

УДК 578.821

АПОПТИН УСИЛИВАЕТ ОНКОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ *in vitro*

© 2013 г. Г. В. Кочнева^{1,2*}, И. Н. Бабкина^{1,3}, Т. А. Лупан², А. А. Гражданцева^{1,2}, П. В. Юдин^{1,2},
Г. Ф. Сиволобова^{1,2}, А. Н. Швалов², Е. Г. Попов^{1,2}, И. В. Бабкин³,
С. В. Нетесов¹, П. М. Чумаков^{1,4}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”, пос. Кольцово Новосибирская обл., 630559

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 31.03.2013 г.

Принята к печати 27.04.2013 г.

Синтезирован ген апоптоина вируса анемии кур – селективного “киллера” опухолевых клеток. Ген апоптоина встроен в геном вируса осповакцины (штамм Л-ИВП), из которого одновременно удален фрагмент гена *CIIR*, кодирующего вирусный фактор роста, существенный для вирулентности. Рекомбинантный вирус VVdGF-ApoS24/2 получен методом временной доминантной селекции с использованием в качестве селективного маркера гена устойчивости к пурамицину. Экспрессия гена апоптоина под контролем синтетического ранне-позднего промотора вируса осповакцины обеспечивает эффективное накопление белка в клетках, инфицированных вирусом VVdGF-ApoS24/2. Несмотря на присутствие на N-конце апоптоина лидерного пептида вирусного фактора роста рекомбинантный белок не секретировался в культуральную среду. Рекомбинантный вирус VVdGF-ApoS24/2 обладал значимо большей избирательной литической активностью в отношении клеток злокачественных опухолей человека (A549, A431, U87MG, RD и MCF7) по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП и его вариантом VVdGF2/6 с делецией гена *CIIR*. Эти данные свидетельствуют о перспективности использования апоптоина для улучшения природных противоопухолевых свойств вируса осповакцины.

Ключевые слова: апоптин, временная доминантная селекция, рекомбинантный вирус осповакцины, вирусный фактор роста, пурамицин, онколитическая активность.

APOPTIN ENHANCES THE ONCOLYTIC ACTIVITY OF VACCINIA VIRUS *in vitro*, by G. V. Kochneva^{1,2*}, I. N. Babkina^{1,3}, T. A. Lupan², A. A. Grazhdantseva^{1,2}, P. V. Yudin^{1,2}, G. F. Sivolobova^{1,2}, A. N. Shvalov², E. G. Popov^{1,2}, I. V. Babkin³, S. V. Netesov¹, P. M. Chumakov^{1,4} (¹Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia; *e-mail: g.v.kochneva@yandex.ru; ²State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia; ³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; ⁴Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). Chicken anemia virus gene encoding apoptin, a selective killer of cancer cells was synthesized and inserted into vaccinia virus (strain L-IVP) genome. The insertion has replaced major part of the viral *CIIR* gene encoding viral growth factor (VGF), which is important for the virulence. The recombinant virus VVdGF-ApoS24/2 was obtained through the transient dominant selection technique with the use of puromycin resistance gene as the selective marker. The expression apoptin gene from a synthetic early-late promoter of vaccinia virus effectively provides accumulation of the protein in the cells infected with the VVdGF-ApoS24/2 virus. Despite the presence of virus growth factor signal peptide at apoptin N-terminal secretion of the recombinant protein into culture medium did not occur. The recombinant virus VVdGF-ApoS24/2 was found to have a significantly greater selective lytic activity on human cancer cell lines (A549, A431, U87MG, RD and MCF7) as compared with the parent strain L-IVP and its variant VVdGF2/6 with the deletion of the *CIIR* gene. The results suggest that the use of apoptin represents a promising approach for improving the natural anticancer activities of vaccinia virus.

Keywords: apoptin, transient dominant selection, recombinant vaccinia virus, virus growth factor, puromycin, oncolytic activity.

DOI: 10.7868/S0026898413050078

* Эл. почта: g.v.kochneva@yandex.ru

Вирус осповакцины (ВОВ) в настоящее время широко используется для создания противоопухолевых препаратов. Это связано с его природными онколитическими свойствами, хорошей изученностью, длительной и очень успешной историей медицинского применения [1, 2]. Важным преимуществом ВОВ является возможность введения сразу нескольких дополнительных генов (трансгенов) с целью достижения большей онкоспецифичности и онколитической активности. Трансгены чаще всего вводят в участки генома, кодирующие факторы вирулентности, с целью дополнительной аттенуации вируса [1, 3]. Изучена возможность использования в качестве трансгенов генов цитокинов и других иммуномодуляторов, ингибиторов ангиогенеза, ферментов, превращающих внутри опухоли нетоксичные предшественники (prodrugs, пролекарства) в их цитотоксичные производные [4]. Полученные рекомбинантные ВОВ показали значимый противоопухолевый эффект в доклинических испытаниях. В настоящее время три рекомбинантных штамма ВОВ, разрабатываемые американской компанией “Jennerex Biotherapeutics”, проходят клинические испытания в качестве противоопухолевых средств [1, 5].

Одним из перспективных трансгенов, усиливающих онколитические свойства вирусов, является ген апоптоина. Апоптоин – неструктурный белок вируса анемии кур, который отвечает за гибель клеток при вирусной инфекции. Изучение цитолитической активности выявило высокую степень избирательности апоптоина, поскольку он способен индуцировать апоптоз опухолевых и трансформированных клеток различного видового и органного происхождения, практически не влияя на жизнеспособность нормальных клеток [6]. Механизм действия апоптоина до конца не выяснен. Однако известно, что в опухолевых клетках апоптоин локализуется преимущественно в ядре, в то время как в нормальных клетках он находится в цитоплазме [7], нестабилен и быстро деградирует [8]. При попадании в опухолевую клетку апоптоин связывается с регуляторной субъединицей PI3-киназы, вызывая ее конститутивную активацию, которая, в свою очередь, обеспечивает активацию киназы Akt и ее транслокацию в ядро вместе с апоптоином [9]. Находясь в ядре, Akt активирует киназу клеточного цикла CDK2 либо путем прямого фосфорилирования, либо непрямым способом, включающим индукцию протеасомного разрушения белка p27/Kip1, ингибитора CDK2 [10]. Активированная киназа CDK2 фосфорилирует Thr108 в молекуле апоптоина и тем самым способствует его локализации в ядре опухолевых клеток. В ядре апоптоин может связываться с такими белками-партнерами, как DEDAF, Nmi, APC/C и PML. Пока неясно, каким образом апоптоин способствует фосфорилированию белка Nur77 и его экспорту из ядра. Известно, что в цитоплазме Nur77 модулирует функцию Bcl-2-подобных белков, превращая их из антиа-

поптотических в проапоптотические [6]. Эти и, возможно, другие события способны инициировать апоптоз через митохондриальный путь активации каспаз [11].

