

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ СИМПОРТЕР НАТРИЯ/ЙОДИДА, ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2023 г. А. В. Семенова<sup>1</sup> \*, А. А. Гражданцева<sup>1</sup>, Г. Ф. Сиволобова<sup>1</sup>, Г. А. Кудров<sup>1</sup>, А. С. Кабанов<sup>1</sup>, А. А. Легкодымов<sup>2</sup>, К. Э. Купер<sup>2</sup>, А. П. Агафонов<sup>1</sup>, Г. В. Кочнева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”

Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559 Россия

<sup>2</sup>ФГБУН Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения

Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

\*e-mail: tkacheva\_av@mail.ru

Поступила в редакцию 26.09.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 07.11.2023 г.

Сконструирован рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-mNIS-dGF, геном которого содержит инсерцию трансгена — симпортера натрия/йодида мыши (*mNIS*). Эта инсерция находится в районе делеции фрагмента гена вирусной тимидинкиназы (*tk*). Дополнительная делеция в гене вирусного ростового фактора (*vgf*) обеспечивает аттенуацию вируса в отношении нормальных клеток и усиливает адресность его репликации в раковых клетках. Противоопухолевые свойства штамма VV-mNIS-dGF изучали на двух мышинных моделях: меланомы B16-F10 и карциномы толстой кишки СТ-26. В обеих моделях сконструированный штамм VV-mNIS-dGF проявлял высокую онколитическую активность, эффективно экспрессировал трансген *mNIS* и аккумулировал йодид в опухолевых клетках как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* в аллотрансплантатах мышей. Количественное определение содержания йода в опухолях проводили методом рентгенофлуоресцентного элементного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ). На основании полученных данных штамм VV-mNIS-dGF можно рассматривать как перспективный препарат для виротерапии и диагностики (тераностики) злокачественных опухолей.

**Ключевые слова:** онколитические вирусы, вирус осповакцины, рекомбинантный штамм, симпортер натрия/йодида, синхротронное излучение, йодид, тераностика

**DOI:** 10.56304/S0234275823050113

Создание препаратов, которые одновременно можно использовать и в ранней диагностике, и в терапии, — новый подход в фармацевтике, получивший название тераностика (англ. *theranostics*). Тераностика — это наиболее эффективный путь для лечения многих заболеваний, в том числе онкологических. Стратегия этого подхода состоит в том, чтобы сначала “увидеть”, то есть диагностировать,

мишень, а потом этим же “инструментом” ее поразить (<https://uihc.org/health-topics/what-theranostics>).

На роль такого инструмента в случае онкологии идеально подходят онколитические вирусы, которые способны адресно распознавать и “убивать” (лизировать) раковые клетки [1]. Онколитические вирусы могут быть генетически модифицированы — с целью повышения их диагностической и терапевтической эффективности в отношении опухолей и метастазов. Особое место при генетической модификации вирусов занимают трансгенные репортерных белков, экспрессия которых в составе онколитических вирусов в раковых клетках позволяет отслеживать четкую картину опухолевого процесса в динамике, а также эффективность терапии [2, 3].

В настоящее время ген симпортера натрия/йодида *SLC5A5*, или чаще упоминаемый в научной

**Сокращения:** MOI (multiplicity of infection) — множественность заражения; NIS (sodium/iodide symporter) — симпортер натрия/йодида; VACV (vaccinia virus) — вирус осповакцины; БОЕ — бляшкообразующая единица; ОФЭКТ — однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография; РФА-СИ — рентгенофлуоресцентный элементный анализ с использованием синхротронного излучения; СИ — синхротронное излучение; ТРО — торможение роста опухоли; ЦТД<sub>50</sub> — 50%-ная цитотоксическая доза.

литературе как *NIS*, является одним из старейших и наиболее успешных репортерных трансгенов, который используют для молекулярной визуализации и таргетной радионуклидной терапии. *NIS* — трансмембранный гликопротеин, участвующий в поглощении йодида в фолликулярных клетках щитовидной железы [4]. Векторная доставка гена *NIS* позволяет сконцентрировать йодид в тканях других органов — в которых обычно *NIS* не экспрессируется. В ряде исследований продемонстрирована возможность визуализации опухолей с использованием технологий позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) благодаря *NIS*-опосредованному поглощению  $\gamma$ -излучающих радиоизотопов йода:  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  и  $^{131}\text{I}$  (см. обзор [5]). Поглощение и концентрирование нерадиоактивного йода опухолевыми клетками можно визуализировать рентгеноскопическими методами, в частности с использованием синхротронного излучения (СИ), где йод — контрастирующий субстрат [6].

Использование СИ в рентгеновском диапазоне открывает новые возможности для оценки эффективности онкотерапии, в том числе это относится к таким новым направлениям, как онколитическая виротерапия [7]. СИ обладает высокой интенсивностью и имеет малую угловую расходимость, поэтому для получения изображений, кроме традиционного метода поглощения (принцип рентгеноскопии), можно использовать рефракцию (преломление) или рассеяние фотонов на границах раздела сред. Благодаря уникальным параметрам СИ можно получать снимки с высоким разрешением даже для тех объектов, плотность которых незначительно отличается друг от друга, что важно для выявления опухоли на ранней стадии ее развития. Технологию синхротронной рентгеноскопии используют в различных диагностических процедурах, таких как ангиография, маммография, денситометрия, то есть там, где требуется высокое качество снимков [4, 8, 9]. Визуализация с помощью СИ опухолей и метастазов у модельных животных в процессе лечения онколитическими вирусами позволит оценивать эффективность терапии в доклинических исследованиях за счет получения изображений с более высоким контрастом и лучшим пространственным разрешением, чем это возможно получить методами ОФЭКТ и ПЭТ.

Вирус осповакцины (*vaccinia virus*, VACV) относится к перспективным онколитическим вирусам для разработки противоопухолевых препаратов [1, 3]. VACV имеет широкий тропизм к клеткам опухолей человека и животных и лизирует их с высокой скоростью. Кроме того, VACV обладает высокой природной онкоселективностью — его репликация в тысячи раз эффективнее в опухолевых клетках, чем в нормальных [10–12].

