

А.-П.С. Шурыгина¹, А.В. Карташев², Е.Г. Кованько², Л.Н. Киселева²,
Ю.И. Пустовалов², А.В. Слита¹, В.В. Зарубаев¹, С.В. Беляевская¹, А.К. Сироткин¹,
О.И. Киселев¹ А.Ю. Егоров¹.

Онколитический потенциал рекомбинантных векторов вируса гриппа А на модели злокачественной глиомы *in vivo*

¹ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург

² Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Минздрава России, Санкт-Петербург

Глиальные опухоли – наиболее распространенный вид первичных объемных образований головного мозга. Несмотря на значительный прогресс в области диагностики и лечения опухолевых заболеваний, прогноз для пациентов, страдающих глиомами III–IV степени злокачественности, остается крайне неблагоприятным. Активно развивающимся направлением в онкологии является применение в терапии опухолей вирусов, обладающих естественной или индуцированной с помощью методов молекулярной генетики онколитической активностью.

В настоящей работе продемонстрирован онколитический потенциал рекомбинантного вектора вируса гриппа, с поврежденной функцией антагониста системы интерферона – белка NS1, в терапии злокачественной глиомы. В качестве модельного штамма был использован вектор вируса гриппа А, экспрессирующий зеленый флуоресцирующий белок (HA-DS-GFP) с открытой рамки считывания белка NS1. Показано, что данный вирус обладал инфекционной активностью по отношению к клеткам глиомы как *in vitro*, так и *in vivo* (экспериментальная модель глиомы у крыс). При интратуморальном введении вирус HA-DS-GFP оказывал значительный терапевтический эффект, выражавшийся в подавлении, а в ряде случаев полном регрессе, опухолевого роста. Полученные нами данные, свидетельствуют о перспективности применения гриппозных векторов в схемах противоопухолевой терапии, в частности, при лечении злокачественных глиом головного мозга.

Ключевые слова: глиальная опухоль, рекомбинантный вирус гриппа А, белок NS1

Глиальные опухоли – наиболее распространенный вид первичных объемных образований головного мозга [23]. За 30 лет (с 1973 по 2003) отмечается неуклонная тенденция к увеличению числа заболевших от 5,9 до 7,0 на 100 000 среди мужчин и от 4,1 до 5,2 на 100 000 среди

женщин [1]. При этом, несмотря на активное внедрение в клиническую практику высокотехнологичных методов визуализации и лечения, прогноз для пациентов, страдающих глиомами III–IV степени злокачественности, остается крайне неблагоприятным. Средняя продолжительность жизни таких пациентов, с момента постановки диагноза составляет около 12 месяцев, а уровень пятилетней выживаемости не превышает 2% [2]. Особенности локализации глиомы, ее высокая пролиферативная активность, инвазивность и ангиогенез обуславливают неэффективность современных методов терапии. В большинстве случаев хирургическое лечение является нерадикальным, что связано с невозможностью тотального удаления опухоли, а также ее относительной радио- и химиорезистентностью [7].

Перспективным направлением в онкологии является применение в терапии онколитических вирусов, обладающих естественной или индуцированной при помощи методов молекулярной генетики онколитической активностью. Основной характеристикой онколитических вирусов является их способность к кондидиальной репликации, то есть способность селективно заражать и разрушать опухолевые клетки, оставляя нетронутыми клетки окружающих тканей. Методы вирусотерапии условно могут быть разделены на две группы: это терапия аттенуированными (ослабленными) онколитическими вирусами, способными к репликации в опухолевых клетках, и векторная терапия, где вирусы, как правило, дефектные по репликации, являются средством доставки суицидных генов (гены смерти) и/или способствуют локальной экспрессии цитокинов [29]. Таким образом, онколитический эффект вирусов может реализоваться посредством ряда механизмов: (1) разрушения зараженной опухолевой клетки вследствие репродукции вируса; (2) вирус-индуцированной иммуно-опосредованной цитотоксичности; (3) разрушения сосудов, питающих опухоль; (4) поражения неинфицированных раковых клеток за счет активации эффекторов противоопухолевого иммунного ответа; (5)

адресной доставки трансгенных белков, экспрессируемых вирусом [9].

Клинические испытания различных вариантов терапии глиом с помощью вирусов производятся с 90-х годов двадцатого века, когда впервые были предприняты попытки применения трансгенных вирусов герпеса в качестве лечебного агента [21].

В настоящее время на различных стадиях клинических исследований активно изучается безопасность и эффективность онколитических вирусов на основе вируса простого герпеса, аденовирусов, полиовирусов, вируса болезни Ньюкасла, реовирусов, парвовирусов и вируса инфекционного паротита, продемонстрировавших активность против глиомы на доклиническом этапе [24]. В генотерапии глиом наиболее изученными являются аденовирусные и ретровирусные векторы. Ретровирусные векторы использовались для внутриопухолевой доставки гена ИЛ-2 с умеренным клиническим эффектом [4,8,25]. Сравнительный ретроспективный анализ показывает, что ретровирусные векторы независимо от принципа терапии были менее эффективны в клинических исследованиях по сравнению с аденовирусами в связи с их низкой инфицирующей активностью [3,20]. Кроме того, в отличие от ретровирусов, репликация аденовируса не сопровождается интегрированием в геном клетки хозяина. В настоящее время несколько продуктов (Gendicine, Advexin) на основе аденовирусного вектора, экспрессирующего p53 белок, разрешены к использованию для лечения опухолей головы и шеи в Китае [17,30,33].