Избирательную индукцию апоптоза опухолевых клеток наблюдали при экспрессии гена апоптоина в составе ретровирусных конструкций [12]. Однако ретровирусные конструкции нельзя применять для лечения человека, поскольку они способны встраиваться в хромосомы и вызывать их неконтролируемые модификации.

Противоопухолевая активность апоптоина показана в системе экспрессии рекомбинантного аденовируса на модели опухолей печени человека в бестимусных мышцах (nude) [13]. Однако проведенные к настоящему времени клинические испытания показали, что литический потенциал рекомбинантного аденовируса недостаточен для остановки роста злокачественных опухолей у человека [14]. Кроме того, вследствие широкой распространенности аденовирусов в человеческой популяции, высокий уровень циркулирующих антител к ним может снижать противоопухолевую эффективность рекомбинантных аденовирусов.

Введение гена апоптоина в геном вируса болезни Ньюкастла [15] или вируса оспы кур [16] приводило к появлению у этих вирусов способности индуцировать апоптоз опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo* на мышечных моделях. Несмотря на безопасность и непатогенность для человека, вирус оспы кур обладает выраженной видовой специфичностью. Этот вирус способен инфицировать опухолевые клетки человека, но не может в них размножаться, что ограничивает возможности его использования в терапии злокачественных новообразований. В этой связи перспективным представляется введение гена апоптоина в ВОВ, который обладает широким клеточным тропизмом и высоким онколитическим потенциалом. После отмены в 1980 году противооспенной вакцинации в человеческой популяции практически отсутствует циркуляция этого вируса и сопутствующие ей антитела, что способствует усилению природной способности ВОВ системно распространяться по организму и инфицировать отдаленные опухоли и метастазы [5].

Цель представленной работы состояла в конструировании аттенуированного варианта ВОВ (штамм Л-ИВП) с делецией гена вирусного фактора роста (virus growth factor, VGF), введении в район делеции гена апоптоина и изучении онколитических свойств полученных рекомбинантных вирусов *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки и вирусы. Вирус ВОВ (штамм Л-ИВП) получен из Государственной коллекции Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”. Вирус

нарабатывали, очищали и титровали как описано ранее [17]. Линии опухолевых клеток человека (A549, A431, U87MG, RD и MCF7) выращивали на среде DMEM (“Invitrogen”) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, “HyClone”, США). Клетки MCF 10A растили на специализированной среде для культивирования эпителиальных клеток молочной железы MEGM BulletKit (“Lonza”, США).

Синтез гена апоптина. Для сборки гена апоптина в соответствии со структурой гена белка VP3 (ORF2) вируса анемии кур, представленной в GenBank (AF390102, нуклеотиды 465–830), были синтезированы перекрывающиеся праймеры, а также два праймера для амплификации полноразмерного сегмента ДНК, кодирующего апоптин. Эти праймеры имели следующую структуру:

1. 5'-AGAGTCTAGAAAGATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCAC-3';
2. 5'-CATCAACGGTGTTCAGGCCACCAACAAGTTCACGGCCGTTGGAAAC-3';
3. 5'-CAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAATCACTCTATCG-3';
4. 5'-GCTGCGCGAATGCTCGCGCTCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGG-3';
5. 5'-CAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGACTTGAGGACCGATC-3';
6. 5'-CCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGC-3';
7. 5'-AAGCTTGATTACCACTACTCCAGCCGACCCCGAACC CGCAAAAAGG-3';
8. 5'-GAGAGGATCCTACAGTCTTATACGCCTTTTTGCGGTTCCGGG-3';
9. 5'-GTAGTGGTAATCAAGCTTTCTTTTAGCTCGCTTACCCTGTACTCGG-3';
10. 5'-GATCGCTTCTTCGAGGGAGGCTTGGGTTGATCGGTCCCTCAAGTCC-3';
11. 5'-CTTGA AACAGTGCTTTCTGAATTGTCCG CAGTTGCAGATCTTAG-3';
12. 5'-GCGAGCATTCGCGCAGCCACACAGCGATAGAGTGATTGTAATTC-3';
13. 5'-CAATCCGGATCTCTCTGCAGTGAGGGGTTTCCAACGGCCGTGAAC-3';
14. 5'-GGCCTGAACACCGTTGATGGTCCGGGTGGAGTATCTTCTTGGAG-3';
15. 5'-AGAGTCTAGAAAGATGAACGCTCTC-3';
16. 5'-AGAGAGGATCCGGCAGTCTTATACGCCTTTTTG-3'.

Перекрывающиеся олигонуклеотиды (номера 1–14) отжигали с образованием промежуточного комплекса с последующей застройкой брешей ДНК-полимеразой фага T4. Фрагменты соединяли лигазой, а затем амплифицировали вставку с использованием двух праймеров (номера 15 и 16), содержащих XbaI- и BamHI-сайты (выделены серым). После выделения из агарозного геля и рестрикции вставку лигировали в плазмиду pUC18. Правильность сборки гена апоптина определяли секвенированием полученной плазмидной конструкции pUC-apoptin.

Конструирование интегративных плазмид. Интегративные плазмиды для конструирования рекомбинантных вариантов ВОВ получены на основе коммерческого вектора pGEM-3Zf(+)

(“Promega”). В этот вектор под контролем синтетического промотора p7.5K BOB [18] встроили ген *pat*, обеспечивающий устойчивость к пурамицину, и получили плазмиду pGEM-Puro. Далее в pGEM-Puro ввели три фрагмента ДНК: левая фланкирующая область гена *C11R*, кодирующего VGF [19], и ранне-поздний промотор pE/L [18]; лидерная последовательность гена *C11R*, кодирующая мотив MLINYLM LLLFAAMIIRSFA, с дополнительным сайтом узнавания пептидазой – DS; полилинкер и правая фланкирующая область гена *C11R*. Для получения этих трех фрагментов ДНК на основе известной нуклеотидной последовательности генома ВОВ штамм Lister107 были рассчитаны праймеры:

17. 5'-GCCAAGGATCCACCATCATATCAACGCTGGTAA-3';
18. 5'-CACCTGGCGCCTTTATATTCACAAAAAATAAAATTTCAATTTTGGCC
TCAGTGTGTGTTTATGACAAGATTGGGA-3';
19. 5'-CGCCACCATGTTGATAAATTATCTGATGTTGTTGTTTCGCTGCTATGATAATCAGAT
CATTCGCCGATAGTGC-3';
20. 5'-GGCCGCACTATCGGCGAATGATCTGATTATCATAGCAGCGAACAACAACATCA
GATAATTTATCAACATGGTGG-3';
21. 5'-CGCCTGCGGCCGCATCCTAGGCATGGGCCCTCAGAAAACCCAAACACTACAAC
GTCATAT-3';
22. 5'-GGGAAGCTTGAAACACCGATATGTGGAGGCA-3'.

