

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-201

**УЛУЧШЕННАЯ ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АДЕНОВИРУСА 5 ЧЕЛОВЕКА  
С КОМБИНАЦИЕЙ МУТАЦИЙ В E3-19K И I-LEADER\*****ENHANCED ONCOLYTIC EFFICACY OF HUMAN ADENOVIRUS 5  
WITH A COMBINATION OF MUTATIONS IN E3-19K AND I-LEADER**А. А. Степаненко<sup>1,2</sup>, А. О. Сосновцева<sup>1,3</sup>, А. А. Васюкова<sup>1</sup>,  
М. П. Валихов<sup>1</sup>, А. А. Чернышева<sup>1</sup>, О. В. Абрамова<sup>1</sup>, В. П. Чехонин<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии  
им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, МоскваА. А. Stepanenko<sup>1,2</sup>, А. О. Sosnovtseva<sup>1,3</sup>, А. А. Vasyukova<sup>1</sup>,  
М. P. Valikhov<sup>1,2</sup>, А. А. Chernysheva<sup>1</sup>, О. V. Abramova<sup>1</sup>, V. P. Chekhonin<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Serbsky National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology, Moscow<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow<sup>3</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ a.a.stepanenko@gmail.com

**Аннотация**

В результате комплексного подхода сравнительной оценки активности генно-модифицированных аденовирусов человека на панели опухолевых клеточных культур мы получили вирусный препарат с комбинацией модификаций в генах *i-leader* и *E3-19K*, который обладает усиленными онколитическими свойствами по сравнению с его генетическими предшественниками.

**Abstract**

As a result of a comprehensive approach to comparative assessment of the activity of genetically modified adenoviruses on a panel of tumor cell cultures, we obtained a unique viral preparation with a combination of modifications in the *i-leader* and *E3-19K* genes, which has enhanced oncolytic properties when compared with its genetic predecessors.

Для решения такой фундаментальной научно-медицинской проблемы, как низкая эффективность стандартной радио- и химиотерапии опухолей, могут быть адаптированы аденовирусы человека. Рекомбинантные онколитические вирусы на основе аденовируса 5 человека сегодня являются одними из самых тестируемых в клинических испытаниях противоопухолевой терапии. Онколитические аденовирусы в клинике характеризуются как безопасные, генетически стабильные и высоко иммуногенные препараты. К сожалению, внутриопухолевая инъекция онколитических аденовирусов не приводила к инфицированию большей части опухоли, так как вирусы не распространялись значительно от места инъекции. Онколитические аденовирусы могут быть улучшены за счет специфических генетических модификаций, направленных на усиление высвобождения потомства из инфицированных клеток и распространения вирусных частиц внутри опухоли.

Мы провели сравнительный анализ рекомбинантных онколитических аденовирусов, полученных методами генетической инженерии, с комбинациями мутаций в генах *E1B-19K*, *i-leader*, *E3-19K* и (или) *L2-pV* для выявления такого вируса, который демонстрирует наилучшую кинетику лизиса опухолевых клеток в монослое под агарозой путем оценки размера бляшек (тест на бляшкообразование). В целом в результате комплексной оценки онколитической активности генно-модифицированных аденовирусов на панели клеточных линий (пять независимых методов: оценка бляшкообразования, цитотоксичности, репродукции, проницаемости мембраны и маркеров иммуногенной клеточной гибели) мы подтвердили получение вирусного препарата с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader*, который обладает усиленными онколитическими свойствами по сравнению с его генетическими предшественниками.

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ (№ 22-75-10087).

Далее мы выявили, что химиопрепарат «Верапамил» способен дополнительно усиливать распространение аденовируса с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader*. Эти данные указывают на то, что молекулярный механизм усиливающего распространения действия у «Верапамила» может быть отличным от модификаций в *E3-19K* и *i-leader*. Однако усиливающий эффект «Верапамила» зависел от типа клеточной культуры.

Мы комплексно подтвердили ранее опубликованные данные о роли аденовирусного белка смерти ADP в блокирующем действии химиопрепарата «Нелфинавир» на распространение аденовируса. Более того, мы показали, что ADP в принципе не нужен для эффективного бляшкообразования вирусом с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader*, однако присутствие ADP может способствовать бляшкообразованию в отдельных опухолевых культурах клеток. «Нелфинавир» оказывал существенное ингибирующее действие на бляшкообразование вируса с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader* вне зависимости от присутствия ADP, хотя эффективность «Нелфинавира» зависела от типа клеток. Блокирующее действие «Нелфинавира» на вирус с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader* и нокаутом ADP, но не на вирус с нокаутом ADP без модификаций в *E3-19K* и *i-leader*, может указывать на более сложный контекст-зависимый механизм действия «Нелфинавира», чем ранее предполагалось.

Наконец, мы доказали на панели опухолевых клеточных культур ( $n = 17$ ), что вне зависимости от положения репортерного трансгена зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в *DBP* или *E1A* локусе аденовируса и вне зависимости от наличия модификаций в *E3-19K* и *i-leader* вирусы с модификацией фибринового протеина RGD-4C (инсерция пептида в N1 петлю головки фибринового протеина, позволяющего использовать интегрин  $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$  как основной рецептор) в тестах на бляшкообразование в целом демонстрировали наибольшую эффективность, затем следовали вирусы с модификацией фибринового протеина Ad5/35 (CD46 выступает в качестве основного рецептора) и самыми неэффективными были вирусы с модификацией фибринового протеина Ad5/3 (десмоглеин 2 выступает в качестве основного рецептора).

Наши данные, полученные в результате комплексной сравнительной оценки рекомбинантных аденовирусов, однозначно указывают на то, что аденовирусы с комбинацией мутаций в *E3-19K* и *i-leader* проявляют большую онколитическую эффективность по сравнению с родительскими вирусами, причем онколитическая активность может быть усилена «Верапамиллом» и подавлена «Нелфинавиром».