Однако следует отметить, что ни один из методов векторной терапии пока не привел к радикальному улучшению прогноза у больных злокачественными глиомами. Необходимо продолжать поиск оптимального онколитического вируса, который обладал бы высокой безопасностью и специфичностью к опухолевым клеткам, и не инактивировался факторами специфического иммунитета при его введении пациентам. Например, применение аденовирусных векторов может иметь существенное ограничение в связи с наличием предшествующего иммунитета к вектору, опосредованному предыдущей респираторной аденовирусной инфекцией.

Антигенная изменчивость вирусов гриппа является основным препятствием в создании эффективной гриппозной вакцины, однако это свойство может оказаться весьма полезным при создании лечебных схем с использованием гриппозных векторов. Антигенная вариабельность вирусов гриппа создает возможность индивидуального подбора вирусного вектора, к которому у пациента отсутствует иммунитет. Более того, векторная терапия может осуществляться

многократным введением вирусов различных антигенных подтипов. Дополнительным преимуществом использования вируса гриппа как вектора является отсутствие при его репликации стадии синтеза ДНК, что исключает интеграцию вирусных последовательностей в геном клетки. Многолетний опыт использования живых гриппозных вакцин доказал полную безопасность аттенуированных вирусов для взрослых и детей [11,13,18,28].

Целью данного исследования являлось изучение онколитического потенциала рекомбинантных векторов вируса гриппа в терапии злокачественной глиомы на примере вектора вируса гриппа А, экспрессирующего зеленый флюоресцирующий белок (GFP) с открытой рамки считывания белка NS1.

Материалы и методы

Вирус и плацебо

Вирус HA-DS-GFP получен методом «обратной генетики» [16,26] путем трансфекции клеток Vero набором из двунаправленных экспрессионных плазмид, кодирующих заданные геномные сегменты вируса гриппа. Гены PB1, PB2, PA, NP, NA, М принадлежат вирусу гриппа A/PR/8/34 (H1N1), HA – вирусу гриппа A/утка/Сингапур/97 (H5N3) (рис.1). Данный вирус был оптимизирован для роста в ИФН-компетентных системах путем последовательных пассажей на клеточной культуре B16f1 [19]. В качестве плацебо использовали сахарозно-фосфатный стабилизирующий буфер (SPGN). При хранении и транспортировке вируса и плацебо соблюдался температурный режим (-70°C).

Клеточные линии

В работе использовали перевиваемую культуру T98 – мультиформная глиобластома человека (банк клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» МЗРФ, СПб), и первичную культуру глиомы крысы «Глиома-35» (банк клеточных культур ФГБУ РНЦРХТ, СПб), полученную путем трипсинизации опухоли (рис. 2). Культивирование клеточных культур осуществляли в культуральной среде DMEM/F12 (Invitrogen) с добавлением 10% ФБС (Invitrogen) при 37°C и 5% относительной влажности.

Животные

Исследования проведены согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». В работе использовали самок белых беспородных крыс, 8-10 недель, полученных из питомника ФГБУ РНЦРХТ, СПб

Модель глиомы

Половозрелым (8-10 недель) самкам нелинейных крыс (24 шт.) была произведена подкожная инъекция клеток «Глиома-35» ($10^{5.5}$ - 10^6 клеток) в наружную поверхность левого бедра. На 5 день исследования, до появления пальпируемых опухолей, животные были рандомизированы в исследуемую и контрольную группы.

Заражение клеток глиомы *in vitro* и *in vivo*

В экспериментах *in vitro* клетки инфицировали исследуемым вирусом со множественностью инфекции (moi.) 0,05 и инкубировали в течение 24 часов в среде DMEM/F12 с добавлением трипсина (Sigma) в концентрации 1 мкг/мл при 37°C и 5% относительной влажности. После этого специфическое свечение GFP оценивали с помощью инвертированного флюоресцентного микроскопа (Zeiss).

Введение вируса в опухоли *in vivo* осуществляли с помощью инсулинового шприца. Однократная доза вируса

составляла 8 lg 50%-ной тканевой инфекционной дозы/мл (ТИД₅₀/мл).

Исследование эффективности HA-DS-GFP *in vivo*

Терапию проводили в соответствии со следующей схемой: животным вводили исследуемый препарат (HA-DS-GFP) или плацебо (SPGN) интратуморально в объеме 0,5 мл. В день начала терапии (5 день исследования) было произведено 2 инъекции с интервалом в 3 часа, и по 1 инъекции каждый третий день до 14 дня исследования включительно.

Контроль размеров опухоли и учет летальности осуществляли на протяжении 70 дней от начала исследования.