В представленной работе использован российский штамм VACV L-IVP (GenBank Acc. No. KP233807), который широко применялся для вакцинации населения против натуральной оспы, поэтому его структура и характеристики, в том числе безопасность, патогенность и реактогенность, хорошо изучены [13]. Использование VACV в качестве вектора при разработке противоопухолевых препаратов сопряжено с необходимостью дополнительной аттенуации вируса — во избежание возможных постинфекционных осложнений [14]. С этой целью в два гена VACV: тимидинкиназы (*tk*) и вирусного ростового фактора (*vgf*) — были введены делеции, сочетанное присутствие которых приводит к практически полному отсутствию репликации вируса в неделящихся или медленно делящихся клетках, в то время как цитотоксический эффект мутанта на раковые клетки не отличается от исходного штамма [15]. Ранее нами показано, что вирулентность рекомбинантных вариантов L-IVP с делециями генов *tk* и *vgf* в 100 и более раз ниже, чем родительского [16].

Цель представленной работы — конструирование и изучение свойств рекомбинантного варианта штамма L-IVP VACV, несущего делеции в генах *tk* и *vgf* и вставку трансгена — симпортера натрия/йодида мыши (*mNIS*) — в район делеции *tk*-гена, с целью оценки его пригодности для терапии опухолей с помощью СИ.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### *Вирусы и культуры клеток*

В работе использовали культуры клеток, полученные из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора: 4647 (линия клеток почки африканской зеленой мартишки; коллекционный шифр — 184); H143TK<sup>–</sup> (дефектный по тимидинкиназе вариант линии клеток НОS остеосаркомы человека; коллекционный шифр — 149). Культура клеток V16-H10 меланомы мыши получена из ФГБНУ “Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина” (Москва); клетки СТ-26 карциномы толстой кишки мышей получены из Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск). Все клетки растили на среде DMEM с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (ООО “БиолоГ”, Россия) и антибиотиками (ампициллин — 100 мкг/мл, гентамицин — 80–160 мкг/мл, амфотерицин В — 25 мкг/мл). Рекомбинантный штамм вируса осповакцины — VVdGF2/6, несущий делецию гена *vgf*, — получен ранее [11]. Вирус растили на культуре клеток 4647 и очищали центрифугированием в градиенте концентраций сахарозы (25–40%). Титр вируса определяли методом бляшкообразования на монослое клеток 4647,

окрашенном фиксирующим раствором кристаллического фиолетового (2 г/л кристаллический фиолетовый, 50 мл/л формальдегид, 100 мл/л этанол, вода).

#### *Конструирование рекомбинантного варианта VV-mNIS-dGF*

Для получения рекомбинантного варианта VV-mNIS-dGF сконструировали инсерционную плазмиду pXJP-P7.5synth-mNIS, которая содержала фрагмент ДНК VACV L-IVP, соответствующий позициям 80682–82251 нуклеотидной последовательности (GenBank Acc. No. KP233807). Фрагмент вирусной ДНК в плазмиде разделили на левую (595 п.н., позиции 80682–81277) и правую (933 п.н., позиции 81307–82251) части (TK flank 1 и TK flank 2 соответственно) с делецией 30 п.н. в центральной части гена *tk* VACV, в область которой встроили фрагмент ДНК, содержащий синтетический промотор VACV P7.5synth (36 п.н.) и полилинкер (*NheI*, *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI*), — для дальнейшего встраивания трансгенов и их экспрессии под контролем промотора P7.5synth [17]. Оптимизированная последовательность гена *mNIS* (GenBank AF235001) — мышинного симпортера натрия/йодида — была синтезирована в ЗАО “Евроген” (Россия) и встроена в полилинкер плазмиды по сайтам рестрикции *HindIII*–*EcoRI*.

Для проведения трансфекции ДНК плазмиды pXJP-P7.5synth-mNIS нарабатывали в препаративных количествах из 250 мл среды Лурия-Бертани (LB) и выделяли с использованием набора EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Германия). Для трансфекции использовали Lipofectamine™ LTX и PLUS™ (Invitrogen, США). Трансфекцию проводили на 90%-ном монослое клеток H143TK<sup>+</sup>, выращенном в 6-луночных планшетах (Greiner, Австрия). Клетки заражали рекомбинантным штаммом-реципиентом VVdGF2/6 с множественностью инфекции (MOI) 0.05 БОЕ/клетка и через 1 ч инкубации при 37°C вносили 1 мл среды DMEM, содержащей 5 мкг плазмидной ДНК, 20 мкл Lipofectamine™ LTX и 5 мкл PLUS™ Reagent. Через 1 ч инкубации при 37°C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> (далее: 37°C/5% CO<sub>2</sub>) в лунки добавляли по 2 мл DMEM и инкубировали еще 24–36 ч до развития цитопатического эффекта. Материал трижды замораживали–оттаивали и обрабатывали ультразвуком для получения гомогенной вирусной суспензии. Далее проводили селекцию рекомбинантов путем двукратного пассирования на монослое клеток H143TK<sup>+</sup> с добавлением 25 мкг/мл бромдезоксиуридина (Sigma, США) в DMEM. Вирус клонировали методом бляшек под твердым агаровым покрытием и анализировали на наличие встроенного трансгена *mNIS* методом ПЦР с использованием пары праймеров: TK-flank1 sense

(5'-CAGAATTAATTAGACGAGTTAGACG-3') и TK-flank2 as (5'-ATTGGGTGAGGAAACCGAGA-3'); делецию гена *vgf* подтверждали с использованием праймеров Up35 (5'-GTAAGCAAAGAATATA-AGAATGAAGCGGTAATG-3') и Apa-L22 (5'-CCATCTCCCGGTATTGTGCTCG-3').

Вирусную ДНК для проведения ПЦР выделяли с использованием набора ДНК-сорб (ЗАО “Интерлабсервис”, Россия). Рекомбинант VV-mNIS-dGF содержал вставку трансгена *mNIS* расчетной длины — 2298 п.н. Отобранный рекомбинантный вариант дважды реклонировали, чтобы избежать следовых примесей исходного вируса. Структуру района вставки подтверждали секвенированием. Готовый рекомбинантный штамм VV-mNIS-dGF с титром 10<sup>9</sup> БОЕ/мл хранили в расфасованном виде при –40°C до использования.

