

УДК 578.5

doi: 10.17223/19988591/23/9

**В.А. Терновой¹, В.А. Святченко¹, М.В. Тарасова^{1,2},
Н.Н. Киселев¹, Е.В. Чуб¹, Т.П. Микрюкова¹,
Е.В. Протопопова¹, В.Б. Локтев^{1,2}, П.М. Чумаков^{2,3}, С.В. Нетесов^{1,2}**

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирская область)

² Новосибирский национальный исследовательский государственный
университет (г. Новосибирск)

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (г. Москва)

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОВИРУСОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН БЕЛКА АПОПТИНА

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (ГК №14.512.11.0003 с ГНЦ ВБ «Вектор» по теме: «Разработка прототипов онколитических препаратов на основе рекомбинантных аденовирусов, избирательно инфицирующих и лизирующих опухолевые клетки человека»).

Осуществлен дизайн последовательностей гена белка апоптоина, промоторов *hTERT*, *CMV* и конструирование несущих их рекомбинантных плазмид. С использованием методологии гомологичной рекомбинации и котрансфекции клеток получены два рекомбинантных аденовируса *AdΔE1a-hT-Aro* и *AdΔE1a-CM-Aro* с инсерциями гена белка апоптоина под контролем *hTERT*- и *CMV*-промоторов и дефектных по репликации в эукариотических клетках. Третий рекомбинантный аденовирус *AdhTE1a-CM-Aro* содержит инсерцию гена апоптоина и ген *E1A* под контролем *hTERT*-промотора и делецию гена *E1B-55K*, что должно обеспечивать ему высокий уровень селективной литической активности в отношении раковых клеток. Полученные аденовирусные векторы могут служить основой для создания перспективных онколитических препаратов, обладающих высокой специфичностью благодаря контролю вирусной репликации *hTERT*-промотором, а также высокой онколитической активности, обусловленной наличием гена белка апоптоина, вызывающего *p53*- и *bcl-2*-независимый апоптоз опухолевых клеток.

Ключевые слова: аденовирус; рекомбинанты; апоптин; онколитические вирусы; *hTERT*-промотор; апоптоз.

Введение

Несмотря на успехи, достигнутые в терапии злокачественных новообразований с применением классических методов лечения, таких как хирургия, радио- и химиотерапия, прогресс их применения в настоящее время представляется достигшим своего предела. В связи с этим актуальной задачей является разработка новых методов противоопухолевой терапии. Одним из таких перспективных и

бурно развивающихся направлений является применение онколитических аденовирусов. Данное семейство вирусов зарекомендовало себя в качестве эффективных и безопасных противоопухолевых агентов, обладающих рядом преимуществ по сравнению с другими семействами вирусов. Задачи, стоящие перед исследователями, конструирующими эффективные онколитические вирусы, заключаются, во-первых, в повышении их специфичности с целью избежать поражение нормальных клеток организма, во-вторых – в усилении их литических свойств для полного уничтожения всех раковых клеток в организме.

Один из наиболее эффективных путей по усилению специфичности онколитических аденовирусов является использование опухолеспецифических промоторов, один из которых, промотор обратной транскриптазы полимеразы (hTERT), показал себя как эффективный инструмент для контроля аденовирусной репликации [1, 2]. Для усиления онколитического потенциала аденовирусов в геном последних вводят различные трансгены, продукты которых могут усиливать литическую активность вирусов, участвовать в индукции противоопухолевого иммунного ответа или выполнять какие-либо другие функции, приводящие к более эффективному уничтожению опухолевых клеток. Одним из перспективных онколитических трансгенов является ген апоптоз-индуцирующего белка апоптоина (продукт генома вируса анемии цыплят), индуцирующего p53- и bcl-2-независимый апоптоз клеток. Было показано, что экспрессия гена апоптоина в клетках сопровождается индукцией апоптоза исключительно опухолевых клеток [3, 4], что позволяет встраивать данный ген под контроль более сильных, нежели опухолеспецифичные, промоторов, например цитомегаловирусного (PCMV).

Цель исследования – конструирование перспективных онколитических рекомбинантных аденовирусов со встроенным геном белка апоптоина, отличающихся по используемым промоторам, контролирующим его экспрессию (hTERT и PCMV), а также по способности вирусов к репликации (репликативно-дефектных и компетентных по репликации, контролирующейся hTERT-промотором).

