

Ткачёва Анастасия Викторовна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Конструирование и изучение свойств онколитических ортопоксвирусов, экспрессирующих гены репортерных, иммуностимулирующих и апоптоз-индуцирующих белков

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.03 Молекулярная биология

Новосибирск – 2018

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В настоящее время проблема профилактики и терапии онкологических заболеваний является одной из наиболее актуальных биомедицинских проблем во всем мире. Несмотря на внушительный арсенал противоопухолевых препаратов и методов терапии, продолжительность жизни пациентов увеличивается незначительно, и главной причиной смертности остается метастатический рост опухолей.

Конструирование рекомбинантных вирусов с целью создания на их основе противоопухолевых препаратов является перспективным направлением биотехнологии.

В настоящее время наряду с другими вирусными семействами значительное внимание уделяется использованию потенциальных возможностей вирусов семейства *Poxviridae* в борьбе с онкологическими заболеваниями. Это объясняется природной онкоселективностью этих вирусов, хорошей изученностью генома, возможностью его генно-инженерной модификации, широким спектром чувствительных клеток, автономной цитоплазматической репликацией, низкой скоростью спонтанного мутирования.

Работы по созданию онколитических вирусов ведутся с несколькими представителями семейства *Poxviridae*, но мы работаем с вирусом осповакцины (*vaccinia virus*, VACV), который имеет длительную и очень успешную историю медицинского применения в качестве вакцины против натуральной оспы. Из этой же истории известно, что в ряде случаев, по-видимому, связанных с теми или иными иммунодефицитами, VACV вызывает осложнения при прививках. Все наши исследования мы проводили с использованием российского штамма Л-ИВП, который широко применялся для вакцинации населения против натуральной оспы и обладает высокой природной онкоселективностью [Zonov et al., 2016]. Для того чтобы снизить существующий риск развития осложнений при использовании данного штамма для противоопухолевой терапии необходимо использовать аттенуированные (ослабленные) варианты вируса. Аттенуация может достигаться удалением одного или нескольких генов факторов вирулентности VACV (к примеру, гена вирусного ростового фактора (VGF) или тимидинкиназы (ТК)).

Также в качестве безопасного вектора для создания онколитических препаратов может быть использован штамм вируса осповакцины MVA (*modified vaccinia virus Ankara*), полученный германскими учеными и используемый в качестве безопасной противооспенной вакцины. Его получили из штамма CVA (*Chorioallantois Vaccine Ankara*) после прохождения 570-ти пассажей CVA на первичных фибробластах куриных эмбрионов [Verheust et al., 2012]. Геномные исследования показали, что, вследствие пассажей, вирус потерял около 15% своего генома по сравнению с родительским

штаммом CVA, а также способность реплицироваться в нормальных клетках млекопитающих. Однако малигнизация клеток млекопитающих, включая клетки человека, способствует повышению их чувствительности к MVA.

Для усиления противоопухолевых свойств аттенуированных вариантов VACV используют способность вируса нести большое количество трансгенов.

В настоящее время известно значительное число трансгенов, которые показали свою эффективность при экспрессии в VACV. Это гены цитокинов и других иммуномодуляторов и иммуностимуляторов [Кочнева и др., 2012; Thorne et al., 2007; Kim et al., 2006; Kirn et al., 2007]; ингибиторов ангиогенеза [Guse et al., 2010; Tysome et al., 2010]; ферментов, превращающих внутри опухоли нетоксичные предшественники в их цитотоксические производные [Chalikonda et al., 2008; McCart et al., 2000].

В данной работе использовались следующие варианты трансгенов:

- 1) Онкотоксический белок NS1 (первый неструктурный белок парвовируса H-1). NS1 является главным фактором, ответственным за онколитическую и цитотоксическую активность парвовирусов. Белок NS1 способен вызвать гибель клеток различными способами. Этот белок может взаимодействовать с различными клеточными белками, нарушая основные процессы жизнедеятельности клеток; может нарушать процессы репликации и транскрипции, связываясь в ядре с белками, которые регулируют эти процессы. В цитоплазме данный белок вызывает деполяризацию мембраны митохондрий, что приводит к высвобождению активных форм кислорода, способствует реорганизации и разрушению белков цитоскелета (тропомиозина, актина и виментина).
- 2) Зелёный флуоресцентный белок GFP2. Встройка белков такого типа позволяет проводить диагностику локализации опухоли, а также вести мониторинг эффективности терапии в реальном времени.
- 3) Онкотоксический белок лактаптин. Является фрагментом каппа-казеина молока человека (23-134 а.о.) и специфически индуцирует гибель клеток рака молочной железы человека *in vitro* и *in vivo* [Koval et al., 2014].
- 4) Ген цитокина ГМ-КСФ. Адьювантные свойства ГМ-КСФ хорошо известны и широко используются при создании различных протективных и терапевтических вакцин. ГМ-КСФ эффективно стимулирует противоопухолевый иммунный ответ в комбинации с клеточными, вирусными и ДНК-вакцинными препаратами. Показано, что ГМ-КСФ усиливает индукцию первичного иммунного ответа за счет активации и рекрутирования (chemo-attraction) антиген-презентирующих клеток.

