирусов для экспрессии рекомбинантных белков в клетках эукариот, преимущества и недостатки системы экспрессии на их основе и обсуждаются возможности их совершенствования.

**Ключевые слова:** эукариотические системы экспрессии, бакуловирусы, клетки насекомых, клетки млекопитающих, рекомбинантные белки, вирусоподобные частицы, посттрансляционные модификации.

**BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEMS FOR RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION IN INSECT AND MAMMALIAN CELLS**, by S. N. Beljelarskaya (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: belj@eimb.ru). The baculovirus vector systems has been extensively used for the expression of foreign gene products in insect and mammalian cells. New advances increase the possibilities and applications of the baculovirus expression system, which has the capability to express multiple genes simultaneously within a single infected insect cells and to use recombinant virus with mammalian cell-active expression cassettes to permit expression of recombinant proteins in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Future investigations of the baculovirus expression system designed for specific target cells, can open wide variety of applications. This review summarizes the recent achievements in applications the baculovirus vector systems and optimization recombinant protein expression in both insect and mammalian cell lines.

**Keywords:** expression systems of eukaryote, baculoviruses, insect cells, mammalian cells, recombinant proteins, virus-like particles, post-translation modifications.

ВВЕДЕНИЕ

Векторы для переноса чужеродных ДНК в клетки млекопитающих и эукариотические системы экспрессии, основанные на их использовании и обеспечивающие эффективную продукцию биологически активных белков *in vitro* и *in vivo*, постоянно совершенствуются. Известны разные методы введения чужеродных генов в клетки эукариот — при помощи физико-химических способов доставки (электропорации, бомбардировки микрочастицами золота или вольфрама и т.д.) или при помощи различных вариантов биологической доставки (липидных конъюгатов — липосом, рекомбинантных вирусов и т.д.). В течение последних двух десятилетий предложено большое число вариантов векторов на

основе различных вирусов как средства доставки чужеродных генов в клетки-мишени. С помощью вирусов — естественных переносчиков чужеродной ДНК в клетки млекопитающих — генетический материал проникает в клетки-мишени, при этом уровень трансфекции клеток *in vitro* и *in vivo*, а также экспрессии внесенных генов высок.

Экспрессирующие векторы на основе бакуловирусов позволяют синтезировать полноценные эукариотические белки в культивируемых клетках насекомых с таким выходом, уровень которого пока не достигнут ни в одной другой эукариотической системе гетерологичной экспрессии генов. Способность бакуловируса насекомых передавать генетическую информацию клеткам млекопитающих позволяет использовать векторы на его основе в

\* Эл. почта: belj@eimb.ru

качестве экспрессирующих векторов для клеток млекопитающих. Так как бакуловirus, передавая информацию клеткам млекопитающих, сам не реплицируется, то векторы на его основе удобны и безопасны *in vitro* и *in vivo*. Высокая емкость бакуловirusных векторов и биологическая безопасность определяют интерес к этой системе и к ее совершенствованию. Экспрессионная система на основе бакуловirusов, позволяющая эффективно продуцировать полноценные эукариотические белки в широком спектре клеток млекопитающих *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, может рассматриваться как перспективная альтернатива векторам на основе вирусов человека. В настоящем обзоре рассмотрены особенности бакуловirusов и систем экспрессии на их основе.

### ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ ПЕРЕНОСА И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ

Векторы на основе вирусов млекопитающих, которые обеспечивают эффективное проникновение генов в клетки-мишени, удобны в качестве естественных векторов для переноса чужеродной ДНК в клетки эукариот. При выборе оптимальной системы важны такие критерии, как простота методологии применения, сила промоторов и возможность их регуляции во времени, скорость получения значительных количеств активных эукариотических белков и т.д. В зависимости от специфики решаемой проблемы предпочтение отдается тому или иному вектору.

К сожалению, все известные *in vitro* и *in vivo* векторные системы доставки репортерных генов далеки от совершенства, хотя проблемы доставки экзогенных ДНК *in vitro*, в основном, решены. Системы же переноса чужеродных генов в клетки-мишени млекопитающих *in vivo* продолжают совершенствоваться. Например, такие характеристики векторных систем, как стабильность их в интегрированном состоянии, регулируемая экспрессия, безопасность использования, все еще нуждаются в доработке. В идеале важно достичь не только устойчивости введенного гена, но и эффективной экспрессии в течение длительного времени.

При решении задач, связанных с совершенствованием систем эффективного переноса и экспрессии трансгенов в клетках эукариот *in vitro* и *in vivo*, в основном, используют различные векторы на основе вирусов человека. Применяются векторы на основе ретровirusов, аденоvirusов, аденоассоциированных virusов, virusа герпеса, лентивirusов, бакуловirusов. Каждая система на их основе имеет свои преимущества и недостатки.

Однако наиболее удобной представляется экспрессионная система на основе бакуловirusных векторов, ее преимущества очевидны. Можно указать на то, что размеры внедренных трансгенов могут достигать 100 т.п.н., а уровень их экспрессии и синтеза рекомбинантных белков высок. Вектор может одновременно экспрессировать несколько генов, включая несплайсированные. Вirus не реплицируется в клетках млекопитающих, и это облегчает его использование в качестве вектора для доставки репортерных генов в клетки млекопитающих как *in vitro*, так и *in vivo*. С его помощью можно осуществлять прямое адресное клонирование при временной и стабильной трансдукции клеток млекопитающих. Можно трансдуцировать первичные клетки разного типа – при широком спектре клеточной специфичности. Бакуловirus может инфицировать неделящиеся клетки, нецитотоксичен, не инфекционен для человека. Это тем более удобно потому, что врожденный иммунитет к большинству virusов человека ограничивает применение векторов на их основе. И бакуловirusы предлагают путь к преодолению этой проблемы, а именно – создание рекомбинантных virusов не человеческого происхождения в качестве векторов для переноса генов. Врожденной гуморальной и клеточной иммунной памяти у человека по отношению к бакуловirusам нет, поскольку они инфекционны только для насекомых.

К недостаткам этой системы можно отнести то, что посттрансляционные модификации белков в клетках насекомых в отдельных случаях неадекватны модификациям в клетках человека, и то, что чувствительность бакуловirusа к действию системы комплемента при доставке чужеродных генов в клетки и ткани млекопитающих *in vivo* достаточно велика. Тем не менее, на сегодняшний день бакуловirusная векторная система успешно применяется для доставки генетической информации в клетки эукариот *in vitro* и ее использование для доставки генов *in vivo* продолжает расширяться. Векторы на основе бакуловirusов находят все большее применение в фундаментальной и прикладной биологии, в биомедицине, для разработок, направленных на создание методов диагностики, вакцинации и генотерапии.

### БАКУЛОВИРУСЫ

#### *Биология бакуловirusов*

Что собой представляют бакуловirusы (сем. Baculoviridae)? Сведения о них обнаружены еще в материалах XVI века, в которых сообщалось о “вялой болезни” гусениц шелкопряда, вызванной, как сейчас очевидно, бакуловirusом. Бакуловirusы патоген-



**Рис. 1.** Схема жизненного цикла бакуловируса. Заражая растения, вирус вместе с пищей попадает в кишечник гусениц, затем путем эндоцитоза попадает в клетки кишечника, где вирусная ДНК, избавляясь от капсида, проникает в клеточное ядро, в котором происходит репликация и транскрипция ДНК вируса и формирование нуклеокапсида. От плазматической мембраны инфицированных клеток отпочковываются частицы внеклеточной промежуточной формы вируса – отдельные вирионы. На заключительной фазе инфекции отдельные вирионы упаковываются в белковые тельца включения-полиэдры, в которых вирионы эффективно сохраняются в окружающей среде.

ны для членистоногих, особенно для насекомых, инфицируя более 30 их видов. Из бакуловирусов наиболее хорошо изучены вирусы ядерного полиэдроза (nucleopolyhedrovirus, NPV), в частности, вирус множественного ядерного полиэдроза калифорнийской совки *Autographa californica* (AcMNPV).

Этот вирус представляет собой стержневидный нуклеокапсид с параметрами  $(35-40) \times (200-400)$  нм, окруженный липопротеидной оболочкой. Он содержит двухцепочечную кольцевую ДНК (134 т.п.н.), в составе которой имеется 154 открытых рамок считывания (ORF). ДНК окружена коровым белком р39 и основным оболочечным белком гр64. Полная последовательность геномной ДНК известна [1]. Репликация и транскрипция вирусного генома происходят в ядре клетки-хозяина. Там же ДНК упаковывается в палочковидный нуклеокапсид [2, 3]. В ходе инфекционного процесса образуются две формы вируса, два разных типа вирусных частиц. Сначала образуются отдельные вирионы BV (Budded Virions), которые используются при горизонтальном распространении инфекции в клеточной популяции. В заключительной фазе инфекции отдельные вирионы взаимодействуют с образованием белковых телец включения ODV (Occlusion Derived Virions), имеющих размеры от 2 до 15 мкм [4, 5] и состоящих из множества вирионов – нуклеокапсидов,

окруженных мембраной. Схема жизненного цикла бакуловируса представлена на рис. 1.

### Молекулярная биология бакуловирусов

Бакуловирусы имеют уникальный двуфазный инфекционный цикл. Первая фаза – литическая, она более инфекционна и характеризуется образованием нуклеокапсидов. Во второй фазе – “оключионной” – образуются полиэдры, основным компонентом которых является белок полиэдрин [6]. После попадания внутрь зараженной клетки вирусной ДНК с нее считываются четыре поколения мРНК и синтезируются четыре поколения вирусных белков. Каждое предыдущее поколение содержит белки-активаторы считывания следующего. Основной стратегией регуляции этих процессов является считывание множественных перекрывающихся РНК в течение четырех различных временных фаз [7, 8]. На самой ранней (immediate early) фазе экспрессируются гены, участвующие в инициации репликации вирусной ДНК, гены вирусных активаторов и гены, которым не требуются вирусные активаторы для транскрипции. Среди них – гены белков IE1, IEN(IE2) и IEO. Средняя (delayed early) фаза характеризуется экспрессией генов, кодирующих белки, которые участвуют в репликации

вирусного генома. На этой стадии вирусные белки IEO, IE1, PE38 регулируют транскрипцию генов, необходимых для репликации вирусной ДНК. На ранней и средней стадиях синтезируются белки, необходимые в начале инфекции. Поздняя (late) фаза — завершение репликации клеточной ДНК, происходит транскрипция генов, кодирующих структурные белки вируса, при участии вирусной РНК-полимеразы и РНК-полимеразы хозяина, образующие нуклеокапсиды. На завершающей (very late) фазе транскрибируются гены полиэдрина и белка P10.

