

УДК 578.5

ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ АДЕНОВИРУСЫ В ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2012 г. В. А. Святченко^{1,2}, М. В. Тарасова², С. В. Нетесов^{1,2}, П. М. Чумаков^{2,3,4*}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл. 630559, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск 630090, Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва 119991, Россия

⁴Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland OH 44195, USA

Поступила в редакцию 23.12.2011 г.

Принята к печати 27.01.2012 г.

Литическая вирусная инфекция сопровождается образованием нового поколения вирионов и гибелью клетки. Опухолевые клетки обладают, как правило, повышенной чувствительностью к вирусам. Изучение явления вирусного онколиза указывает на возможность его использования в качестве альтернативного подхода к терапии рака. Способность вирусов селективно убивать клетки опухоли была отмечена давно, но лишь в последние годы, благодаря углублению знаний в области молекулярной биологии вирусов и клетки, а также разработке методов направленной модификации свойств вирусов, появилась возможность получения вариантов вирусов, обладающих максимальным терапевтическим потенциалом. Аденовирусы считаются одной из наиболее изученных моделей онколитических вирусов. Эти ДНК-содержащие вирусы удобны для генно-инженерных манипуляций и относительно малопатогенны. В представленном обзоре суммированы сведения о направлениях и подходах к созданию высокоэффективных онколитических аденовирусов, включая направленную генетическую модификацию, ускоренную селекцию онколитических вариантов после действия мутагенов, использование аденовирусов в качестве векторов для введения терапевтических генов, улучшение систем доставки, минимизацию действия иммунной системы организма и др. Состояние исследований в этой области позволяет надеяться на скорое введение многих вариантов онколитических аденовирусов в медицинскую практику.

Ключевые слова: онколитические аденовирусы, рак, генная терапия, p53.

ONCOLYTIC ADENOVIRUSES IN ANTI-CANCER THERAPY: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES, by V. A. Svyatchenko^{1,2}, M. V. Tarasova², S. V. Netesov^{1,2}, P. M. Chumakov^{2,3,4*} (¹State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia; ²Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia; ³Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ⁴Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland OH 44195; *e-mail: chumakovpm@yahoo.com). Lytic viral infection results in production of viral progeny, and lysis of the infected cells. Tumor cells are usually more sensitive to virus infection. Studies of viral oncolysis indicate that it could represent a promising alternative approach to cancer therapy. The ability of viruses to kill selectively cancer cells had been noticed for quite a long time ago. However, only in recent years, based on deeper understanding of molecular biology of viruses and the cell and due to the development of modern methods for directed modification of viruses, there emerged a real opportunity for development of virus variants with improved therapeutic potential. Adenoviruses represent one of the most studied models of oncolytic viruses. The DNA-containing viruses are very suitable for genetic manipulation and show minimal pathogenicity. The review summarizes data on directions and approaches aiming generation of highly efficient variants of oncolytic adenoviruses. The approaches include introduction of directed genetic modifications into viral genome, accelerated selection of oncolytic viral variants following treatment with mutagens, the use of adenoviruses as vectors for introduction of therapeutic gene products, optimization of viral delivery systems, minimalization of negative effects from the host immune system etc. The dynamic development of studies in the field holds promise for introduction into clinical practice of many variants of oncolytic adenoviruses in the very near future.

Keywords: oncolytic adenoviruses, cancer, gene therapy, p53.

Принятые сокращения: Ad – аденовирусы (при указании серотипа); CAR – рецептор вирусов Коксаки и аденовирусов; CELO – аденовирус птиц серотипа I; ITR – инвертированные концевые повторы; PKR – РНК-зависимая протеинкиназа R; БОЕ – бляшкообразующая единица; GM-CSF – фактор, стимулирующий рост колоний гранулоцитов и макрофагов; МСК – мезенхимные стволовые клетки; НСК – нервные стволовые клетки; TNF α – фактор некроза опухоли α ; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты; IL – интерлейкин.

* Эл. почта: chumakovpm@yahoo.com

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на успехи в диагностике и терапии опухолей, в развитых странах смертность от злокачественных новообразований занимает второе место, уступая только сердечно-сосудистым заболеваниям. В настоящее время основными при онкологических заболеваниях являются хирургические методы, химио- и радиационная терапия. Однако многие формы опухолей относятся к неоперабельным, устойчивым к химио- и радиотерапии. Кроме того, существенный минус химио- и радиотерапии — их низкий терапевтический индекс, из-за чего увеличение дозы или комбинирование подходов для преодоления устойчивости или усиления разрушения раковых клеток сопровождается токсичностью и повреждением нормальных тканей. Поэтому высокой остается потребность в новых эффективных и высокоспецифичных средствах терапии онкологических заболеваний.

В последние десятилетия интенсивно изучается возможность разработки противоопухолевых средств на основе онколитических вирусов. Концепция использования вирусов при злокачественных новообразованиях восходит к началу двадцатого века, когда заметили спонтанную регрессию опухолей после введения антирабической вакцины или перенесенного вирусного заболевания [1]. В частности, описаны случаи ремиссии у больных лимфомами Бёркитта и Ходжкина, перенесших корь [2]. Проведенные в 20-е годы XX века опыты на животных подтвердили, что вирусы могут заражать и лизировать экспериментальные опухоли у мышей, а в 1950-х появилось несколько сообщений об онколитических свойствах птичьего вируса болезни Ньюкасла и вируса гриппа [3, 4]. В конце 40-х и начале 50-х годов начались доклинические и клинические исследования онколитических вирусов как потенциальных противоопухолевых средств. Первое сообщение об онколитических свойствах аденовирусов человека было опубликовано в 1956 году в докладе Национального Института Рака (США). В этом докладе сообщалось об испытании эффективности различных серотипов аденовирусов дикого типа при раке шейки матки [5]. Более чем у половины больных, получивших живые аденовирусы, наблюдалась регрессия опухоли без заметной токсичности, в отличие от контрольной группы, получавшей инактивированный вирус и не показавшей никакого ответа.

Разработка методов генетической инженерии и установление молекулярных механизмов взаимодействия вируса и клетки открыли дорогу для направленной модификации аденовирусов с целью обеспечения их максимальной избирательности в отношении раковых клеток и отсутствия патогенности для человека. К настоящему времени опубликовано более 2000 научных работ, по-

священных онколитическим вирусам и перспективам их применения в клинической практике, причем приблизительно в половине из них моделями служили аденовирусы человека. Подобная популярность аденовирусов не случайна. Аденовирусы, особенно второй и пятый серотипы (Ad2 и Ad5), в целом слабопатогенны для человека, они не вызывают серьезных заболеваний. Кроме того, аденовирусы способны заражать широкий круг клеток человека, как делящихся, так и не делящихся и принадлежащих к различным тканям. Аденовирусный геном представлен двухцепочечной ДНК (дцДНК), что удобно для всевозможных генетических манипуляций.

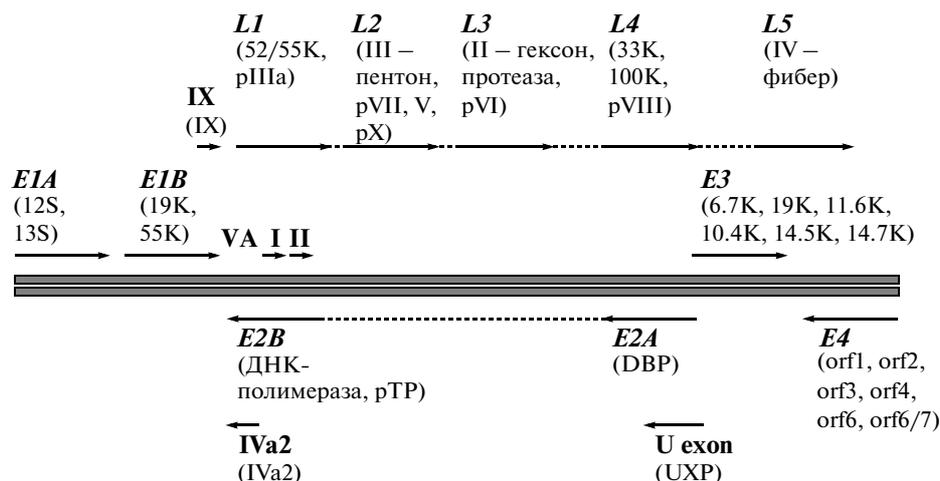
Инфекционный цикл аденовируса можно разделить на две фазы. Первая, или ранняя фаза, — это прикрепление и проникновение вируса в хозяйскую клетку и транспортировка вирусного генома в клеточное ядро, за которой следуют выборочная транскрипция и трансляция ранних генов. Эти ранние события модулируют функционирование клетки для облегчения репликации вирусной ДНК и экспрессии поздних генов. В результате такой модуляции происходит сборка в ядре вирусных капсидов из структурных белков и созревание инфекционных вирусов. Ранняя фаза в перmissive клетках может занимать около 6–8 ч (в зависимости от числа внешних факторов), в то время как поздняя фаза обычно короче — 4–6 ч [6].