Материалы и методики исследования

Клетки и вирусы. В работе были использованы культуры клеток НЕК293 (клетки почки эмбриона человека, трансформированные генами E1A и E1B аденовируса человека 5-го серотипа), HEp2 (эпителиальная карцинома гортани человека), аденовирус человека 5-го серотипа (Ad5), полученный из Государственной коллекции вирусных штаммов при Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Конструирование рекомбинантных аденовирусов. Последовательность коровой части промотора hTERT длиной 236 п.н. синтезировали методом элонгации праймеров в ПЦР согласно Li X. et al. [2]. Для синтеза были рассчитаны, химически синтезированы и использованы следующие праймеры:

F1 GGCCAGGCCGGGCTCCCA
R1 CGCGGGGTGGCCGGGC
F2 GGCCAGGCCGGGCTCCAGTGGATTGCGGGGCACAGACGCCAGGACCGCGCTCCCCACGT
R2 GAAGGGGCAGGACGGGTGCCCGGTCCCCAGTCCCTCCGCCACGTGGGGAGCGCGGTCC
F3 CACCCGTCTGCCCCCTTACCTTCCAGTCCGCCTCTCCGCGCGGACCCCGCCCCGTCC
CGACCCCTCCCG
R3 GGAAAGGAAGGGGAGGGGCTGGGAGGGCCCGAGGGGGCTGGGCCGGGACCCGGGAGGG
GTCGGGACG
F4 CCAGCCCTCCCTTCTTTCCGCGGCCCCGCCCTCTCTCGCGGCGGAGTTTCAGGCA
GCGCTGC
R5 CGCGGGGTGGCCGGGGCCAGGGCTTCCACGTGCGCAGCAGGACGCAGCGCTGCCTGAA
ACTCGC

Синтез гена белка апоптоина с последовательностью репортерного пептида осуществляли методом элонгации праймеров в ПЦР. С этой целью по прототипной последовательности гена белка VP3 (апоптин) вируса анемии цыплят (GenBank P54094) были рассчитаны, химически синтезированы и использованы следующие праймеры:

F1B ACCTTAGGAAAATTTGGCCAACAATCCGAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTC-
CACCCGGACCATCAACGGTG
R1A GAGGGGTTTCCAACGGCCGTGAACCTTGTGGTGGCCTGAACACCGTTGATGGTCC-
GGGTGGAGT
F2A CAAGTTCACGGCCGTTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTATCGCT
R2A TCGCGCAGCCACACAGCGATAGAGTGATTGTAATTCCAGCGATAATCCGGATCTCTCT
F3A TCGTGTTGGTGGCTGCGCGAATGCTCGCGCTCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGA-
CAATTCAGAA
R3A GGGTTGATCGGTCCTCAAGTCCGGCACATTCTTGAAACCAGTGCTTTCTGAATTGTC-
CGCAGTTGCAGA
F4A CTTGAGGACCGATCAACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAG-
TACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAA
R4A-End TTACAGTCTTATACACCTTCTTGCGGTTTCGGGGTCGGCTGGGAGTAGTGGTAAT-
CAAGCTTTCTTTAGCTCGCTTACCCTG
R4A-add ATTTTCCTAAGGTTGTTATGGTAGCTCTCAGTCTTATACACCTTCTTGCGGT

Для получения фрагмента аденовирусного генома с 459 по 2178 п.н., несущего последовательности генов E1A и E1B-19K, использовали следующие праймеры:

F1-hTERT-E1a-Ad5 GCCCCGGCCACCCCGCGATGAGACATATTATCTGCCACGGA
R1-E1b-19K-Ad5 AGTTCTGGATACAGTTCAGCCACCT

Фрагмент ДНК 601 п.н., содержащий промотор CMV, получали с использованием плазмиды pсDNA4 методом ПЦР с помощью праймеров:

Fpсmv GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
Rpсmv CCTAGTTAGCCAAGAGAGCTCTGC