Цель исследования:

Конструирование рекомбинантных вариантов аттенуированных штаммов VACV, несущих трансгены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков и изучение их онколитических свойств с целью создания терапевтических противоопухолевых вакцин.

Задачи исследования:

1) Выбор аттенуированного штамма VACV: конструирование и сравнение противоопухолевого эффекта рекомбинантных вариантов репликативно-компетентного штамма Л-ИВП и репликативно-некомпетентного штамма MVA, имеющих одинаковую вставку трансгена онкотоксического белка NS1 парвовируса H-1;

2) Оценка безопасности и онкоселективности аттенуированного штамма Л-ИВП VACV: конструирование рекомбинантного штамма VACV, несущего делеции двух генов вирулентности и вставку репортерного трансгена GFP2 (VVdGF-GFP2), анализ диссеминации VVdGF-GFP2 в органы *nude* мышей и динамики его накопления в опухоли и модельном метастазе на основе ксенографтов эпидермоидной карциномы A431;

3) Конструирование двойного рекомбинантного штамма Л-ИВП с удалением генов вирулентности и вставкой трансгенов противоопухолевого белка лактапина и ГМ-КСФ, оценка его противоопухолевых свойств *in vitro* и *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Этап 1.

Рекомбинантные варианты штаммов Л-ИВП и MVA со вставкой трансгена NS1 получали методом временной доминантной селекции с использованием в качестве маркера гена устойчивости к пуромицину [Kochneva et al., 2013]. Структура рекомбинантных вариантов представлена на рис. 1А. Рекомбинантный вариант VV-NS1-dGF содержит вставку трансгена NS1 в районе делеции гена VGF штамма Л-ИВП (рис. 1Б, дорожка 4, фрагмент 2456 п.н.). Рекомбинантный вариант MVA-NS1 несет вставку трансгена NS1 в районе делеции II (рис. 1В, дорожка 2, фрагмент 2600 п.н.). Структура районов вставки обоих рекомбинантных вариантов была подтверждена секвенированием. Экспрессию трансгена NS1 в составе рекомбинантов анализировали методом Вестерн-блот с использованием коммерческих антител на эпитоп FLAG, введенный в С-конец рекомбинантного белка. Результаты эксперимента представлены на рис. 1С, из которого следует, что в лизатах клеток, инфицированных рекомбинантными вариантами VV-NS1-dGF и MVA-NS1 выявляется белок с молекулярной массой 100 кДа,

который позитивно реагирует с антителами к эпитопу FLAG. Размер транскрипта, включающего последовательность гена NS1 и эпитопа FLAG, составляет 2163 п.н. Расчетная молекулярная масса полипептида составляет 75-80 кДа. По данным литературы в инфицированных парвовирусом Н-1 клетках регистрируется две формы белка NS1 – с молекулярной массой 84 кДа и 100 кДа [Rhode et al., 1989]. Увеличение молекулярного веса обуславливается разной степенью фосфорилирования белка. Таким образом, сконструированные нами рекомбинантные штаммы VACV экспрессируют белок NS1 в форме, наиболее близкой к его природной полноразмерной модификации.

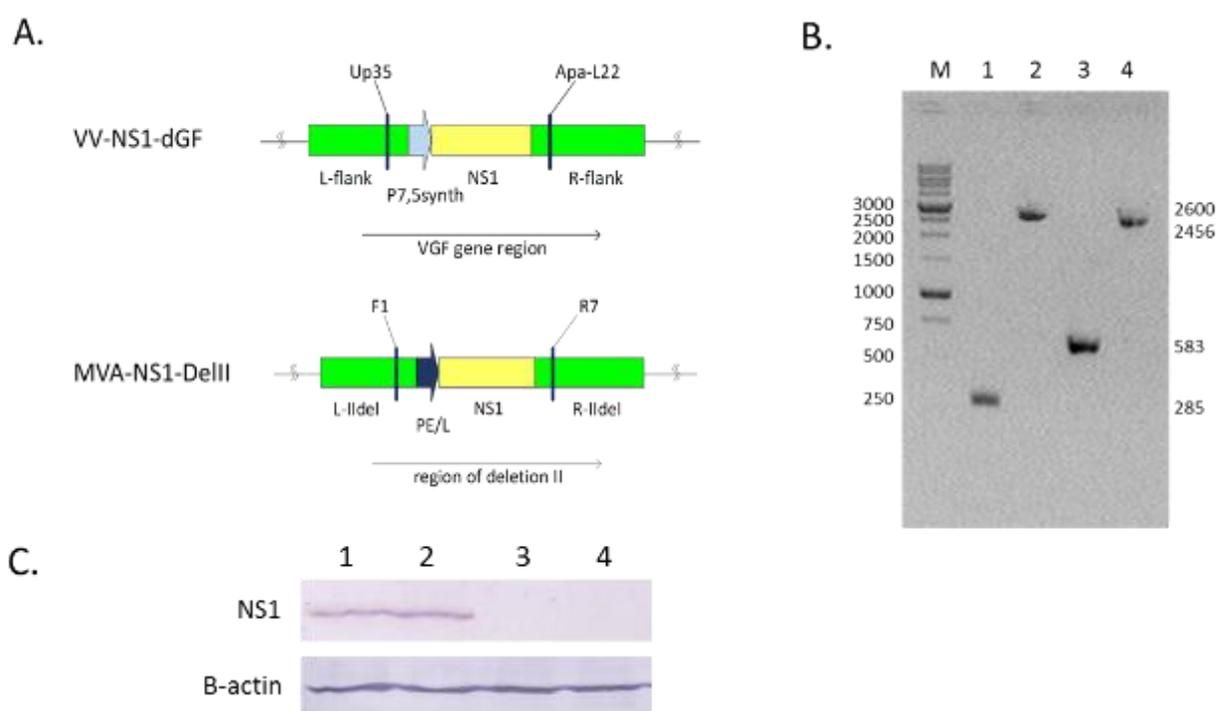


Рис. 1: Конструирование рекомбинантных вариантов ВОВ и анализ рекомбинантов.