Для транскрипции своих генов бакуловирусы используют транскрипционный аппарат и РНК-полимеразу II клетки-хозяина, но с участием собственных энхансеров (hrs) и транскрипционных активаторов IEO, IE1, PE38. Очевидно, РНК-полимераза II клетки-хозяина транскрибирует ранние гены вируса. Возможно, как и в случае других вирусов, при репликации бакуловирусного генома, происходящей в ядре клетки, участвуют и вирусные белки и белки клетки-хозяина. Механизм репродукции бакуловирусов, в частности, механизм репликации их генома в инфицированных клетках, а также общая схема репликации ДНК этих вирусов изучены пока далеко недостаточно [8–10].

Основные белки четвертого позднего поколения — полиэдрин (от 24 до 29 кДа в разных штаммах вируса) и p10 (10 кДа) — образуются в больших количествах, составляя 25–50% общего клеточного белка. Оба белка, участвуя в образовании полиэдров, не существенны для репликации вируса. В генах полиэдрина и белка p10 имеются сильные промоторы, обеспечивающие синтез большого количества вирусных белков на поздних стадиях инфекции. Промоторы этих белков регулируются пятью регуляторными элементами, равномерно распределенными по вирусной ДНК. Среди поздних белков, кроме полиэдрина и p10, есть еще два, несущественных для репликации, — протамин-подобный белок p6.9, образующий кор нуклеокапсида, и основной капсидный белок p39. И именно на этом этапе под контроль промоторов генов поздних белков могут быть вставлены последовательности чужеродных генов. Этот этап лежит в основе конструирования бакуловирусных экспрессирующих векторов.

### БАКУЛОВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ (БЭС) РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ

#### *Системы экспрессирующих векторов на основе бакуловирусов*

Бакуловирусную систему экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых начали интенсивно изучать и использовать после того, как в на-

чале 1980-х годов появились первые сообщения об их применении для экспрессии чужеродных белков в клетках *Spodoptera frugiperda* [11–15]. Рекомбинантный вирус использовали для заражения их природных хозяев-клеток насекомых. В ходе инфекции рекомбинантный бакуловирус реплицируется, а введенные чужеродные гены экспрессируются. Сильный промотор полиэдринового гена вируса инициирует транскрипцию кодирующей последовательности с высокой частотой, обеспечивая высокий выход белка. Поскольку цикл развития вируса не зависит от наличия полиэдринового гена, то замена его на ген чужеродного белка в составе рекомбинантного бакуловируса приводит к синтезу в культуре клеток насекомого большого количества гетерологичного белка с посттрансляционными модификациями, близкими или идентичными тем, которые осуществляются в клетках млекопитающих. Исходную методику получения рекомбинантных бакуловирусов модифицировали и улучшали. В первых исследованиях рекомбинантные вирусы распознавали визуально, отбирая вирусные бляшки с полиэдрин-негативным фенотипом, которые обычно составляют 0.1–1.0%. Этот процесс трудоемок и малоэффективен. Далее, на клетках насекомых были разработаны следующие технологии. В первой из них используют гомологичную рекомбинацию между транспортным вектором, содержащим репортерный ген, и полиэдриновым локусом вирусной ДНК, что приводит к образованию рекомбинантного вируса; во второй используют сайт-специфическую рекомбинацию; и в третьей — сайт-специфическую транспозицию.

Для возможности осуществления гомологичной рекомбинации векторные ДНК должны содержать участок вирусной ДНК протяженностью до 7 т.п.н., а также промотор, 5'-лидерную последовательность мРНК одного из генов бакуловируса, инициирующий кодон и все регуляторные элементы, необходимые для функционирования экспрессирующего вектора. Этот метод встраивания чужеродных генов в геном бакуловируса с помощью гомологичной рекомбинации между транспортным вектором, содержащим последовательность целевого гена, которая замещает ген полиэдрина, и вирусной ДНК первыми опубликовали и запатентовали Смит (Smith) и Саммерс (Summers) [16–19]. Рекомбинантный вирус распознавали только визуально под микроскопом — по отсутствию полиэдров в вирусных бляшках. Частота рекомбинации при использовании этого метода составляла не более 2%. Эффективность рекомбинации затем удалось повысить. Вначале линейаризовали кольцевую вирусную ДНК (для ограничения инфицирующей способности вирусного генома), затем вводили ген *lac Z E. coli*

в вирусный геном, а затем добавляли уникальный сайт рестрикции Bsu361 в ORF603 полиэдринового локуса. Частота рекомбинации действительно повышалась — примерно до 30%, однако при этом необходимо было проводить несколько раундов очистки рекомбинантного вируса от родительского-дикого с помощью метода “plaque assay” [20, 21].

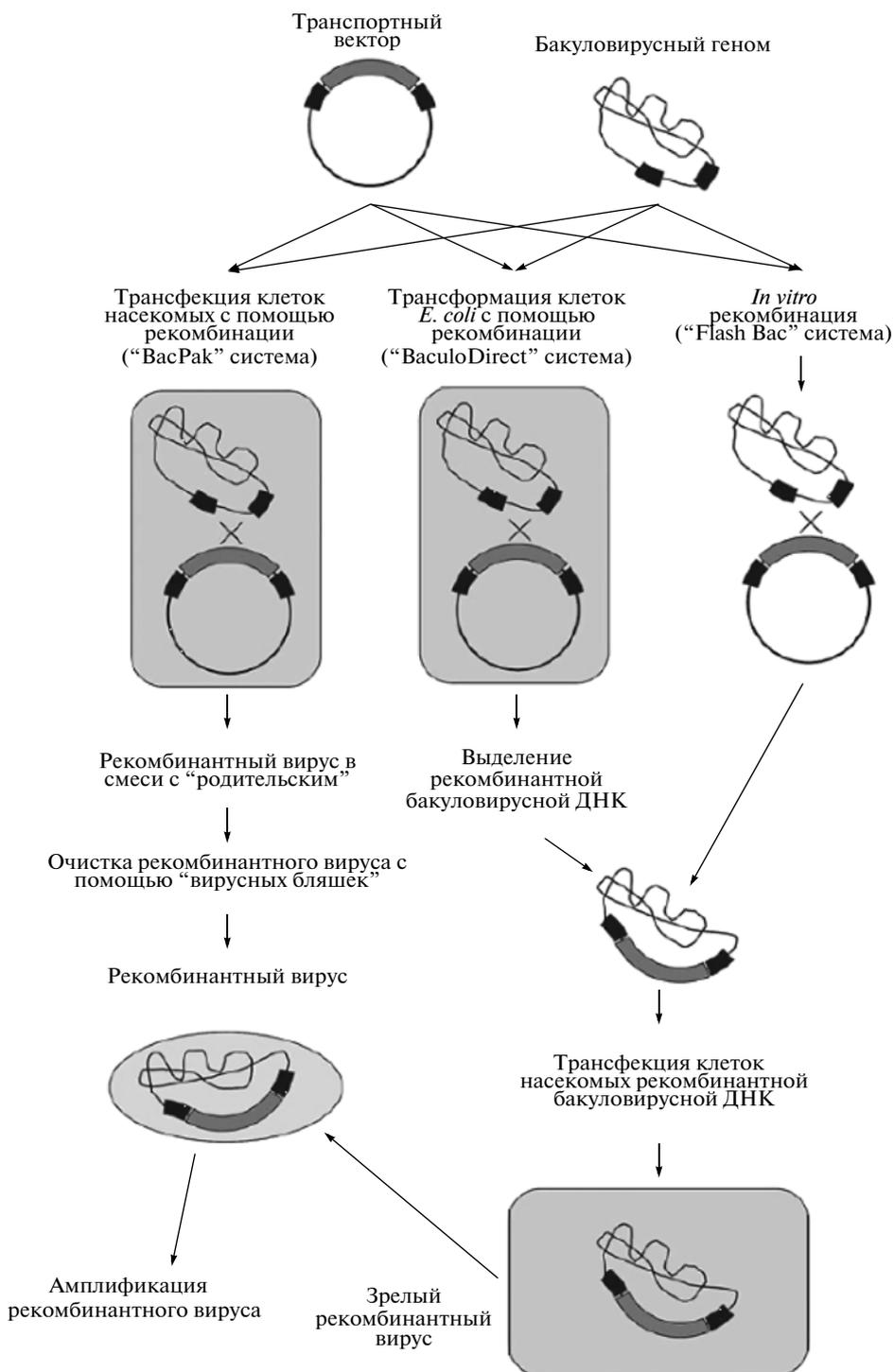
Следующий шаг в усовершенствовании методов получения рекомбинантных бакуловирусов с использованием системы гомологичной рекомбинации — разработка новой технологии, “flash VAC system”, которая позволяет избежать стадии очистки “plaque assay”. Это сокращает время получения рекомбинантного вируса с высоким титром. В этой системе экспрессии вирусная ДНК содержит делеции в гене ORF1629, необходимом для репликации бакуловируса. Они инактивируют вирус, что препятствует его репликации в клетках насекомых, но в то же время вирусная ДНК содержит бактериальную искусственную хромосому (bacterial artificial chromosome, VAC) в полиэдриновом локусе вместо гена полиэдрина. Это позволяет вирусной ДНК размножаться в клетках *E. coli* в виде кольцевой формы. В результате гомологичной рекомбинации между модифицированной вирусной ДНК и векторной ДНК, содержащей целевой ген, восстанавливается функция гена, необходимого для репликации бакуловируса, и удаляется последовательность VAC. Рекомбинантный бакуловирус реплицируется, образуя генетически гомогенный вирус. Описанная система позволяет работать с любыми бакуловирусными векторами, пригодными для гомологичной рекомбинации, повышает выход секретируемых белков и белков, связанных с мембранами [22, 23].