В семидесятые годы аденовирусы использовали в качестве модельного организма для изучения экспрессии генов, благодаря чему их структурно-функциональная организация была всесторонне изучена. Аденовирусы исключительно удобны в качестве векторов для доставки и экспрессии чужеродных генов. Наконец, что немаловажно, аденовирусы способны хорошо расти в культуре клеток, причем векторные аденовирусы могут быть наработаны и сконцентрированы до высоких титров — вплоть до 10^{13} бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл [7].

В настоящее время на основе аденовирусов разработано два класса противоопухолевых средств: дефектные по репликации аденовирусные векторы, способные переносить и экспрессировать терапевтические трансгены, и компетентные по репликации онколитические аденовирусы, способные избирательно заражать и убивать опухолевые клетки, а также осуществлять доставку в заражаемые клетки терапевтических генов.

АДЕНОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

Аденовирусы представляют собой икосаэдрические частицы от 70 до 90 нм в диаметре, не имеющие липидной мембраны. Аденовирусы всех типов имеют одинаковую общую организацию генома; у всех аденовирусов человека гены бел-



Схематическая карта генома аденовируса типа 2. Стрелками обозначены семейства мРНК. Пунктиром показаны участки, транскрибируемые в виде единой первичной мРНК. В скобках указаны названия белков, транслируемых с процессированных мРНК данного семейства. Транскрипция клеточной РНК-полимеразой II происходит с обеих цепей вирусной хромосомы и инициируется (у Ad2) с пяти ранних (Early) промоторов (образуются семейства мРНК *E1A*, *E1B*, *E2*, *E3* и *E4*), двух промежуточных промоторов (семейства мРНК *IX* и *IVa2*), позднего (major Late) промотора (при процессинге первичной мРНК формируется пять семейств мРНК – *L1*, *L2*, *L3*, *L4* и *L5*), а также промотора экзона U (*U exon*), образующего с двумя другими меньшими экзонами (на схеме не обозначены) белок экзона U (UXP). Кроме того, аденовирусный геном содержит один или два (в зависимости от серотипа) гена вирус-ассоциированной (*VA*) РНК, транскрибируемого(ых) клеточной РНК-полимеразой III.

ков, выполняющих специфическую функцию, локализованы в одинаковых позициях вирусной хромосомы [8]. Геном аденовирусов представлен дцДНК размером от 26 до 48 т.п.н., на концах которой локализованы инвертированные концевые повторы (ITR) длиной от 36 до 371 п.н. в зависимости от серотипа. На каждом конце вирусной хромосомы содержится по одному идентичному участку начала репликации. Геном также имеет *цис*-действующий сигнал упаковки, который занимает несколько сотен пар нуклеотидов в концевой области вирусной хромосомы [9]. Схема строения аденовирусного генома на примере Ad2 приведена на рисунке.

К сегодняшнему дню известно более 50 серотипов аденовируса человека [10]. Большинство аденовирусных векторов сконструировано на основе Ad5. Первое поколение аденовирусных векторов создано путем замены кодирующих участков блоков ранней транскрипции *E1* и/или *E3* на чужеродные гены. Поскольку продукты гена *E1A* необходимы для транскрипции других ранних генов и регуляции экспрессии клеточных белков, которые отвечают за репликацию ДНК, удаление участка гена *E1A* исключает возможность самостоятельной репликации такого вируса в клетке, т.е. делает вектор репликационно-дефектным. Однако векторы, из которых удалена область *E1*, сохраняют способность к репликации в хелперной линии клеток HEK293, содержащей и экспрессирующей 11% генома Ad5, в том числе всю область *E1*. Это делает возможной замену практи-

чески всей области *E1* (вплоть до 3181 н.) за исключением сигнала упаковки и области, кодирующей белок IX. Известно, что вирионы Ad5 способны упаковывать не только свой полный геном, но еще до 5% чужеродной ДНК [11], поэтому аденовирусный вектор с делецией области *E1* может нести трансген размером до 4.7–4.9 т.п.н. Емкость вектора можно дополнительно увеличить, если удалить область *E3*, практически неважную для репликации вируса. Комбинированная делеция областей *E1* и *E3* увеличивает суммарную емкость вектора до 8.3 т.п.н.

Аденовирусные векторы второго поколения содержат дополнительные делеции, которые уменьшают число кодируемых вирусных белков и тем самым снижают иммунный ответ, направленный против вектора. В векторах второго поколения помимо области *E1* удалены также области *E2* и/или *E4* [12]. Область *E2* кодирует белки, участвующие в репликации вирусной хромосомы: ДНК-полимеразу, ДНК-связывающий белок (DBP) и терминальный белок, связывающий 5'-конец ДНК (TP и его предшественник рTP). Область *E4*, расположенная на правом конце аденовирусного генома, кодирует белки, необходимые для репликации вирусной ДНК, синтеза поздних белков и подавления синтеза клеточных белков. Для размножения векторов с делецией областей *E1/E4* специально созданы клеточные линии, способные комплементировать область *E4*.

Аденовирусные векторы третьего поколения, так называемые “выпотрошенные” векторы [13,

14], созданы по принципу дальнейшей минимизации числа аденовирусных генов. Репликация таких векторов зависит от вируса-помощника, поставляющего белки для упаковки векторной ДНК в псевдовиральные частицы. Принципиальным преимуществом таких хелпер-зависимых векторов является еще большая клонирующая емкость. При удалении всех генов, кодирующих вирусные белки, суммарная емкость вектора может быть увеличена до 35 т.п.н., поскольку *цис*-действующие элементы вирусного генома, необходимые для репликации и упаковки вектора (включая ITR), занимают лишь 500 п.н. на концах генома. Важно также, что удаление всех вирусных генов позволяет избежать развития нежелательного иммунного ответа хозяина.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕПЛИКАЦИОННО-ДЕФЕКТНЫХ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

В 90-е годы дефектные по репликации Ad5-векторы впервые применили в клинической практике для доставки терапевтических генов. С учетом природного тропизма аденовирусов, сконструированные на их основе векторы использовали для переноса генов в клетки дыхательного эпителия и в терапии плоскоклеточного рака головы и шеи [15, 16]. Клинические испытания Ad5-вектора, экспрессирующего ген регулятора трансмембранной проводимости, в качестве средства для генотерапии муковисцидоза показали достаточно эффективную и толерантную доставку этого гена в клетки дыхательного эпителия человека [16]. Репликационно-дефектный Ad5 использовали также для переноса гена-супрессора *p53* в опухолевые клетки больных раком легкого. При этом наблюдали определенный терапевтический эффект от применения этого вируса в комбинации с цисплатином [17]. На основе этих и подобных рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих *p53*, получены препараты INGN 201 (Advexin) и Gendicine. Gendicine [18] — это рекомбинантный Ad5, в котором область *E1* заменена кассетой, экспрессирующей *p53* под контролем промотора вируса саркомы Рауса. В 2003 году Gendicine прошел патентование и лицензирование в Китае, став, таким образом, первым в мире рекомбинантным онколитическим препаратом, разрешенным к практическому применению. В клинических испытаниях (фазы II и III) Gendicine действовал синергично с радио- и химиотерапией, а также в сочетании с гипертермией [18].

Дефектные по репликации аденовирусные векторы использовали также для экспрессии цитотоксических генов. Рекомбинантный вектор Ad-OC-ТК экспрессирует тимидинкиназу, ген которой встроен в область *E1* под контроль про-

мотора гена остеокальцина. Клинические испытания этого вектора указывают, с одной стороны, на экспрессию этого суицидального гена в зараженных клетках-мишенях, а с другой, выявляют терапевтический эффект, который усиливается при сочетании с химиотерапией доцетакселом и эстрамустином [19].

ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ АДЕНОВИРУСЫ, СПОСОБНЫЕ РЕПЛИЦИРОВАТЬСЯ В КЛЕТКАХ ОПУХОЛИ

Основной недостаток репликационно-дефектных аденовирусов — относительно невысокий уровень экспрессии трансгенов, обусловленный неспособностью вируса к самостоятельной репликации, что снижает их терапевтический эффект. Экспрессия терапевтического гена в составе такого вектора обычно носит кратковременный характер и не затрагивает клетки, примыкающие к первоначально инфицированным участкам, т.е. введенный вектор не воздействует на клеточное окружение. Разработка аденовирусных векторов началась именно с репликационно-дефектных вариантов, так как на ранних этапах работ приоритет отдавался безопасности. Однако впоследствии появились аргументы против излишних опасений по поводу потенциальной угрозы применения реплицирующихся аденовирусных векторов. Во-первых, аденовирусы реплицируются с большей эффективностью в клетках с нарушенной регуляцией клеточного цикла [20], т.е. в опухолевых. Во-вторых, онколитические штаммы аденовирусов принадлежат преимущественно к серогруппе С. Инфицирование такими вирусами иммунокомпетентных взрослых людей в абсолютном большинстве случаев протекает без всяких проявлений [21, 22]¹. Наконец, при маловероятной генерализации инфекционного процесса, вызванного модифицированными онколитическими штаммами, можно применять противовирусные средства [24]. В целом, преимущества репликационно-компетентных аденовирусных векторов перевешивают их недостатки. Далее мы сосредоточимся на рассмотрении этой группы онколитических аденовирусов.

Онколитические вирусы разрабатываются для направленного уничтожения злокачественных клеток. В основе избирательности их действия ле-

¹ Стоит, однако, отметить случай, когда в Институте генной терапии человека университета штата Пенсильвания на четвертый день после введения рекомбинантного аденовируса, примененного в качестве генной терапии наследственной недостаточности орнитинтранскарбамилазы, скончался 18-летний больной [23]. У этого больного было редкое иммунное нарушение, он умер вследствие гиперреакции иммунной системы. Учитывая вероятность подобных случаев, перед вирусной терапией, как правило, должна проводиться проверка на толерантность.

жат три основных механизма. Первый основан на том, что, реплицируясь, вирус вызывает гибель зараженной, чувствительной к нему раковой клетки, не затрагивая нормальные клетки. Образовавшееся при этом потомство вируса заражает соседние чувствительные к нему клетки и также вызывает их гибель. В результате наблюдается продолжительный эффект, который сопровождается многократным умножением введенной дозы вируса. Этот процесс прекращается только либо за счет формирования иммунного ответа, либо в результате уничтожения всех чувствительных клеток. В процессе репликации вирусы синтезируют белки, токсичные для опухолевых клеток. В частности, к таким белкам у аденовирусов относится “белок смерти” (11.6 кДа продукт области E3) и белок E4orf4 [25].

Второй механизм, обуславливающий гибель опухолевых клеток под действием онколитических вирусов, связан с индукцией неспецифического и специфического противоопухолевого иммунитета. Так, заражение опухолевых клеток аденовирусом, экспрессирующим белок E1A, приводит к увеличению их чувствительности к фактору некроза опухоли α (TNF α) [26]. Особенно важна индукция специфического противоопухолевого иммунитета, приводящего к долгосрочному действию и предотвращению рецидивов. При заражении опухолью вирусом наблюдается ее инфильтрация лимфоцитами, антигенпредставляющими клетками, а также повышение уровня цитокинов. Вирусные антигены представлены на клеточной поверхности в составе белков главного комплекса гистосовместимости класса I. Этот комплекс опознается цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ), которые привлекаются к зараженным опухолевым клеткам. С помощью еще не установленного механизма эти ЦТЛ в процессе распознавания вирусных антигенов и разрушения клеток приобретают специфичность к опухолевым антигенам [27]. Так, при экспериментальной терапии меланом и рака яичников специфический иммунитет активировали при помощи онколизатов (экстрактов зараженных опухолевых клеток), что приводило к индукции гуморального иммунного ответа в отношении антигенов опухолевых клеток [28].

Третий механизм онколитической активности аденовирусов связан с их способностью вызывать увеличение чувствительности раковых клеток к химио- и радиационной терапии. Например, продукт аденовирусного гена E1A увеличивает чувствительность опухолевых клеток, особенно клеток с функциональным p53, повышая его уровень [29]. Интересно, что продукт аденовирусного гена E1A может усиливать чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам даже в отсутствие функционального p53, хотя этот механизм пока не совсем ясен [30, 31].

“ВООРУЖЕННЫЕ” ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ АДЕНОВИРУСЫ, КОМПЕТЕНТНЫЕ ПО РЕПЛИКАЦИИ

Эффективный подход к созданию онколитических вирусов основан на введении в вирусный геном терапевтических трансгенов. Такие штаммы онколитических аденовирусов условно называют “вооруженными”. Можно выделить пять основных приемов, приводящих к усилению онколитического действия репликационно-компетентных аденовирусов.

Экспрессия чужеродных цитотоксических белков или повышение экспрессии собственных цитотоксических белков аденовирусов

Наиболее часто трансген встраивают в область E3. Распространение аденовирусов в опухолях можно усилить, повысив экспрессию аденовирусного “белка смерти” [32]. С этой же целью сконструированы штаммы, которые экспрессируют белки ряда оболочечных вирусов, обладающие фузигенными свойствами, т.е. способные вызывать слияние мембран прилегающих клеток и тем самым способствовать распространению вирусной инфекции от клетки к клетке без выхода наружу [33]. Чтобы сделать опухолевое микроокружение более проницаемым для онколитического аденовируса, сконструирован штамм, экспрессирующий пептид релаксин [34, 35], который усиливает синтез металлопротеиназ и снижает продукцию коллагена. Распространение такого штамма внутри опухоли и его онколитическая активность оказались значительно выше, чем у родительского вируса. Сконструированы также штаммы, продуцирующие белки, которые обладают прямым цитотоксическим действием. Получены обнадеживающие данные, указывающие на противоопухолевую активность онколитических аденовирусов, которые экспрессируют TNF α или апоптоз-индуцирующий лиганд TRAIL [5, 36–38].

Экспрессия генов, повышающих токсичность пролекарств

Этот способ заключается в доставке и экспрессии в опухолевых клетках генов ферментов, способных превращать нетоксичные соединения (пролекарства) в токсичные антиметаболиты [39]. В настоящее время опробованы гены трех подобных ферментов – цитозиндезаминазы кишечной палочки, тимидинкиназы вируса простого герпеса и цитохрома P450 (CYP2B1), которые придают клеткам чувствительность к 5-фторцитозину, ганцикловиру и циклофосфамиду соответственно. Благодаря высокой избирательности аденовирусных векторов в отношении опухолевых клеток, а также встраиванию под контроль определенного опухолеспецифического промотора, терапевтиче-

ские гены могут экспрессироваться главным образом в опухолевых клетках. Чувствительными к действию цитотоксических веществ оказываются сами зараженные клетки, соседствующие с ними опухолевые клетки и лишь в незначительной степени – нормальные ткани, окружающие опухоль. При таком подходе можно избежать системного воздействия токсичного препарата на здоровые клетки, органы и ткани.

Экспрессия генов цитокинов и других иммуномодуляторов

Прямая доставка генов цитокинов в опухолевые клетки вызывает значительный интерес в качестве иммунотерапевтического средства против злокачественных новообразований. В экспериментах на животных в опухолевые клетки вводили гены цитокинов и наблюдали подавление роста опухолей *in vivo*, обусловленное стимулированием воспалительного и иммунного ответа. К настоящему времени описаны онколитические штаммы аденовирусов, которые экспрессируют фактор, стимулирующий образование колоний гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF). Этот фактор стимулирует антигенпредставляющие клетки [40, 41], Fas-лиганд и цитокин интерлейкин-27 (IL27), которые усиливают представление антигенов на дендритных клетках [38]; интерфероны (IFN) α , β и γ , обладающие прямой противоопухолевой активностью и провоспалительным действием [37, 42, 43]; хемокин RANTES, привлекающий дендритные клетки и Т-лимфоциты, IL12, активирующий Т-лимфоциты [44]. Показано, что продукция рекомбинантным аденовирусом одновременно двух цитокинов с различными клеточными мишенями приводит к более интенсивному иммунному ответу. Так, например, при совместной экспрессии IL12 (мишенями которого служат Т-лимфоциты, натуральные киллеры и натуральные Т-киллеры) и GM-CSF (действует на антигенпредставляющие клетки) противоопухолевый иммунитет активировался с использованием нескольких путей [45]. С целью усиления иммунного ответа против опухолевых клеток создан также штамм аденовируса, экспрессирующий белок теплового шока – шаперон Hsp70 [46]. После лизиса опухолевых клеток таким штаммом комплекс шаперона Hsp70 с пептидами, содержащими опухолевые эпитопы, эффективно представлялся дендритными клетками, что стимулировало развитие иммунного ответа против опухоли.