Гистологическое исследование

В анализе использовали образцы опухоли, полученные через 24, 48 и 72 часа после однократного введения препарата HA-DS-GFP. Криосрезы готовили из замороженных в жидком азоте образцов опухоли на криотоме Leica. Для световой микроскопии образцы фиксировали в 10%-формалине на физиологическом фосфатном буфере, заливали в парафин по общей методике, готовили срезы и окрашивали их гематоксилином-эозином.

Электронная микроскопия

Образцы опухоли, полученные через 48 часов после однократного введения препарата HA-DS-GFP, фиксировали 2,5% раствором OsO₄, обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон/аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Austria), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Japan) при инструментальном увеличении 2000 - 20000. Фотосъемку производили на пленку ФТ-41МД.

Результаты и обсуждение

Вектор вируса гриппа, экспрессирующий GFP, инфицирует клетки глиомы *in vitro* и *in vivo*

Для демонстрации инфекционной активности препарата HA-DS-GFP в клетках глиомы были использованы две клеточные культуры: T98 – перерываемая клеточная культура (мультиформная глиобластома человека) и «Глиома-35» первичная клеточная культура, полученная из клеток глиомы крысы путем трипсинизации опухоли. Клетки в трех повторах инфицировали вирусом HA-DS-GFP и через 24 часа инкубации оценивали специфическое свечение GFP посредством люминесцентной микроскопии (рис. 3). Наличие специфического свечения GFP в исследуемых образцах наглядно свидетельствовало о способности вируса HA-DS-GFP инфицировать клетки глиомы *in vitro*.

Дальнейшее изучение инфекционного потенциала в отношении опухолевой ткани вектора HA-DS-GFP, проводили на модели глиомы крыс *in vivo*. Крысам (6 шт.) в область левого бедра подкожно вводили клетки «Глиома-35» (10^{5.5}-10⁶) и через 12 дней к моменту образования выраженных, хорошо пальпируемых опухолей, объемом не менее 1 см³, интратуморально однократно вводили вирус HA-DS-GFP (0,5 мл, 8 lg ТИД₅₀/животное). Забор образцов опухоли осу-

ществляли через 24 и 72 часа после введения препарата. Приготовленные криосрезы анализировали посредством люминесцентной микроскопии. Для каждого образца просматривали не менее 5 криосрезов (рис. 4).

Во всех препаратах наблюдались обширные поля специфического свечения GFP как на 24, так и на 72 часа после введения препарата, свидетельствующее о способности вектора не только инфицировать, но и синтезировать трансгенный белок в клетках глиомы *in vivo*.

С целью отображения морфологических изменений, провоцируемых вирусом HA-DS-GFP в опухолевой ткани, из образцов опухоли, собранных через 48 часов после однократного интратуморального введения вируса или плацебо были приготовлены гистологические срезы, окрашенные гематоксилином-эозином для световой микроскопии и препараты для электронно-микроскопического исследования (рис. 5.).

Анализ гистологических срезов выявил, что контрольные образцы опухоли, не инфицированные вирусом гриппа, характеризовались гомогенной структурой, плотными клеточными контактами и большим количеством митотически делящихся клеток и клеток с гетеротипическими ядрами. Признаки воспалительной инфильтрации, цитотоксичности и клеточного распада отсутствовали. В отличие от контрольных образцов опухоли, в исследуемых образцах наблюдалась выраженная периваскулярная инфильтрация лимфоцитами, нейтрофилами и макрофагами. Часть клеток опухоли были вакуолизированы, имели признаки конденсации хроматина и формировали очаги мелкоглыбчатого распада.

С помощью электрон-микроскопического анализа было наглядно показано, что клетки контрольной опухоли, не инфицированной вирусом гриппа, имели интактную структурированную цитоплазму. Ядро было крупным и содержало 1-2 ядрышка. Плазматическая и ядерная мембраны, а также клеточные органеллы, выглядели интактными. Однократное интратуморальное инфицирование вирусом гриппа HA-DS-GFP приводило к полной деградациии органелл и в целом цитоплазмы опухолевых клеток. Как и при исследовании при помощи световой микроскопии, отмечалась выраженная конденсация хроматина в ядрах, что, по-видимому, является свидетельством апоптотических процессов, индуцируемых вирусом.

В целом, наблюдаемые морфологические изменения в исследуемых образцах свидетельствуют о значительном цитотоксическом эффекте вектора вируса гриппа А, экспрессирующего GFP, на клетки глиомы *in vivo*.



Рисунок 1. Схема рекомбинантного гена NS1 вируса HA-DS-GFP. NS1 представлен 104 аминокислотами открытой рамки считывания NS1, при этом открытая рамка считывания NEP образуется в результате сплайсинга, как указано на схеме. Светло-голубой участок соответствует 12 аминокислотам общим для NS1 и NEP, светло-серым обозначен участок соответствующий нуклеотидам, кодирующим 12 случайных аминокислот «сшитых» с GFP (SLYQNGPGDHGL), темно-серым участком представлена кодирующая последовательность для 29 аминокислот, оставшаяся от вектора клонирования GFP; ncr – некодирующая область. Цифрами обозначены позиции нуклеотидов.