Новой технологией является система гомологичной рекомбинации на основе сайт-специфической рекомбинации. Она представляет собой комбинацию системы “GateWay”, в которой используется свойство бактериофага  $\lambda$  интегрироваться в хромосому *E. coli*, с помощью сайт-специфической рекомбинации *in vitro*, с системой “VaculoDirect”. Целевой ген клонируют в векторе “entry clone” между двумя сайтами рекомбинации attL1 и attL2. Донорная линейная ДНК содержит эти сайты в полиэдриновом локусе. В результате LR-рекомбинации образуется рекомбинантная бакуловирусная ДНК с клонируемым целевым геном в полиэдриновом локусе. Использование линейной ДНК снижает шанс образования нерекомбинантного вируса, в результате чего образуется чистый рекомбинантный вирус без примеси родительского вируса дикого типа (рис. 2) [24, 25].

И, наконец, широкое распространение получила еще одна система, которая позволяет осуществлять все генно-инженерные манипуляции по созда-

нию рекомбинантного экспрессирующего вектора в клетках *E. coli* с использованием метода, основанного на сайт-специфической транспозиции репортерного гена и последующей трансфекции клеток насекомых. Система получила название “Vac-to-Vac”. Этот метод основан на перемещении целевого гена, заключенного между элементами Tn7L и Tn7R транспозона Tn7, из донорной плазмиды в плазмиду-мишень (бакмиду) по сайтам *mini-att-Tn7*. Транспозиция происходит с участием плазмиды-помощника, несущей ген транспозазы *tns-A-E*. Бакмида содержит бакуловирусный геном, репликон *mini-F* для стабильной репликации в клетках *E. coli* и сайт *mini-att-Tn7*, встроенный в ген *lacZ*. Этот метод удобен тем, что создание и идентификация бакуловирусной ДНК осуществляются в бактериальных клетках [26–28].

Уровень синтеза эукариотических белков в культивируемых клетках насекомых высок и не достигнут до сих пор ни в одной другой эукариотической системе гетерологичной экспрессии генов (в большинстве случаев до 500 мг/л, секретируемые белки — до 1–10 мг/л). Бакуловирусный геном способен акцептировать большие сегменты чужеродной ДНК. Пока даже не известен верхний предел размера чужеродной вставки в геном бакуловируса. Рекомбинантные бакуловирусы, несущие любую дополнительную последовательность ДНК, достигают титра, аналогичного титру вируса дикого типа в течение одинакового периода времени. Последовательности ДНК не претерпевают изменений и остаются стабильными в течение многократных клеточных пассажей, при этом уровень экспрессии генов не снижается. Имеется еще одно преимущество, а именно — возможность экспрессировать одновременно несколько генов в одной инфицированной клетке насекомого и получать мультимерные белки, функционально близкие природному аналогу. В большинстве случаев в клетках насекомых (в отличие от бактерий) белковый продукт остается в растворенном виде. Рекомбинантные белки локализуются в тех же субклеточных компартментах, в которых экспрессируются нативные белки. Ядерные рекомбинантные белки размещаются в клеточном ядре, мембранные закрепляются в клеточной мембране, а секретируемые участвуют в секреторном пути клетки. Чужеродный белковый продукт в клетках насекомых в большинстве случаев проходит все стадии созревания и модификации, присущие эукариотическим системам, что важно для проявления полной биологической активности. Бакуловирусы не патогенны для млекопитающих и растений, они неинфекционны для клеток млекопитающих, что позволяет получать временную и стабильную трансдукцию клеток млекопитающих.



**Рис. 2.** Схема получения рекомбинантного бакуловируса с последующей экспрессией рекомбинантного белка с помощью гомологичной рекомбинации между рекомбинантным трансфер-вектором и вирусным геномом.

**Получение функционально активных рекомбинантных белков с использованием бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых**

Белки в клетках насекомых проходят все стадии созревания и модификации, присущие эукариоти-

ческим системам: гликозилирование, фосфорилирование, пальмитилирование (ацилирование остатками жирных кислот), амидирование, карбоксиметилирование, расщепление сигнальных пептидов и протеолитическое расщепление. Рекомбинантные белки формируют дисульфидные связи и принима-

ют необходимую вторичную и третичную структуры. Сайты указанных модификаций, как правило, совпадают с их аналогами в природном белке, рекомбинантный белок структурно и функционально подобен его природной копии. Экспрессия белков эукариот в бакуловирусной системе экспрессии, по большей части, обеспечивает получение биологически активных продуктов, сохраняющих свои антигенные свойства.

Поверхностный антиген вируса СПИДа, gp160 HIV, синтезированный в бакуловирусной системе, связывается с моноклональными антителами к аутентичному gp160 и с рецептором CD4. Антигенные свойства рекомбинантного gp160 не отличаются от природного [29]. В клетках насекомых с использованием бакуловирусной системы экспрессии удалось получить биологически активную секреторную форму рецептора CD4 ВИЧ-1 [30], а также белки  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц хорионического гонадотропина (ХГ) человека, имеющие антигенные детерминанты  $\alpha$ -ХГ и  $\beta$ -ХГ [31]. В бакуловирусной системе получен белок P2 Kirsten-Ras(4B) человека [32], тирозинкиназа p56<sup>lck</sup> из лимфоцитов человека [33], правильно процессированный белок х1саах-1 типа Ras [34]; получен рекомбинантный энтактин мыши с правильно процессированным сигнальным пептидом, реагирующий с поликлональными антителами к энтактину и обеспечивающий прикрепление и агрегацию клеток в культуре, т.е. обладающий свойствами природного компонента матрикса [35]. Белжеларская и Саттон (Satton) [36] экспрессировали ген функционально активного серотонинового рецептора мыши 5HT1c в культуре клеток насекомых и показали, что он обладает функциональной активностью этого рецептора в клеточном ответе на серотонин. Рецептор, связываясь с лигандом при участии GTP-связывающего белка, активирует фосфолипазу C, иницируя поток кальция в клетке. Гришук и соавт. [37, 38] синтезировали стероид-21-гидроксилазу (CYP21A2) человека и ее новые мутантные варианты в клетках насекомых и изучили влияние мутаций в гене этого фермента на его активность. Хаземан (Hasemann) и Капра (Capras) [39] экспрессировали в клетках насекомых гены иммуноглобулинов мыши. Рекомбинантная векторная плазида содержала кДНК тяжелых (H) и легких (L) цепей иммуноглобулина. Обе цепи оказались правильным образом процессированы и гликозилированы; в клетках насекомых они собирались в комплекс H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>. В работе Эрнста (Ernst) и соавт. [40] показана возможность использования бакуловирусной системы для создания и скрининга эукариотических экспрессионных библиотек. Всего с помощью этой системы уже получено свыше 1000 различных гетерологичных белков, при этом более 95%

из них претерпевали правильные посттрансляционные модификации.

Однако не всегда N-гликозилирование в клетках насекомых происходит точно так же, как в клетках млекопитающих. Впрочем, на примере экспрессии гемагглютинаина и нейраминидазы вируса гриппа показано, что, хотя гликозилирование белков протекает не вполне адекватно, конечные продукты имеют те же антигенные свойства (по данным иммунофлюоресцентного анализа), что и аутентичные белки [41]. Возможно, пик синтеза гликопротеинов опережает максимум синтеза остальных белков в условиях инфекции по отношению к синтезу полиэдрина. Использование бакуловирусных ранних промоторов позволяют иногда преодолевать проблемы неадекватности гликозилирования [42]. Кроме того, гиперэкспрессия чужеродных белков может влиять на способность клеток модифицировать белки [43]. N-гликозилирование полипептидных цепей гликопротеинов в клетках млекопитающих с участием гликозилтрансфераз приводит к образованию белкового продукта с N-гликанами, содержащими концевые сиаловую кислоту и галактозу. В клетках насекомых, вероятно, отсутствуют соответствующие гликозилтрансферазы, поэтому N-гликозилирование белка происходит не всегда в полной мере [44–46] (рис. 3.)

Для преодоления этих проблем предложена система, в которой клетки насекомых Sf9 генетически модифицировали, получив клеточную линию (Mimic™ Sf9 Insect Cells, “Invitrogen”), содержащую гены для  $\alpha$ -2,6-сиалилтрансферазы и  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазы. Эта линия способна при инфекции рекомбинантным бакуловирусом экспрессировать ген функционально активного белка с посттрансляционными модификациями, свойственными клеткам млекопитающих [47, 48]. Для увеличения продукции правильно процессированных функциональных белков клетками насекомых, инфицированными рекомбинантным бакуловирусом, используют разнообразные подходы. Например, экспрессировали ген  $\beta$ -1,4-галактозилтрансферазы быка в клетках Sf9 под контролем бакуловирусного раннего промотора *ie1*. Заражение таких клеток рекомбинантным бакуловирусом с последовательностью ДНК, кодирующей тканевый активатор плазминогена, приводит к образованию галактозилированного конечного продукта [49, 50]. Использование ранних бакуловирусных промоторов позволяет преодолевать проблемы неадекватности посттрансляционной модификации рекомбинантных белков в клетках насекомых на поздних стадиях инфекции, когда усиленный синтез чужеродного белка понижает способность клетки модифицировать белковый продукт. Созданы новые

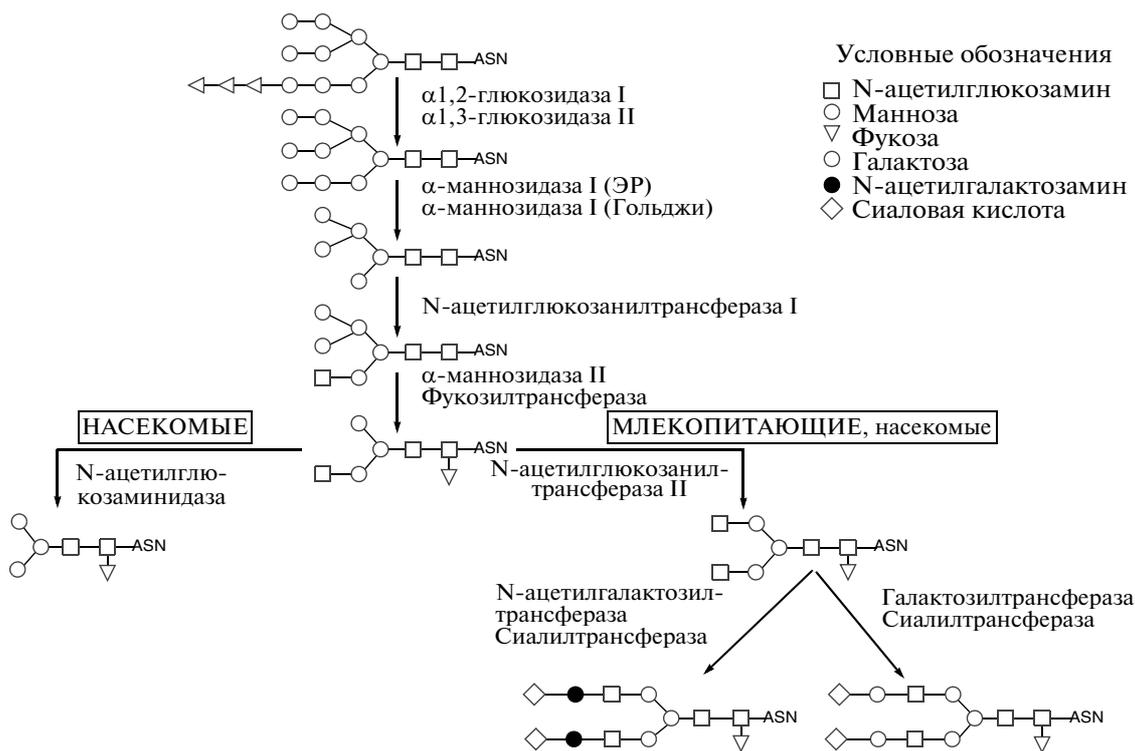


Рис. 3. Схема N-гликозилирования белка в клетках насекомых и млекопитающих.