А – Структуры рекомбинантных вариантов VV-NS1-dGF и MVA-NS1 с указанием позиций праймеров, использованных в ПЦР-анализе рекомбинантных вирусных ДНК.

В – ПЦР-анализ рекомбинантных вариантов с использованием пар праймеров F1–R7 (дорожки 1, 2) и Up35–ApaL22 (дорожки 3,4). М – маркер молекулярного веса, 1 - исходный штамм MVA - 285 п.н., 2 – рекомбинант MVA-NS1 - 2600 п.н., 3 - ДНК исходного штамма Л-ИВП - 583 п.н., 4 – рекомбинант VV-NS1-dGF – 2456 п.н.

С – Вестерн-блот анализ с использованием коммерческих антител на эпитоп FLAG, введенный в С-конец рекомбинантного белка NS1, а также с антителами к структурному белку β -actin в качестве контроля. 1 – 4 – лизаты клеток, инфицированные: 1 – VV-NS1-dGF., 2 – MVA-NS1., 3 – ЛИВП., 4 – MVA.

При исследовании цитолитической активности *in vitro* вируса MVA-NS1 в сравнении с диким типом вируса MVA на панели опухолевых клеток человека разного тканевого и органного происхождения было показано, что рекомбинантный вариант вируса MVA со встройкой гена белка NS1 имеет достоверно (на уровне значимости 95%) большую

цитотоксическую активность для клеток глиобластомы человека U87MG по сравнению с исходным родительским штаммом (рис.2).

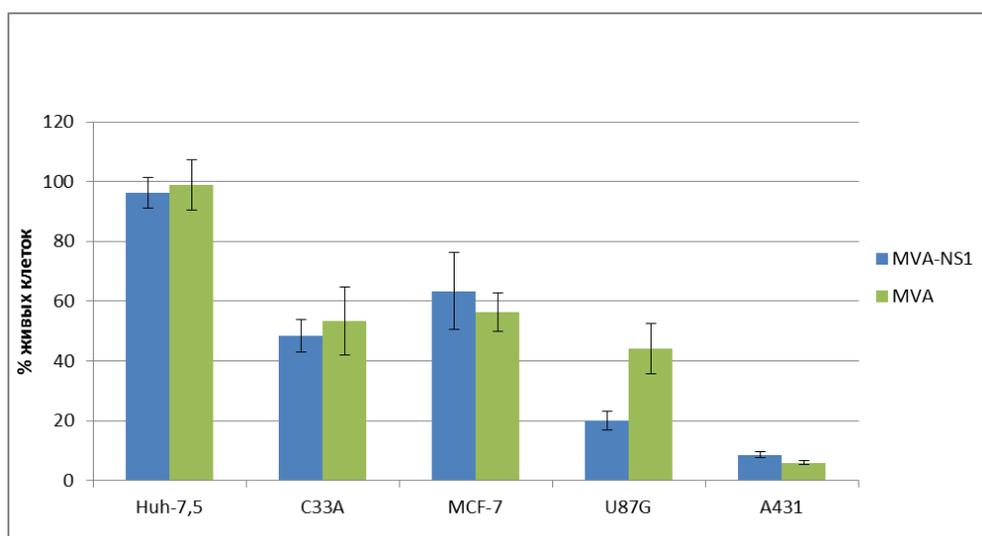


Рис. 2. Цитолитическая активность рекомбинантного варианта MVA-NS1 и исходного штамма MVA в опухолевых клетках человека различного генеза при множественности инфекции 1 MOI.

Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что парвовирус крыс Н-1 высокочувствителен к клеткам опухолей мозга человека и показал высокую эффективность против глиобластомы, причем характерна была полная ремиссия и уничтожение опухоли в доклинических испытаниях, при этом нормальные клетки мозга не повреждались [Geletneky et al., 2012]. На основе парвовируса крыс Н-1 создан препарат ParvOrux, который в настоящее время успешно проходит клинические испытания в группе пациентов с мультиформной рецидивирующей глиобластомой [Geletneky et al., 2012; Rommelaere et al., 2010]. Показано, что главным фактором, ответственным за онколитическую активность парвовирусов, является белок NS1 [Geletneky et al., 2017], поэтому мы в своей работе и решили объединить онколитический потенциал парвовируса Н-1 и аттенуированных штаммов VACV в отношении глиом.