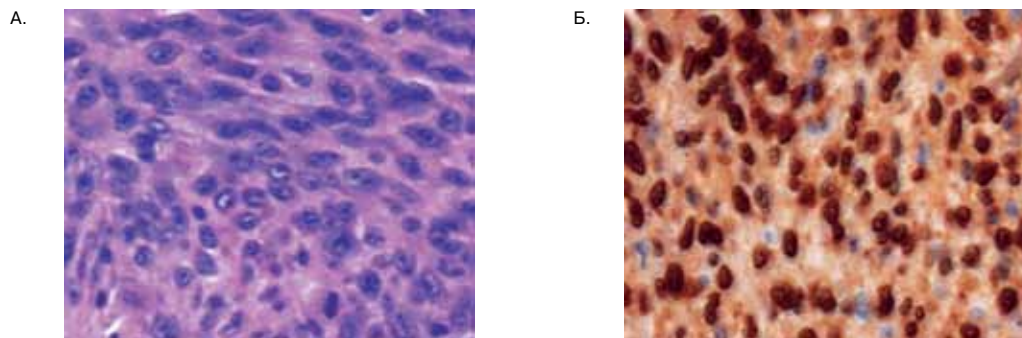


Рисунок 2. Перевиваемая опухоль «Глиома-35». (А) Окраска гематоксилин-эозин (х100). (Б) Окраска Ki-67 (х100). Опухоль имеет характерную для глиальных опухолей структуру, состоит преимущественно из пучков веретеновидных клеток с овальными и веретеновидными ядрами. Ki-67-положительны более 90% клеток.

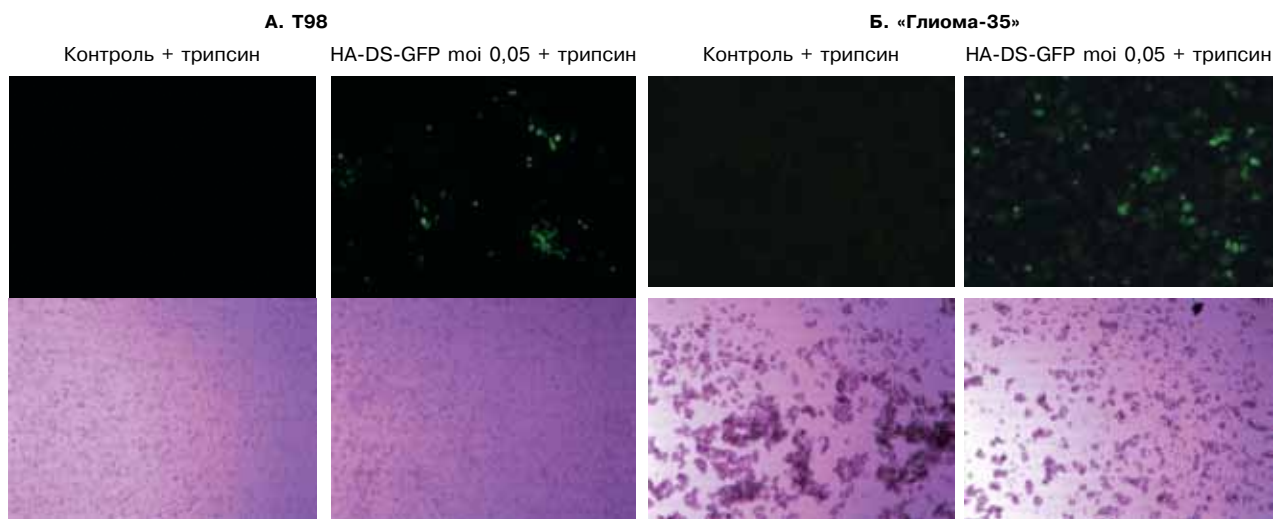


Рисунок 3. Инфекционная активность вектора вируса гриппа А, экспрессирующего GFP (HA-DS-GFP) в клеточных культурах глиомы T98 (А) и «Глиома-35» (Б) *in vitro*. Люминесцентная (верхний ряд) и световая (нижний ряд) микроскопия (х 100) 24 часа после внесения вируса в клеточную культуру.

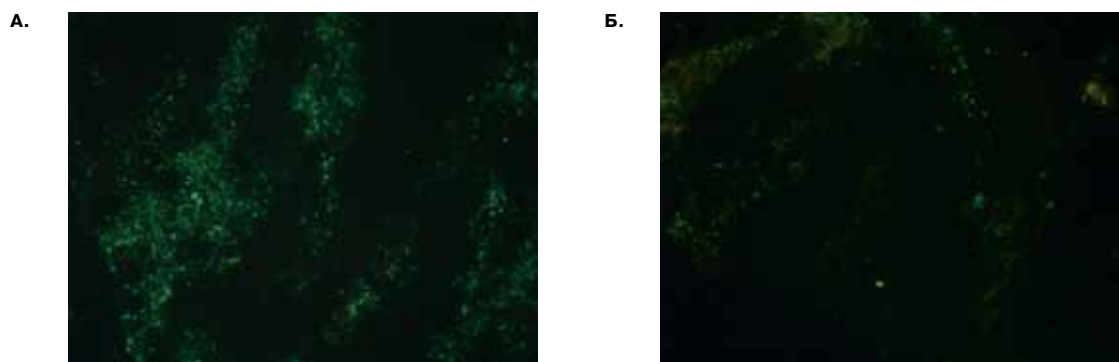


Рисунок 4. Инфекционная активность вектора вируса гриппа А, экспрессирующего GFP (HA-DS-GFP) образцах глиомы крыс (35) *in vivo*. Люминесцентная микроскопия (х 40) криосрезов образцов, полученных 24 (А) и 72 (Б) часов после однократного интратуморального введения вируса.