трансгенные клеточные линии *Sf9*, каждая из которых обладает более успешным N-гликозилированием, чем исходные клетки *Spodoptera frugiperda*, и может производить рекомбинантные гликопротеины с N-гликанами млекопитающих [50–53].

Синтез функциональной секретируемой формы эктодомена рецептора лютропина с адекватным N-гликозилированием усиливается, если он находится под контролем промотора *P10* (в сравнении с промотором полиэдрина *PH*) [53]. Показана также более эффективная функциональная экспрессия гена белка *vankyrin* полиднавируса под контролем промотора *P10* бакуловируса в сравнении с промотором *PH* [54]. Кулаковский и соавт. [55] исследовали степень N-гликозилирования секретируемой плацентарной щелочной фосфатазы, которая была синтезирована в инфицированных рекомбинантным бакуловиром клеточных линиях *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*. Клетки *Sf* синтезировали олигосахариды с более высокой степенью фукозилирования, чем любая из изученных линий *T. ni* [55]. Усовершенствование бакуловирных систем экспрессии в клетках насекомых для синтеза “human-like” гликопротеинов продолжается [45, 47, 57].

Из недостатков бакуловирной экспрессионной системы можно назвать неэффективность процессирования гетерологичных белков, предварительно синтезированных в виде крупных неактив-

ных белковых предшественников, таких как пептидные гормоны, нейропептиды, факторы роста, металлопротеазы и некоторые другие. В ряде случаев, когда нативный белок функционирует как гетеродимер или имеет ткане- или видоспецифичные модификации, при получении в бакуловирной системе он не будет функционально активным, если его связывающий партнер (рецептор, лиганд) или модифицирующий фермент не будет коэкспрессироваться в этой же системе [58]. Неспособность клеток насекомых полностью процессировать большое количество белковых предшественников, вероятно, обусловлена недостаточным количеством фуриноподобного фермента в клетках [59–61]. Постхауз (Posthouse) и соавт. [62] показали, что активность конвертаз в бакуловирной экспрессионной системе экспрессии также повышается при коэкспрессии фурина.

Секреция гетерологичных белков IgG в клетках насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловиром, приводит к получению нерастворимого иммуноглобулина. Но при коэкспрессии иммуноглобулина и шаперона БТШ70 образуется растворимый внутриклеточный иммуноглобулин и увеличивается количество секретируемого белка [63]. В ряде случаев, если белок образует мультимерную структуру за счет образования дисульфидных связей между одинаковыми субъединицами, он мо-

жет экспрессироваться в биологически активной мультимерной форме. Так, анализ экспрессии VP60, уникального компонента капсида вируса RHDV (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus) в бакуловирусной системе экспрессии (БЭС) показал, что при встраивании кДНК гена VP60 под контроль полиэдринового промотора рекомбинантный белок образует не только правильные димеры с мол. весом 80 кДа, но и побочные димеры по 100 кДа и 62 кДа — из-за сдвига рамки трансляции. При этом димеры образуются за счет дисульфидных связей [64].

Поскольку в БЭС рекомбинантные белки могут претерпевать протеолитическое расщепление, в этой системе можно получить белок-предшественник, который расщепится протеазой клетки с образованием нескольких различных полипептидов. Экспрессия гена белка-предшественника HIV-1 (55 кДа) с промотора гена полиэдрина позволяет получить три различных структурных белка вируса иммунодефицита человека [65]. Получен также биологически активный интерлейкин-1 $\beta$ -преобразующий фермент (ИПФЧ) человека. Биологически активным ферментом является гетеродимер, состоящий из полипептидов 10 кДа и 20 кДа. кДНК белка-предшественника ИПФЧ экспрессируется под контролем полиэдринового промотора. После синтеза полипептидная цепь предшественника расщепляется по связи Asp116-Asp117, а полипептидные цепи образуют гетеродимер белка ИПФЧ. Расщепление обусловлено самим белком, а именно — его участком, обладающим протеолитической активностью (pro) [66].

Иногда для получения мультимерных белков необходимо экспрессировать отдельно кДНК каждой субъединицы. Один из способов достижения этой цели заключается в котрансфекции культуры клеток насекомых двумя и более типами рекомбинантных ДНК, содержащих гены субъединиц. В таких опытах не всегда удается получить зрелый активный продукт, поскольку характер сборки субъединичного комплекса в клетках насекомых может существенно отличаться от такового в естественных условиях. Ранее пытались получить таким образом комплекс полимеразы вируса гриппа, состоящий из трех субъединиц [67]. Каждый из трех генов полимеразы — *pb1*, *pb2*, *pbA* — хорошо экспрессируется с полиэдринового промотора. При инфекции клеток насекомых вирусными рекомбинантными ДНК PB1 и PB2 получили гетеродимер этих субъединиц. Но при трансфекции клеток всеми тремя рекомбинантными ДНК получить комплекс из трех субъединиц не удалось. Возможно, в этом случае клетки насекомых не могли обеспечить специфическую модификацию белка РВА, либо для правильной

сборки необходимо участие дополнительных генов вируса гриппа.

#### **Получение вирусоподобных частиц и вакцин в клетках насекомых с использованием бакуловирусной системы экспрессии**

Система БЭС/насекомые позволяет изучать процессы сборки вирусных частиц в отсутствие инфекционного вируса и все чаще используется для разработки кандидатов в вакцины, основанных на получении вирусоподобных частиц и обычных рекомбинантных антигенов [68–71].

Для экспрессии генов сложных белков, белков из нескольких субъединиц и многобелковых комплексов в клетках насекомых создаются специальные экспрессирующие кассеты, содержащие три, четыре и более промоторов поздних вирусных генов. Так, в случае ВТВ (Bluetongue Virus), имеющего в составе вириона семь структурных белков, получен комплекс вирусоподобных частиц, содержащих четыре рекомбинантных белка вируса. Для этого переносили трансфер-вектор pAcAB4, содержащий блок последовательностей генов ВТВ (*VP2*, *VP6*, *VP7* и *NS1*) под контролем двух промоторов рН и двух промоторов гена *p10*, в культуру клеток насекомых. При этом промоторы рН и *p10* располагались поочередно [72]. В других случаях рекомбинантные бакуловирусы использовали для получения вирусоподобных частиц вируса ВВС (Bluetongue Virus Core), экспрессирующих ген Т-клеточного эпитопа белка М1 вируса гриппа А, для индукции Т-клеточного ответа [73]. Экспрессируемый в клетках насекомых ген белка GAG, этот основной компонент нуклеокапсида ретровирусов не только обладает аутентичными антигенными свойствами, но и формирует вирусоподобные частицы, которые отпочковываются с поверхности клетки в среду [74]. Белки L1 и L2 капсида вируса папилломы человека (HPV) образуют комплекс, подобный капсиду [75]. Клетки насекомых инфицировали рекомбинантными бакуловирусами, синтезирующими белки капсида вируса герпеса HSV-1 (Herpes Simplex Virus type 1). При смешивании экстрактов инфицированных клеток *in vitro* происходит сборка вирусного капсида; более того, очищенные капсидные белки вируса герпеса обладают способностью собираться в прокапсиды *in vitro* в отсутствие дополнительных факторов клеток насекомых [76, 77].

При использовании рекомбинантных бакуловирусов в клетках насекомых получен основной структурный гликопротеин VP1 полиомавируса человека (JC virus), возбудителя мультифокусной лейкоэнцефалопатии, который формирует вирусоподобные частицы с типичной морфологией свобод-

ных вирусных частиц полиома вируса. Очищенные вирусоподобные частицы высоко иммуногенны при введении с адьювантом и могут оказаться полезными для разработки вакцины [78–80]. Сборку капсидоподобных частиц полиомавируса при использовании комбинации рекомбинантных бакуловирусов, синтезирующих вирусные структурные белки VP1, VP2 и VP3, наблюдали также другие авторы [81]. Синтез одного VP2 или VP3 не приводит к образованию частиц, однако эти белки участвуют в образовании VP1 и упаковываются в VLPs.

При вакцинации млекопитающих для индукции иммунного ответа Касал (Kasal) и соавт. [82] использовали вирусоподобные частицы парвовируса, полученные путем экспрессии гена основного компонента капсида парвовируса VP2 в инфицированных рекомбинантным бакуловирусом клетках насекомых. Парвовирусные VLPs обладают высокой иммуногенностью в отсутствие адьюванта [82]. С использованием рекомбинантных бакуловирусов получены вирусоподобные частицы ротавируса (rotavirus). Вакцинация очищенными ротавирусными VLPs вызывает иммунитет у млекопитающих против гетеротипичного ротавируса [83]. При помощи рекомбинантных бакуловирусов получены вирусоподобные частицы вирусов гепатита В и С. Очищенные вирусные частицы использовали для иммунологических и терапевтических исследований [84–87]. Вирусоподобные частицы вируса папилломы использовали для разработки белков-кандидатов для получения вакцины [71], а вирусоподобные частицы коронавируса использовали для изучения процесса сборки вирусных частиц [90]. Белжеларская и соавт. [87] синтезировали самособирающиеся, нереплицирующиеся, лишённые генома вирусоподобные частицы вируса гепатита С и использовали их в качестве модели вириона для изучения посттрансляционного гликозилирования оболочечных белков этого вируса (HCV). Метод получения гемагглютиниана и нейроминидазы вируса гриппа А с помощью рекомбинантных бакуловирусов в клетках насекомых может быть альтернативным современным методом создания вакцин против гриппа на куриных эмбрионах. В последнее время, рекомбинантные бакуловирусные векторы используют для получения ретровирус- и лентивирусоподобных частиц для разработки вакцин против ВИЧ [89, 102].