Сравнительный анализ онколитических свойств *in vitro* штаммов MVA-NS1 и VV-NS1-dGF проводили на наиболее чувствительной к штамму MVA-NS1 культуре клеток глиобластомы человека U87MG (рис. 3). В качестве группы сравнения для оценки активности штамма VV-NS1-dGF использовали аналогичным образом аттенуированный рекомбинант VVdGF2/6 с делецией гена VGF, но не содержащий вставку трансгена NS1 [Kochneva et al., 2013]. Рекомбинантный штамм VVdGF2/6 является более адекватным контролем для оценки онколитической активности рекомбинанта VV-NS1-dGF, чем родительский неаттенуированный штамм Л-ИВП. Как следует из рис. 3А, вставка трансгена NS1 значительно усиливает цитотоксическую активность вируса в отношении

клеток глиобластомы ($P < 0,05$). ЦТД₅₀ рекомбинантных штаммов VV-NS1-dGF и VVdGF2/6 составляет 0,082 и 0,3 БОЕ/клетку, соответственно. Аналогичный эффект наблюдается для рекомбинантного штамма MVA-NS1 (рис. 3Б).

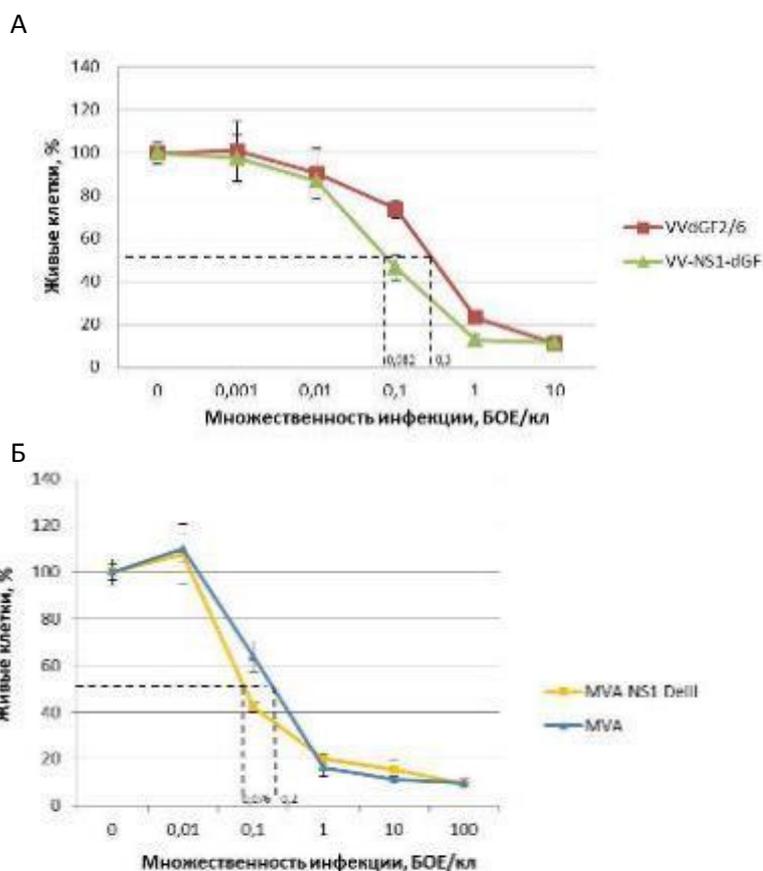


Рис. 3: Сравнительный анализ цитотоксического эффекта рекомбинантных вариантов штамма Л-ИВП VACV (VV-NS1-dGF и VVdGF2/6) и MVA (MVA-NS1 и исходный MVA) на культуре опухолевых клеток U87MG. Выращенный в 96-луночных планшетах 50%-ный монослой клеток инфицировали вирусом с множественностью 0.001–10 БОЕ/клетка для вариантов штамма Л-ИВП, и 0,01 – 100 БОЕ/клетка для вариантов штамма MVA (ось абсцисс), инкубировали в течение 48 ч и определяли процент выживших клеток в ХТТ-тесте (ось ординат) по сравнению с контролем (неинфицированные клетки).

Из данных, представленных на рис. 2, следует, что значения ЦТД₅₀ как для исходного штамма MVA (0,2 БОЕ/клетка), так и для его рекомбинантного варианта MVA-NS1 (0,076 БОЕ/клетка), хотя и значительно отличаются между собой ($P < 0,05$), не отличаются от аналогичных значений вариантов литического штамма Л-ИВП VVdGF2/6 (0,3 БОЕ/клетка) и VV-NS1-dGF (0,082 БОЕ/клетка). Это свидетельствует о высокой чувствительности клеток глиобластомы U87MG к литическому действию VACV со встройкой гена NS1 парвовируса крыс независимо от уровня аттенуации исходного штамма вируса. Однако в экспериментах *in vivo*, где U87MG клетки представлены не в виде хорошо доступного для вируса монослоя, а в виде опухолеподобных ксенографтов с

многослойной плотной массой клеток, были выявлены отличия между штаммами MVA-NS1 и VV-NS1-dGF.

Как видно из графика, приведенного на рис. 4, однократное введение в район опухоли рекомбинантного штамма MVA-NS1 (10^7 БОЕ/мышь) приводит к полному торможению роста ксенографтов. Введение же штамма VV-NS1-dGF в той же самой дозе (10^7 БОЕ/мышь) приводит не только к торможению роста, но и к значимому уменьшению размеров ксенографтов.