Экспрессия суперантигенов

Активацию Т-лимфоцитов усиливали также с использованием энтеротоксина стафилококка А. При экспрессии гена энтеротоксина под контролем промоторов генов теломеразы и фактора, ин-

дуцируемого гипоксией, замедлялось деление клеток опухоли мочевого пузыря *in vitro*, а также усиливалась продукция цитокинов (в частности, IL2, IL4 и TNF α) в сокультивируемых лимфоцитах [47].

Экспрессия антиангиогенных факторов

Неконтролируемый рост опухолевых клеток приводит к гипоксии, поэтому многие опухоли начинают секретировать ангиогенные факторы, стимулируя образование сети новых кровеносных капилляров. Подавление ангиогенеза нарушает снабжение опухолевых клеток необходимыми питательными веществами, что приводит к замедлению роста опухоли [48]. Примечательно, что в новообразованном эндотелии повышена продукция $\alpha v \beta 3$ -интегринов [49], которые служат корцепторами аденовирусов, в результате чего аденовирусы проявляют тропизм к сосудам, проросшим в опухоли. Для усиления этого свойства получены штаммы аденовирусов, продуцирующие эндостатин [50], антагонист VEGF [51, 52] и цитокины – интерфероны типа 1 [37, 42] и IL24 [53].

МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ АДЕНОВИРУСОВ И СПОСОБЫ ЕЕ УСИЛЕНИЯ

Какие же механизмы определяют специфичность онколитических вирусов в отношении опухолей? Существует много примеров природных вирусов, способных к селективной репликации в опухолевых клетках. Так, автономно реплицирующийся парвовирус лейкоза мышей (*mice minute virus*) и парвовирус H1, реовирус человека и все аденовирусы более эффективно реплицируются в трансформированных и опухолевых клетках [54]. Хотя в целом ряде случаев детальный механизм этого явления еще не понятен, однако показано, что опухолевые клетки утрачивают многие естественные механизмы защиты от вирусов, в результате чего оказываются незащищенными от вирусной инфекции.

Кроме естественной повышенной чувствительности опухолевых клеток к вирусам, эффективность избирательной токсичности можно усилить при помощи модифицированных вирусов. На сегодняшний день существует множество способов повышения специфичности вирусов в отношении опухолевых клеток путем генно-инженерных манипуляций.

Делеция вирусных генов

В этой стратегии повышения специфичности аденовирусов используется такое уникальное свойство раковых клеток, как нарушение клеточного цикла в результате повреждения или утраты

опухолевых генов-супрессоров. Ярким примером онколитического аденовируса, селективно направленного против опухолей с поврежденными опухолевыми супрессорами p53 и pRB, является ONYX-015, из которого удален ген *E1B*, кодирующий белок 55 кДа.

Мутации в гене *p53* обнаруживаются приблизительно в половине опухолей человека. Белок p53 играет важную роль в поддержании стабильности генома и в защите от развития опухолей [55]. В ответ на повреждение ДНК и других клеточных структур, а также на стрессовые воздействия и нарушение баланса физиологических процессов в клетке индуцируется синтез белка p53. p53 либо останавливает прохождение клеточного цикла до завершения процессов репарации, либо, если повреждение невозможно своевременно репарировать, индуцирует вступление клеток в апоптоз. Поскольку в опухолевых клетках функция p53 нарушена, в них накапливаются многочисленные повреждения. Именно поэтому опухолевые клетки особенно чувствительны к введению экзогенного p53, который приводит к массивной индукции апоптоза [56].

Вирусная инфекция также распознается клеткой как нарушение, в результате чего должен индуцироваться p53. Однако индукция p53-зависимого апоптоза, вызванная вирусной инфекцией, приводила бы к гибели клетки до завершения репликации вируса, поэтому вирусы выработали специальные механизмы, позволяющие им подавлять функцию белка p53. Мутантный аденовирус, из генома которого удалены эти гены, утрачивает способность размножаться в нормальных клетках, но сохраняет эту способность при заражении опухолевых клеток, в которых функция белка p53 уже нарушена.

Первый вариант такого вируса испытали в 1996 году [57]. Этот мутант, известный как dl1520 [58], был создан за несколько лет до испытаний, однако в качестве онколитического препарата он получил название ONYX-015. ONYX-015 представляет собой Ad5 с делецией гена *E1B*, кодирующего белок 55 кДа [57]. Этот белок образует комплекс с p53 [59] и подавляет его транскрипционную функцию [60, 61] за счет удерживания p53 в цитоплазме [62]. Помимо этого, белок E1B-55K образует комплекс с другим аденовирусным белком, E4orf6, вместе с которым вызывает форсированное разрушение p53 [63–65]. Мутантный аденовирус с делецией белка E1B-55K не способен подавлять функцию p53 и предотвращать развитие апоптоза, что ограничивает репликацию вируса в нормальных клетках, но позволяет ему реплицироваться в опухолевых клетках, лишенных функции p53 [66–68]. Как и ожидалось, ONYX-015 оказывает цитолитическое действие на раковые клетки, экспрессирующие мутантные формы p53,

он значительно менее токсичен для нормальных фибробластов и эндотелиальных клеток человека. Введение ONYX-015 в растущие на бестимусных мышцах опухоли, происходящие из p53-негативных опухолевых клеток человека, вызвало выраженный терапевтический эффект [57]. Однако в отсутствие белка E1B-55K происходило некоторое снижение репликативных свойств аденовируса даже в перmissive опухолевых клетках, поскольку в комплексе с E4orf6 этот белок не только подавляет активность p53, но и участвует в транспорте вирусных РНК в цитоплазму [69]. E1B-55K нужен также для эффективного подавления белкового синтеза в хозяйской клетке [70]. В связи с этим были предприняты попытки получения аденовирусов с мутацией в белке E1B-55K, способных осуществлять транспорт вирусных РНК, но не подавляющих функцию p53. В результате получили два рекомбинантных вируса, ONYX-051 и ONYX-053, которые содержали точечные замены в белке E1B-55K, не подавляли функцию p53, но селективно и с большей эффективностью размножались в опухолевых клетках [71].

Во многих опухолях нарушен противовирусный интерфероновый сигнальный путь, что, в частности, связано с активацией онкогена *Ras*, выявляемой приблизительно в 25% опухолей [72]. Это свойство также используется для создания терапевтических рекомбинантных аденовирусов, например, путем введения делеции в ген *VA*, который кодирует малую вирусную РНК, блокирующую противовирусную РНК-зависимую протеинкиназу R (PKR). Ген *VA* необходим для эффективной репликации вируса за счет подавления PKR, которая в ответ на вирусную инфекцию блокирует трансляцию. В ходе жизненного цикла аденовируса синтезируются дцРНК, активирующие PKR. Однако в опухолевых клетках этому препятствует активированный онкоген *Ras*, поэтому аденовирусы с делецией гена *VA* способны эффективно размножаться только в опухолевых клетках с активированным онкогеном *Ras*.

Использование опухоле- или тканеспецифичных промоторов

Встраивание в вирусный геном опухоле- или тканеспецифичных промоторов для экспрессии незаменимых вирусных генов является одной из эффективных стратегий повышения селективности вируса в отношении опухолей. Таким путем создан мутантный онколитический аденовирус, в котором обязательный для репликации ген *E1A* находится под контролем промотора гена α -фетопротеина. Этот промотор активен исключительно в клетках эмбриональной печени и в гепатокарциномах, но не работает в клетках нормальной печени. Благодаря зависимости гена *E1A* от активности гена α -фетопротеина аденовирус

AvE1A04i реплицируется преимущественно в клетках гепатокарциномы [73].