Праймеры содержали сайты рестрикции (выделены серым) для: 17 – BamHI; 18 – MlyI13I; 21 – NotI; 22 – HindIII. Праймер 18 содержит последовательность ранне-позднего промотора рЕ/Л (подчеркнута и выделена жирным). Олигонуклеотиды 19 и 20 комплементарны друг другу и содержат лидерную последовательность гена *C11R* (выделена рамкой) с сайтом узнавания для пептидазы DS (подчеркнут). Эта пара олигонуклеотидов формирует дуплекс с “липкими” NotI- и MlyI13I-концами. Олигонуклеотиды были синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Матрицей для амплификации фланкирующих фрагментов служила ДНК ВОВ (штамм Л-ИВП), выделенная из очищенного препарата вируса с помощью набора ДНК-сорб-АМ (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Полученные фрагменты клонировали в вектор рGEM-Puro в два этапа. На первом этапе проводили совместное лигирование обработанного соответствующими эндонуклеазами рестрикции ПЦР-фрагмента левой фланкирующей области гена *C11R* ВОВ с ранне-поздним промотором рЕ/Л, и олигонуклеотидного дуплекса, содержащего лидерную последовательность гена *C11R* с сайтом узнавания пептидазы DS. Полученный фрагмент

клонировали в промежуточную плазмиду по сайтам BamHI и NotI. Другую промежуточную плазмиду синтезировали путем лигирования ПЦР-фрагментов, содержащих полилинкер и правую фланкирующую область гена *C11R* ВОВ, обработанных соответствующими эндонуклеазами рестрикции, и последующего клонирования по сайтам рестриктаз NotI и HindIII. Конструирование плазмиды рGEM-Puro-UN-DS заключалось в совместном лигировании BamHI–NotI- и NotI–HindIII-фрагментов промежуточных плазмид в векторную плазмиду рGEM-Puro/BamHI–HindIII. Вектор рGEM-Puro-UN-DS представляет собой универсальную конструкцию для встраивания любых трансгенов в геном ВОВ в район делеции фрагмента гена *C11R* и экспрессии этих трансгенов под контролем ранне-позднего синтетического промотора рЕ/Л.

Плазмида рGEM-Puro-DS-Apo-Flag (рис. 1а) получена переносом гена апоптоина из плазмиды рUC-apoptin в вектор рGEM-Puro-UN-DS. Фрагмент, содержащий ген апоптоина (APO), синтезирован с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды рUC-apoptin и следующих праймеров:

23. 5'-GCCGTGCGGCCGCGATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCA-3';
 24. 5'-GGCTTGGGCCCTA CTTATCGTCGTCGTCCTTGTAATC CAGTCTTATACGCC-TTTTGGCGTTC-3'.

В состав праймеров 23 и 24 были введены сайты рестрикции (выделены серым): NotI и ApaI соответственно. Праймер 24 содержит терминирующий кодон (подчеркнут и выделен жирным) и последовательность, кодирующую эпитоп FLAG с мотивом DYKDDDDK (выделена рамкой). Эта последовательность введена для иммунодетекции синтезируемого апоптоина. Конструирование целевой плазмиды заключалось в лигировании ПЦР-фрагмента APO/NotI–ApaI в векторную плазмиду рGEM-Puro-UN-DS/NotI–ApaI.

Трансфекция клеток CV-1 плазмидной ДНК и получение рекомбинантных вариантов ВОВ. Рекомбинантные варианты ВОВ с делецией гена *C11R* получали с помощью интегративной плазмиды рGEM-Puro-UN-DS, а со вставкой гена апоптоина – с использованием рGEM-Puro-DS-Apo-Flag. ДНК интегративных плазмид для проведения трансфекции наработали в препаративных количествах в 500 мл среды Лурия–Бертани и выделили с использованием набора EndoFree Plasmid Maxi Kit (“Qiagen”). Трансфекцию проводили с помощью реагента Lipofectamine™ LTX Plus (“Invitrogen”) на 90%-ном монослое клеток CV-1, выращенном в шестилуночных планшетах (“Greiner”, ФРГ). Клетки инфицировали ВОВ (штамм Л-ИВП)

с множественностью 0.05 БОЕ/клетка. После инкубации в течение 1 ч при 37°C добавляли смесь плазмидной ДНК (5 мкг) с Lipofectamine™ LTX Plus в соответствии с рекомендацией производителя в 1 мл среды Opti-MEM (“Invitrogen”). Через 1 ч инкубации при 37°C в лунки добавляли 2 мл среды Opti-MEM и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24–36 ч до развития цитопатического действия. Материал трижды замораживали–оттаивали и обрабатывали ультразвуком для получения гомогенной вирусной суспензии. Далее проводили селекцию рекомбинантов путем трехкратного пассирования на монослое клеток CV-1 с добавлением пуромицина (“Sigma-Aldrich”) в концентрации 10 мкг/мл среды DMEM. Вирус клонировали методом бляшек под твердым агаровым покрытием. Делецию фрагмента гена *C11R* или наличие вставки гена апоптоина выявляли методом ПЦР с использованием праймеров Not-U26 5'-AATTATCTGATGTTGTTGTTCCGCTGC-3' и Apa-L22 5'-GAGCACAATACCGGGAGATGG-3'. Вирусную ДНК для проведения ПЦР выделяли с использованием наборов ДНК-сорб-АМ. Размер амплифицированного фрагмента ДНК исходного ВОВ составлял 316 п.н., с делецией фрагмента гена *C11R* – 134 п.н., а рекомбинантного вируса со