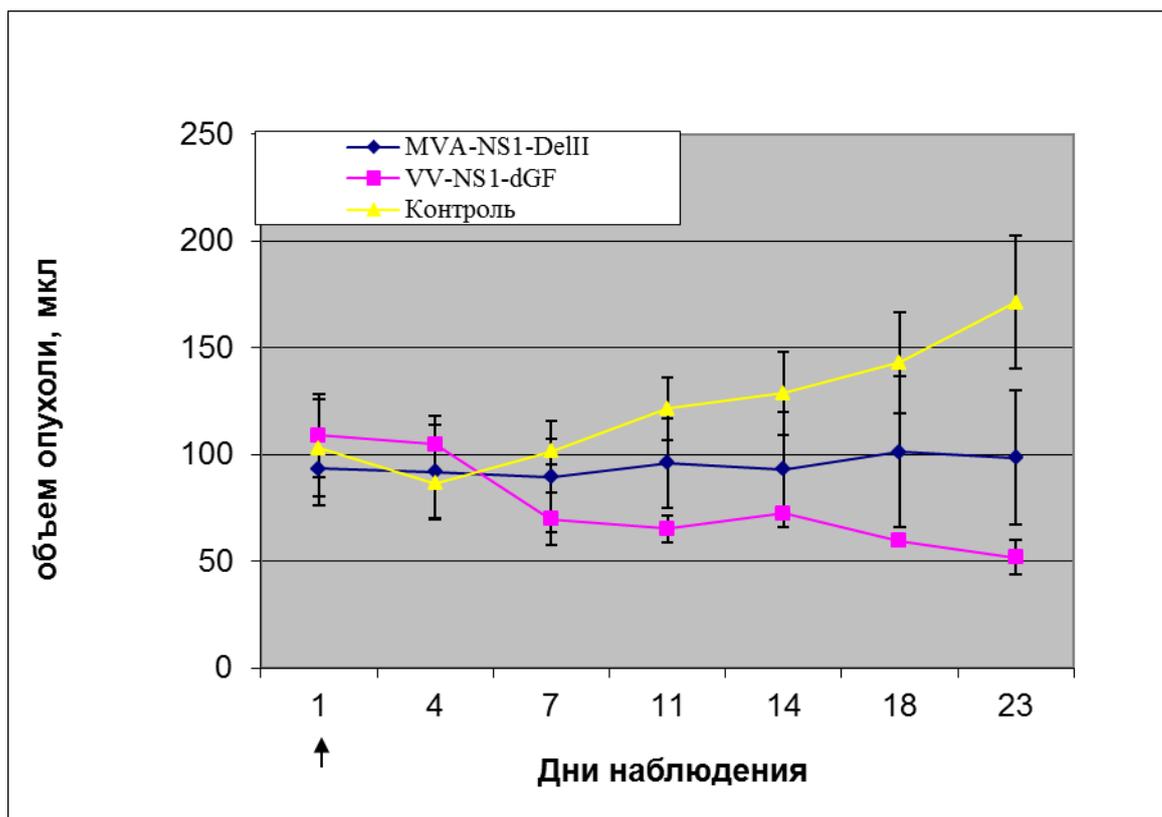


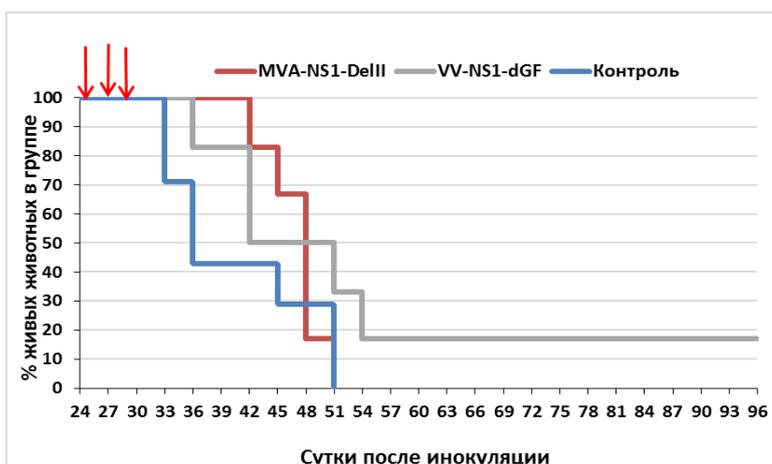
Рис. 4. Ингибирование роста подкожных ксенографтов глиобластомы человека U87MG, привитых мышам линии Nu/Nu, рекомбинантными штаммами VV-NS1-dGF и MVA-NS1. Стрелкой указана точка введения вируса и начала измерения (1 сутки). Дни наблюдения на оси абсцисс указывают период, прошедший после начала «лечения» (введение вируса). Различия между всеми группами достоверны на 23 сутки эксперимента на уровне значимости $P < 0,05$.

Максимальный титр штамма VV-NS1-dGF составляет 10^8 БОЕ/мл 10%-ного гомогената опухоли и отмечается в ксенографтах через 15 сут после введения вируса, тогда как максимальный титр штамма MVA-NS1 на порядок меньше – 10^7 БОЕ/мл 10%-ного гомогената опухоли и отмечается лишь через 24 сут. Введение штамма VV-NS1-dGF приводит к полной деструкции ткани ксенографта к 15 сут после введения, штамм MVA-NS1 разрушает не более 50% ткани опухолей к этому периоду времени. Случаев полной деструкции ксенографтов глиобластомы после введения штамма MVA-NS1 не отмечено

вплоть до окончания эксперимента (23 сут после введения вируса), не возрастала и доля разрушенной ткани.