Для клонирования в аденовирусный геном использовали наборы ViraPover Adenoviral Gateway Expression Kit и TOPO TA Cloning, «Invitrogen» (США). Генные кассеты, содержащие последовательности гена белка апоптоина под контролем промотора hTERT, гена белка апоптоина под контролем промотора CMV и гена E1A под контролем промотора hTERT + ген белка апоптоина встраивали в промежуточную плазмиду pCR2.1. В результате были получены плазмиды pCR2.1-hT-Apo, pCR2.1-CMV-Apo и pCR2.1-hTE1a-CMV-Apo соответственно. На следующем этапе, с использованием LR Clonase™ II и клеток *E. coli* T1, проводили рекомбинацию вышеуказанных промежуточных плазмид с векторной плазмидой, несущей последовательности аденовирусного генома pAd/CMV/V5-DEST™. Рекомбинантные клоны *E. coli* T1, содержащие плазмиды, несущие вставки гена апоптоина, отбирали на основании ПЦР-анализа с использованием праймеров:

T7 promoter/priming site TAATACGACTCACTATAGGG
V5(C-term) reverse priming site ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT

Правильность сборки полученных конструкций подтверждали секвенированием на генетическом анализаторе ABI3130xl.

Для проведения трансфекции эукариотических клеток плазмидные ДНК были наработаны в препаративных количествах и очищены от эндотоксина с использованием набора реагентов «EndoFree Plasmid Maxi Kit», «QIAGEN» (США). После подтверждения наличия и правильности целевых инсерций в векторных плазмидных ДНК секвенированием проводили трансфекцию клеток HEK293. Использовали реагент для трансфекции Lipofectamine™ LTX и реагент Plus «Invitrogen» (США). Трансфекцию проводили в шестилуночных культуральных планшетах смесью соответствующей векторной плазмидной ДНК (pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-hT-Apo, pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-CMV-Apo или pAd/CMV/V5-DEST-AdhTE1a-CMV-Apo) гидролизованной эдонуклеазой рестрикции PacI в присутствии реагентов для трансфекции (2,5 мкг плазмидной ДНК + липофектамин, 10 мкл + реагент Plus, 3,5 мкл) в соответствии с рекомендациями производителя в 1 мл среды Opti-MEM (Invitrogen, USA). После 6 ч инкубации клеток с трансфекционной смесью при 37°C в лунки добавляли еще 2 мл среды Opti-MEM и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ 4–8 сут до развития вирусиндуцированного цитопатического действия (ЦПД). Освобожденный из клеток трехкратным замораживанием – оттаиванием вирус клонировали методом бляшек на культуре клеток HEK293, после чего проводили наработку вирусного потомства отдельных клонов. Рекомбинантный

генотип полученных аденовирусов подтверждали ПЦР-анализом и частичным секвенированием вирусных геномных ДНК. Для подтверждения наличия инсерции трансгена рассчитывали две пары праймеров: одна пара лежит во фланкирующих место встройки последовательностях аденовирусного генома, вторая включает праймер, лежащий внутри трансгена, и праймер на геномной последовательности, тем самым осуществляя привязку встройки к определенному району вирусного генома. Расчет структур праймеров выполняли в среде ПО «Vector NTI v.9.1» производства «Madison Inc.» (США), специфичность полученных последовательностей оценивали, используя программу «BLAST», интегрированную в систему базы данных «GenBank». Обработку и анализ нуклеотидных последовательностей проводили в среде ПО «Vector NTI v.9.1» производства «Madison Inc.» (США) и ПО секвенатора «ABI 3130xl» (США).

Результаты исследования и обсуждение

В ходе данной работы предполагалось сконструировать три варианта аденовирусных векторов, несущих встройки гена белка апоптоина. Первые две конструкции обеспечивают создание репликативно-дефектных аденовирусов, в геноме которых делетирован ген E1A, абсолютно необходимый для репликации вируса. В первом случае ген белка апоптоина был встроен под контроль промотора обратной транскриптазы теломеразы (hTERT), а во втором – под контроль промотора цитомегаловируса. Третья конструкция представляет собой репликативно-компетентный вектор, в котором отсутствует область, кодирующая белок E1B-55K, а активация E1A возможна только в присутствии теломеразы, в связи с чем репликация данного аденовируса ограничивается опухолевыми клетками [2, 5]. На рис. 1 представлены схемы генома сконструированных аденовирусных векторов.