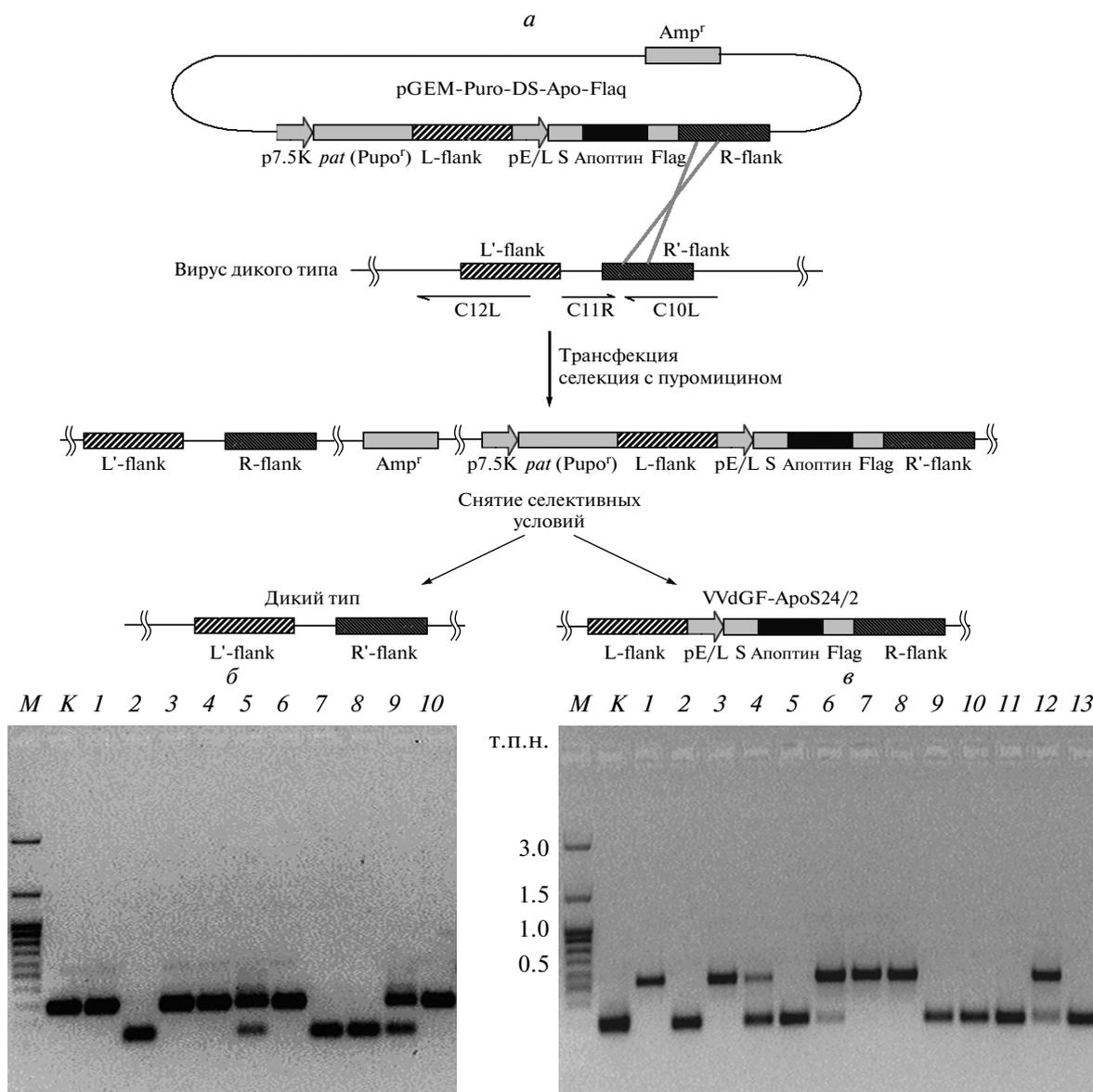


Рис. 1. Конструирование рекомбинантных вариантов ВОВ методом временной доминантной селекции с использованием гена устойчивости к пурамицину. *а* – Схема получения рекомбинантного варианта VVdGF-ApoS24/2. L'-flank и R'-flank – области генома ВОВ, гомологичные фрагментам L-flank и R-flank плазмиды интеграции pGEM-Puro-DS-Apo-Flag. S – лидерная последовательность гена *C11R* с сайтом узнавания для пептидазы DS. *б* – Получение делеционных по гену *C11R* вариантов ВОВ. ПЦР-анализ 10 клонов вируса из трансфекционного пула с плазмидой pGEM-Puro-UN-DS после трех раундов селекции с пурамицином: *М* – маркер молекулярных масс 100 п.н. + 1.5 т.п.н. + 3 т.п.н. (“СибЭнзим”, Россия); *К* – ВОВ дикого типа (Л-ИВП); *1–10* – клоны, из которых *2, 7, 8* – делеционные варианты, а *5 и 9* – смесь делеционного варианта и вируса дикого типа. *в* – Получение рекомбинантов со вставкой гена апоптоина в район гена *C11R*. ПЦР-анализ 13 клонов из трансфекционного пула с плазмидой pGEM-Puro-DS-Apo-Flag после трех раундов селекции с пурамицином: *М* – маркер; *К* – ВОВ дикого типа (Л-ИВП); *1–13* – клоны, из которых *1, 3, 7, 8* – целевые рекомбинанты, а *4, 6, 12* – смесь рекомбинантного вируса и вируса дикого типа.

вставкой гена апоптоина – 513 п.н. Отобранные рекомбинантные клоны дважды реклонировали, нарабатывали на монослой клеток CV-1 и очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (25–40%). Титр вируса определяли методом бляшек на монослой клеток CV-1, окрашенном фиксирующим раствором кристаллического фио-

летового (2 г/л кристаллический фиолетовый, 50 мл/л формальдегид, 100 мл/л этанол). Очищенные рекомбинантные вирусы с титром 10^9 БОЕ/мл хранили в расфасованном виде при -80°C .

Анализ экспрессии гена апоптоина в составе рекомбинантного ВОВ. Монослой клеток CV-1, выращенный в культуральном матрасе объемом 650 мл

(“Greiner”, ФРГ), инфицировали рекомбинантным ВОВ с множественностью 1 БОЕ/кл. Инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM, затем среду удаляли, клетки разрушали лизирующим буфером (50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 5 мМ MgCl₂, смесь ингибиторов протеаз (proteases inhibitor cocktail) в объеме 7 мл. Проводили три раунда замораживания—оттаивания и обработку ультразвуком (3 раза по 20 с при 200–300 Вт с охлаждением (10 с) после каждой обработки), центрифугировали (14000 об./мин, 30 мин, 4°C). Супернатант анализировали методом Вестерн-блоттинга с использованием в качестве первичных антител ANTI-FLAG BioM2 (“Sigma-Aldrich”), а в качестве вторичных — антимышиные IgG (целая молекула), конъюгированные со щелочной фосфатазой (“Sigma-Aldrich”). В качестве субстрата использовали BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) и NBT (NitroBluetetrazolium). Реакцию останавливали промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Оценка онколитической активности рекомбинантных ВОВ в культурах клеток опухолей человека различного происхождения. Онколитическую активность ВОВ и его рекомбинантных вариантов в культурах клеток определяли микрометодом на 96-луночных планшетах (“Greiner”) с использованием 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамиды (реагент ХТТ, “Sigma-Aldrich”) [20]. Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый ХТТ в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Перевод формазана в раствор с помощью феназинметасульфата (PMS) и последующая фотометрия позволяют точно соотносить изменение оптической плотности раствора с изменением количества жизнеспособных клеток. Мы оценивали специфическую гибель инфицированных вирусами клеток по отношению к неинфицированным (контроль, 100% жизнеспособности).