Сравнительная противоопухолевая активность штаммов MVA-NS1 и VV-NS1-dGF была также проведена на модели ортотопической ксенотрансплантации клеток U87MG мышам линии SCID [Zavjalov et al., 2016]. Эта модель более приближена к клинической картине заболевания, чем подкожные ксенотрансплантаты клеток U87MG, описанные выше. Для лечения мышей линии SCID с установившимися внутримозговыми ксенографтами глиобластомы человека U87MG мы использовали системное введение рекомбинантных вирусов. Такой путь введения препаратов наиболее предпочтителен при опухолях головного мозга, поскольку в большинстве случаев при этой патологии прямое внутриопухолевое введение невозможно. Инфицирование проводили трехкратно с интервалом 3 дня, начиная с 24 суток после инокуляции клеток. В эксперимент были отобраны животные с детектируемыми опухолями объемом 5 мкл и более. Наличие опухолей и их размер контролировали МРТ. Результаты представлены на рис. 5.

А



Б

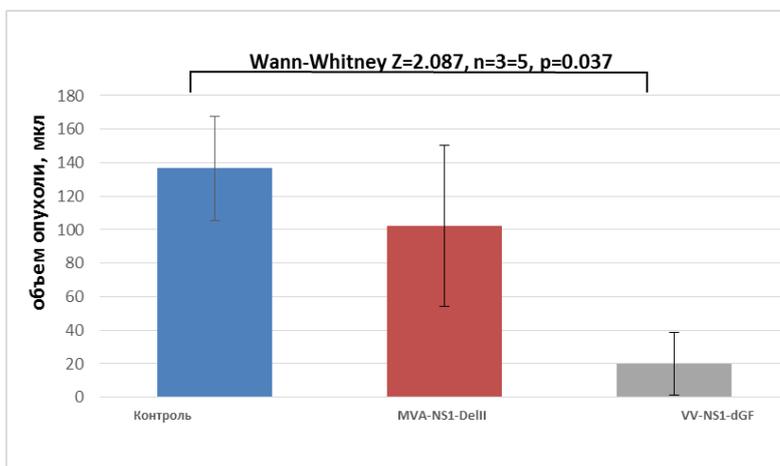


Рис. 5. Эффект системного введения рекомбинантных штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1 на выживаемость (А) и ингибирование роста внутримозговых ксенографтов глиобластомы человека U87MG (Б), привитых мышам линии SCID. А: Стрелкой указаны дни введения вируса в дозе 10^7 БОЕ. Точка начала эксперимента (1 день) – день интрацеребральной прививки суспензии клеток U87MG. Мышам контрольной группы вводили 0,9% NaCl. Б: Объем опухолей в группах мышей, измеренный методом МРТ, 36 сутки эксперимента.

Как следует из рис. 5А, время жизни мышей, леченных штаммом MVA-NS1, не увеличивается по сравнению с контролем. Мыши этих обеих групп погибают к 51 дню эксперимента. В то же время в группе мышей, леченных штаммом VV-NS1-dGF, 33% животных оставались живы на 51 сутки. МРТ головного мозга этих мышей показало практически полное торможение роста опухоли к этому времени. Одно животное из этой группы прожило более 90 суток и было выведено из эксперимента эвтаназией на 96 сутки после его начала. При измерении объемов опухолей мозга у мышей, выживших через 36 суток после инокуляции клеток U87MG, когда в контрольной группе гибель составила более 50%, было показано, что объем глиобластом у мышей, леченных штаммом VV-NS1-dGF, значительно отличается от контроля ($P=0,037$). Лечение глиобластомы штаммом MVA-NS1 не приводило к значимому эффекту, хотя положительная тенденция по уменьшению объема опухоли и увеличению продолжительности жизни мышей на временном отрезке после трехкратного введения вируса и до гибели животных (36-51 дни) в группе «MVA-NS1» по сравнению с группой «контроль» наблюдается.

Из полученных на данном этапе данных следует, что рекомбинант VV-NS1-dGF, полученный на основе репликативно-компетентного штамма Л-ИВП VACV обладает значимо большей противоопухолевой активностью, поэтому создание противоопухолевых препаратов целесообразно проводить на основе литически активного (вирулентного) штамма Л-ИВП VACV. Полученный на данном этапе штамм VV-NS1-dGF может рассматриваться в качестве перспективного препарата для лечения опухолей мозга человека (заявка на патент № 2018124583 от 06.07.2018 г.).

Этап 2

На предыдущем этапе работы наряду с другими результатами было показано, что даже при внутриопухолевом введении рекомбинантные штаммы VACV попадают в небольшом количестве в кровь через 2 суток после введения, приобретая, таким образом, возможность системного распространения по организму и достижения отдалённых от места введения опухолей и метастазов. Второй этап работы мы посвятили более полному изучению диссеминации аттенуированного штамма Л-ИВП VACV осповакцины в органы

мышей линии Nu/Nu и динамики его накопления в опухоли и метастазах. Мыши линии Nu/Nu в данном случае моделируют статус иммунодефицитных раковых больных.