#### *Анализ экспрессии mNIS методом иммуноблоттинга*

Монослой клеток B16-F10 заражали рекомбинантным штаммом VV-mNIS-dGF и исходным штаммом VVdGF2/6 (отрицательный контроль) с MOI 10 БОЕ/клетка и инкубировали 24 ч при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Клетки разрушали лизирующим буфером RIPA (Sigma), центрифугировали 30 мин при 22 000 g и 4°C, белки разделяли методом SDS-PAGE и анализировали методом иммуноблоттинга, как описано ранее [18], используя в качестве первичных моноклональные анти-NIS-антитела G-5 (#sc-514487; Santa Cruz Biotechnology, США), специфичные к 594–617 а.о. С-концевого цитоплазматического домена белка mNIS, а также антитела против β-актина — в качестве внутреннего контроля (sc-47778; Santa Cruz Biotechnology). В качестве вторичных использовали конъюгированные с щелочной фосфатазой поликлональные антитела козы против IgG мыши (#A3562; Sigma).

#### *Анализ экспрессии трансгена mNIS методом ПЦР в реальном времени*

Монослой клеток B16-F10 и CT-26, выращенный в 6-луночных культуральных планшетах, заражали рекомбинантными вирусами с MOI 0.1, 1.0 и 10.0 БОЕ/клетка. Через 24 ч выделяли суммарную клеточную РНК с использованием набора для выделения РНК на колонках RU-250 (ООО “Биолабмикс”, Россия) по протоколу производителя. Для удаления загрязнения геномной ДНК и исключения контаминаций при ПЦР полученные образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (Ambion DNase I; Invitrogen). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора реактивов OT-M-MuLV-RH (ООО “Биолабмикс”) по протоколу производителя. Уровень экспрессии гена *mNIS* определяли методом ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR

**Таблица 1.** Структура праймеров  
**Table 1.** Structures of the primers

| Праймер         | Последовательность, 5' → 3' |
|-----------------|-----------------------------|
| <i>GAPDH</i> -F | GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG    |
| <i>GAPDH</i> -R | GAGCCCCAGCCTTCTCCATG        |
| <i>ACTB</i> -F  | CCTGGCACCCAGCACAAAT         |
| <i>ACTB</i> -R  | GGGCCGGACTCGTCATAC          |
| <i>NIS</i> -F   | GATGCACCAATGCCTCTGTC        |
| <i>NIS</i> -R   | TACCCAGAGCCCCGTAGTAG        |

Blue (2×) (ООО “Биолабмикс”) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве внутренних контролей для нормирования продуктов амплификации использовали гены “домашнего хозяйства”: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) и β-актина (*ACTB*). Праймеры к мРНК *mNIS*, *GAPDH* и β-актина подбирали с помощью программы Primer Blast (табл. 1).

Изменения в экспрессии генов рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  [19]. Для анализа полученных данных и количественного определения уровня экспрессии целевых генов использовали программное обеспечение Manager 3.1 амплификатора Bio-Rad CFX.

#### *Оценка онколитической активности рекомбинантного вируса in vitro*

Цитотоксический эффект рекомбинантного штамма VV-NIS-dGF в отношении опухолевых клеток мышей (онколитическая активность) определяли в фотометрическом тесте с использованием субстрата для митохондриальных дегидрогеназ 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбосанилида (реагент ХТТ, Sigma), как описано ранее [11]. Онколитическую активность штамма оценивали по отношению специфической гибели клеток, инфицированных рекомбинантом VV-mNIS-dGF, к аналогичному показателю для неинфицированных клеток. В работе использовали раковые клетки мыши В16-Ф10 и СТ-26. Онколитическую активность выражали как 50%-ную цитотоксическую дозу (ЦТД<sub>50</sub>) — концентрацию вируса, вызывающую гибель 50% клеток. Чем выше ЦТД<sub>50</sub>, тем ниже онколитическая активность вируса. Диапазон доз инфицирования, MOI, варьировал в пределах 0.0001–10 БОЕ/клетка. Значение для каждой точки определяли в 5 повторях, рассчитывали среднее значение и дисперсию для различных концентраций вируса, строили график зависимости оптической плотности от множественности инфекции. Все расчеты проводили с использованием программного обеспечения LabView.

#### *Реакция Санделла–Колтоффа [20] для определения поглощения ионов йода клетками*

Монослой клеток В16-Ф10 и СТ-26 в культуральных 96-луночных микропланшетах заражали вирусной суспензией в 10-кратных разведениях (MOI от 1 до 0.01 БОЕ/клетка), инкубировали 24 ч, промывали буфером HHBS (Hank’s буфер с 10 мМ HEPES) 4 раза (после каждого цикла промывки оставляли в лунке 95 мкл). После последней процедуры промывки в каждую лунку вносили 5 мкл раствора 0.1 мМ NaI (конечная концентрация 0.005 мМ). Клетки инкубировали 2 ч при комнатной температуре, промывали 4 раза буфером HHBS, планшет переворачивали и высушивали в течение 10 мин, чтобы удалить оставшиеся внеклеточные ионы йода (I<sup>-</sup>). Стандартные растворы NaI (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 пмоль в 100 мкл воды) и воду вносили в двух повторях в контрольные лунки планшета. Во все лунки, кроме содержащих стандартные образцы, вносили по 100 мкл деионизованной воды, а затем во все лунки планшета — по 100 мкл 10.5 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub> и 100 мкл 24 мМ NaAsO<sub>2</sub>. Планшет инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и регистрировали оптическую плотность при длине волны 405 нм (OD<sub>450</sub>) на планшетном спектрофотометре SpectraCount (Packard, США). Для каждого планшета строили кривую зависимости значений OD<sub>450</sub> от стандартных концентраций NaI и использовали линейную регрессию для построения калибровочной кривой. Концентрацию йодида в инфицированных клетках определяли по калибровочной кривой на основании значения OD<sub>450</sub> в соответствующей лунке планшета. Значения OD<sub>450</sub> для каждой экспериментальной точки определяли в 8 повторях, рассчитывали среднее значение и дисперсию.

#### *Эксперименты на животных*

В работе использовали мышей линий BALB/c и C57BL/6 (самки, возраст 8 недель, масса 18–22 г, без посторонней микрофлоры), которые были получены из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора. Животных содержали на стандартном рационе питания и свободном доступе к воде.

#### *Оценка противоопухолевой активности рекомбинантного штамма VACV*

Опухолевые клетки В16-Ф10 и СТ-26 трансплантировали мышам подкожно, вдоль позвоночника в верхнюю половину туловища. Объем клеточной суспензии во всех случаях составлял 100 мкл. Клетки разводили 0.9%-ным раствором NaCl, доза введения составляла  $5 \times 10^5$  для клеток В16-Ф10 и  $1 \times 10^6$  для клеток СТ-26. Через 10 сут у мышей образовывались опухолевые узлы разме-

ром 200–400 мм<sup>3</sup>, животных делили на 2 группы: опытная ( $n = 10$ ) и контрольная ( $n = 10$ ) — для каждого вида опухоли.