Онколитическую активность выражали как 50%-ную цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀) — концентрацию вируса, вызывающую гибель 50% клеток. Для определения ЦТД₅₀ в лунки планшета с 50%-ным монослоем клеток вносили десятикратные разведения вирусной суспензии с множественностью инфекции от 0.001 до 10 БОЕ на клетку в 100 мкл среды 199 с добавлением 2% ЭТС. Планшеты помещали в термостат (37°C, 5% CO₂, влажность 85%) и инкубировали в течение 72 ч. После инкубации в каждую тестируемую лунку добавляли по 50 мкл смеси ХТТ и PMS (“Fluka”, США), приготовленной из расчета 20 мкл 1.25 мМ PMS на 1 мл рабочего раствора ХТТ 1 мг/мл. Планшет инкубировали в течение еще 4 ч и определяли оптическую плотность (OD_{490/620}) на планшетном спектрофотометре SpectraCount

(“Packard”). Значения для каждой точки определяли в пяти повторностях, рассчитывали среднее значение и дисперсию для различных концентраций вируса, строили график зависимости оптической плотности от множественности инфекции. По графику определяли величину ЦТД₅₀ — концентрацию вируса, при которой величина OD_{490/620}, измеренная в зараженных лунках, составляет 50% от величины OD_{490/620} в лунках с незараженной культурой. Сравнивали ЦТД₅₀ для разных культур клеток: чем больше ЦТД₅₀, тем меньшей онколитической активностью обладает вирусный препарат в данной культуре клеток. Все расчеты проводили с использованием программного обеспечения LabView.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование рекомбинантных вариантов вируса осповакцины с делецией фрагмента гена C11R и вставкой гена апопттина

В структуре генома ортопоксвирусов выделяют инвертированные концевые повторы различной длины. Эти участки генома высоко вариативны, различия в них наблюдаются не только у разных штаммов одного и того же вида, но и среди отдельных субклонов одного штамма [21]. Ген C11R, кодирующий VGF, обычно расположен в левом вариативном районе генома в непосредственной близости от концевого инвертированного повтора. В этом районе могут происходить процессы рекомбинации, обуславливающие транслокации и инверсии участков вирусного генома. Вследствие этого ряд изолятов ВОВ содержит две копии гена C11R, когда в правом вариативном районе генома находится инвертированная копия этого гена. В настоящее время в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) представлена информация о полных нуклеотидных последовательностях 34 различных геномов ВОВ. Проведенный нами сравнительный анализ этих геномов позволил заключить, что 14 изолятов ВОВ содержат две копии гена C11R. Можно отметить, что 10 из 13 клоновых вариантов штамма Другах и два из 11 изолятов штамма Ankara содержат две копии гена C11R. По две копии гена C11R обнаружены также у штаммов GLV-1h68 и WR. В базе данных GenBank представлены полные геномы четырех биовариантов штамма Lister, все они содержат одну копию гена, кодирующего VGF. В качестве основы для конструирования рекомбинантных вариантов ВОВ был выбран российский штамм Л-ИВП (биовариант штамма Lister), в геноме которого имеется одна копия гена C11R.

Ген C11R кодирует секретлируемый белок VGF, аналог эпидермального фактора роста (EGF, epidermal growth factor). Известно, что этот белок не существует для репликации вируса *in vitro*. Однако опыты по генетической инактивации пока-

зали, что VGF играет важную роль в увеличении вирулентности и стимуляции пролиферации клеток в месте первичной инфекции *in vivo* [22]. Поксвирусные факторы роста действуют посредством связывания своего EGF-подобного домена с представителями семейства рецепторов ErbB. В результате запускается сигнальный каскад, который включает активируемые митогенами протеинкиназы и приводит к стимуляции роста и деления клеток [23]. Удаление EGF-подобного домена вызывает полную инактивацию гена *C11R*.

Рекомбинантные варианты ВОВ с делецией участка, кодирующего EGF-подобный домен гена *C11R*, были получены с использованием инсерционной плазмиды pGEM-Puro-UN-DS (см. “Экспериментальную часть”). Кассету для экспрессии гена апоптоина, содержащую промотор ВОВ, последовательность лидерного пептида VGF и синтетический ген апоптоина, встраивали в район делеции EGF-подобного домена с использованием инсерционной плазмиды pGEM-Puro-DS-Apo-Flag. Оба рекомбинантных варианта получены на основе клонированного варианта ВОВ (штамм Л-ИВП), который по всем параметрам (скорость репликации в клетках CV-1, время образования, размер и фенотип бляшек, а также оспин на хорион-аллантаоисных оболочках 11-дневных куриных эмбрионов, профиль HindIII-гидролизата вирусной ДНК) не отличался от исходной неклонированной популяции вируса.

Рекомбинанты получали методом временной доминантной селекции с использованием в качестве маркера гена устойчивости к пуромицину (*pat*), что позволило выделить целевые рекомбинантные вирусы уже на третьем пассаже селекции, в котором по данным ПЦР-анализа вирусной ДНК (см. “Экспериментальную часть”) свыше 50% вирусных клонов содержали искомую делецию (рис. 1б, клоны 2, 5, 7–9) или вставку (рис. 1в, клоны 1, 3, 4, 6–8, 12). При использовании системы селекционного маркера *gpt* (гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза), которая позволяет преодолеть токсичность микофеноловой кислоты [24], нужные рекомбинанты ортопоксвирусов удавалось количественно выявить только после пяти–шести раундов селекции [25, 26]. Схема получения рекомбинантов на примере вставки гена апоптоина приведена на рис. 1а. Рекомбинантный ВОВ, содержащий вставку гена апоптоина в район гена *C11R*, назвали VVdGF-ApoS24/2, а вирус с делецией фрагмента гена *C11R* – VVdGF2/6.

Для оценки экспрессии гена апоптоина в составе рекомбинантного ВОВ в С-концевую область белка ввели антигенный эпитоп FLAG (см. “Экспериментальную часть”), на который имеются коммерческие антитела для проявления белков методом Вестерн-блоттинга. Размер транскрипта,

включающего лидерную область *C11R*, ген апоптоина и последовательность FLAG, составляет 467 п.н., а расчетная молекулярная масса синтезируемого полипептида – 16 кДа. Согласно опубликованным данным, молекулярная масса апоптоина равна 13.6 кДа [27]. Результаты Вестерн-блот-анализа культуральной среды и лизатов клеток, инфицированных рекомбинантным ВОВ, приведены на рис. 2. В качестве отрицательного контроля использовали исходный родительский штамм ВОВ Л-ИВП. Как следует из рис. 2, апоптин выявляется только в лизатах клеток, инфицированных рекомбинантным вирусом VVdGF-ApoS24/2, причем количество белка увеличивается по мере развития инфекции (с 24 до 48 ч). Важно отметить, что на электрофореграмме лизатов клеток апоптин представлен одной полосой с молекулярной массой, соответствующей расчетной (16 кДа), и отсутствуют продукты протеолитической деградации, что свидетельствует о высокой стабильности белка. В культуральной среде не удалось обнаружить ни полноразмерного апоптоина, ни продуктов его гидролиза, что указывает на отсутствие секреции рекомбинантного белка при использовании конструкций данного типа.