Для создания конструкций, представленных на рис. 1, были синтезированы целевые последовательности, осуществлен их дизайн и сконструированы генные кассеты, обеспечивающие интеграцию трансгенов в аденовирусный геном. Синтез трансгенов осуществляли по опубликованным последовательностям промотора hTERT [2] и гена белка апоптоина (GenBank P54094). Последовательность коровой части промотора hTERT длиной 236 п.н. синтезировали методом элонгации праймеров в ПЦР. Амплифицированная последовательность промотора hTERT была секвенирована и полностью соответствовала литературным данным по нуклеотидной последовательности промотора hTERT. Синтез гена белка апоптоина с последовательностью репортерного пептида осуществляли методом элонгации праймеров в ПЦР. Фрагмент ДНК длиной 601 п.н., содержащий промотор CMV, получали с использованием плазмиды pcDNA4 методом ПЦР.

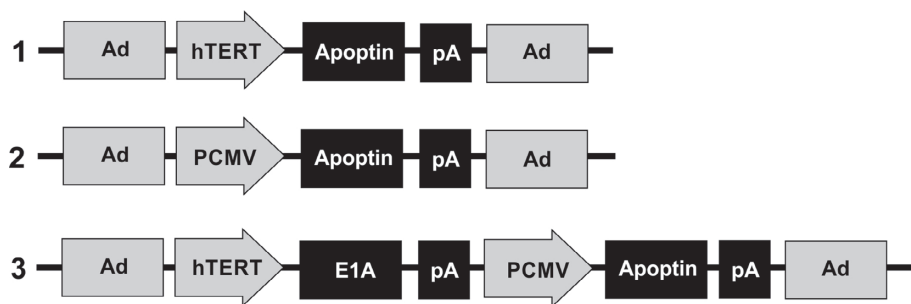


Рис. 1. Схема геномной организации сконструированных рекомбинантных аденовирусов: 1 – дефектный по репликации аденовирус с делетированными генами E1A и E1B с инсерцией гена апоптоина под контролем hTERT-промотора; 2 – дефектный по репликации аденовирус с делетированными генами E1A и E1B с инсерцией гена апоптоина под контролем CMV-промотора; 3 – компетентный по репликации аденовирус с геном E1A под контролем hTERT-промотора (несущий делецию гена E1B-55K) с инсерцией гена апоптоина по контролю CMV-промотора. pA – сигнал полиаденилирования

С целью последующего конструирования компетентного по репликации рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего трансген и несущего делецию гена E1B-55K, методом ПЦР с использованием геномной ДНК аденовируса 5-го серотипа в качестве матрицы амплифицировали фрагмент аденовирусного генома с 459 по 2178 п.н., включающий последовательность генов E1A и E1B-19K.

На следующем этапе полученные фрагменты кДНК гена белка апоптоина (444 п.н.), CMV-промотора (601 п.н.), промотора hTERT (236 п.н.) и генов E1A и E1B-19K аденовируса 5-го серотипа (1719 п.н.) методом ПЦР-лигирования собирали в генные кассеты и клонировали в промежуточную плазмиду pCR2.1ТОРО. В результате были получены плазмиды pCR2.1-hT-Apo, pCR2.1-CM-Apo и pCR2.1-AdhTE1a-CM-Apo. Сконструированные генные кассеты методом 5'- и 3'-концевого удлинения праймеров в ПЦР фланкировали последовательностями attB1 и attB2 и клонировали в векторную плазмиду pAd/CMV/V5-DEST, несущую аденовирусный геном, методом гомологичной рекомбинации к клетках *E. coli* T1. Рекомбинантные клоны *E. coli* T1, содержащие рекомбинантные плазмиды, отбирали на основании ПЦР и рестрикционного анализа. Были получены векторные плазмиды, несущие аденовирусный геном, и встроенные генные кассеты: pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-hT-Apo, pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-CM-Apo и pAd/CMV/V5-DEST-AdhTE1a-CM-Apo. Наличие и правильность целевых инсерций в векторных плазмидных подтверждены секвенированием, после чего проводили трансфекцию клеток НЕК293. Для контроля эффективности трансфекции использовали аденовирусную ДНК в комплексе с терминальным белком, выделенную из рекомбинантного варианта аденовируса

Adel2, делеционного по гену E1B-55K [6, 7]. Типичное для клеток HEK293 аденовирусное ЦПД было выявлено на 4-е сут для контрольной аденовирусной ДНК Adel2, на 6-е и 8-е сут для векторных плазмидных ДНК pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-hT-Apo и pAd/CMV/V5-DEST-AdhTE1a-CM-Apo соответственно. Появление вирусиндуцированного ЦПД в монослое клеток HEK293, трансфицированных векторной ДНК pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-CM-Apo, выявлено при выполнении пересева («слепого» пассажа) трансфицированных клеток. На рис. 2 приведены фотографии трансфицированных плазмидными и аденовирусной ДНК клеток HEK293 с типичными проявлениями аденовирусного ЦПД.