Вирус вводили мышам опытных групп в район опухоли двукратно с интервалом 3 сут в дозе  $1 \times 10^7$  БОЕ/опухоль в 50 мкл 0.9%-ного NaCl, мышам контрольных групп вводили только физраствор в том же объеме.

Эффективность виротерапии оценивали по уменьшению объема опухолевого узла и проценту торможения роста опухоли (ТРО). Размер опухоли оценивали электронным штангенциркулем в двух измерениях, объем вычисляли по формуле:

$$V(\text{мм}^3) = 0.5ab^2,$$

где  $a$  — длина (мм),  $b$  — ширина (мм).

Процент ТРО вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО}(\%) = \frac{(V_k - V_o) \cdot 100}{V_k},$$

где  $V_k$  — средний объем опухоли в контрольной группе;  $V_o$  — средний объем опухоли в опытной группе.

Длительность эксперимента составляла 21 сут; на 22 сутки мышей выводили из эксперимента и забирали образцы опухолевых узлов для последующего рентгенофлуоресцентного анализа.

#### *Рентгенофлуоресцентный элементный анализ опухолей с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ)*

За 30 мин до выведения из эксперимента мышам внутрибрюшинно вводили 100 мкл раствора 20 mM NaI (Scharlau, Испания) в 0.9%-ном NaCl. После эвтаназии фрагменты опухолей извлекали и готовили 25%-ные гомогенаты в 0.9%-ном NaCl. По 4 образца гомогенатов опухолей из опытных и контрольных групп животных лиофилизировали в системе FreeZone 2.5 (Labconco, США) в течение 24 ч. Для лиофилизации использовали следующие объемы 25%-ных гомогенатов: по 350 мкл в случае аллотрансплантатов B16-F10 и по 500 мкл для СТ-26. Из высушенных образцов массой более 10 мг прессовали таблетки диаметром 6 мм под давлением  $\sim 200$  кг/см<sup>2</sup>. Таблетки помещали между двумя майларовыми пленками и закрепляли во фторопластовые кольца. Эксперименты проводили на станции РФА-СИ накопительного кольца ВЭПП-4М ИЯФ СО РАН. Характеристики станции РФА-СИ на накопителе ВЭПП-4М и ее экспериментальное оборудование подробно описаны в работе [21]. Синхротронное излучение генерировалось 9-полюсным вигглером, установленным в прямолинейном промежутке накопителя ВЭПП-4М. Рабочая энергия электронного пучка в накопителе составляла 4.5 ГэВ при среднем токе электронов около 20 мА. Магнитное поле в

вигглере составляло 1.9 Тл. Эти параметры позволяли обеспечить высокий поток рентгеновских фотонов с энергией более 40 кэВ.

Эксперимент выполнен по методу внешних стандартов. Важным критерием для подбора стандартного образца было соответствие матриц стандартного и исследуемого образцов. Так, для исследования элементного состава фрагментов опухолей мышей использовали международный стандартный образец тканей устрицы — NIST<sup>®</sup> SRM<sup>®</sup> 1556b (National Institute of Standards and Technology, США). Для количественного определения содержания йода в исследуемых образцах их облучали монохроматическим пучком с энергией возбуждения 38 кэВ, время экспозиции каждого образца составляло 600 с.

#### *Статистический анализ данных*

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ GraphPad Prism 8.0.1 и Microsoft Excel 2019. Для сравнения групп в экспериментах *in vitro* использовали  $t$ -критерий Стьюдента. Различия между средними значениями объема опухоли у животных из разных групп оценивали непараметрическим критерием Манна–Уитни ( $U$ -test). Данные РФА-СИ представлены средними значениями  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Во всех случаях критический уровень значимости ( $p$ ) принимали равным 0.05.

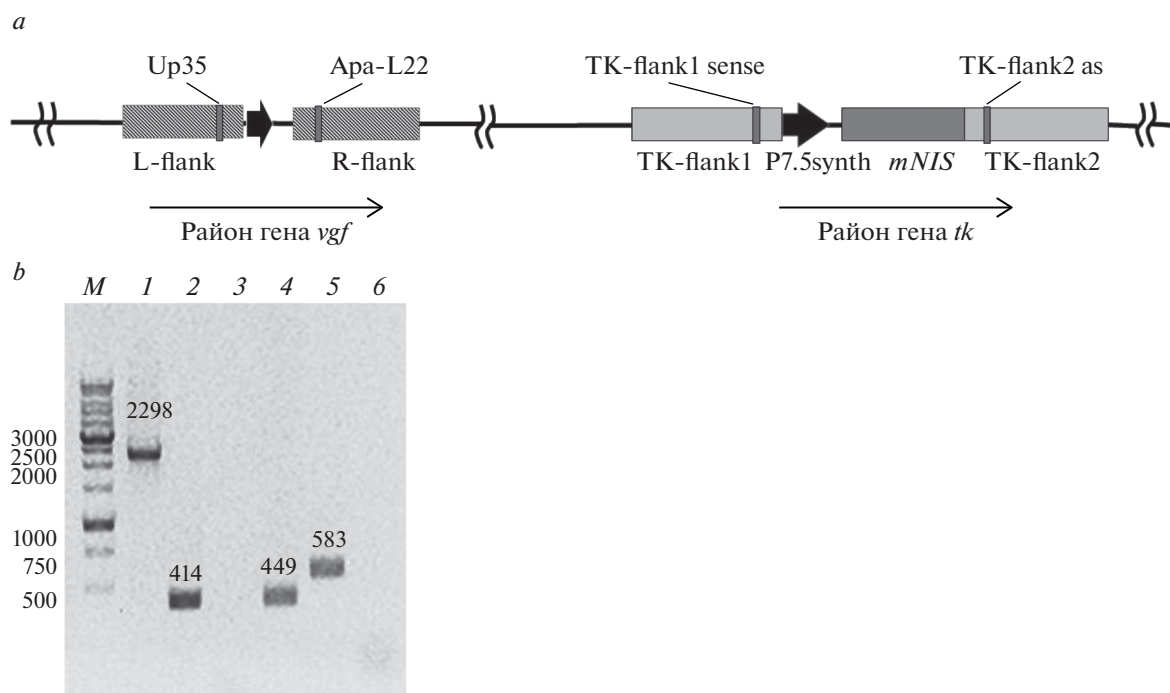
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Создание рекомбинантного штамма VV-mNIS-dGF*

Способность онколитических вирусов находить опухолевые клетки и селективно реплицироваться в них, а также возможность встраивания в геном вирусов трансгенов репортерных белков можно использовать для визуализации и определения размеров опухолевой массы, а также для обнаружения метастазов [2, 3]. В качестве репортерного белка мы использовали симпортер натрия/йодида (NIS).