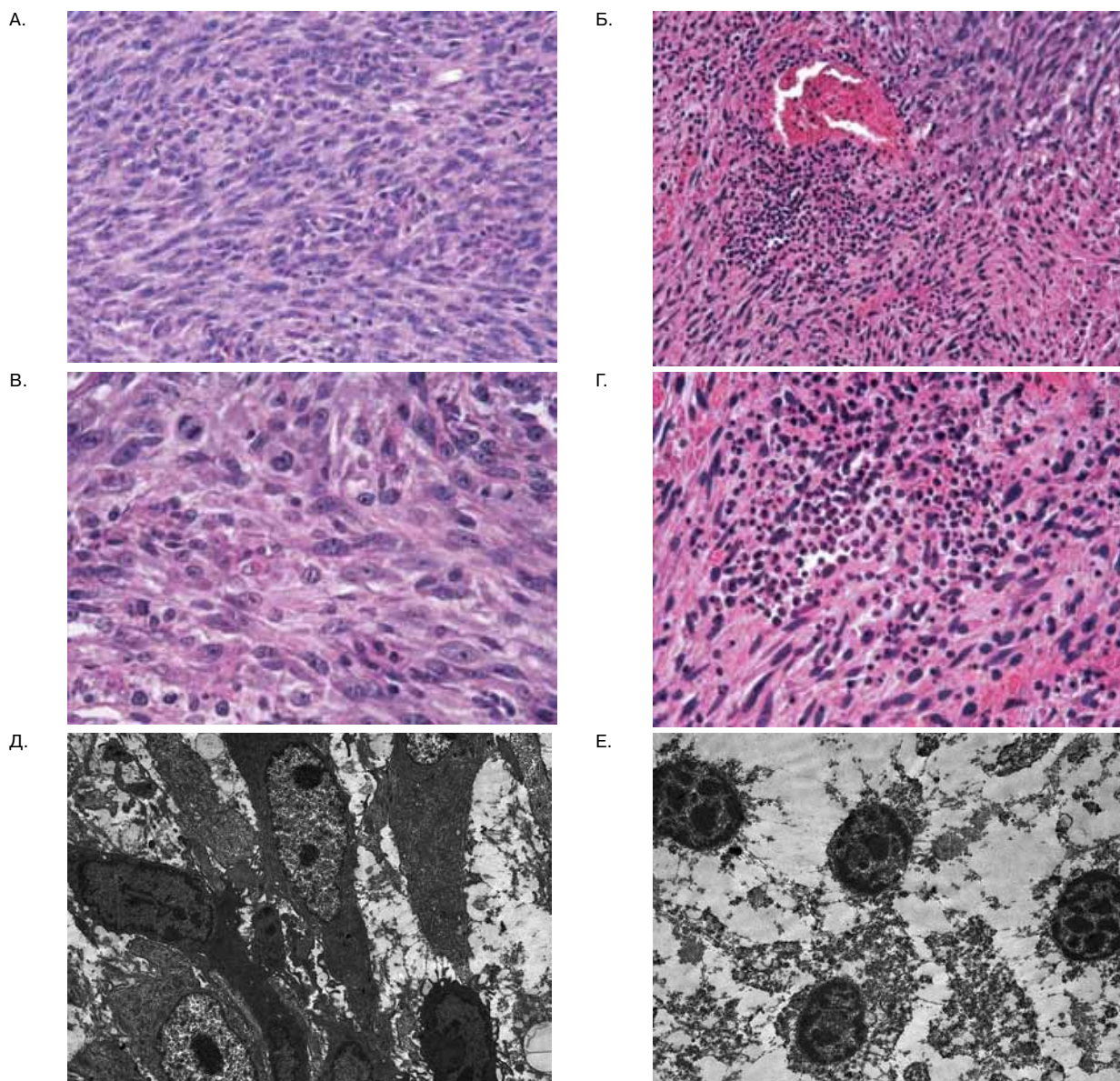


Рисунок 5. Морфологические изменения, индуцированные вектором вируса гриппа А, экспрессирующим GFP (HA-DS-GFP) в ткани глиомы *in vivo* через 48 часов после однократного интратуморального введения HA-DS-GFP. Световая микроскопия контрольных (А – увеличение x200; В- увеличение x400) и исследуемых (Б – увеличение x200; Г- увеличение x400) образцов. Электронная микроскопия контрольных (Д- увеличение x2000) и исследуемых (Е- увеличение x2000) образцов.