Онколитическая активность рекомбинантных вариантов ВОВ

Онкоселективность исходного штамма Л-ИВП и рекомбинантных вариантов VVdGF2/6 и VVdGF-ApoS24/2 проверяли на двух культурах клеток (нормальной и раковой) эпителия молочной железы: MCF10A – нормальный эпителий молочной железы; MCF7 – аденокарцинома молочной железы. Результаты оценки цитотоксической активности вирусов представлены на рис. 3 и в таблице. Как следует из рис. 3, с увеличением множественности инфекции содержание (%) живых клеток в популяции клеток MCF10A уменьшается незначительно, в то время как клетки аденокарциномы MCF7 практически полностью лизируются при увеличении множественности инфекции до 10 БОЕ/клетка. Из таблицы видно, что в паре гомологичных культур клеток эпителия молочной железы раковая/нормальная (MCF7/MCF10A) индекс онкоселективности всех исследованных вирусов превышает 100. При этом наибольшую селективность показал рекомбинант VVdGF-ApoS24/2, продуцирующий апоптин.

Сравнительный анализ онколитической активности рекомбинантных штаммов ВОВ проводили на четырех культурах опухолевых клеток человека различного происхождения: карциномы легкого (A549); эпидермоидной карциномы (A431); эпителиальной глиобластомы/астроцитомы (U87MG); рабдомиосаркомы (RD). Результаты опытов представлены на рис. 4. Как следует из полученных дан-

ных клетки карциномы человека, независимо от их органного происхождения, обладают высокой чувствительностью как к рекомбинантным вариантам ВОВ, так и к родительскому штамму Л-ИВП (ЦТД₅₀ < 0.015 БОЕ/клетка), в то время как клетки глиобластомы и рабдомиосаркомы менее чувствительны ко всем исследованным вирусам. В этом случае для вирусов Л-ИВП и VVdGF2/6 ЦТД₅₀ > 0.07 БОЕ/клетка.

Делеционный вариант VVdGF2/6 не отличался от исходного штамма Л-ИВП по цитолитической активности в отношении высокочувствительных клеток. В клетках глиобластомы U87MG его активность была выше, а в клетках рабдомиосаркомы — ниже, чем у Л-ИВП, однако эти различия недостоверны при *P* < 0.05. Рекомбинантный вирус VVdGF-ApoS24/2, продуцирующий апоптин, проявлял большую цитотоксическую активность по сравнению с Л-ИВП и делеционным вариантом, и эти различия были статистически значимы на всех четырех тестируемых культурах клеток злокачественных опухолей человека.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВОВ обладает природной онкоселективностью, но ее выраженность существенно различается у разных штаммов [28]. Мы использовали штамм Л-ИВП (вариант штамма Lister), который применяли в медицинской практике для борьбы с оспой в России в 1960–1970-е гг. [2]. На примере пары культур клеток эпителия молочной железы человека — раковая/нормальная (MCF7/MCF10A) — мы показали, что цитотоксическая активность Л-ИВП на раковых клетках более чем в 290 раз превышает активность на нормальных клетках. Эти данные свидетельствуют о перспективности использования российского вакцинного штамма Л-ИВП в качестве вектора для создания на его основе противоопухолевых препаратов.

Для предотвращения возможных осложнений, обусловленных применением противоопухолевых средств на основе живого вакцинного штамма Л-ИВП, у онкологических больных с иммунодефицитом мы провели аттенуацию вируса за счет инактивации гена одного из факторов вирулентности — VGF. Этот ген расположен в инвертированном концевом повторе генома вируса, поэтому ряд штаммов ВОВ содержит две копии гена *C11R*, кодирующего VGF. Однако все варианты штамма Lister, включая Л-ИВП, имеют только один ген *C11R* в левой части генома. Такая структура генома штамма Л-ИВП существенно облегчила получение делеционных по этому гену вариантов ВОВ за счет однократного раунда рекомбинации вирусной ДНК с интегративной плазмидой pGEM-Puro-UN-DS, несущей фрагмент *C10L–C12L* вирусного генома с делецией в

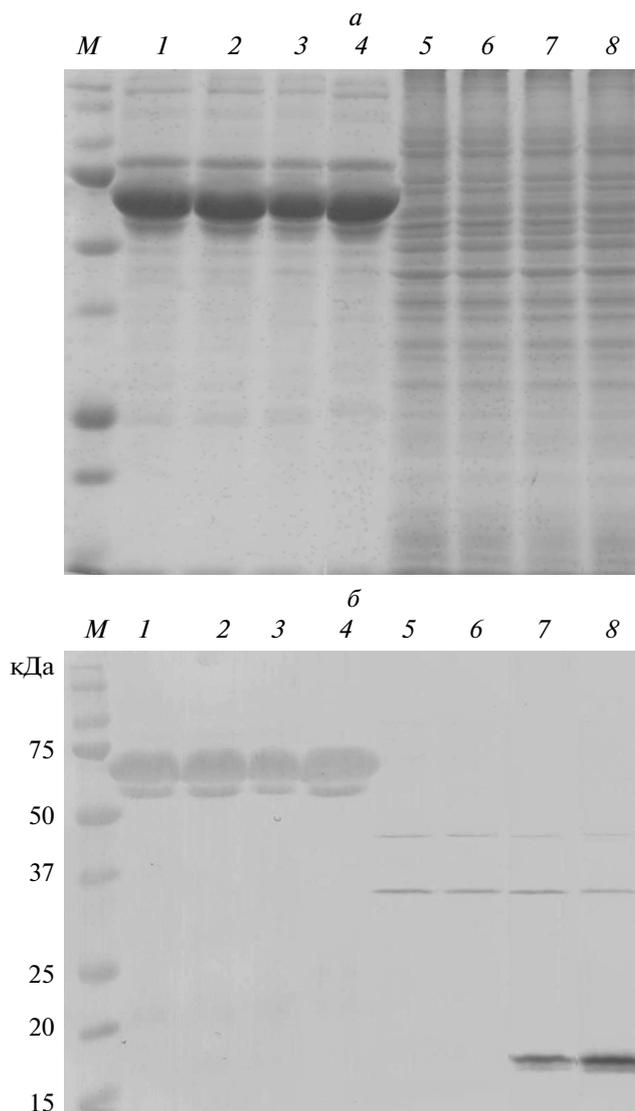


Рис. 2. Экспрессия гена апоптина в составе рекомбинантного ВОВ в клетках CV-1. Электрофореграмма (а) и Вестерн-блот (б). М — маркер молекулярных масс — 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 кДа. 1–4 — образцы культуральной среды; 5–8 — лизаты клеток. 1, 5 — неинфицированные клетки; 2, 6 — ВОВ (Л-ИВП), 48 ч после инфекции; 3, 7 — VVdGF-ApoS24/2, 24 ч после инфекции; 4, 8 — VVdGF-ApoS24/2, 48 ч после инфекции.

районе гена *C11R*. Рекомбинанты получали методом временной доминантной селекции с использованием в качестве доминантного маркера гена устойчивости к пуromицину (*pat*), введенного в инсерционную плазмиду pGEM-Puro-UN-DS и экспрессируемого под контролем синтетического промотора p7.5K ВОВ. В нашей работе система *pat*/пуromицин была впервые использована для селекции рекомбинантов ВОВ и показала более высокую эффективность по сравнению с используемой ранее системой *gpt*/микофеноловая кислота.