NIS — консервативный белок позвоночных с высокой межвидовой гомологией [22]. Для встраивания в геном онколитического вируса нами была выбрана последовательность мышинного гена *NIS* (*mNIS*), соответствующая GenBank AF235001. Выбор обусловлен тем, что *mNIS* более эффективно катализирует транспорт йодида в трансфицированные клетки, чем NIS человека. Предполагают, что это обусловлено их различной локализацией: *mNIS* преимущественно обнаруживают на плазматической мембране, а его человеческий ортолог внутри экспрессирующих клеток (примерно в 40%) [23].

В качестве вируса-реципиента для встраивания трансгена *mNIS* в район *tk*-гена был использо-



**Рис. 1.** Структура рекомбинантного штамма VV-mNIS-dGF. *a* – Схематичное изображение структуры генома рекомбинантного варианта VV-mNIS-dGF с указанием позиций праймеров. *b* – ПЦР-анализ ДНК VV-mNIS-dGF с использованием пары праймеров TK-flank1 sense и TK-flank2 as (дорожки 1–3) или Up35 и ApaL22 (4–6). Дорожки 1 и 4 – VV-mNIS-dGF; дорожки 2 и 5 – L-IVP; дорожки 3 и 6 – вода; *M* – маркер длин ДНК (ООО “СибЭнзайм”, Россия).  
**Fig. 1.** Structure of recombinant VV-mNIS-dGF strain. *a* – Schematic representation of the recombinant virus genome with primer positions indicated. *b* – PCR analysis of recombinant VACV DNA using following primer pairs: TK-flank1 sense/TK-flank2 as (tracks 1–3) and Up35/ApaL22 (4–6). Tracks 1 and 4, VV-mNIS-dGF; 2 and 5, L-IVP; 3 and 6, water; *M*, DNA ladder (SibEnzyme LLC, Russia).

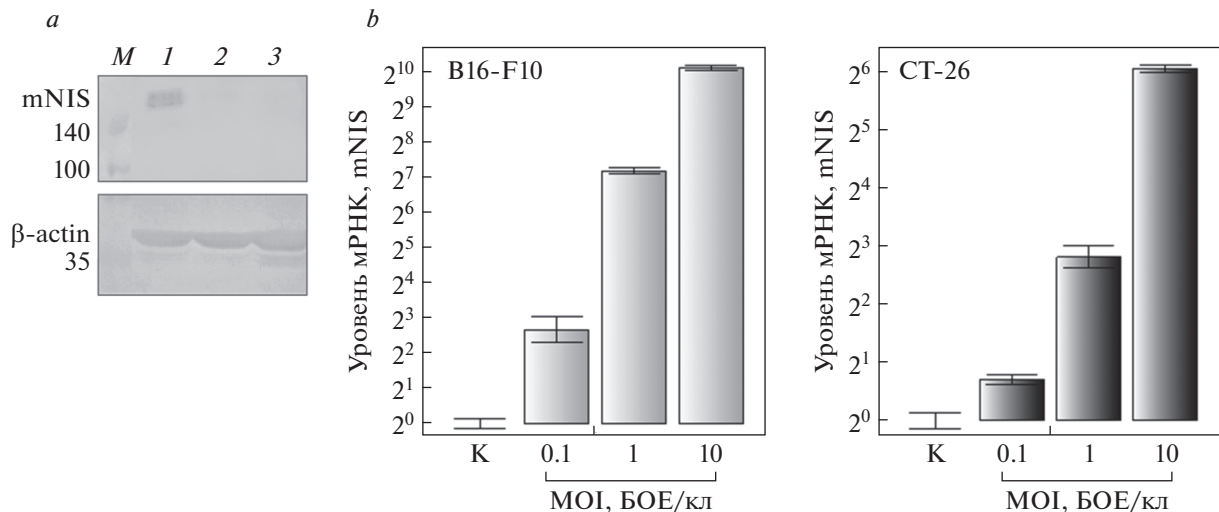
ван ранее сконструированный штамм VVdGF2/6 – вариант штамма L-IVP с делецией гена *vgf* [11]. Рекомбинантный штамм VV-mNIS-dGF с инсерцией *mNIS* получен в результате двойного кроссинговера по гомологичным участкам плазмидной ДНК рXJP-P7.5synth-mNIS и ДНК штамма-реципиента VVdGF2/6 соответственно и последующей селекции рекомбинантов в клетках H143TK<sup>−</sup> с добавлением в культуральную среду 5-бромдезоксисуридина. Схематичное изображение структуры рекомбинантного штамма VV-mNIS-dGF представлено на рис. 1*a*. Наличие в геноме рекомбинанта вставки трансгена *mNIS* подтверждено методом ПЦР со специфической парой праймеров: TK-flank1 sense и TK-flank2 as – а делеции гена *vgf* – с праймерами Up35 и Apa-L22. Как видно из рис. 1*b*, геном сконструированного вируса содержит вставку трансгена *mNIS* расчетной длины (2298 п.н.) и несет делецию гена *vgf*, которая уменьшает размер амплифицированного фрагмента до 449 п.н. – в отличие от исходного штамма L-IVP, с ДНК которого амплифицируется фрагмент размером 583 п.н. Определена полная нуклеотидная последовательность генома рекомбинантного варианта VV-mNIS-dGF: длина составляет 188 292 п.н., трансген *mNIS* встроен по позициям 81 265–

83 178 п.н. Рекомбинантный штамм VV-mNIS-dGF депонирован в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора под номером V-1205.

#### *Экспрессия mNIS в клетках B16-F10, инфицированных VV-mNIS-dGF*

Na<sup>+</sup>/I<sup>−</sup> симпортер мыши и крысы состоит из 618 а.о. и несет три сайта N-гликозилирования, расположенных во внемембранных сегментах в позициях Asn225, Asn485 и Asn497. В результате этой посттрансляционной модификации образуется зрелый белок, который мигрирует в SDS-PAGE с кажущейся молекулярной массой 80–90 кДа. В нескольких исследованиях показано, что этот белок встречается в димерных и олигомерных формах, что характерно для многих мембранных белков [24, 25].