Таким образом, спектр разнообразных рекомбинантных белков, экспрессируемых в клетках насекомых, существенно расширился. В нем мы находим цитозольные, ядерные, митохондриальные, связанные с мембранами и секретируемые белки. Оказалось, что бакуловирусная система экспрессии особенно полезна для наработки функциональных, мультисубъединичных белковых структур, как, на-

пример, вирусоподобных частиц (VLPs). Она все чаще используется для разработки белков-кандидатов для получения вакцин, основанных на использовании вирусоподобных частиц и обычных рекомбинантных антигенов. Исследования одновременной экспрессии ферментов, участвующих в гликозилировании, расщеплении, и секреции, показали возможность значительно повысить выход функциональных рекомбинантных белков, синтезированных в клетках насекомых. Применение рекомбинантных бакуловирусов для идентификации чужеродных белков и эпитопов на поверхности вирусов эффективно как средство для изучения белок-белковых взаимодействий. Рекомбинантные бакуловирусы используют для получения белков, встречающихся в минорных количествах, либо белков, выделение которых представляет определенные сложности. К таким белкам можно отнести онкобелки, белки внеклеточного матрикса и внутриклеточной передачи сигнала. Возможности бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых и перспективные направления ее развития создали предпосылки для применения этой системы для доставки и экспрессии гетерологичных генов в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo*.

#### ***Бакуловирусы – средство введения и экспрессии гетерологичных генов у млекопитающих***

Интерес к БЭС усилился после того, как было показано, что рекомбинантные бакуловирусы можно применять для доставки генетической информации в клетки млекопитающих [93–99]. В клетках насекомых собственные бакуловирусные гены транскрибируются, в клетках же млекопитающих транскрибируются только гены, находящиеся под контролем промотора млекопитающих. В клетках насекомых вирусная ДНК реплицируется и упаковывается в нуклеокапсиды. В клетках млекопитающих репликации не происходит и вирусное потомство не образуется.

Способность бакуловируса AcMNPV доставлять гены в культивируемые клетки млекопитающих, прежде всего в гепатоциты, впервые описанная Хофманом (Hofmann) и соавт. [91], подтверждена Бойсом (Boyce) и Бухером (Bucher) [92] и до сих пор привлекает внимание исследователей. Так как бакуловирус, передавая генетическую информацию клеткам млекопитающих, не инициирует продукцию инфекционного вируса, рекомбинантные бакуловирусные векторы стали использовать в разработке систем для переноса и экспрессии генов функциональных белков в клетках высших животных и человека *in vitro* и *in vivo* [96–98]. Основное условие экспрессии гена, доставленного бакулови-

русом в клетки млекопитающих, — контроль транскрипции репортерного гена промотором и регуляторными элементами, функционирующими в таких клетках. К ним относятся внутренние сайты связывания рибосом, сайты начала репликации, зоны матричного прикрепления и т.д. Различные регуляторные элементы, активные в клетках млекопитающих и присутствующие в бакуловирусе, могут участвовать в регуляции и повышать, тем самым, эффективность экспрессии. Трансдукция в первичные гепатоциты и в клетки гепатомы эффективна и дает высокий уровень активности репортерных генов [100, 101]. Предложена новая VasMat-система экспрессии белка в клетках млекопитающих. Она основана на использовании модифицированного бакуловируса AcMNPV, получившего название VasMat-вирус. Он содержит экспрессионную кассету с промотором, работающим в клетках млекопитающих, и направляет доставку и экспрессию клонированных генов в культивируемых клетках млекопитающих [91, 95, 96]. VasMat-система не токсична для клеток млекопитающих, проста в применении, не требует очистки ДНК и рекомбинантного вируса для трансдукции. Чаще всего используют рекомбинантные бакуловирусные векторы с экспрессирующими кассетами под контролем промотора цитомегаловируса или промотора вируса саркомы Рауса, а также СAG-промотора или промотора вируса SV40 [92, 94, 95, 103]. Сконструированы гибридные бакуловирусные векторы, содержащие экспрессионные кассеты под контролем промоторов млекопитающих, фланкированных инвертированными повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). Во всех случаях наблюдается сайт-специфическая интеграция генома AAV в геном животной клетки [104]. Появляется все больше работ, в которых рекомбинантные бакуловирусные векторы используются для направленной доставки генетической информации в специфические клетки-мишени человека и животных [105, 106]. Так, изучали репликацию вируса гепатита С с помощью бакуловирусной трансдукции клеток Huh7, помещая полноразмерную кДНК вируса под контроль промотора цитомегаловируса (CMV) [100]. Изучали также сборку вирусоподобных частиц вируса гепатита С, используя трансдукцию модифицированного бакуловируса в клетки млекопитающих Hek293T и Huh7, несущих последовательности кДНК структурных генов ВГС под контролем CMV [107]. Бакуловирусные векторы, несущие кДНК генов гепатита В и гепатита С, используют для изучения вирусных инфекций, для поиска новых антивирусных стратегий. Отсутствие репликации и цитотоксичности бакуловирусных векторов в клетках млекопитающих позволяет получать высокие титры

полиовируса в системе с бакуловирусной гибридной РНК-полимеразой T7 [108].

#### **Клеточные линии млекопитающих, чувствительные к бакуловирусной трансдукции**

Как правило, бакуловиром эффективно трансдуцируются различные типы клеток [95, 96, 98], причем самый высокий уровень экспрессии рекомбинантных генов наблюдается в клетках печеночного происхождения [91]. При изучении большой панели клеточных линий, включая и первичные культуры клеток человека, показано, что экспрессия эукариотического гена с помощью бакуловируса регулируется промотором CMV и что рекомбинантный бакуловиром можно использовать не только для временной экспрессии в клетках млекопитающих, но и для получения стабильных клеточных линий, поддерживающих экспрессию белка репортерного гена после множественных пассажей культуры. По крайней мере, участок 12 т.п.н. введенного генома вируса сохраняется в стабильной линии клеток яичника китайского хомячка, однако пока не ясно, интегрирована ли бакуловирусная ДНК в геном клетки-хозяина. При трансдукции в клетки CHO-K1 рекомбинантного бакуловируса, содержащего экспрессионную кассету с промотором SV40 и геном неомифосфотрансферазы, в присутствии антибиотика G418 образуется стабильная линия клеток, экспрессирующая ген GFP в течение более 5 мес. [109]. Другой бакуловирусный вектор, содержащий две экспрессионные кассеты (одна — с геном  $\beta$ -gal и геном устойчивости к гигромицину, другая — с фланкированными обращенными концевыми повторами (ITR) вируса AAV и геном *rep*) эффективно и стабильно доставляет рекомбинантные гены в клетки CHO. Если удалить ген *rep*, количество клеток, устойчивых к гигромицину, уменьшается, а при наличии гена *rep* — возрастает в 10–50 раз, причем происходит интеграция генома AAV в геном клетки-хозяина, а доля выживших клеток достигает более чем 40% [104].

Получен рекомбинантный бакуловиром, несущий промотор гена белка теплового шока *hsp70* дрозофилы, который контролирует экспрессию гена GFP и эффективно доставляет гены в клетки дрозофилы S2 [63]. Опыты показывают, что бакуловирусные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки. Этот процесс включает этап транспорта бакуловирусного нуклеокапсида через поры клеточного ядра, в отличие, например, от аденовируса или вируса герпеса [110]. Возможность введения генов в делящиеся и неделящиеся клетки *in vitro* и *in vivo* — еще одно важное преимущество бакуловирусов как экспрессионных векторов. Например, бакуловиром использовали в качестве транспортно-

го вектора для стволовых клеток [105]. Список клеточных линий млекопитающих, подверженных бакуловirusной трансдукции, постоянно расширяется и, в зависимости от типа клеток, эффективность трансдукции колеблется от 10 до 90%.

### **Эффективность бакуловirusной трансдукции**

Эффективность экспрессии генов в менее чувствительных клеточных линиях млекопитающих обусловлена не блокировкой проникновения вируса в клетку, а способностью вируса попадать в клеточное ядро, избегая попадания во внутриклеточные везикулы. Предложен механизм, который ответствен за различия в эффективности трансдукции разных клеток [111]. Бакуловirusные векторы, несущие увеличенное количество последовательностей, кодирующих белок gp64 или другой белок оболочки, проявляют более высокую эффективность трансдукции в клетки млекопитающих [112, 113]. Кроме того, после обработки клеток бутиратом натрия или трихостатином А, сразу же после заражения рекомбинантным бакуловirusом, 20-кратно повышается уровень экспрессии [95, 114]. Электростатические взаимодействия вируса с клетками млекопитающих с участием гепаринсульфата поверхности клетки также влияют на эффективность доставки генов с помощью бакуловirusов [115]. На эффективность доставки и экспрессии репортерного гена в клетках млекопитающих влияют еще ряд факторов: фосфолипиды на поверхности трансдуцируемых клеток [116], использование гибридного бакуловirusа в комбинации с другим вирусом (BV + AAV) [104, 117], введение гена рекомбиназы в векторные конструкции [118] и применение двойной селекции трансформанта [119]. Два основных трансактиватора — IE1 и IE2 — AcMNPV могут активировать бакуловirusный геном в клетках млекопитающих [129].