Изменение поверхностных фибрилл

Жизненный цикл аденовируса можно разделить на несколько стадий: прикрепление и проникновение в хозяйскую клетку, синтез и трансляция вирусных РНК, репликация ДНК, сборка и выход потомства вируса. Каждый из этих процессов можно использовать для усиления опухолевой специфичности аденовирусов. Например, существенное ограничение накладывает невысокая эффективность заражения клеток, слабо экспрессирующих рецептор вирусов Коксаки и аденовирусов (CAR), при помощи которого аденовирус проникает в клетки. Ad2 и Ad5, основа большинства вирусных векторов, реплицируются в широком круге клеток. Однако эти вирусы плохо размножаются в клетках гладких мышц, эндотелия, в гемопоэтических стволовых клетках, макрофагах и Т-клетках, которые содержат мало CAR. Для преодоления этого препятствия ген фибриллы аденовирусов серогруппы С заменяли на ген фибриллы из генома аденовирусов серогруппы В [74]. Аденовирусы серогруппы В используют в качестве рецепторов белки CD46 [75] или CD80/86 [76], представленные на ряде типов клеток, у которых отсутствуют рецепторы CAR (например, на клетках яичников), или же уровень CAR понижается в процессе малигнизации (например, на клетках рака печени), что позволяет С/В-гибридным векторам заражать клетки, нечувствительные или малочувствительные к Ad5 [77]. Кроме использования генов фибрилл аденовирусов другой серогруппы, можно модифицировать белок фибриллы, что также позволит преодолеть данный природный барьер. В частности, в белок фибриллы встраивали пептид, содержащий мотив Arg-Gly-Asp (RGD) вместе с семью остатками лизина, что значительно повышало тропизм в отношении клеток, ранее мало чувствительных к вирусу [78]. С CAR связан и другой фактор, снижающий эффективность инфицирования аденовирусами: инфицированные клетки продуцируют в огромном количестве фибриллы, связывающиеся с CAR, которые сливаются с их поверхности еще до лизиса клеток. Секретируемые фибриллы блокируют CAR на неинфицированных соседних клетках и таким образом предотвращают проникновение вируса в клетку. Для борьбы с этими двумя факторами, связанными с CAR, получили аденовирус, в котором в ген вирусного капсидного белка пентона ввели трансдуцирующий домен белка Tat HIV-1. Этот домен способствует проникновению вируса, приводя к его CAR-независимой адсорбции, при которой избыток свободных вирусных фибрилл не подавляет входение вируса в клетки. Аденовирус, модифи-

цированный подобным образом, подавлял рост привитых мышам нейробластом человека и нейроэндокринных опухолей и повышал выживаемость животных [79].

С целью увеличения спектра чувствительных клеток созданы аденовирусы с композитными фибриллами, содержащими структурные домены ряда филогенетически отдаленных вирусов, таких как бактериофаг T4 или реовирус [80, 81]. Для увеличения специфичности вируса к фибрилле присоединяли наноантитела [82] или лиганд для CD40 [83].

Методы биоселекции

Существенно повысить селективность вируса в отношении опухолевых клеток можно посредством направленных генетических воздействий, однако для этого необходимо глубоко понимать жизненный цикл вируса. Этого не требуется при использовании методов биоселекции, один из которых – мутагенез с последующим культивированием мутантных вирусов на опухолевых клетках и селекцией быстрорастущих вариантов [84–86]. Так, Ad5 обрабатывали мутагеном (NaNO₂), после чего проверяли способность полученных клонов убивать клетки рака толстого кишечника HT29 [86]. Таким способом были получены два варианта ONYX-201 и ONYX-203, которые убивали те же клетки в 1000 раз более эффективно, чем Ad5 дикого типа.

Метод биоселекции использовали также для получения аденовируса, способного интенсивно размножаться и проявлять цитотоксичность по отношению к активированным опухолевым фибробластам. Такие фибробласты имеют постоянно активированный фенотип, способствуют образованию измененного внеклеточного матрикса, прорастанию в опухоль новых сосудов, что усиливает прогрессию опухоли [87]. Кроме того, активированные опухолевые фибробласты в значительной степени ограничивают эффективность онколитических аденовирусов, поскольку у них снижена восприимчивость к вирусу и модифицирован внеклеточный матрикс, что препятствует распространению вируса и заражению опухолевых клеток [88, 89]. Несколько раундов биоселекции аденовируса дикого типа с очень ранним сбором вируса, вышедшего после заражения активированных опухолевых фибробластов, позволили отобрать вариант, способный эффективно размножаться на таких клетках и оказывать выраженное цитолитическое действие на нескольких линиях опухолевых клеток. Этот вариант имел укороченный С-концевой участок i-лидерного белка. На мышах с привитым раком легкого было показано, что аденовирус, полученный таким образом, обладает повышенной противоопухолевой активностью [90].

Другой способ биоселекции включает последовательное пассирование смеси аденовирусов различных серотипов на линиях опухолевых клеток при малой множественности заражения, что способствует образованию многочисленных рекомбинантных вариантов. В процессе подобного отбора получен гибридный аденовирус Ad3/Ad11 с усиленной онколитической активностью [91].

Химическая модификация аденовирусов

Химическая модификация вирионов также может приводить к изменению их тропизма. Опубликованы работы, в которых изучали комплексы аденовирусов с липосомами [92, 93] и с биспецифичными лигандами [94, 95]. С целью химической модификации вирионы покрывают гидрофильными полимерами, такими как полиэтиленгликоль и поли-N-(гидроксипропил)-метакриламид [96], а также биodeградируемыми полимерами [97]. Полимерный слой защищает вирусный вектор от циркулирующих антител и повышает его эффективность при последующем введении. Для увеличения тропизма вектора к соответствующей опухоли лиганды рецепторов, представленных на опухолевых клетках или опухолевом эндотелии (EGF, FGF-2, VEGF), связывали с вирионами, покрытыми полиэтиленгликолем [98–100].

Изменение опухолевого матрикса

Помимо рассмотренных подходов, направленных на усиление специфичности вирусов к опухолевым клеткам, в настоящее время интенсивно разрабатываются и другие способы повышения эффективности доставки вируса к опухолевым клеткам. Большинство солидных опухолей имеют очень сложную архитектуру с барьерами, препятствующими распространению вируса внутри опухоли. Исследователи и клиницисты пытаются преодолеть это препятствие, вводя вирус одновременно во множество участков опухоли [101] или в артерию, снабжающую опухоль кровью [102].

Сообщается о попытке применения аденовирусов при поверхностном раке мочевого пузыря [41]. Установлено, что глюкозаминогликановый слой, выстилающий внутреннюю поверхность мочевого пузыря, препятствует адсорбции аденовируса, причем удаление этого слоя детергентом существенно повышает эффективность заражения [103, 104]. В последнее время появляется все больше работ, в которых опухоль перед инъекцией аденовирусов обрабатывали ультразвуком. Такая процедура улучшает проникновение вируса через стенки кровеносных сосудов в опухоли и его распространение в участки, удаленные от кровеносных сосудов. В результате такой обработки

экспрессия трансгенов, переносимых аденовирусами, увеличивалась в 200 раз [105]. В аналогичных опытах *in vivo* мышей с привитыми клетками рака молочной железы обрабатывали ультразвуком, а затем вводили им покрытый полимерной оболочкой рекомбинантный аденовирус, несущий ген люциферазы, который смешивали с микропузырьками SonoVue. В результате этой процедуры доставка вируса в клетки опухоли повышалась в 30 раз по сравнению с контрольной группой животных, которым аденовирус ввели без предварительной фокусированной ультразвуковой обработки [106].

Использование дополнительных носителей

Эффективность доставки аденовирусов в опухолевые клетки можно увеличить, если связать их с магнитными наночастицами, а затем воздействовать магнитным полем [107]. Недавно были опубликованы сообщения о доставке аденовирусов в опухоль с помощью мезенхимных стволовых клеток (МСК). МСК хорошо заражаются онколитическим аденовирусом [108]. Введенные внутривенно зараженные МСК проникали в опухоль, где высвобождали вектор, способствуя заражению опухолевых клеток. В мышинной модели МСК, зараженные Ad5/3, химерным по гену белка фибриллы, эффективно доставляли вектор до внутрибрюшинных опухолей яичника, что существенно усиливало противоопухолевое действие в сравнении с простым введением Ad5/3 [108]. Эффективность использования МСК, зараженных онколитическим аденовирусом, показана также на модели бестимусных мышей с привитыми клетками рака легкого и молочной железы. Этот способ обеспечивал существенно лучшие результаты, чем введение того же вектора в чистом виде, даже в том случае, когда не отмечалось накопления МСК в опухолях [109].