Экспрессия трансгена *mNIS* в составе VV-mNIS-dGF подтверждена методом иммуноблотинга с антителами, специфичными к С-концевому цитоплазматическому домену белка mNIS. Как видно из результатов, представленных на рис. 2*a*, в лизатах клеток B16-F10, инфицированных VV-mNIS-dGF,



**Рис. 2.** Анализ экспрессии mNIS. *a* – Анализ экспрессии mNIS в клетках B16-F10 методом иммуноблоттинга. На дорожки 12%-ного SDS-PAAG были нанесены лизаты клеток, зараженных VV-mNIS-dGF (1), VVdGF2/6 (2), а также лизат контрольных клеток (3) и маркер молекулярной массы белков (*M*; Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; Thermo Fisher Scientific, США). Разделенные белки переносили на PVDF-мембрану и детектировали целевой продукт, как описано в разделе “Условия эксперимента”. *b* – Оценка методом ПЦР в реальном времени экспрессии мРНК mNIS в культурах клеток B16-F10 и CT-26, инфицированных штаммом VV-mNIS-dGF с MOI 0.1, 1.0 и 10.0 БОЕ/клетка. Статистические различия между контрольной (K) и экспериментальными группами были значимыми ( $p < 0.01$  для MOI 10.0 БОЕ/клетка;  $p < 0.05$  для MOI 0.1 и 1.0 БОЕ/клетка).

**Fig. 2.** Analysis of mNIS expression. *a* – Western blot analysis of mNIS expression in B16-F10 cells. Lysates of cells infected with VV-mNIS-dGF (1), VVdGF2/6 (2), as well as control cells (3), and a protein molecular weight marker (*M*; Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; Thermo Fisher Scientific, USA) were loaded onto 12% SDS-PAAG. The separated proteins were transferred to a PVDF membrane, and the target product was detected as described in the “Experimental”. *b* – RT-qPCR evaluation of mNIS mRNA expression in B16-F10 and CT-26 cells infected with VV-mNIS-dGF strain with MOI of 0.1, 1.0 and 10.0 PFU/cell. Statistical differences between control (K) and experimental groups were significant ( $p < 0.01$  for MOI 10.0 PFU/cell;  $p < 0.05$  for MOI 0.1 and 1.0 PFU/cell).

детектируется белок с молекулярной массой более 200 кДа, взаимодействующий с антителами к mNIS. Из этого можно сделать вывод, что сконструированный рекомбинантный штамм экспрессируют белок mNIS, причем в димерной или олигомерной форме, устойчивой к действию детергента (SDS), что согласуется с результатами исследования E. Darrouzet и др. [26].

Экспрессия трансгена *mNIS* в инфицированных рекомбинантом VV-mNIS-dGF клетках опухолей мышей, B16-F10 и CT-26, также подтверждена по уровням мРНК mNIS, определенным методом ПЦР в реальном времени. Как видно из данных, представленных на рис. 2b, уровни мРНК mNIS коррелировали с множественностью заражения клеток рекомбинантным штаммом VV-mNIS-dGF. В неинфицированных клетках обнаружен только низкий фоновый уровень экспрессии мРНК mNIS, который был принят за условную единицу. В клетках B16-F10 содержание мРНК mNIS было в 15–20 раз выше, чем в клетках CT-26, из чего можно сделать вывод о повышенной чувствительности клеток меланомы к

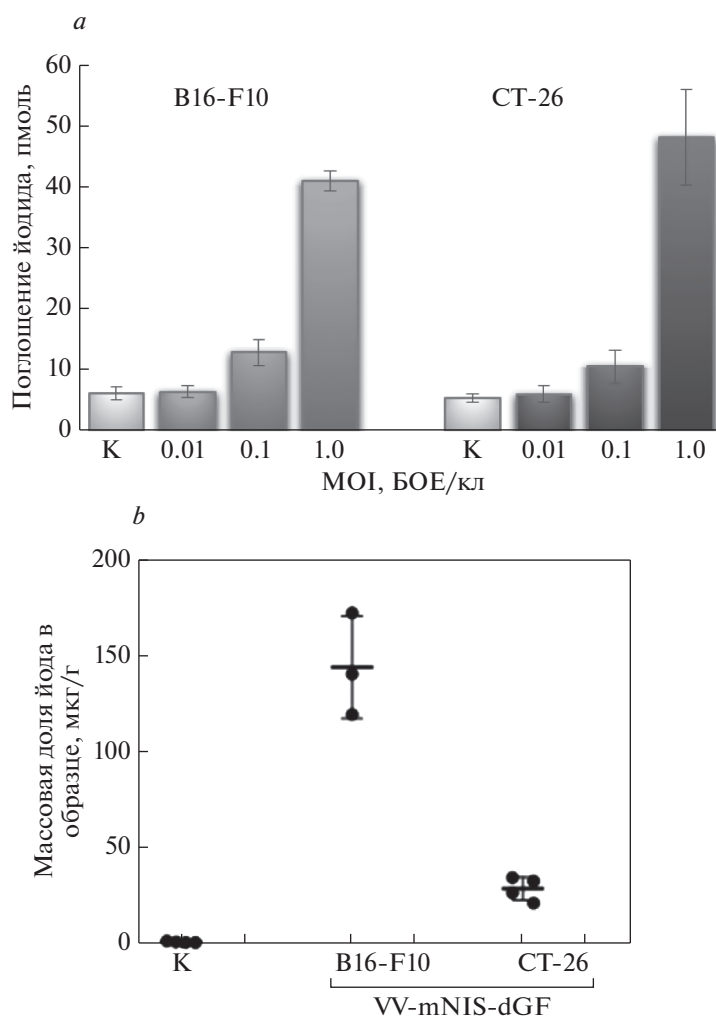
рекомбинантному штамму VV-mNIS-dGF по сравнению с клетками карциномы толстой кишки.

#### Онколитическая активность штамма VV-mNIS-dGF *in vitro* и *in vivo*

На рис. 3a представлены результаты определения цитотоксической активности рекомбинантного штамма VV-mNIS-dGF в отношении клеток B16-F10 и CT-26. Для клеток B16-F10 значение ЦТД<sub>50</sub> штамма VV-mNIS-dGF составляло 0.05 БОЕ/клетка, а для CT-26 – 0.8 БОЕ/клетка, то есть клетки меланомы в 16 раз чувствительнее к заражению этим вирусом, чем клетки карциномы толстой кишки.