### **Механизм взаимодействия бакуловirusа с клетками млекопитающих**

Механизм проникновения и трансдукции в клеточные линии млекопитающих бакуловirusных векторов, специфичность взаимодействия вируса с клетками остаются до сих пор не изученными. Не ясна природа молекулы на клеточной поверхности, которая взаимодействует с бакуловirusом при его поглощении клеткой. Кинетика насыщения при поглощении клетками вируса в процессе трансдукции в клетки Huh7 предполагает наличие специфического рецептора на поверхности клеток, которые связывают вирус. Проникновение бакуловirusа в неделящиеся гепатоциты также предполагает специфическое взаимодействие между вирусом и клетками. В отличие от этого, при взаимодействии баку-

ловirusа с клетками HEK293 не происходит насыщения поглощения вируса клетками — даже при высоких дозах вируса, что свидетельствует о неспецифическом взаимодействии бакуловirusа с этими клетками. Фосфолипиды клеточной мембраны клеток HepG2 важны для этапа инициации проникновения бакуловirusа в клетку. Кроме того, для прикрепления вируса к клеточной поверхности необходимы электростатические взаимодействия, их могут обеспечивать остатки гепаринсульфата на поверхности. Фосфатидная кислота фосфолипидов и фосфатидилинозит ингибируют трансдукцию в клетки млекопитающих, в то время, как гепарин и гепаринсульфат — нет. Возможной причиной этих противоречий могут быть различные механизмы взаимодействия бакуловirusа с клетками разных типов. Например, лизосомотропные факторы, такие как хлорохин, ингибируют бакуловirusную экспрессию генов; повидимому, “подкисленные” эндосомы обладают регулирующим инструментом в процессинге вирусных вирионов в клетках млекопитающих [91, 95, 110]. Предполагается, что для узнавания вируса и клетки, для проникновения бакуловirusа требуется белок вирусной оболочки gp64 AcMNPV. Бакуловirusные векторы с дополнительным геном белка оболочки вируса gp64, обеспечивают повышенный уровень трансдукции клеток млекопитающих [113].

### **Доставка и экспрессия гетерологичных генов в клетки млекопитающих *in vivo***

Неспособность бакуловirusа размножаться в клетках млекопитающих *in vitro* и, более того, отсутствие врожденной гуморальной и клеточной иммунной памяти у человека по отношению к бакуловirusам расширяет область применения этой векторной системы и делает ее привлекательной для применения *in vivo*, а также в перспективе для разработки методов диагностики и вакцинации в генной терапии. Применение рекомбинантных бакуловirusов *in vivo* имеет некоторые ограничения. Основное из них — нейтрализация бакуловirusа системой комплемента в результате активации С-пути. Ранее показано, что при введении бакуловirusных векторов крысам и мышам *in vivo* разными способами, в том числе, прямой инъекцией в паренхиму печени, доставки генов не происходит и что свежая сыворотка инактивирует вирус, а инактивированная нагреванием сыворотка нет [120]. Использование сыворотки с недостатком специфических факторов системы комплемента показало, что ответственными за неспособность вируса переносить гены являются термолabile факторы сыворотки.

Работа с истощенными сыворотками показала, что в блокировке бакуловируса участвует классический путь комплемента [121–123]. Для преодоления “С-барьера” к бакуловирусной системе *in vivo* применяют инактивацию системы комплемента или используют возможность избежать контакта с С-системой. Инъекции рекомбинантного бакуловируса с дефицитом комплемента в хвостовые вены мышей “позволяет” экспрессию трансгена в селезенке, печени и почке. Создан вирус, устойчивый к комплементу в присутствии фактора DAF, ускоряющего распад комплексов комплемента [124, 125]. Ранее показано, что DAF повышает скорость разрушения системы комплемента [126]. Вирус, включающий слитый оболочечный белок gp64-DAF, доставляет ген фактора IX человека новорожденным крысам при внутривенной инъекции [113]. Модифицированные бакуловирусы, несущие белок вируса везикулярного стоматита G (VSVG), также проявляют устойчивость к комплементу [127].

Бакуловирусы могут участвовать в переносе генов к местам, где они не контактируют с системой комплемента. Так, прямая инъекция рекомбинантного бакуловируса в мозговую ткань мышей приводит к эффективному переносу генов, в основном, в глиальные клетки [114]. Для доставки генов *in vivo* в сонные артерии кроликов использовали “воротник”, содержащий вирус, расположенный вне артерии, чтобы избежать контакта рекомбинантного бакуловируса с комплементом [128]. Избежать контакта бакуловируса с С-системой удастся и при использовании перфузии сегмента печени человека *ex vivo*. При помощи такой процедуры удастся трансдуцировать бакуловирусные векторы в ткани печени; следовательно, перенос генов в ткани млекопитающих с помощью бакуловируса возможен [122].

Таким образом, для блокировки системы комплемента применяют разные способы: подавление путей каскада комплемента (использование сыворотки, лишенной различных факторов комплемента), нейтрализация (истощение) C3, обработка сыворотки антителами к компоненту C5 или фактором яда кобры (CVF), использование регулятора активности комплемента sCR1 (растворимый рецептор), использование вирусного регулятора комплемента VCP (ингибирует как классический, так и альтернативный путь активации комплемента), использование регулятора активности комплемента DAF (фактор, ускоряющий распад комплемента), псевдотипирование вируса по VSV-G, создание комплемент-устойчивых бакуловирусных векторов. Угнетение каскада комплемента защищает бакуловирус от инактивации сывороткой, делает возможным его использование в качестве вектора в генной терапии *in vivo*.

Дальнейшее исследование механизмов, приводящих к значительному повышению экспрессии гена под контролем промоторов, активных в клетках млекопитающих, а также факторов, влияющих на эффективность экспрессии репортерного гена в клетках млекопитающих (таких как введение бутирата Na или трихостина А, модификацию белка вирусной оболочки бакуловируса gp64, как способ расширения спектра трансдуцируемых клеток и тканей) позволит еще более расширить возможности бакуловирусной системы экспрессии и области ее применения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биология бакуловируса ядерного полиэдроза, уникальность его двуфазного инфекционного цикла и особенности организации бакуловирусного генома обеспечили мощный инструмент для экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых и млекопитающих. Принципы конструирования трансфер-векторов и преимущества технологии бакуловирусной экспрессирующей системы позволили создать эукариотические системы экспрессии, с помощью которых можно нарабатывать эукариотические белки *in vitro* и *in vivo*.

Система “БЭС/насекомые” позволяет изучать процессы сборки вирусных частиц в отсутствие инфекционного вируса; она все чаще используется для получения кандидатов в вакцины, основанной на получении вирусоподобных частиц и обычных рекомбинантных антигенов. Спектр синтезированных в клетках насекомых, инфицированных бакуловирусом рекомбинантных белков, широк — от цитозольных ферментов до мембранных белков.

Преимущества системы “БЭС/млекопитающие” по сравнению с другими системами экспрессии, отсутствие врожденной гуморальной и клеточной иммунной памяти у человека по отношению к бакуловирусам позволяет рассматривать векторы на основе бакуловирусов как перспективную альтернативу векторам на основе вирусов человека.

Автор благодарит С.А. Недоспасова и П.М. Рубцова за критические замечания при подготовке данного обзора, а также С.Н. Кочеткова, В.С. Михайлова и С.Г. Скуридина за критическое прочтение рукописи. Автор признательна также О.В. Орловой и А.В. Тимоховой за техническую помощь при работе над обзором.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (05-04-49477, 07-04-12136, 08-04-00281).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ayres M.D., Howard S.C., Kuzio J., Lopez-Ferber M., Possee R.D. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. **202**, 586–605.
2. Rohrmann G.F., Martignoni M.E., Beaudreau G.S. 1982. *J. Gen. Virol.* **62**, 137–142.
3. Miller L.K. 1986. Biotechnology advances in invertebrate pathology and cell culture. Orlando FL: Acad. Press.
4. Козлов Э.А., Левитина Л.Т., Гусак Н.М., Овандер М.Н., Серебряный С.Б. 1981. Сравнение аминокислотных последовательностей белков тел включения вирусов ядерного полиэдроза тутового и непарного шелкопряда и большой вошинной моли. *Биоорг. химия*. **7**, 1008–1015.
5. Miller L.K., Lingg A.J., Bulla L.A. 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science*. **219**, 715–721.
6. van der Beek C.P., Saaijer-Riep J.D., Vlaskovits J.M. 1980. On the origin of the polyhedral protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Isolation, characterization, and translation of viral messenger RNA. *J. Virol.* **100**, 326–333.
7. Volkman L.E., Zaal K.J.M. 1990. *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus: Microtubules and replication. *Virology*. **175**, 292–302.
8. Rohrmann G.F. 2008. *Baculovirus molecular biology*. NCBI. Bethesda. US. *Book*.
9. Kool M., Ahrens C.S., Vlaskovits J.M., Rohrmann G.M. 1995. Replication of baculovirus DNA. *J. Gen. Virol.* **76**, 2103–2118.
10. Mikhailov V.S., Rohrmann G.F. 2002. The baculovirus replication factor LEF-1 is a DNA primase. *J. Virol.* **76**, 2287–2297.
11. Miller L.K. 1988. Baculovirus as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 177–199.
12. Miller D.W., Safer P., Miller L.K. 1986. An insect baculovirus host vector for high-level expression of foreign genes. In: *Genetic Engineering*. Eds Setlow J.K., Hollaender A. N.Y.: Plenum. **8**, 277–298.
13. Summers M.D., Smith G.E. 1987. A manual of method for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Bulletin No. 1555*. Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M University, Publishers College Station, Texas. 10–39.
14. Matsuura Y., Possee R., Bishop D. 1987. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **68**, 1233–1250.
15. Luckow V.A., Summers M.D. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnol.* **6**, 47–55.
16. Smith G.E., Summers M.D., Fraser M.J. 1983. Production of human beta-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.* **3**(12), 2156–2165.
17. Pennock G.D., Shoemaker C., Miller L.K. 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell Biol.* **4**, 399–406.
18. Smith G.E., Summers M.D. 1988. United States Patent Application: US4745051.
19. Smith G.E., Summers M.D. 1989. United States Patent Application: US4879236.
20. Kitts P.A., Ayres M.D., Possee R.D. 1990. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucl. Acids Res.* **18**, 5667–5672.
21. Kitts P.A., Possee R.D. 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques*. **14**, 810–817.
22. Possee R.D., King L.A. 2001. United States Patent Application: WO0112829.
23. Possee R.D., Hitchman R.H., Richards K.S., et al. 2008. Generation of baculovirus vectors for the high throughput production of proteins in insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 1115–1122.
24. Berger I., Richmond T.J. 2005. United States Patent Application: WO20055085456
25. Fitzgerald D.J., Berger P., Schaffitzel C., Yamada K., Richmond T.J., Berger I. 2006. Protein complex expression by using multigene baculovirus vectors. *Nat. Methods*. **3**, 1021–1032.
26. Lee S.C., Leusch M.S., Luckow V.A., Olins P.O. 1994. United States Patent Application: US5348886.
27. Luckow V.A., Lee S.C., Barry G.F., Olins P.O. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67**, 4566–4579.
28. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. *Instruction Manual*. 1993. St. Louis, MO: Life Technologies, Inc., Monsanto Corp. Res.
29. Wells D.E., Compans R.W. 1990. Expression and characterization of a functional human immunodeficiency virus envelope glycoprotein in insect cells. *Virology*. **176**, 575–584.
30. Белжеларская С.Н., Сутугина Л.П., Толкачева Т.В., Рубцов П.М., Скрябин К.Г. 1996. Экспрессия гена CD4-рецептора ВИЧ-1 в клетках насекомых с использованием бакуловирусной недели. *Молекуляр. биология*. **30**, 524–528.
31. Белжеларская С.Н., Сутугина Л.П., Филенко О.М., Бучацкий Л.П., Рубцов П.М. 1996. Экспрессия кДНК хорионического гонадотропного гормона человека в культуре клеток насекомых. *Молекуляр. биология*. **30**, 518–523.
32. Lowe P.N., Page M.J., Bradley S., Rhodes S., Sydenham M., Paterson H., Skinner R.H. 1991. Characterization of recombinant human Kirsten-ras (4B) p21 produced at high levels in *Escherichia coli* and insect baculovirus expression systems. *J. Biol. Chem.* **226**, 1672–1678.
33. Ramer S.E., Winkler D.G., Carrera A., Roberts T.M., Walsh Ch.T. 1991. Purification and initial characterization of the lymphoid-cell protein-tyrosine kinase p56 *lek* from a baculovirus expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 6254–6258.
34. Kloc M., Reddy B., Crawford S., Etkin L.D. 1991. The use of baculoviruses as expression vectors. *J. Biol. Chem.* **226**, 8206–8212.