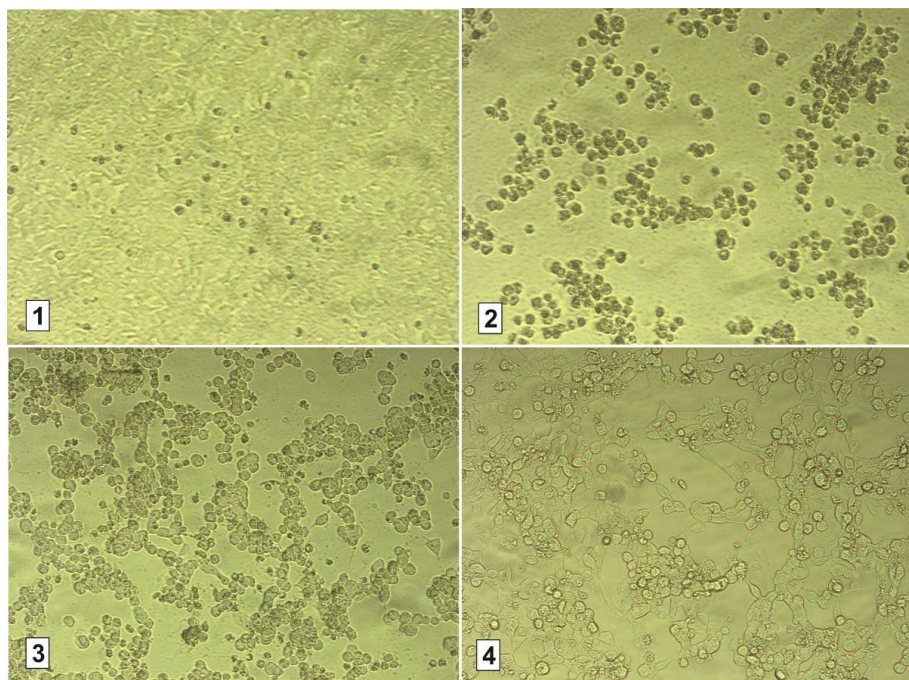


Рис. 2. Вирусиндуцированное ЦПД клеток HEK293, трансфицированных векторными плазмидными и аденовирусной Adel2 ДНК: 1 – контрольный монослой клеток HEK293; 2 – клетки HEK293, трансфицированные ДНК рекомбинантного аденовируса Adel2; 3 – клетки HEK293, трансфицированные векторной плазмидной ДНК pAd/CMV/V5-DEST-AdhTE1a-CM-Apo; 4 – клетки HEK293, трансфицированные векторной плазмидной ДНК pAd/CMV/V5-DEST-AdΔE1a-hT-Apo

Полученные рекомбинантные аденовирусы были клонированы методом бляшек. Инфекционную активность рекомбинантных аденовирусов определяли титрованием на клетках HEK293. Для определения фенотипа (репликационно-компетентный или дефектный) проводили параллельное титрование сконструированных рекомбинантных аденовирусов на культу-

ре клеток HEp2 (не комплементирующая дефект аденовирусного гена E1A перевиваемая линия эпителиальных клеток гортани человека, чувствительная к аденовирусной инфекции). В качестве контрольного рекомбинантного аденовируса использовали делеционный по гену E1B-55K аденовирус Adel2. Результаты приведены в таблице, инфекционный титр рекомбинантных аденовирусов выражали через ТЦПД₅₀/мл (50%-ная тканевая цитопатическая доза) [8]. Как видно из табл. 1, рекомбинантные аденовирусы AdΔE1a-hT-Apo и AdΔE1a-CM-Apo инфицируют с высокой активностью комплементарные клетки HEK293 и в то же время не способны к эффективной репликации в культуре клеток HEp2, что свидетельствует о репликационно-дефектном фенотипе этих двух рекомбинантов. Рекомбинантный аденовирус AdhTE1a-CM-Apo способен эффективно инфицировать как клетки HEK293, так и HEp2 (с активностью, близкой к таковой рекомбинанта Adel2) и соответственно является компетентным по репликации аденовирусом. Способность AdhTE1a-CM-Apo инфицировать клетки HEp2 обусловлена, по-видимому, тем, что данная клеточная культура является перевиваемой (иммортилизованной) и характеризуется повышенным уровнем теломеразной активности.