Опухоли не всех типов одинаково способны к привлечению МСК. Например, на модели глиобластомы сравнили эффективность МСК и нервных стволовых клеток (НСК). На бестимусных мышцах с ксенографтами опухолей человека сравнивали эффективность доставки онколитических аденовирусов в клетки диссеминированных опухолей головного мозга. Хотя стволовые клетки обоих типов поддерживали доставку аденовируса в опухоль, количество вируса, продуцируемого НСК, было намного выше, причем при внутрикраниальном введении. Отмечалось также существенно большее увеличение продолжительности жизни животных [110].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДЕНОВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Отдельное направление в разработке онколитических аденовирусов представляют подходы с использованием аденовирусов животных. Так, получены онколитические штаммы на основе аденовируса собак, и на мышинной модели показана их эффективность [111]. Сконструированы векторы на основе аденовирусов свиней и крупного рогатого скота, способные эффективно переносить терапевтические гены в различные опухолевые клетки человека [112, 113]. Получены обнадеживающие результаты доклинических испытаний векторов OAdV623 и OAdV220 на основе аденовирусов овец [14, 114]. Экспрессирующий ген тимидинкиназы рекомбинантный вектор на основе птичьего аденовируса (CELO) обладал выраженной онколитической активностью на ряде опухолевых клеточных линий человека *in vitro*. Он оказался эффективным на модели иммунокомпетентных мышей с привитой меланомой [115]. Вектор на основе вируса CELO применили также для введения в клетки опухоли функционального р53 [116]. К очевидным преимуществам векторов на основе аденовирусов животных относятся ожидаемая апатогенность и отсутствие иммунитета к ним у людей.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ РЕПЛИКАЦИОННО-КОМПЕТЕНТНЫХ АДЕНОВИРУСОВ

Клинические испытания онколитических аденовирусов в большинстве случаев не продвинулись дальше фазы I, т.е. ограничились изучением их переносимости и безопасности для человека [117]. Однако испытания некоторых препаратов уже дошли до фаз II и III, причем один из них, H101 (Oncorine), уже получил лицензию на применение в терапии рака носоглотки в Китае [118]. Подробное описание клинических исследований онколитических аденовирусных препаратов можно найти в обзорах [119, 120]. В ходе многочисленных испытаний не отмечалось дозозависимой токсичности аденовирусов, а побочные эффекты были легкими или умеренными. В подавляющем же большинстве испытаний зарегистрирован достоверный клинический эффект. Клинические исследования онколитических аденовирусов проводятся в режиме как монотерапии, так и в комбинации с химио- и радиотерапией. Стоит отметить, что поскольку большинство химиотерапевтических препаратов обладает иммуносупрессивными свойствами, при разработке комбинированных схем терапии целесообразнее в начале курса проводить химиотерапию, и лишь затем применять онколитический аденовирус. Именно с эффектом иммуносупрессии в случае устойчивых к химиотерапии опухолей связывают эффект синер-

гичного действия аденовирусов и химиопрепаратов [121].

В России также имеется опыт проведения клинических исследований онколитических аденовирусов. Первым в нашей стране онколитическим аденовирусным препаратом, доведенным до стадии клинических испытаний, является Канцеролизин, мутантный вариант Ad5 человека, Adel2 [122], дефектный по гену белка E1B-55K. Этот штамм получен в Государственном научном центре “Вектор”. Проведен полный комплекс доклинических исследований данного онколитического аденовируса, а также ограниченные клинические испытания безопасности на больных плоскоклеточным раком головы и шеи и диссеминированной меланомой кожи [123–125]. Препарат признан безопасным и хорошо переносимым. В настоящее время завершена работа, необходимая для получения разрешения на проведение клинических испытаний фазы II.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные доклинические и целый ряд клинических испытаний (фазы I–II) указывают на безопасность и явную эффективность онколитических аденовирусов. Однако эффективность уже разработанных штаммов остается недостаточной для использования в режиме монотерапии. Результаты проведенных к настоящему времени испытаний свидетельствуют о перспективности применения аденовирусной терапии после или в комбинации с классическими средствами, в первую очередь, с химио- и радиотерапией. С целью повышения эффективности онколитических аденовирусов активно разрабатываются различные подходы, включающие модификацию генома самих вирусов, улучшение систем доставки, предотвращение или минимизацию нейтрализации терапевтических вирусов иммунной системой хозяина и др. В последнее время все больший интерес вызывают аденовирусные онколитические векторы, сочетающие в одном штамме сразу нескольких онколитических механизмов, что обеспечивает их высокую избирательность по отношению к опухолевым клеткам, а также увеличивает их онколитическое действие. Таким образом, онколитические агенты на основе аденовирусов весьма перспективны, клинические испытания их различных вариантов проводятся в массовых масштабах и во многих клиниках, и в ближайшее время следует ожидать разрешения на массовое применение целого ряда новых средств онколитической виротерапии.

Настоящая работа выполнена за счет базового финансирования НИР в Новосибирском государственном университете и Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, в рамках работы по Договору

НГУ с Министерством образования и науки № 11.G34.31.0034 “Новые подходы к разработке лекарств: поиск, отбор и конструирование непатогенных для человека штаммов вирусов, перспективных для использования в качестве онколитических препаратов”, при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-0410 и 11-04-92697) и программы Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Pace N. 1912. Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia*. **9**, 82–89.
- Ring C.J. 2002. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *J. Gen. Virol.* **83**, 491–502.
- Flanagan A.D., Love R., Tesar W. 1955. Propagation of Newcastle disease virus in Ehrlich ascites cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**, 82–86.
- Sinkovics J., Horvath J. 1993. New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology*. **36**, 193–214.
- Sova P., Ren X.W., Ni S., et al. 2004. A tumor-targeted and conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL for treatment of liver metastases. *Mol. Ther.* **9**, 496–509.
- Russell W.C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* **81**, 2573–2604.
- Vattemi E., Claudio P.P. 2006. Adenoviral gene therapy in head and neck cancer. *Drug News Perspect.* **19**, 329–337.
- Harrach B., Benko M., Both G.W., et al. 2011. Adenoviridae. In: *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Eds King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. San Diego: Elsevier Acad. Press.
- Berk A.J. 2007. Adenoviridae. In: *Fields Virology*. Eds Knipe D.M., Howley P.M. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2355–2394.
- Shirakawa T. 2008. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy. *Mol. Cells*. **25**, 462–466.
- Bett A.J., Prevec L., Graham F.L. 1993. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* **67**, 5911–5921.
- Hitt M.M., Parks R.J., Graham F.L. 1999. Structure and genetic organization of adenovirus vectors. In: *The Development of Human Gene Therapy*. Ed. Friedmann T. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 61–86.
- Hackett N.R., Crystal R.G. 2000. Adenovirus vectors for gene therapy. In: *Gene Ther.* Eds Templeton N.S., Lasic D.D. N.Y.: Marcel Dekker, 17–39.
- Voeks D., Martiniello-Wilks R., Madden V., et al. 2002. Gene therapy for prostate cancer delivered by ovine adenovirus and mediated by purine nucleoside phosphorylase and fludarabine in mouse models. *Gene Ther.* **9**, 759–768.
- Clayman G.L., el-Naggar A.K., Lippman S.M., et al. 1998. Adenovirus-mediated *p53* gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2221–2232.
- Crystal R.G., McElvaney N.G., Rosenfeld M.A., et al. 1994. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **8**, 42–51.
- Nemunaitis J., Swisher S.G., Timmons T., et al. 2000. Adenovirus-mediated *p53* gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **18**, 609–622.
- Peng Z. 2005. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1016–1027.
- Shirakawa T., Terao S., Hinata N., et al. 2007. Long-term outcome of phase I/II clinical trial of Ad-OC-TK/VAL gene therapy for hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Hum. Gene Ther.* **18**, 1225–1232.
- Vaillancourt M.T., Atencio I., Quijano E., et al. 2005. Inefficient killing of quiescent human epithelial cells by replicating adenoviruses: potential implications for their use as oncolytic agents. *Cancer Gene Ther.* **12**, 691–698.
- Dhar D., Spencer J.F., Toth K., Wold W.S. 2009. Pre-existing immunity and passive immunity to adenovirus 5 prevents toxicity caused by an oncolytic adenovirus vector in the Syrian hamster model. *Mol. Ther.* **17**, 1724–1732.
- Wold W.S.M., Horwitz M.S. 2007. Adenoviruses. In: *Field's Virology*. Eds Knipe D.M., Howley P.M. Philadelphia, PA.: Lippincott, Williams & Wilkins, 2395–2436.
- Marshall E. 1999. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*. **286**, 2244–2245.
- Toth K., Spencer J.F., Dhar D., et al. 2008. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 7293–7297.
- Tollefson A.E., Ryerse J.S., Scaria A., et al. 1996. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology*. **220**, 152–162.
- Gooding L.R. 1994. Regulation of TNF-mediated cell death and inflammation by human adenoviruses. *Infect. Agents Dis.* **3**, 106–115.
- Todo T., Rabkin S.D., Sundaresan P., et al. 1999. Systemic antitumor immunity in experimental brain tumor therapy using a multimitated, replication-competent herpes simplex virus. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2741–2755.
- Savage H.E., Rossen R.D., Hersh E.M., et al. 1986. Antibody development to viral and allogeneic tumor cell-associated antigens in patients with malignant melanoma and ovarian carcinoma treated with lysates of virus-infected tumor cells. *Cancer Res.* **46**, 2127–2133.
- Lowe S.W., Bodis S., McClatchey A., et al. 1994. *p53* status and the efficacy of cancer therapy *in vivo*. *Science*. **266**, 807–810.
- Khuri F.R., Nemunaitis J., Ganly I., et al. 2000. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cis-