Для оценки противоопухолевой активности штамма VV-mNIS-dGF *in vivo* использовали две сингенных модели: “меланома B16-F10 – мыши линии C57BL/6” и “карцинома CT-26 – мыши линии BALB/c”. Как видно из рис. 3b, штамм VV-mNIS-dGF значительно ингибировал рост этих двух типов опухолей относительно соответствующего отрицательного контроля. Индекс ТРО в





**Рис. 4.** Накопление йодида в инфицированных VV-mNIS-dGF опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo*. *a* – Поглощение ионов йода клетками B16-F10 и CT-26, зараженными VV-mNIS-dGF (MOI 0.01, 0.1, 1.0 БОЕ/клетка), и контрольными (К) в реакции Санделла–Колтоффа. Приведено содержание  $I^-$  в лунке. *b* – Количественное определение содержания йода в опухолевых клетках методом РФА-СИ. Клетки заражали VV-mNIS-dGF двукратно, с интервалом 3 суток, в дозе  $1 \times 10^7$  БОЕ/опухоль.

**Fig. 4.** Iodine accumulation in VV-mNIS-dGF-infected tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *a* – Iodine ion uptake by B16-F10 and CT-26 cells infected with VV-mNIS-dGF (MOI 0.01, 0.1, 1.0 PFU/cell), and control cells (K) in the Sandell–Koltoff reaction. The content of  $I^-$  per well is shown. *b* – Quantification of iodine content in tumor cells by X-ray Fluorescence Analysis with using Synchrotron Radiation (XRF-SR). Cells were infected with VV-mNIS-dGF twice, 3 days apart, at a dose of  $1 \times 10^7$  PFU/tumor.

Полученные *in vitro* результаты подтверждены в экспериментах *in vivo*. Из аллотрансплантатов меланомы B16-F10 и карциномы толстой кишки CT-26, обработанных и не обработанных VV-mNIS-dGF, готовили образцы (таблетки) для РФА-СИ. Массовая доля йода в образцах контрольных (нелеченых) опухолей составляла в среднем 0.48 мкг/г таблетки, в обработанных вирусом опухолях B16-F10 – в среднем 143 мкг/г, CT-26 – 28.3 мкг/г.

Таким образом, сконструированный нами рекомбинантный онколитический вирус VV-mNIS-dGF эффективно экспрессирует трансген *mNIS* и аккумулирует йодид в опухолевых клетках как в

культуре, так и в аллотрансплантатах опухолей. В дальнейших экспериментах с использованием рекомбинантного штамма VV-mNIS-dGF и СИ мы планируем провести неинвазивную прижизненную визуализацию модельных опухолей как мыши, так и человека. Неинвазивная визуализация всего организма экспериментального животного в нескольких временных точках позволит оценить эффективность доставки вируса в целевые органы и ткани, а также контролировать и оценивать вирусемию и экспрессию терапевтических трансгенов на протяжении всего курса лечения. Известно, что, в отличие от широко применяемых в онкологии ядерных методов визуализации

(ОФЭКТ/КТ, ПЭТ), для получения рентгеновского изображения с помощью СИ не требуется введения радионуклида в организм. Однако можно ввести рентгеноконтрастное соединение, содержащее йод (например, NaI), и визуализировать клетки, в которых происходит репликация рекомбинантного вируса, не нагружая организм при этом радиоактивными препаратами [4]. Еще один важный момент — при использовании синхротронного излучения для рентгеноскопии требуется меньшие дозы контрастного вещества для получения качественного изображения, чем при обычной рентгеновской диагностике [9]. Высокий контраст и пространственное разрешение изображений, полученных с помощью синхротронной рентгеноскопии, обеспечит возможность отслеживания онкологической активности рекомбинантных штаммов вируса осповакцины, экспрессирующих трансген *NIS*, даже для небольших опухолей и метастазов на ранней стадии формирования.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1355 от 12.10.2021, тема “Использование синхротронного излучения для вирусологических исследований”) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы.

### ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Авторы подтверждают соблюдение институциональных, национальных и международных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (протокол № 3 от 28.12.2022).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Ткачева А.В., Горчаков А.А., Кулемзин С.В. Комбинированная терапия рака на основе онколитической виротерапии и таргетной CAR T/NK-клеточной иммунотерапии. *Молекуляр. биология*, 2020, 54(1), 3–16. <https://doi.org/10.31857/S0026898420010103>
2. Haddad D., Fong Y. Molecular imaging of oncolytic viral therapy. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2014, 1, 14007. <https://doi.org/10.1038/mto.2014.7>
3. Kirn D.H., Thorne S.H. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 2009, 9(1), 64–71. <https://doi.org/10.1038/nrc2545>
4. Semenova A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Agafonov A.P., Kochneva G.V. Reporter transgenes for monitoring the antitumor efficacy of recombinant oncolytic viruses. *Acta Naturae*, 2022, 14(3), 46–56. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11719>
5. Spitzweg C., Nelson P.J., Wagner E., Bartenstein P., Weber W.A., Schwaiger M., Morris J.C. The sodium iodide symporter (NIS): novel applications for radionuclide imaging and treatment. *Endocr. Relat. Cancer*, 2021, 28(10), T193–T213. <https://doi.org/10.1530/ERC-21-0177>
6. Brown S.L., Freytag S.O., Barton K.N., Flynn M.J., Peck D.J., Dragovic A.F., Jin R., Yen Y.N., Fyhrrie D.P., Les C.M., Zhu G., Kolozsvary A., Pitchford W.C., Nathanson S.D., Fenstermacher J.D., Kim J.H. Reporter gene imaging using radiographic contrast from nonradioactive iodide sequestered by the sodium-iodide symporter. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2007, 2(5), 240–247. <https://doi.org/10.1002/cmmi.150>
7. Кондранова А.М., Гладышева А.А., Гладышева А.В., Агафонов А.П. Использование синхротронного излучения в вирусологии. *Здоровье населения и среда обитания*, 2022, 30(12), 81–88. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-12-81-88>
8. Pelka J.B. Synchrotron radiation in biology and medicine. *Acta Phys. Pol. A*, 2008, 114(2), 309–329. <https://doi.org/10.12693/APhysPolA.114.309>
9. Morgan K.S., Parsons D., Cmielewski P., McCarron A., Gradl R., Farrow N., Siu K., Takeuchi A., Suzuki Y., Uesugi K., Uesugi M., Yagi N., Hall C., Klein M., Maksimenko A., Stevenson A., Hausermann D., Dierolf M., Pfeiffer F., Donnelly M. Methods for dynamic synchrotron X-ray respiratory imaging in live animals. *J. Synchrotron Radiat.*, 2020, 27(1), 164–175. <https://doi.org/10.1107/S1600577519014863>
10. Thorne S.H., Hwang T.H.H., O’Gorman W.E., Bartlett D.L., Sei S., Kanji F., Brown C., Werier J., Cho J.H., Lee D.E., Wang Y., Bell J., Kirn D.H. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest.*, 2007, 117(11), 3350–3358. <https://doi.org/10.1172/JCI32727>
11. Кочнева Г.В., Бабкина И.Н., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Юдин П.В., Сиволобова Г.Ф., Швалов А.Н., Попов Е.Г., Бабкин И.В., Немесов С.В., Чумаков П.М. Апоптин усиливает онколитическую активность вируса коровьей оспы *in vitro*. *Молекуляр. биология*, 2013, 47(5), 733–742. <https://doi.org/10.1134/S0026893313050075>
12. Zonov E., Kochneva G., Yunusova A., Grazhdantseva A., Richter V., Ryabchikova E. Features of the antitumor effect of vaccinia virus Lister strain. *Viruses*, 2016, 8(1), 20. <https://doi.org/10.3390/v8010020>
13. Shvalov A.N., Sivolobova G.F., Kuligina E.V., Kochneva G.V. Complete genome sequence of vaccinia virus strain L-IVP. *Genome Announc.*, 2016, 4(3), e00372–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00372-16>
14. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta*