Инфекционная активность сконструированных рекомбинантных аденовирусов

Аденовирус	Инфекционный титр для клеточной культуры, ТЦПД ₅₀ /мл	
	HEK293	HEp2
AdΔE1a-hT-Apo	10 ¹⁰	<10 ³
AdΔE1a-CM-Apo	2×10 ¹⁰	<10 ³
AdhTE1a-CM-Apo	10 ¹⁰	5×10 ⁷
Adel2	5×10 ¹⁰	5×10 ⁸

На основании полученных результатов можно утверждать, что удалось получить два рекомбинантных дефектных по репликации аденовируса с инсерциями гена белка апоптоина под контролем hTERT- и CMV-промоторов соответственно и компетентный по репликации делеционный по гену E1B-55K аденовирус с инсерцией гена апоптоина и геном E1A под контролем hTERT-промотора.

Верификацию правильности внесенных генетических модификаций в геномах сконструированных аденовирусных вариантов проводили секвенированием геномных ДНК. ДНК для анализа выделяли из очищенных в градиенте хлористого цезия препаратов рекомбинантных аденовирусов. После проведения ПЦР с праймерами к фланкирующим встроенные генные кассеты районам векторной ДНК pAd/CMV/V5-DEST и выделенными из сконструированных рекомбинантных аденовирусов геномных ДНК в качестве матриц образцы продуктов амплификации очищали и секвенировали

по прямой и обратной цепи ДНК. Все нуклеотидные последовательности были определены дважды в независимых экспериментах.

Их анализ показал, что в ДНК рекомбинантов AdΔE1a-hT-Apo и AdΔE1a-CM-Apo в районе встройки генных кассет полностью делетирован ген E1 (E1A, E1B-19K и E1B-55K, позиции 459–3 512 п.н. аденовирусного генома). В геномной ДНК AdhTE1a-CM-Apo восстановлена последовательность гена E1A, помещенная под контроль hTERT промотора и E1B-19K (протяженностью 1720 п.н.) и делетирован ген E1B-55K (1330 п.н.). Тот факт, что вариант AdhTE1a-CM-Apo способен инфицировать не комплементирующие дефект по гену E1 клетки HEp2, свидетельствует о функциональности восстановленного за счет встройки генной кассеты гена E1A. Кроме того, у всех сконструированных рекомбинантных аденовирусов делетирован необязательный для вирусной репликации ген E3.

Заключение

В результате проведенной работы сконструированы три варианта рекомбинантных аденовирусов 5-го серотипа, несущих встройку гена белка апоптоина под контролем промоторов CMV и hTERT; два рекомбинанта являются репликативно-дефектными в связи с делецией гена E1A, необходимого для вирусной репликации, третий – компетентным по репликации аденовирусом. Правильность полученных конструкций верифицировали секвенированием. Полученные аденовирусные векторы могут служить основой для создания перспективных онколитических препаратов, обладающих высокой специфичностью благодаря контролю вирусной репликации hTERT-промотором, а также высокой онколитической активностью благодаря экспрессии терапевтического трансгена – гена белка апоптоина, вызывающего p53- и bcl-2-независимый апоптоз опухолевых клеток. В дальнейшем онколитическая активность сконструированных рекомбинантных аденовирусов будет исследована *in vitro* и *in vivo*.

Литература

1. Dong C.K., Masutomi K., Hahn W.C. Telomerase: regulation, function and transformation // Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2005. Vol. 54. P. 85–93.
2. Li X., Liu Y., Wen Z. et al. Potent anti-tumor effects of a dual specific oncolytic adenovirus expressing apoptin *in vitro* and *in vivo* // Molecular cancer. 2010. Vol. 9. P. 10.
3. Bullenkamp J., Cole D., Malik F. et al. Human Gyrovirus Apoptin shows a similar subcellular distribution pattern and apoptosis induction as the chicken anaemia virus derived VP3/ Apoptin // Cell death & disease. 2012. Vol. 3. P. e296.
4. Wu Y., Zhang X., Wang X. et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of Newcastle disease virus // Intervirology. 2012. Vol. 55. P. 276–286.
5. O'Shea C.C., Johnson L., Bagus B. et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity // Cancer cell. 2004. Vol. 6. P. 611–623.