- platin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* **6**, 879–885.
31. Sanchez-Prieto R., Quintanilla M., Cano A., et al. 1996. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus *E1A* gene. *Oncogene*. **13**, 1083–1092.
 32. Barton K.N., Paielli D., Zhang Y., et al. 2006. Second-generation replication-competent oncolytic adenovirus armed with improved suicide genes and ADP gene demonstrates greater efficacy without increased toxicity. *Mol. Ther.* **13**, 347–356.
 33. Galanis E., Bateman A., Johnson K., et al. 2001. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. *Hum. Gene Ther.* **12**, 811–821.
 34. Ganesh S., Gonzalez Edick M., Idamakanti N., et al. 2007. Relaxin-expressing, fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice. *Cancer Res.* **67**, 4399–4407.
 35. Kim J.H., Lee Y.S., Kim H., et al. 2006. Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 1482–1493.
 36. Hawkins L.K., Hermiston T. 2001. Gene delivery from the *E3* region of replicating human adenovirus: evaluation of the *E3B* region. *Gene Ther.* **8**, 1142–1148.
 37. Shashkova E.V., Spencer J.F., Wold W.S., Doronin K. 2007. Targeting interferon-alpha increases antitumor efficacy and reduces hepatotoxicity of E1A-mutated spread-enhanced oncolytic adenovirus. *Mol. Ther.* **15**, 598–607.
 38. Tagawa M., Kawamura K., Shimozato O., et al. 2006. Virology- and immunology-based gene therapy for cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 1420–1425.
 39. Springer C.J., Niculescu-Duvaz I. 2000. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J. Clin. Invest.* **105**, 1161–1167.
 40. Lei N., Shen F.B., Chang J.H., et al. 2009. An oncolytic adenovirus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor shows improved specificity and efficacy for treating human solid tumors. *Cancer Gene Ther.* **16**, 33–43.
 41. Ramesh N., Ge Y., Ennist D.L., et al. 2006. CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 305–313.
 42. He L.F., Gu J.F., Tang W.H., et al. 2008. Significant antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing human interferon-beta for hepatocellular carcinoma. *J. Gene Med.* **10**, 983–992.
 43. Su C., Peng L., Sham J., et al. 2006. Immune gene-viral therapy with triplex efficacy mediated by oncolytic adenovirus carrying an interferon-gamma gene yields efficient antitumor activity in immunodeficient and immunocompetent mice. *Mol. Ther.* **13**, 918–927.
 44. Lapteva N., Aldrich M., Weksberg D., et al. 2009. Targeting the intratumoral dendritic cells by the oncolytic adenoviral vaccine expressing RANTES elicits potent antitumor immunity. *J. Immunother.* **32**, 145–156.
 45. Choi K.J., Zhang S.N., Choi I.K., et al. 2011. Strengthening of antitumor immune memory and prevention of thymic atrophy mediated by adenovirus expressing IL-12 and GM-CSF. *Gene Ther.* doi: 10.1038/gt.2011.125.
 46. Haviv Y.S., Blackwell J.L., Li H., et al. 2001. Heat shock and heat shock protein 70i enhance the oncolytic effect of replicative adenovirus. *Cancer Res.* **61**, 8361–8365.
 47. Hu J., Xuan X., Han C., et al. 2012. Anti-tumor function of double-promoter regulated adenovirus carrying SEA gene, in the treatment of bladder cancer. *Cell Biochem. Biophys.* **62**, 353–359.
 48. Hanna E., Quick J., Libutti S.K. 2009. The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy. *Oral Dis.* **15**, 8–17.
 49. Hood J.D., Bednarski M., Frausto R., et al. 2002. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science*. **296**, 2404–2407.
 50. Li G., Sham J., Yang J., et al. 2005. Potent antitumor efficacy of an E1B 55kDa-deficient adenovirus carrying murine endostatin in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer.* **113**, 640–648.
 51. Yoo J.Y., Kim J.H., Kwon Y.G., et al. 2007. VEGF-specific short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus elicits potent inhibition of angiogenesis and tumor growth. *Mol. Ther.* **15**, 295–302.
 52. Zhang Z., Zou W., Wang J., et al. 2005. Suppression of tumor growth by oncolytic adenovirus-mediated delivery of an antiangiogenic gene, soluble Flt-1. *Mol. Ther.* **11**, 553–562.
 53. Sarkar D., Lebedeva I.V., Su Z.Z., et al. 2007. Eradication of therapy-resistant human prostate tumors using a cancer terminator virus. *Cancer Res.* **67**, 5434–5442.
 54. Rommelaere J., Tattersall P. 1990. Oncosuppression by parvoviruses. In: *Handbook of Parvoviruses*. Ed. Tijssen P. Boca Raton, FL: CRC Press, 41–57.
 55. Chumakov P.M. 2007. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc.)* **72**, 1399–1421.
 56. Алмазов В.П., Кочетков Д.В., Чумаков П.М. 2007. p53 – инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека. *Молекуляр. биология.* **41**, 947–963.
 57. Bischoff J.R., Kirn D.H., Williams A., et al. 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. **274**, 373–376.
 58. Barker D.D., Berk A.J. 1987. Adenovirus proteins from both *E1B* reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology*. **156**, 107–121.
 59. Sarnow P., Sullivan C.A., Levine A.J. 1982. A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virology*. **120**, 510–517.
 60. Yew P.R., Berk A.J. 1992. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*. **357**, 82–85.
 61. Yew P.R., Liu X., Berk A.J. 1994. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev.* **8**, 190–202.

62. Zhao L.Y., Liao D. 2003. Sequestration of p53 in the cytoplasm by adenovirus type 12 E1B 55-kilodalton oncoprotein is required for inhibition of p53-mediated apoptosis. *J. Virol.* **77**, 13171–13181.
63. Querido E., Marcellus R.C., Lai A., et al. 1997. Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J. Virol.* **71**, 3788–3798.
64. Roth J., König C., Wienzek S., et al. 1998. Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J. Virol.* **72**, 8510–8516.
65. Steegenga W.T., van Laar T., Riteco N., et al. 1996. Adenovirus E1A proteins inhibit activation of transcription by p53. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2101–2109.
66. Levine A.J. 1989. The p53 tumor suppressor gene and gene product. *Princess Takamatsu Symp.* **20**, 221–230.
67. van den Heuvel S.J., van Laar T., Kast W.M., et al. 1990. Association between the cellular p53 and the adenovirus 5 E1B-55 kDa proteins reduces the oncogenicity of Ad-transformed cells. *EMBO J.* **9**, 2621–2629.
68. van den Heuvel S.J., van Laar T., The I., van der Eb A.J. 1993. Large E1B proteins of adenovirus types 5 and 12 have different effects on p53 and distinct roles in cell transformation. *J. Virol.* **67**, 5226–5234.
69. Dobbstein M., Roth J., Kimberly W.T., et al. 1997. Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* **16**, 4276–4284.
70. Babich A., Feldman L.T., Nevins J.R., et al. 1983. Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translational discrimination. *Mol. Cell Biol.* **3**, 1212–1221.
71. Shen Y., Kitzes G., Nye J.A., et al. 2001. Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J. Virol.* **75**, 4297–4307.
72. Cascallo M., Capella G., Mazo A., Alemany R. 2003. Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer Res.* **63**, 5544–5550.
73. Hallenbeck P.L., Chang Y.N., Hay C., et al. 1999. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1721–1733.
74. Shayakhmetov D.M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G., Lieber A. 2000. Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J. Virol.* **74**, 2567–2583.
75. Gaggar A., Shayakhmetov D.M., Lieber A. 2003. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* **9**, 1408–1412.
76. Short J.J., Pereboev A.V., Kawakami Y., et al. 2004. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology.* **322**, 349–359.
77. Chen W., Wu Y., Liu W., et al. 2011. Enhanced antitumor efficacy of a novel fiber chimeric oncolytic adenovirus expressing p53 on hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **307**, 93–103.
78. Wickham T.J., Tzeng E., Shears L.L., 2nd, et al. 1997. Increased *in vitro* and *in vivo* gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* **71**, 8221–8229.
79. Yu D., Jin C., Leja J., et al. 2011. Adenovirus with hexon tat-protein transduction domain modification exhibits increased therapeutic effect in experimental neuroblastoma and neuroendocrine tumors. *J. Virol.* **85**, 13114–13123.
80. Krasnykh V., Belousova N., Korokhov N., et al. 2001. Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin. *J. Virol.* **75**, 4176–4183.
81. Mercier G.T., Campbell J.A., Chappell J.D., et al. 2004. A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein sigma1 targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 6188–6193.
82. Einfeld D.A., Brough D.E., Roelvink P.W., et al. 1999. Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fiber or penton base. *J. Virol.* **73**, 9130–9136.
83. Belousova N., Korokhov N., Krendelshchikova V., et al. 2003. Genetically targeted adenovirus vector directed to CD40-expressing cells. *J. Virol.* **77**, 11367–11377.
84. Gros A., Martinez-Quintanilla J., Puig C., et al. 2008. Bioselection of a gain of function mutation that enhances adenovirus 5 release and improves its antitumor potency. *Cancer Res.* **68**, 8928–8937.
85. Subramanian T., Vijayalingam S., Chinnadurai G. 2006. Genetic identification of adenovirus type 5 genes that influence viral spread. *J. Virol.* **80**, 2000–2012.
86. Yan W., Kitzes G., Dormishian F., et al. 2003. Developing novel oncolytic adenoviruses through bioselection. *J. Virol.* **77**, 2640–2650.
87. Kalluri R., Zeisberg M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 392–401.
88. Lopez M.V., Viale D.L., Cafferata E.G., et al. 2009. Tumor associated stromal cells play a critical role on the outcome of the oncolytic efficacy of conditionally replicative adenoviruses. *PLoS One.* **4**, 8.
89. Sauthoff H., Hu J., Maca C., et al. 2003. Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points. *Hum. Gene Ther.* **14**, 425–433.
90. Puig-Saus C., Gros A., Alemany R., Cascallo M. 2012. Adenovirus i-leader truncation bioselected against cancer-associated fibroblasts to overcome tumor stromal barriers. *Mol. Ther.* **20**, 54–62.
91. Kuhn I., Harden P., Bauzon M., et al. 2008. Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. *PLoS One.* **3**, e2409.
92. Lee E.M., Hong S.H., Lee Y.J., et al. 2004. Liposome-complexed adenoviral gene transfer in cancer cells expressing various levels of coxsackievirus and adenovirus receptor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **130**, 169–177.
93. Steel J.C., Cavanagh H.M., Burton M.A., et al. 2007. Increased tumor localization and reduced immune response to adenoviral vector formulated with the liposome DDAB/DOPE. *Eur. J. Pharm. Sci.* **30**, 398–405.
94. Kashentseva E.A., Douglas J.T., Zinn K.R., et al. 2009. Targeting of adenovirus serotype 5 pseudotyped with short fiber from serotype 41 to c-erbB2-positive cells using bispecific single-chain diabody. *J. Mol. Biol.* **388**, 443–461.