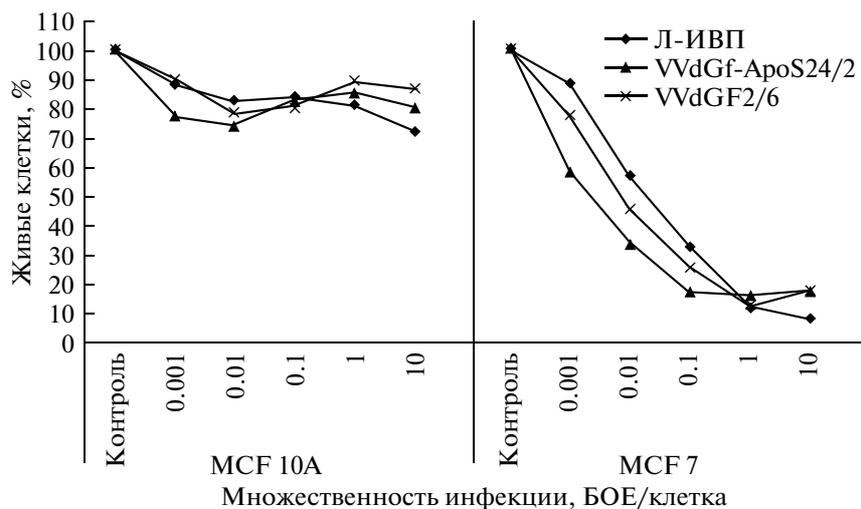


Рис. 3. Сравнительный анализ цитотоксического эффекта исходного штамма (Л-ИВП) и рекомбинантных вариантов (VVd-ApoS24/2 и VVdGF2/6) BOV на культурах нормальных (MCF10A) и раковых (MCF7) клеток. Выращенный в 96-луночных планшетах 50%-ный монослой клеток инфицировали вирусом с множественностью 0.001–10 БОЕ/клетка (ось абсцисс), инкубировали в течение 72 ч и определяли процент выживших клеток в ХТТ-тесте (ось ординат) по сравнению с контролем. Контроль – неинфицированные клетки, выращенные и инкубированные в тех же условиях, 100%-ная выживаемость.

Рекомбинантный вирус VVdGF2/6 с делецией последовательности, кодирующей EGF-подобный домен гена *C11R*, имеет более высокий по сравнению с Л-ИВП индекс селективности в отношении клеток рака молочной железы в паре культур клеток MCF7/MCF10A (800 против 290). Цитолитическая активность VVdGF2/6 в отношении других тестируемых в работе опухолевых клеток человека не отличалась от активности исходного штамма Л-ИВП.

Введение гена апоптоина вируса анемии кур в район делеции гена *C11R* позволило значимо повысить онколитическую активность Л-ИВП, при этом индекс селективности в отношении раковых клеток вырос до 2500 в паре MCF7/MCF10A. Экспрессия гена апоптоина в составе рекомбинантного вируса VVdGF-ApoS24/2 осуществлялась под контролем синтетического ранне-позднего промотора BOV, поэтому в процессе инфекции в клетках наблюдалось накопление рекомбинантно-

го белка. Несмотря на введение в структуру белка лидерного пептида VGF, нам не удалось добиться секреции апоптоина в ростовую среду. Известно, что участок, прилегающий к N-концевой сигнальной последовательности, важен как для секреции белка, так и для его процессинга [29]. Возможно, только лидерной области недостаточно для секреции рекомбинантного белка, для этого требуется более протяженный фрагмент N-концевой части VGF, несущий контекст, необходимый для эффективного действия пептидазы. В настоящее время создается новая конструкция, которая позволит получить секретлируемую форму апоптоина, способную обеспечить дополнительное цитотоксическое воздействие на клетки, соседствующие с инфицированными рекомбинантным вирусом клетками внутри опухоли, за счет передачи белка через межклеточное пространство.

Рекомбинантный вирус VVdGF-ApoS24/2 обладает значимо большей литической активно-

Сравнительная цитотоксическая активность исходного штамма Л-ИВП и двух рекомбинантных вариантов вируса осповакцины

Культура клеток	ЦТД ₅₀ , БОЕ/клетка		
	Л-ИВП	VVdGF2/6	VVdGF-ApoS24/2
MCF10A	>10	>10	>10
MCF7	0.034**	0.012	0.004**
Индекс селективности*	>290	>800	>2500

* Индекс селективности рассчитывали для каждого вируса как соотношение ЦТД₅₀ в нормальных и опухолевых клетках.

** Различия статистически значимы при $P < 0.05$.

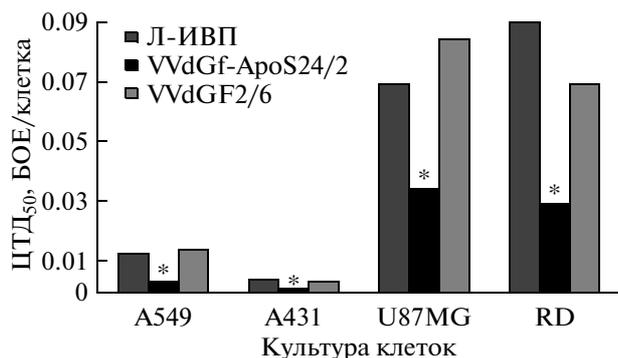


Рис. 4. Онколитическая активность рекомбинантных вариантов ВОВ и исходного штамма Л-ИВП в опухолевых клетках человека. Использовали четыре культуры клеток: А549, А431, U87MG и RD. Клетки выращивали в 96-луночных планшетах, инфицировали (10-кратные разведения вируса в диапазоне доз 0.001–10.0 БОЕ/клетка) и рассчитывали 50%-ную цитотоксическую дозу для каждого вируса (ЦТД₅₀) в ХТТ-тесте (см. “Экспериментальная часть”). Статистический анализ проводили по результатам трех независимых экспериментов. Звездочкой отмечены статистически значимые отличия ЦТД₅₀ рекомбинантного варианта VVd-ApoS24/2 при $P < 0.05$.

стью в отношении опухолевых клеток А549, А431, U87MG, RD и MCF7 по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП и его вариантом с делецией гена *C11R*. Однако его цитотоксическая активность в отношении нормальных клеток MCF10A была такой же, как у исходного вируса. Важно отметить, что тестируемые в работе линии опухолевых клеток человека различаются и по чувствительности к ВОВ, и по статусу гена *p53*, мутантного в клетках А431 и RD и дикого типа – в клетках А549, U87MG и MCF7. Полученные результаты согласуются с опубликованными данными о том, что апоптин способен индуцировать апоптоз в различных опухолевых и трансформированных клетках, но не в нормальных клетках, а индуцированный апоптином апоптоз не зависит от состояния гена *p53* [6, 11].