6. Качко А.В., Святченко В.А., Терновой В.А. и др. Варианты аденовируса типа 5 с делециями в ранних генах: способность к селективной репликации в р53-дефектных опухолевых клетках человека // Молекулярная биология. 2003. Т. 37. С. 868–875.
7. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А. и др. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата «канцеролизин» // Вопросы вирусологии. 2006. № 6. С. 39–42.
8. Chanas A.C., Johnson B.K., Simpson D.I. Antigenic relationships of alphaviruses by a simple micro-culture cross-neutralization method // Journal of General Virology. 1976. Vol. 32. P. 295–300.

Поступила в редакцию 05.07.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 100–110

doi: 10.17223/19988591/23/9

Vladimir A. Ternovoy¹, Viktor A. Svyatchenko¹, Margarita V. Tarasova^{1,2}, Nikolay N. Kiselev¹, Elena V. Chub¹, Tamara P. Mikryukova¹, Elena V. Protopopova¹, Valeryi B. Loktev¹, Petr M. Chumakov^{2,3}, Sergey V. Netesov^{1,2}

¹ State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk area, Russia

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

THE CONSTRUCTION OF RECOMBINANT ADENOVIRUSES EXPRESSING APOPTIN

This work was partially supported by FSP (SC № 14.512.11.0003).

The use of oncolytic viruses is one of the promising areas of malignant diseases modern treatment methods. In numerous studies of the adenoviruses strains oncolytic properties, their efficacy and safety in the treatment of various cancers were shown. The vast majority of the studies were carried out with the use of adenovirus serotype 5. To improve these anticancer agents means to increase their specificity for cancer cells and their lytic activity. To this end, adenovirus serotype 5 recombinant variants were constructed expressing apoptin (VP3 protein of chicken anemia virus) and causing p53 and bcl-2 independent apoptosis, increasing the lytic properties of viruses. Furthermore, to increase the specificity of adenovirus replication towards tumor cells, telomerase reverse transcriptase promoter (hTERT) was used. According to the data indicating that the apoptin expression in the cells is accompanied by induction of apoptosis in tumor cells only, the adenoviruses variants were constructed in which apoptin expression is regulated by cytomegalovirus promoter (CMV), which is stronger than hTERT. As a result, the design of apoptin gene sequences, CMV and hTERT promoters and the construction of recombinant plasmids bearing them, which are necessary for constructing recombinant adenoviruses, was created. Using the methodology of homologous recombination and co-transfection of cells, two replications of defective recombinant adenovirus AdΔE1a-hT-Apo and AdΔE1a-CMV-Apo with insertions of apoptin gene under the control of the hTERT-and CMV-promoter, respectively, were obtained. In these recombinants, E1A and E1B genes, necessary for viral replication, are deleted, which makes such agents safer. The third constructed recombinant represents replication competent adenovirus AdhTE1a-CMV-Apo with deletion of E1B-55K protein gene and insertion of

apoptin gene and E1A gene under the control of the hTERT-promoter. The use of the tumor-specific promoter in this recombinant strain allows the virus to replicate only in the cells with an active telomerase. Furthermore, the specificity of this adenoviral variant to tumor cells is enhanced by deletion of the gene coding E1B-55K protein, limiting its replication in normal cells, which are not able to complement the function of this protein. The sequencing of recombinant adenoviruses genomic DNA demonstrated the presence of engineered gene cassettes in their genomes, the validity of the introduced transgenes and regulatory sequences and their compliance with the chosen design scheme. The obtained adenovirus vectors can serve as a basis for creating perspective oncolytic agents with high specificity due to the control of viral replication by hTERT promoter and high lytic activity due to the presence of the apoptin gene as a transgene causing p53 and bcl-2-independent apoptosis in tumor cells.

Key words: adenovirus; recombinants; apoptin; oncolytic viruses; hTERT promoter; apoptosis.

Received July 5, 2013