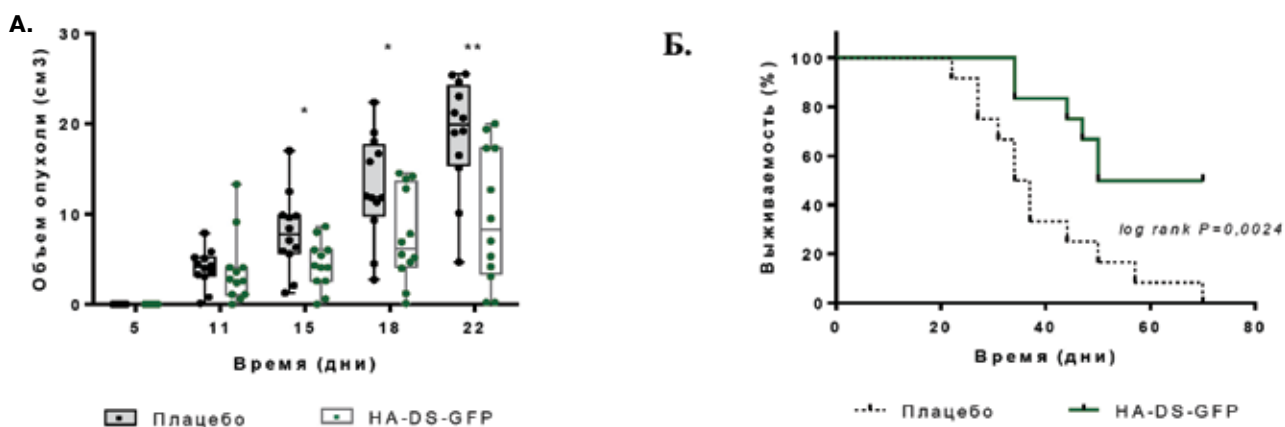


Рисунок 6. Протективный эффект вектора вируса гриппа, экспрессирующего GFP (HA-DS-GFP) на модели глиомы у крыс. Объем опухоли (А). Данные представлены в виде «ящичковых» диаграмм. Границы «ящика» соответствуют нижней и верхней квартили, горизонтальная линия – медиана, «усы» отображают минимальное и максимальное значения выборки, точками обозначены индивидуальные размеры опухолей (см³); * P < 0,05, ** P < 0,005 (множественный t-критерий). Выживаемость (Б). Данные представлены за период наблюдения 70 дней. P=0,0024 (лог-ранговый критерий Мантеля-Кокса). Различия статистически достоверны при P < 0,05.

Вектор вируса гриппа, экспрессирующий GFP подавляет опухолевый рост глиомы и способствует повышению выживаемости животных

Противоопухолевую эффективность вектора вируса гриппа А, экспрессирующего GFP, оценивали на модели глиомы крыс. Половозрелым самкам крыс (24 шт.) в область левого бедра подкожно вводили клетки «Глиома-35» ($10^{5.5-10^6}$). На 5 день исследования, до появления пальпируемых опухолей, животные были рандомизированы в исследуемую (введение HA-DS-GFP в дозе $8,0 \lg \text{ТИД}_{50}/0,5 \text{ мл}$) и контрольную (SPGN – буфер $0,5 \text{ мл}$) группы. Терапию проводили по следующей схеме: день 5 – 2 инъекции интратуморально с интервалом в 3 часа и по 1 инъекции каждый третий день до 14 дня исследования включительно. Размеры опухолей оценивали в течение первых 20 дней (гибель первого животного), выживаемость оценивали в течение 70 дней (гибель последнего животного в контрольной группе).

В контрольной группе у всех животных наблюдалось быстро прогрессирующее развитие солидных опухолей, в то время как в исследуемой группе у двух животных (16,7%) был отмечен полный регресс опухолей на ранних стадиях развития, и еще у четырех животных (33,3 %) стабилизация размеров глиом в течение длительного времени (Рис. 6А). При этом медиана выживаемости в исследуемой группе составила 60,0, что почти в два раза превышало данный показатель в контрольной группе (35,5) при $P=0,0024$ (ранговая корреляция лог-ранговый критерий Манталя-Кокса) (Рис. 6Б).

В настоящей работе впервые продемонстрирован онколитический потенциал рекомбинантных векторов вируса гриппа в терапии злокачественной глиомы. На примере вектора вируса гриппа А, экспрессирующего GFP (HA-DS-GFP), наглядно показано, что вирус обладает инфекционной активностью по отношению к клеткам глиомы как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, данный вирус обладал выраженным терапевтическим действием на клетки опухоли, что обуславливало подавление, а в ряде случаев полный регресс опухолевого роста и значительно более высокую выживаемость в исследуемой группе, по сравнению с группой, получившей плацебо.

В качестве терапевтического агента был использован вирус гриппа в котором геномная последовательность белка NS1 была замещена последовательностью репортерного белка GFP. Ранее было показано, что NS1 мутанты вируса гриппа не способны подавлять систему врожденного иммунитета и могут иметь онколитиче-

скую активность вследствие стимуляции локальной продукции провоспалительных цитокинов [6,10,22].