В связи с вышесказанным интересным и полезным представляется дальнейшее изучение онколитической активности штамма VVdGF-ApoS24/2 на моделях опухолей человека *in vivo*, а также конструирование на его основе препаратов, предназначенных для терапии злокачественных новообразований.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Российской Федерации (ГК 11.G34.31.0034), Программы государственной поддержки ведущих научных школ (НШ-2996.2012.4), Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (ГК 14.V37.21.1972) и Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритет-

ным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (ГК 14.512.11.0002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Юдина К.В., Бабкин И.В., Чумаков П.М., Нетесов С.В. 2012. Онколитические поксвирусы. *Молекуляр. генет., микробиол. и вирусол.* **1**, 8–15.
2. Маренникова С.С., Шелкунов С.Н. 1998. *Патогенные для человека ортопоксвирусы*. М.: КМК Scientific Press Ltd.
3. Нетесов С.В., Кочнева Г.В., Локтев В.Б., Святченко В.А., Сергеев А.Н., Терновой В.А., Тикунова Н.В., Шишкина Л.Н., Чумаков П.М. 2011. Онколитические вирусы: достижения и проблемы. *Эпидемиология и санитария.* **13**(157), 10–17.
4. Chalikhonda S., Kivlen M., O'Malley M., Dong X., McCart J., Gorry M., Yin X., Zeh H., Guo Z., Bartlett D. 2008. Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene. *Cancer Gene Ther.* **15**, 5–25.
5. Breitbach C., Burke J., Jonker D., Stephenson J., Haas A., Chow L., Nieva J., Hwang T., Moon A., Patt R., Pelusio A., LeBoeuf F., Burns J., Evgin L., De Silva N., Cvancic S., Robertson T., JeJ., Lee Y., Parato K., Diallo J., Fenster A., Daneshmand M., Bell J., Kim D. 2011. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature.* **477**, 99–102.
6. Los M., Panigrahi S., Rashedi I., Mandal S., Stetefeld J., Essmann F., Schulze-Osthoff K. 2009. Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1793**, 1335–1342.
7. Rohn J.L., Zhang Y.H., Aalbers R.I., Otto N., Den Hertog J., Henriquez N.V., Van De Velde C.J., Kuppen P.J., Mumberg D., Donner P., Noteborn M.H. 2002. A tumor-specific kinase activity regulates the viral death protein apoptin. *J. Biol. Chem.* **277**, 50820–50827.
8. Noteborn M.H.M. 2004. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms. *Veterinary Microbiology.* **98**, 89–94.
9. Maddika S., Mendoza F.J., Hauff K., Zamzow C.R., Paranjothy T., Los M. 2006. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol. Therapy.* **5**, 10–19.
10. Maddika S., Panigrahi S., Wiechec E., Wesselborg S., Fischer U., Schulze-Osthoff K., Los M. 2009. Unscheduled Akt-triggered activation of cyclin-dependent kinase 2 as a key effector mechanism of apoptin's anticancer toxicity. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1235–1248.
11. Zhou S., Zhang M., Zhang J., Shen H., Tangsakara E., Wang J. 2012. Mechanisms of apoptin-induced cell death. *Med. Oncol.* **29**, 2985–2991.
12. Noteborn M.H., Pietersen A. 2007. Gene delivery vehicle expressing the apoptosis-inducing proteins VP2 and/or apoptin. *US Patent.* #7.253.150.
13. Zhang K., Qian J., Wang S., Yang Y. 2012. Targeting gene-viro-therapy with AFP driving apoptin gene shows potent antitumor effect in hepatocarcinoma. *J. Biomed. Sci.* **19**, 20–32.

14. Rojas J., Thorne S. 2012. Theranostic potential of oncolytic vaccinia virus. *Theranostics*. **2**(4), 363–373.
15. Wu Y., Zhang X., Wang X., Wang L., Hu S., Liu X., Meng S. 2012. Apoptin enhances the oncolytic properties of newcastle disease virus. *Intervirology*. **55**, 276–286.
16. Li X., Jin N., Mi Z., Lian H., Sun L., Zheng H. 2006. Antitumor effects of a recombinant fowlpox virus expressing apoptin *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Cancer*. **119**, 2948–2957.
17. Серпинский О.И., Кочнева Г.В., Урманов И.Х., Сиволобова Г.Ф., Рябчикова Е.И. 1996. Конструирование рекомбинантных вариантов ортопоксвирусов путем встройки чужеродных генов в межгенный промежуток вирусного генома. *Молекуляр. биология*. **30**, 1064–1073.
18. Merchlinsky M., Eckert D., Smith E., Zauderer M. 1997. Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. *Virology*. **238**, 444–451.
19. Kim M., Yang H., Kim S., Reche P., Tirabassi R., Hussey R., Chishti Y., Rheinwald J., Morehead T., Zech T., Damon I., Welsh R., Reinherz E. 2004. Biochemical and functional analysis of smallpox growth factor (SPGF) and anti-SPGF monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **279**(24), 25838–25848.
20. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolf A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**(11), 757–766.
21. Fenner F., Wittek R., Dumbell K. 1989. *The Orthopoxviruses*. N.Y.: Acad. Press.
22. Buller R., Chakrabarti S., Cooper J., Twardzik D., Moss B. 1988. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J. Virol.* **62**, 866–874.
23. Tzahar E., Moyer J.D., Waterman H., Barbacci E.G., Bao J., Levkowitz G., Shelly M., Strano S., Pinkas-Kramarski R., Pierce J.H., Andrews G.C., Yarden Y. 1998. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *EMBO J.* **17**(20), 5948–5963.
24. Falkner F.G., Moss B. 1990. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* **64**, 3108–3111.
25. Колосова И.В., Серегин С.В., Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И., Бессмельцева Е.В., Бабкина И.Н., Соленова Т.Е., Бабкин И.В., Щелкунов С.Н. 2003. Изучение ортопоксвирусных генов, кодирующих kelch-подобные белки. II. Создание вариантов вируса оспы коров с направленными делециями генов. *Молекуляр. биология*. **37**, 585–594.
26. Кочнева Г.В., Колосова И.В., Лупан Т.А., Сиволобова Г.Ф., Юдин П.В., Гражданцева А.А., Рябчикова Е.И., Кандрин Н.Ю., Щелкунов С.Н. 2009. Ортопоксвирусные гены, кодирующие kelch-подобные белки. III. Создание вариантов вируса оспы мышей (эктромелии) с направленными делециями генов. *Молекуляр. биология*. **43**, 616–622.
27. Noteborn M., Todd D., Verschuere A., de Gauw H., Curran W., Veldkamp S., Douglas A., McNulty M., van der EB A., Koch G. 1994. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J. Virol.* **68**(1), 346–351.
28. Thorne S., Hwang T., O’Gorman W., Bartlett D., Sei S., Kanji F., Brown C., Werier J., Cho J., Lee D., Wang Y., Bell J., Kirn D. 2007. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest.* **117**, 3350–3358.
29. Flinterman M., Farzaneh F., Habib N., Malik F., Gacken J., Tavassoli M. 2009. Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products. *Mol. Therapy*. **17**, 334–342.