Для дополнительной аттенуации литически активного (вирулентного) штамма Л-ИВП мы ввели делецию ТК-гена, который также как ген VGF является фактором вирулентности VACV. Показано, что подавление ТК и VGF генов VACV приводит к практически полному отсутствию репликации вируса в неделящихся клетках, при этом эффективность разрушения раковых клеток такими двойными мутантами не отличается от исходного штамма [McCart et al., 2007]. Для визуализации селективного накопления вируса в опухоли и метастазах в район делеции ТК-гена был введен репортерный трансген зеленого флюоресцентного белка GFP2. Полученный рекомбинант обозначили VVdGF-GFP2.

В качестве модели опухоли и метастаза использовали два удаленных друг от друга ксенографта эпидермоидной карциномы человека A431, трансплантированных подкожно мышам линии Nu/Nu. При таком способе трансплантации карцинома A431 развивается только в месте прививки у мышей и при введении вируса в один ксенографт («опухоль»), второй можно рассматривать как «метастаз» и использовать для оценки адресности распространения и онколитической активности вируса. Вирус вводили однократно в один из ксенографтов, который моделировал опухоль.

Проведенные эксперименты показали (рис. б), что при внутриопухолевом периферическом введении VVdGF-GFP2 в первые же сутки выходит в кровь и инфицирует удаленный опухолевый узел (метастаз), а также селезенку и легкие. Вероятно, это происходит вследствие механического повреждения капсулы опухоли и прилежащих тканей. На 4-е сутки и далее на протяжении всего исследованного периода вирус в крови не регистрируется, что свидетельствует об отсутствии вторичной вирусемии.

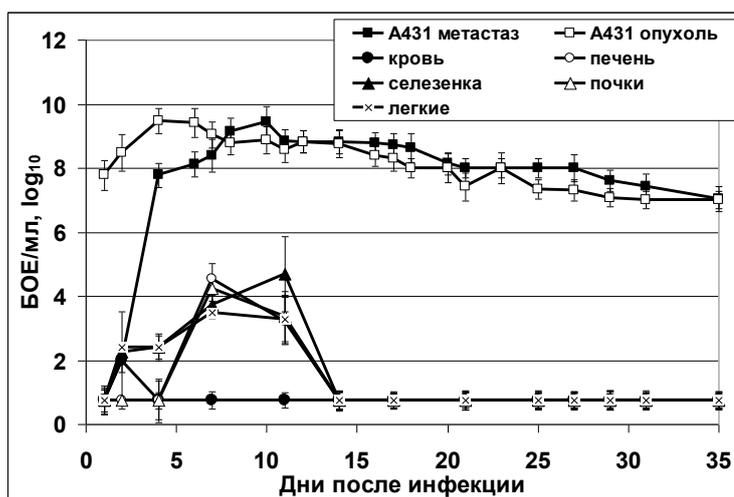


Рис. 6. Динамика накопления рекомбинантного штамма VVdGF-GFP2 в опухоли, метастазе, крови и органах мышей линии Nu/Nu при интратуморальном введении. Нижняя линия указывает предел чувствительности метода (около 10 БОЕ/мл). Стандартное отклонение рассчитывали для $P < 0,05$.

В этот же период вирус начинает регистрироваться в почках и печени, однако на 14-е сут после инфицирования VVdGF-GFP2 вирус выявляется только в опухоли и метастазе. Показано, что вирус не только находит отдаленный метастаз, но и эффективно реплицируется в нем до высоких концентраций (10^9 БОЕ/мл на 8-е сут), разрушая при этом клетки опухоли, как следует из данных микроскопического анализа. Вторичной вирусемии не наблюдается в течение всего периода исследования (35 дней), что, очевидно, связано с низким уровнем репликации аттенуированного штамма VVdGF-GFP2 и быстрым клиренсом вируса из органов мышей, а также его строгой внутриопухолевой локализацией (рис. 7).

Как следует из рис. 7 через 12 суток после инфицирования интенсивная флюоресценция наблюдается как в районе опухоли (рис. 7А), так и метастаза (рис. 7Б). На рис. 7А видно также небольшое свечение в районе легких мышей, что согласуется с данными рис. 6. Через 12 суток после инфицирования вирус регистрируется в легких в концентрации 10^3 БОЕ/мл 10%-ного гомогената органа, однако в дальнейшем накопления вируса не происходит, и через 15 суток он в легких не обнаруживается.