Для вирусов гриппа А и В показано, что NS1 делеционные мутанты способны к размножению только в культуре клеток Vero, а также в культурах опухолевых клеток, дефектных по выработке интерферонов I типа, или не имеющих активной протеинкиназы R [5,15]. Введение подобных вирусов животным и людям приводит к abortивной инфекции, апоптозу зараженных клеток и быстрому освобождению организма от введенного вируса [31]. При этом зараженные клетки успевают синтезировать ранние вирусспецифические белки, в том числе белок NS1 или последовательность трансгенного белка, находящегося в его рамке считывания. Таким образом, за счет нарушения функции белка NS1 достигается эффект аттенуации вируса и его опухолевой селективности, а также иммуно-адьювантный эффект, необходимый для стимуляции подавленного противоопухолевого иммунитета. Кроме того, укорочение рамки считывания NS1 белка освобождает место для введения в геном чужеродных последовательностей, кодирующих опухолевые антигены или цитокины, что потенциально может усиливать противоопухолевый эффект вектора [27,32]. В данной работе, преследуя цель визуализации инфекции, в качестве трансгенного белка, был использован флюоресцирующий белок GFP, позволивший показать инфекционную активность вируса в клетках глиомы *in vitro* и *in vivo*. Следует также отметить, что применение рекомбинантного вектора вируса гриппа, экспрессирующего GFP не ограничивается использованием в качестве модельного вектора на этапе доклинических исследований, подобная технология в перспективе может быть адаптирована для визуализации остаточных опухолевых клеток в ходе оперативного вмешательства [12].

Таким образом, полученные нами данные, свидетельствуют о хороших перспективах применения гриппозных векторов в схемах противоопухолевой терапии, в частности, при комбинированном лечении злокачественных глиом головного мозга. Аттенуированные гриппозные векторы могут быть использованы для введения в полость после хирургического удаления опухоли для поражения остаточных опухолевых клеток и для стимуляции системы врожденного иммунитета в зоне оперативного вмешательства.