95. van der Poel H.G., Molenaar B., van Beusechem V.W., et al. 2002. Epidermal growth factor receptor targeting of replication competent adenovirus enhances cytotoxicity in bladder cancer. *J. Urol.* **168**, 266–272.
96. Kreppel F., Kochanek S. 2008. Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: a scientific review and technical guide. *Mol. Ther.* **16**, 16–29.
97. Kim P.H., Kim J., Kim T.I., et al. 2011. Bioreducible polymer-conjugated oncolytic adenovirus for hepatoma-specific therapy via systemic administration. *Biomaterials.* **32**, 9328–9342.
98. Eto Y., Yoshioka Y., Mukai Y., et al. 2008. Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand. *Int. J. Pharm.* **354**, 3–8.
99. O’Riordan C.R., Song A. 2008. PEGylated adenovirus for targeted gene therapy. *Meth. Mol. Biol.* **434**, 133–160.
100. Park J.W., Mok H., Park T.G. 2008. Epidermal growth factor (EGF) receptor targeted delivery of PEGylated adenovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 769–774.
101. Barton K.N., Xia X., Yan H., et al. 2004. A quantitative method for measuring gene expression magnitude and volume delivered by gene therapy vectors. *Mol. Ther.* **9**, 625–631.
102. Reid T., Warren R., Kirn D. 2002. Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther.* **9**, 979–986.
103. Ramesh N., Memarzadeh B., Ge Y., et al. 2004. Identification of pretreatment agents to enhance adenovirus infection of bladder epithelium. *Mol. Ther.* **10**, 697–705.
104. Tao Z., Connor R.J., Ashoori F., et al. 2006. Efficacy of a single intravesical treatment with Ad-IFN/Syn 3 is dependent on dose and urine IFN concentration obtained: implications for clinical investigation. *Cancer Gene Ther.* **13**, 125–130.
105. Bazan-Peregrino M., Arvanitis C.D., Rifai B., et al. 2011. Ultrasound-induced cavitation enhances the delivery and therapeutic efficacy of an oncolytic virus in an *in vitro* model. *J. Control. Release.* **157**, 235–242.
106. Choi J.J., Carlisle R.C., Coussios C.C. 2011. Enhanced viral activity in tumors using focused ultrasound and microbubbles—A long term study. *J. Acoust. Soc. Am.* **130**, 2502.
107. Tresilwised N., Pithayanukul P., Holm P.S., et al. 2012. Effects of nanoparticle coatings on the activity of oncolytic adenovirus-magnetic nanoparticle complexes. *Biomaterials.* **33**, 256–269.
108. Komarova S., Kawakami Y., Stoff-Khalili M.A., et al. 2006. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 755–766.
109. Hakkarainen T., Sarkioja M., Lehenkari P., et al. 2007. Human mesenchymal stem cells lack tumor tropism but enhance the antitumor activity of oncolytic adenoviruses in orthotopic lung and breast tumors. *Hum. Gene Ther.* **18**, 627–641.
110. Ahmed A.U., Tyler M.A., Thaci B., et al. 2011. A comparative study of neural and mesenchymal stem cell-based carriers for oncolytic adenovirus in a model of malignant glioma. *Mol. Pharm.* **8**, 1559–1572.
111. Hemminki A., Kanerva A., Kremer E.J., et al. 2003. A canine conditionally replicating adenovirus for evaluating oncolytic virotherapy in a syngeneic animal model. *Mol. Ther.* **7**, 163–173.
112. Bangari D.S., Shukla S., Mittal S.K. 2005. Comparative transduction efficiencies of human and nonhuman adenoviral vectors in human, murine, bovine, and porcine cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 960–966.
113. Loser P., Huser A., Hillgenberg M., et al. 2002. Advances in the development of non-human viral DNA-vectors for gene delivery. *Curr. Gene Ther.* **2**, 161–171.
114. Wang X.Y., Martiniello-Wilks R., Shaw J.M., et al. 2004. Preclinical evaluation of a prostate-targeted gene-directed enzyme prodrug therapy delivered by ovine atadenovirus. *Gene Ther.* **11**, 1559–1567.
115. Shashkova E.V., Cherenova L.V., Kazansky D.B., Doronin K. 2005. Avian adenovirus vector CELO-TK displays anticancer activity in human cancer cells and suppresses established murine melanoma tumors. *Cancer Gene Ther.* **12**, 617–626.
116. Logunov D.Y., Ilyinskaya G.V., Cherenova L.V., et al. 2004. Restoration of p53 tumor-suppressor activity in human tumor cells *in vitro* and in their xenografts *in vivo* by recombinant avian adenovirus CELO-p53. *Gene Ther.* **11**, 79–84.
117. Kumar S., Gao L., Yeagy B., Reid T. 2008. Virus combinations and chemotherapy for the treatment of human cancers. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **10**, 371–379.
118. Garber K. 2006. China approves world’s first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 298–300.
119. Pesonen S., Kangasniemi L., Hemminki A. 2011. Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data. *Mol. Pharm.* **8**, 12–28.
120. Toth K., Wold W.S. 2010. Increasing the efficacy of oncolytic adenovirus vectors. *Viruses.* **2**, 1844–1866.
121. Dhar D., Spencer J.F., Toth K., Wold W.S. 2009. Effect of preexisting immunity on oncolytic adenovirus vector INGN 007 antitumor efficacy in immunocompetent and immunosuppressed Syrian hamsters. *J. Virol.* **83**, 2130–2139.
122. Качко А.В., Святченко В.А., Терновой В.А., и др. 2003. Варианты аденовируса типа 5 с делециями в ранних генах: способность к селективной репликации в р53-дефектных опухолевых клетках человека. *Молекуляр. биология.* **37**, 868–875.
123. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А., и др. 2006. Изучение реактогенности, безопасности с специфической активностью противоракового лечебного препарата “Канцеролизин” на животных. *Биотехнология.* **2**, 66–72.
124. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А., и др. 2006. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата “Канцеролизин”. *Вопросы вирусологии.* **6**, 39–42.
125. Вдовиченко Г.В., Радаева И.Ф., Сергеев А.А., и др. 2006. Создание банков перевиваемой культуры клеток 293 для производства антиракового вирусного лечебного препарата “Канцеролизин”. *Биотехнология.* **1**, 62–67.