- Naturae*, 2015, 7(4), 113–121.  
<https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-4-113-121>
15. McCart J.A., Bartlett D.L., Moss B. A combined growth factor-deleted and thymidine kinase-deleted vaccinia virus vector. Patent EP1180157B1, Publ. 2012.11.28. <https://www.patentguru.com/EP1180157B1>
  16. Koval O., Kochneva G., Tkachenko A., Troitskaya O., Sivolobova G., Grazhdantseva A., Nushtaeva A., Kuligina E., Richter V. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells. *Biomed. Res. Int.*, 2017, 2017, 3620510. <https://doi.org/10.1155/2017/3620510>
  17. Merchlinsky M., Eckert D., Smith E., Zauderer M. Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. *Virology*, 1997, 238(2), 444–451. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8828>
  18. Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Gileva I.P., Kuligina E.V., Rikhter V.A., Kochneva G.V. Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2016, 52(7), 685–691. <https://doi.org/10.1134/S0003683816070036>
  19. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat. Protoc.*, 2008, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
  20. Dong H., Atlas E., Wade M.G. Development of a non-radioactive screening assay to detect chemicals disrupting the human sodium iodide symporter activity. *Toxicol. In Vitro*, 2019, 57, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.01.021>
  21. Легкодимов А.А., Купер К.Э., Колмогоров Ю.П., Баранов Г.Н. Станция РФА-СИ на накопительном кольце ВЭПП-4М. *Известия Российской академии наук. Серия физическая*, 2019, 83(2), 158–162. <https://doi.org/10.1134/S0367676519020194>
  22. Concilio S.C., Russell S.J., Peng K.-W. A brief review of reporter gene imaging in oncolytic virotherapy and gene therapy. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2021, 21, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.03.006>
  23. Dayem M., Basquin C., Navarro V., Carrier P., Marsault R., Chang P., Huc S., Darrouzet E., Lindenthal S., Pourcher T. Comparison of expressed human and mouse sodium/iodide symporters reveals differences in transport properties and subcellular localization. *J. Endocrinol.*, 2008, 197(1), 95–109. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0455>
  24. Huc-Brandt S., Marcellin D., Graslin F., Averseng O., Bellanger L., Hivin P., Quemeneur E., Basquin C., Navarro V., Pourcher T., Darrouzet E. Characterisation of the purified human sodium/iodide symporter reveals that the protein is mainly present in a dimeric form and permits the detailed study of a native C-terminal fragment. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, 1808(1), 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2010.08.013>
  25. Hingorani M., Spitzweg C., Vassaux G., Newbold K., Melcher A., Pandha H., Vile R., Harrington K. The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2010, 10(2), 242–267. <https://doi.org/10.2174/156800910791054194>
  26. Darrouzet E., Lindenthal S., Marcellin D., Pellequer J.L., Pourcher T. The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, 1838(1 Pt. B), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.08.013>

## Recombinant Vaccinia Virus Expressing Sodium/Iodide Symporter for Theranostics of Malignant Tumors Using Synchrotron Radiation

A. V. Semenova<sup>a, #</sup>, A. A. Grazhdantseva<sup>a</sup>, G. F. Sivolobova<sup>a</sup>, G. A. Kudrov<sup>a</sup>,  
 A. S. Kabanov<sup>a</sup>, A. A. Legkodymov<sup>b</sup>, K. E. Kuper<sup>b</sup>, A. P. Agafonov<sup>a</sup>, and G. V. Kochneva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia

<sup>b</sup>Budker Institute of Nuclear Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>#</sup>e-mail: tkacheva\_av@mail.ru

**Abstract**—A recombinant strain of the vaccinia virus, VV-mNIS-dGF, has been constructed. The genome of this strain contains an insertion of the mouse sodium/iodide symporter transgene (*mNIS*). This insertion is located in the deleted region of the viral thymidine kinase gene (*tk*). In addition, the viral growth factor gene (*vgf*) was deleted, ensuring that the virus had an attenuated effect on normal cells without affecting its replication in cancer ones. The antitumor activity of the VV-mNIS-dGF strain was investigated in two mouse cancer models, melanoma B16-F10 and colorectal carcinoma CT-26. In both models, the strain exhibited high oncolytic activity, efficiently expressed the mNIS and accumulated iodide in tumor cells in both *in vitro* experiments and *in vivo* on mouse allografts. Quantification of iodide content in tumors was performed by elemental analysis using X-ray Fluorescence Analysis with using Synchrotron Radiation (XRF-SR). The results indicate the possibility of using the VV-mNIS-dGF strain for both therapy and diagnosis (theranostics) of malignant tumors.

**Keywords:** oncolytic viruses, vaccinia virus, recombinant strain, NIS, synchrotron radiation, iodide, theranostics