При невозможности хирургической операции, онколитический вектор может быть введен в зону опухолевого роста на фоне проводимой радио- или химиотерапии для потенцирования их действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. CBTRUS. Statistical report: Primary Brain Tumors in the United States, 1998. – 2002. – 2005 – P. 202.-224.
2. Adams H., Chaichana K. L., Avendano J. et al. Adult cerebellar glioblastoma: understanding survival and prognostic factors using a population-based database from 1973 to 2009 // *World Neurosurg.* – 2013. – Vol. 80 (6). – P. 237-243.
3. Agarwalla P.K., Barnard Z.R., Curry W.T. Jr. Virally mediated immunotherapy for brain tumors // *Neurosurg. Clin. N. Amer.* – 2010. – Vol. 21. – P. 167-179.
4. Barzon L., Pacenti M., Franchin E. et al. HSV-TK/IL-2 gene therapy for glioblastoma multiforme // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 4. – P. 529–549.
5. Bergmann M., Garcia-Sastre A., Carnero E. et al. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74. – P. 6203–6206.
6. Bergmann M., Romirer I., Sachet M. et al. A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 8188–8193.
7. Chargari C., Moncharmont C., Levy A. et al. Cancer stem cells, cornerstone of radioresistance and perspectives for radiosensitization: glioblastoma as an example // *Bull. Cancer.* – 2012. – Vol. 99 (12) – P. 1153-1160.
8. Colombo F., Barzon L., Franchin E., Pacenti M. et al. Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results // *Cancer Gene Ther.* – 2005. – Vol. 12. – P. 835–848.
9. Dey M., Auffinger B., Lesniak M. S. et al. Antiglioma oncolytic virotherapy: unattainable goal or a success story in the making? // *Future virology* 2013. – Vol. 8. – P. 675-693.
10. Efferson C.L., Tsuda N., Kawano K. et al. Prostate tumor cells infected with a recombinant influenza virus expressing a truncated NS1 protein activate cytolytic CD8+ cells to recognize noninfected tumor cells // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80. –P. 383–394.
11. Ferko B., Stasakova J., Sereinig S. et al. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice // *Ibid.* – 2001. – Vol. 75. –P. 8899–8908.
12. Fujiwara T. In vivo imaging of human cancer with telomerase-specific replication-selective adenovirus // *Methods in molecular biology.* – 2012. – Vol. 872. – P. 129-139.
13. García-Sastre A., Percy N., Barclay W., Palese P. Introduction of foreign sequences into the genome of influenza A virus // *Dev. Biol. Stand.* – 1994. – Vol. 82. – P. 237–246.
14. García-Sastre A., Egorov A., Matassov D., Brandt S. et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems // *Virology.* – 1998. – Vol. 252. –P. 324–330.
15. Hatada E., Saito S., Fukuda R. Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells // *J. Virol.* – 1999. – Vol. 73. – P. 2425–2433.
16. Hoffmann E. and Webster R. G. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase IItranscription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids // *J Gen Virol.* – 2000. – Vol. 81 (Pt 12) . – P. 2843-2847.
17. Huang P.I., Chang J.F., Kirn D.H., Liu T.C. Targeted genetic and viral therapy for advanced head and neck cancers // *Drug Discov. Today.* – 2009. – Vol. (11-12). – P. 570–578.
18. Kittel C., Ferko B., Kurz M. et al. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79. – P. 10672 –10677.
19. Kuznetsova I., Shurygina A.-P., Wolf B. et al. Adaptive mutation in nuclear export protein allows stable transgene expression in a chimaeric influenza A virus vector // *J. Gen. Virol.* – 2005. – Vol. 95 (Pt 2). – P. 337-349.
20. Kyritsis A.P., Sioka C., Rao J.S. Viruses, gene therapy and stem cells for the treatment of human glioma // *Cancer Gene Ther.* – 2009. – Vol. 16. – P. 741 –752.
21. Mineta T., Rabkin S. D., Yazaki T. et al. Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas // *Nat. Med.* – 1995. – Vol. 1 (9). – P. 938-943.
22. Muster T., Rajtarova J., Sachet M., Unger H. et al. Interferon resistance promotes oncolysis by influenza virus NS1-deletion mutants // *Int. J. Cancer.* – 2004. – Vol. 110 (1) – P. 15-21.
23. Nabors, L. B., M. Ammirati, Bierman, P. J. et al. Central nervous system cancers // *J Natl Compr. Canc. Netw.* – 2013. – Vol. 11 (9) . – P. 1114-1151.
24. Ning J. and Wakimoto H. Oncolytic herpes simplex virus-based strategies: toward a breakthrough in glioblastoma therapy // *Frontiers in microbiology.* – 2014. – Vol. 5. – P. 303.
25. Palù G., Cavaggioni A., Calvi P. et al. Gene therapy of glioblastoma multiforme via combined expression of suicide and cytokine genes: a pilot study in humans // *Gene Ther.* – 1999. – Vol. 6. – P. 330 –337.
26. Pleschka, S., R. Jaskunas, Engelhardt O.G. et al. A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus // *J Virol.* – 1996. – Vol. 70 (6) . – P. 4188-4192.
27. van Rikxoort M., Michaelis M., Wolschek M. et al. Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame // *PloS one.* – 2012. – Vol. 7 . –P.e. 36506.
28. Sereinig S., Stukova M., Zabolotnyh N. et al. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – Vol. 13. – P. 898 –904.
29. Tobias A. L., Thaci B., Auffinger B., et al. The timing of neural stem cell-based virotherapy is critical for optimal therapeutic efficacy when applied with radiation and chemotherapy for the treatment of glioblastoma // *Stem Cells Transl. Med.* – 2006. – Vol. 2 (9). – P. 655-666.
30. Shi J., Zheng D. An update on gene therapy in China // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 2009. – Vol. 11. – P. 547 –553.
31. Wacheck V., A. Egorov. Groiss F. et al. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1 // *J. Infect. Dis.* – 2010. –Vol. 201(3). – P. 354-362.
32. Weiss R., Sachet M., Zinngrebe J. et al. IL-24 sensitizes tumor cells to TLR3-mediated apoptosis // *Cell death and differentiation.* – 2013. – Vol. 20 . – P. -833.

33. Yoo G.H., Moon J., Leblanc M., Lonardo F. A phase 2 trial of surgery with perioperative INGN 201 (Ad5CMV-p53) gene therapy followed by chemoradiotherapy for advanced, resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, hypopharynx, and larynx: report of the Southwest Oncology Group // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg . – 2009. – Vol. 135. – P. 869-874.

Поступила в редакцию 15.01. 2015 г.

*A.-P.S.Shurygina¹, A.V.Kartashev², E.G.Kovanko²,
L.N.Kiseleva², Yu.I.Pustovalov², A.V.Slita¹,
V.V.Zarubaev¹, S.V.Belyaevskaya¹, A.K.Sirotkin¹,
O.I.Kiselev¹, A.Yu.Egorov¹*

Oncolytic potential of recombinant influenza A virus vectors on a model of malignant glioma *in vivo*

¹Research Institute of Influenza

²Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies
St. Petersburg, Russia

Malignant glioma is the most frequently occurring primary brain tumor. Despite significant progress in the diagnostics and treatment of neoplastic diseases the prognosis for patients with III-IV grade gliomas, remains extremely unfavorable. Rapidly developing area in oncology is the employment of therapeutic viruses with natural or genetically engineered oncolytic activity. In the present study we demonstrated the oncolytic potential of a recombinant influenza A virus vector with impaired interferon antagonism function of NS1 protein in treatment of malignant glioma. Recombinant influenza A virus (HA-DS-GFP) expressing green fluorescent protein from the NS1 open reading frame was used as a model vector. HA-DS-GFP virus has shown infectivity towards glioma cells both in vitro, and in vivo (experimental glioma model in rats). Intratumoral inoculation of HA-DS-GFP resulted in a substantial inhibition or complete regression of tumor growth. Our data demonstrate that recombinant influenza vectors have promising potential in therapy of malignant gliomas.

Keywords: malignant glioma, recombinant influenza A virus, protein NS1