35. Tsao T., Hseih J.C., Durkin M.E., Wu C.Y., Chakravarti S., Dong L.J., Lewis M., Chung A.E. 1990. Characterization of the basement membrane glycoprotein entactin synthesized in a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* **265**, 5188–5191.
36. Белжеларская С.Н., Саттон Ф. 2004. Экспрессия кДНК гена серотонинового рецептора мыши (5HT1C) в культуре клеток насекомых. *Молекуляр. биология.* **38**, 477–482.
37. Гришук Ю.В., Рубцов П.М., Белжеларская С.Н. 2007. Экспрессия и функциональный анализ стероид 21-гидроксилазы человека и ее мутантного варианта в клетках насекомых. *Молекуляр. биология.* **41**, 77–78.
38. Grischuk Yu., Rubtsov P., Riepe F., Grotzinger J., Beljelarskaya S., Prassolov V., Kalintchenko N., Semitcheva T., Peterkova V., Tiulpakov A., Sippell W.G., Krone N. 2006. Four novel missense mutations in the *CYP21* gene in Russian patients with classical form of congenital adrenal hyperplasia (CAH): identification, functional characterization and structural modeling. *J. Clin. Endocrin. Metab.* **91**, 4976–4980.
39. Hasemann G.A., Capra J.D. 1990. High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 3842–3846.
40. Ermst W., Grabherr R., Wegner D., Borth N., Grassauer A., Katinger H. 1998. Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epitope library. *Nucl. Acids Res.* **26**, 1717–1723.
41. Weyer U., Possee R.D. 1991. A baculovirus dual expression vector derived from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin and p10 promoters: coexpression of two influenza virus genes in insect cells. *J. Gen. Virol.* **72**, 2967–2974.
42. Pajot-Augy E., Bozon V., Remy J.J., Couture L., Salesse R. 1999. Critical relationship between glycosylation of recombinant lutropin receptor ectodomain and its secretion from baculovirus-infected insect cells. *Eur. J. Biochem.* **260**, 635–648.
43. Jarvis D.L. 1993. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system. *Ann. New York Acad. Sci.* 240–246.
44. Harrison R.L., Jarvis D.L. 2006. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and efforts to engineer insect cells to produce “mammalianized” recombinant glycoproteins. *Adv. Virus. Res.* **68**, 159–191.
45. Harrison R.L., Jarvis D.L. 2007. Transforming lepidopteran insect cells for improved protein processing. *Meth. Mol. Biol.* **388**, 341–356.
46. Shi X., Jarvis D.L. 2007. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr. Drug. Targets.* **8**, 1116–1125.
47. Jarvis D.L. 2009. United States Patent Application: 20090288178
48. Jarvis D.L., Beek N.V., Fraser M. 2007. United States Patent Application: US20070067855.
49. Hollister J.R., Jarvis D.L. 2001. Engineering lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase and alpha 2,6-sialyltransferase genes. *Glycobiology.* **11**, 1–9.
50. Hollister J.R., Grabenhorst E., Nimitz M., Conradt H., Jarvis D.L. 2002. Engineering the protein N-glycosylation pathway in insect cells for production of biantennary, complex N-glycans. *Biochemistry.* **41**, 15093–15104.
51. van Patten S.M., Hughes H., Huff M.R., et al. 2007. Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease. *Glycobiology.* **17**(5), 467–478.
52. Aumiller J.J., Hollister J.R., Jarvis D.L. 2003. A transgenic lepidopteran insect cell line engineered to produce CMP-sialic acid and sialoglycoproteins. *Glycobiology.* **13**, 497–507.
53. Seo N.S., Hollister J.R., Jarvis D.L. 2001. Mammalian glycosyltransferase expression allows sialoglycoprotein production by baculovirus-infected insect cells. *Prot. Exp. Purif.* **22**, 234–241.
54. Pajot-Augy E., Bozon V., Remy J.-J., Couture L., Salesse R. 1999. Critical relationship between glycosylation of recombinant lutropin receptor ectodomain and its secretion from baculovirus – infected insect cells. *Eur. J. Biochem.* **260**, 635–648.
55. Fath-Goodin A., Kroemer J., Martin S., Reeves K., Webb B.A. 2006. Polydnavirus genes that enhance the baculovirus expression vector system. *Adv. Virus Res.* **68**, 75–90.
56. Kulakovskiy P.C., Shuler M.L., Wood H.A. 1998. N-glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in three insect cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **34**, 101–108.
57. Shi Xianzong Jarvis, Donald L. 2007. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr. Drug. Targets.* **8**, 1116–1125.
58. Yokoyama N., Hirata M., Ohtsuka K., Nishiyama Y., et al. 2000. Co-expression of human chaperonas Hsp70 and Hsc70 or Hsp40 cofactor increase solubility of overexpressed target proteins in insect cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1493**, 119–124.
59. Bruns J.B., Carattino M.D., Sheng S., Maarou A.B. 2007. Epithelial Na<sup>+</sup> channels are fully activated by furin- and prostatin-dependent release of an inhibitory peptide from the  $\gamma$  – subunit. *J. Biol. Chem.* **282**, 6153–6160.
60. Hughey R.P., Bruns J.B., Kinlough C.L., Harkleroad K.L., Tong Q., Carattino M.D., Johnson J.P., Stockand J.D., Kleyman T.R. 2004. Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 18111–18114.
61. Laprise M.H., Grondin F., Dubois C.M. 1998. Enhanced TGPH maturation in high five cells coinfecting with recombinant baculovirus encoding the convertase furin\pace; improved technology for the production of recombinant proproteins in insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 85–91.
62. Posthaus H., Dubois C.M., Laprise M.H., Grondin F., Suter M.M., Muller E. 1998. Proprotein cleavage of E-cadherin by furin in baculovirus over-expression system: potential role of other convertase in mammalian cells. *FEBS Lett.* **438**, 306–310.

63. Lee D.-F., Chen C.-C., Hsu T.-A., Juang J.-L. 2000. A baculovirus superinfection system: Efficient vehicle for gene transfer into *Drosophila* S2 cells. *J. Virol.* **74**, 11873–11880.
63. Ailor E., Betenbaugh M.J. 1998. Overexpression of a cytosolic chaperone to improve solubility and secretion of a recombinant IgG protein in insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 196–203.
64. Laurent S., Vautherot J.-F., Madelaine M.-F., Le Call C., Rasschaert D. 1994. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into virus particles and induces protection. *J. Virol.* **68**, 6794–6798.
65. Malim M.H., Tiley L.S., McCarn D.F., Rusche J.R., Hauber J., et al. 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the rev *trans*-activator to its RNA target sequence. *Cell.* **60**, 675–683.
66. Walker N.P.C., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferenz C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C., Hammill L.D. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1-beta-converting enzyme: a(p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell.* **78**, 343–352.
67. Angelo C., Smith G.E., Summers M.D., Krug R.M. 1987. Coexpression of three or more recombinant polymerases influences in insect cells. *Virology.* **67**, 361–365.
68. Conner M., Zarley C., Hu B., Parsons S., Drabinski D., Greiner S., Smith R., Jiang B. 1996. Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J. Infect Dis.* **174**, 88–92.
69. Hu Y.C., Bentley W.E., Edwards G.H., Vakharia V.N. 1999. Chimeric infectious bursal disease virus-like particles expressed in insect cells and purified by immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 721–729.
70. Hu Y.C., Hsu T.A., Huang J.H., Ho M.S., Ho Y.S. 2003. Formation of enterovirus-like particle aggregates by recombinant baculoviruses co-expressing P1 and 3CD in insect cells. *Biotechnol. Lett.* **25**, 919–925.
71. Mortola E., Roy P. 2004. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett.* **576**, 174–178.
72. Belyaev A.S., Roy P. 1993. Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1219–1223.
73. Adler S., Reay P., Roy P. 1998. Induction of T cell response by bluetongue virus core-like particles expressing a T cell epitope of the M1 protein of influenza A virus. *Med. Microbiol. Immunol.* **187**, 91–96.
74. Luo L., Kang C.Y. 1990. Expression of gag precursor protein and secretion of virus-like gag particles of HIV-2 from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Virology.* **179**, 874–880.
75. Xi S.Z., Bants L.M. 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *J. Gen. Virol.* **72**, 2991–2998.
76. Newcomb W.W., Homa F.L., Thomsen D.R., Booy F.P., Trus B.L., Steven A.C., Spencer J.V., Brown J.C. 1996. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J. Mol. Biol.* **263**, 432–446.
77. Newcomb W.W., Homa F.L., Thomsen D.R., Brown J.C. 2001. *In vitro* assembly of the herpes simplex virus procapsid: formation of small procapsids at reduced scaffolding protein concentration. *J. Struct. Biol.* **133**, 23–31.
78. Touze A., Bousarghin L., Ster C., Combita A.-L., Roingeard P., Coursaget P. 2001. Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *J. Gen. Virology.* **82**(12), 3005–3009.
79. Goldman C., Petry H., Frye S., Ast O., Ebitsch S., Klaus-Diter J., Kaup F.J., Weber F., Trebst C., Nisslein T., Hunsmann G., Weber T., Lüke W. 1999. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J. Virol.* **73**, 4465–4469.
80. Notka F., Stahl-Hennig C., Dittmer U., Wolf H., Wagner F. 1999. Construction and characterization of recombinant VLPs and Semliki-Forest virus live vectors for comparative evaluation in the SHIV monkey model. *Biol. Chem.* **380**, 341–352.
81. Ke A., Gillock E.T., Sweat J.A., Reeves W.M., Consigli R.A. 1999. Use of baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J. Gen. Virol.* **80**, 1009–1016.
82. Casal J.I. 1999. Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 141–150.
83. Crawford S.E., Estes M.K., Ciarlet M., Barone C., O'Neal C.M., Cohen J., Conner M.E. 1999. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J. Virol.* **73**, 4813–4822.
84. Xiang J., Wunschmann S., George S.L., Klinzman D., Schmidt W.N., LaBrecque D.R., Stapleton J.T. 2002. Recombinant hepatitis C virus-like particles, expressed by baculovirus: utility in cell-binding and antibody detection assays. *J. Med. Virol.* **68**, 537–43.
85. Zhao W., Liao G.Y., Jiang Y.J., Jiang S.D. 2003. No requirement of HCV 5'NCR for HCV like particles assembly in insect cells. *J. Gastroenterol.* **10**, 2226–2231.
86. Bartosch B., Dubuisson J., Cosset F.L. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* **197**, 633–642.
87. Белжеларская С.Н., Королева Н.Н., Попенко В.В., Друца В.Л., Орлова О.В., Рубцов П.М., Кочетков С.Н. 2010. Синтез и характеристика структурных белков и вирусоподобных частиц вируса гепатита с помощью бакуловиральной системы экспрессии в клетках насекомых. *Молекуляр. биология.* **44**, 107–119.
88. Kang C.Y., Luo L., Wainberg M.A., Li Y. 1999. Development of HIV/AIDS vaccine using chimeric gag-env virus-like particles. *Biol. Chem.* **380**, 341–352.
89. Gronowski A.M., Hilbert D.M., Sheehan K.C.F., Garrow G. 1999. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J. Virol.* **73**, 9944–9951.
90. Schiller J.T., Lowy D.R. 2010. Vaccines to prevent infections by oncoviruses. *Annu Rev. Microbiol.* **64**, 23–41.

91. Hofmann C., Sandig V., Jennings G., Rudolph M., Schlag P., Strauss M. 1995. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 10099–10103.
92. Boyce F.M., Bucher N.L.R. 1996. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 2348–2352.
93. Huser A., Hofmann C. 2003. Baculovirus vector: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their application. *Am. J. Pharmacogenomics*. **3**, 53–63.
94. Matsuura Y., Shoji I., Yap C.-C., Tani H., Ishii K., Miyamura T. 1997. Gene transfer into mammalian cells by baculovirus vector and its applications. *Virus*. **47**, 247–256.
95. Condreay J.P., Witherspoon S.M., Clay W.C., Kost T.A. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells, transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 127–132.
96. Shoji I., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Chiba T., Saito I., Miyamura T., Matsuura Y. 1997. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J. Gen. Virology*. **78**, 2657–2664.
97. Kost T., Condreay J.P. 1999. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 428–433.
98. Hu Y.-C. 2005. Baculovirus as a high efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol. Sinica*. **26**, 405–416.
99. Белжеларская С.Н. 2002. Бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых. *Молекуляр. биология*. **36**, 371–385.
100. Fipaldini C., Bellei B., La Monica N. 1999. Expression of hepatitis C virus cDNA in human hepatoma cell line mediated by a hybrid baculovirus-HCV vector. *Virology*. **255**, 302–311.
101. Sandig V., Hofmann C., Steinert S., Jennings G., Schlag P., Strauss M. 1996. Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1937–1945.
102. Tani H., Limn C.K., Yap C.C., Onishi M., Nozaki M., Nishimune Y., Okahashi N., Kitagawa Y., Watanabe R., Mochizuki R., Moriishi K., Matsuura Y. 2003. *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.* **77**, 9799–808.
103. Song U.S., Shin S.-H., Kim S.-Ki., Choi G.-S., Kim W.-C., Lee M.-H., Kim S.-J., Kim I.-H., Choi M.-S., Hong Y.-J., Lee K.-H. 2003. Effective transduction of osteogenic sarcoma cells by a baculovirus vector. *J. Gen. Virol.* **84**, 697–703.
104. Palombo F., Monciotti A., Recchia A., Cortese R., Ciliberto G., La Monica N. 1998. Site-specific integration in mammalian cells mediated by a new hybrid baculovirus-adeno-associated virus vector. *J. Virol.* **72**, 5025–5034.
105. Chuang C.K., Sung L.Y., Hwang S.M., Lo W.H., Chen H.C., Hu Y.C. 2007. Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering. *Gene Ther.* **14**, 1417–1424.
106. Chen H.-C., Chang Y.-H., Chuang C.-K., Lin C.-Y., Sung L.-Y., Wang Y.-H., Hu Y.-C. 2009. The repair of osteochondral defects using baculovirus – mediated gene transfer with de-differentiated chondrocytes in bioreactor culture. *Biomaterials*. **30**, 674–681.
107. Королева Н.Н., Спиринов П.В., Тимохова А.В., Рубцов П.М., Кочетков С.Н., Прасолов В.С., Белжеларская С.Н. 2010. Бакуловирусные векторы для эффективной доставки и экспрессии генов в клетках млекопитающих. *Молекуляр. биология*. **44**, 541–550.
108. Yap C.-C., Ishii K., Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Shimizu H., Ueno Y., Miyamura T., Matsuura Y. 1997. A hybrid baculovirus –T7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology*. **231**, 192–200.
109. Ramos L., Kopec L.A., Sweitzer S.M., Fornwald J.A., Zhao H., McAllister P., McNulty D.E., Trill J.J., Kane J.F. 2002. Rapid expression of recombinant proteins in modified CHO cells using the baculovirus system. *Cytotechnology*. **38**, 37–41.
110. van Loo N.D., Fortunati E., Ehlert E., Rabelink M., Grosveld F., Scholte B.J. 2001. Baculovirus infection of non-dividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J. Virol.* **75**, 961–970.
111. Barsoum J., Brown R., McKee M., Boyce F.M. 1997. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis G glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* **8**, 2011–2018.
112. Tami C., Farber M., Palma E.L., Taboga O. 2000. Presentation of antigenic sites from foot – and- mouth disease virus on the surface of baculovirus and in the membrane of infected cells. *Arch. Virol.* **145**, 1815–1828.
113. Ojala K., Mottershead D.G., Suokko A., Oker-Blom C. 2001. Specific binding of baculoviruses displaying gp64 fusion proteins to mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res.* **284**, 777–784.
114. Sarkis J. 2000. A comparative analysis of DEA as a discrete alternative multiple criteria decision tool. *Eur. J. Oper. Res.* **123**, 543–557.
115. Duisit G., Saleun S., Douthe S., Barsoum J., Chadeuf G., Moullier P. 1999. Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparin sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *J. Gene Med.* **1**, 93–102.
116. Tani H., Nishijima M., Ushijima H., Miyamura T., Matsuura Y. 2001. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology*. **279**, 343–353.
117. Sollerbrant K., Elmen J., Wahlestedt C., Acker J., Lebloy-Prehaud H., Latta-Mahieu M., Yeh P., Perricaudet M. 2001. A novel method using baculovirus-mediated gene transfer for production of recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Gen. Virol.* **82**, 2051–2060.
118. Cheshenko N., Krougliak N., Eisensmith R.C., Krougliak V.A. 2001. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther.* **8**, 846–854.
119. Merrinew R.V., Clay W.C., Condreay J.P., Witherspoon S.M., Dallas W.S., Kost T.A. 2001. Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells. *J. Virol.* **75**(2), 903–909.

120. Sandig V., Hofmann C., Steinert S., Ennings G., Schlag P., Strauss M. 1996. Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1937–1945.
121. Hofmann C., Strauss M. 1998. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther.* **5**, 531–536.
122. Hofmann C., Huser A., Lehnert W., Strauss M. 1999. Protection of baculovirus-vectors against complement-mediated inactivation by recombinant soluble complement receptor type 1. *Biol. Chem.* **380**, 393–395.
123. Kaikkonen M.U., Maatta A.I., Yla-Herttuala S., Airene K. 2010. Screening of complement inhibitors: Shielded baculoviruses increase the safety and efficacy of gene delivery. *Mol. Ther.* **18**, 987–989.
124. Kircheis R., Wightman L., Schreiber A., Robitza B., Rossler V., Kursu M., Wagner E. 2001. Polyethyleneimine/DNA complexes shielded by transferring target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* **8**, 28–40.
125. Huser A., Rudolph M., Hofmann Ch. 2001. Incorporation of decay accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors. *Nat. Biotechnol.* **19**, 451–455.
126. Brodbeck W.G., Liu D., Sperry J., Mold C., Medof M.E. 1996. Localization of classical and alternative pathway regulatory activity within decay-accelerating factor. *J. Immunol.* **156**, 2528–2533.
127. Ory D.S., Neugeboren B.A., Mulligan R.C. 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 11400–11406.
128. Airene K.J., Hiltunen M.O., Turunen M.P., Turunen A.-M., Laitinen O.H., Kulomaa M.S., Yla-Herttuala S. 2000. Baculovirus-mediated periaxonal gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* **7**, 1499–1504.
129. Liu Catherine Y.Y., Wang Ch.H., Wang J.Ch., Chao Yu.Ch. 2007. Stimulation of baculovirus transcriptome expression in mammalian cells by baculoviral transcriptional activators. *J. General Virol.* **88**, 2176–2184.
130. Jarvis D.L., Weinkauff C., Guarino L.A. 1996. Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* **8**, 191–203.