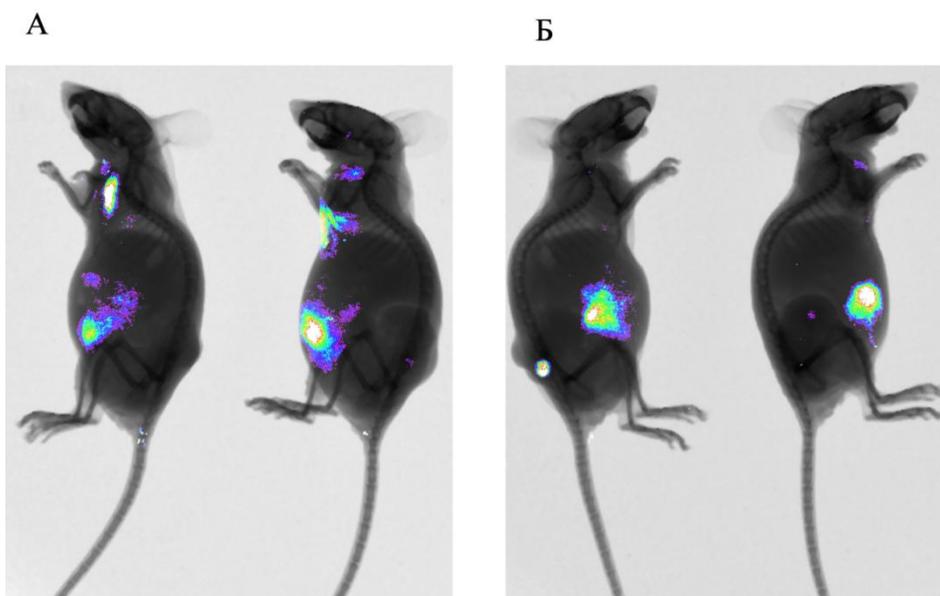


Рис. 7. УФО-изображения мышей, полученные с использованием In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Германия), через 12 суток после инфицирования. А – инфицированные вирусом VVdGF-GFP2 опухоли. Б – неинфицированные метастазы.

Под микроскопом «Axiovert» 40 CFL ZEISS с использованием люминесцентных светофильтров на срезах ксенографтов наблюдали свечение опухолевых клеток, при этом признаков репродукции вируса в клетках стромы ксенографтов не выявлено. Это также свидетельствует о селективной репликации вируса в опухолевых, но не нормальных клетках ксенографтов. Полная деструкция ткани опухоли регистрировалась через 12 сут, а метастаза – через 20 сут после инъекции VVdGF-GFP2. В обоих случаях деструкция сопровождалась выраженным отеком и лейкоцитарной инфильтрацией ксенографтов. Рекомбинантный вирус индуцировал значимое уменьшение размеров опухоли и метастаза; к окончанию эксперимента (35-е сут) размер ксенографтов контрольных мышей в 10 раз превышал аналогичный параметр леченных ($5\ 000\ \text{мм}^3$ против $500\ \text{мм}^3$). Таким образом, на примере рекомбинантного штамма VVdGF-GFP2 и двух модельных ксенографтов карциномы человека A431, привитых мышам линии Nu/Nu, мы показали, что аттенуированный штамм Л-ИВП VACV даже при однократном локальном введении не только способен адресно разрушать ткань первичного опухолевого узла, но также обладает отчетливым антиметастатическим действием, что подтверждает его высокую онколитическую активность.

Этап 3.

Поскольку литического потенциала штамма Л-ИВП VACV с двойной делецией генов тимидинкиназы и ростового фактора может быть недостаточно для искоренения крупных солидных опухолей и множественного метастазирования, необходимастройка

дополнительных трансгенов, усиливающих противоопухолевые свойства вируса. Наиболее перспективной, на наш взгляд, является встройка трансгенов онкотоксических белков, как это было показано на этапе 1 нашей работы на примере трансгена NS1 парвовируса Н-1. Из мирового опыта также известно, что встройка трансгенов цитокинов в геномы онколитических вирусов способствует усилению противоопухолевого иммунитета. Наиболее успешным в этом отношении является трансген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [Гражданцева и др., 2015].

На данном этапе работы целью было исследование онколитических свойств двойного рекомбинантного штамма Л-ИВП VACV, содержащего встройки трансгенов ГМ-КСФ и онкотоксического белка лактапина [Koval et al., 2014] в районе делеций вирусных генов ТК и VGF, соответственно. Встройку трансгенов в вирусный геном проводили последовательно. Сначала на основе штамма Л-ИВП нами был сконструирован рекомбинантный штамм VV-GMCSF-S1/3, содержащий встройку гена ГМ-КСФ человека в центральной части гена ТК с одновременной его инактивацией [Кочнева и др., 2015]. Трансген ГМ-КСФ в составе рекомбинанта экспрессируется под контролем природного промотора VACV p7.5K и продуцирует секретлируемую форму биологически активного ГМ-КСФ человека в клетках млекопитающих на уровне 1-40 мкг на мл культуральной среды [Гражданцева и др., 2015]. Штамм VV-GMCSF-S1/3 был использован далее в качестве реципиента для введения дополнительного трансгена лактапина в район делеции гена VGF. Лактапин является фрагментом каппа-казеина молока человека (23-134 а.о.), который специфически индуцирует гибель клеток рака молочной железы человека *in vitro* и *in vivo* [Koval et al., 2014].

Для корректного сравнительного изучения противоопухолевых свойств рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact со встройкой лактапина необходимо было сконструировать рекомбинантный вариант вируса VV-GMCSF-dGF, который, также как и рекомбинант с лактапином, содержал встройку трансгена ГМ-КСФ в районе делеции гена ТК вируса, но имел дополнительно делецию гена VGF без встройки трансгена лактапина (рис. 8А). Структура обоих рекомбинантных штаммов была подтверждена методами ПЦР (рис. 8Б) и секвенирования.

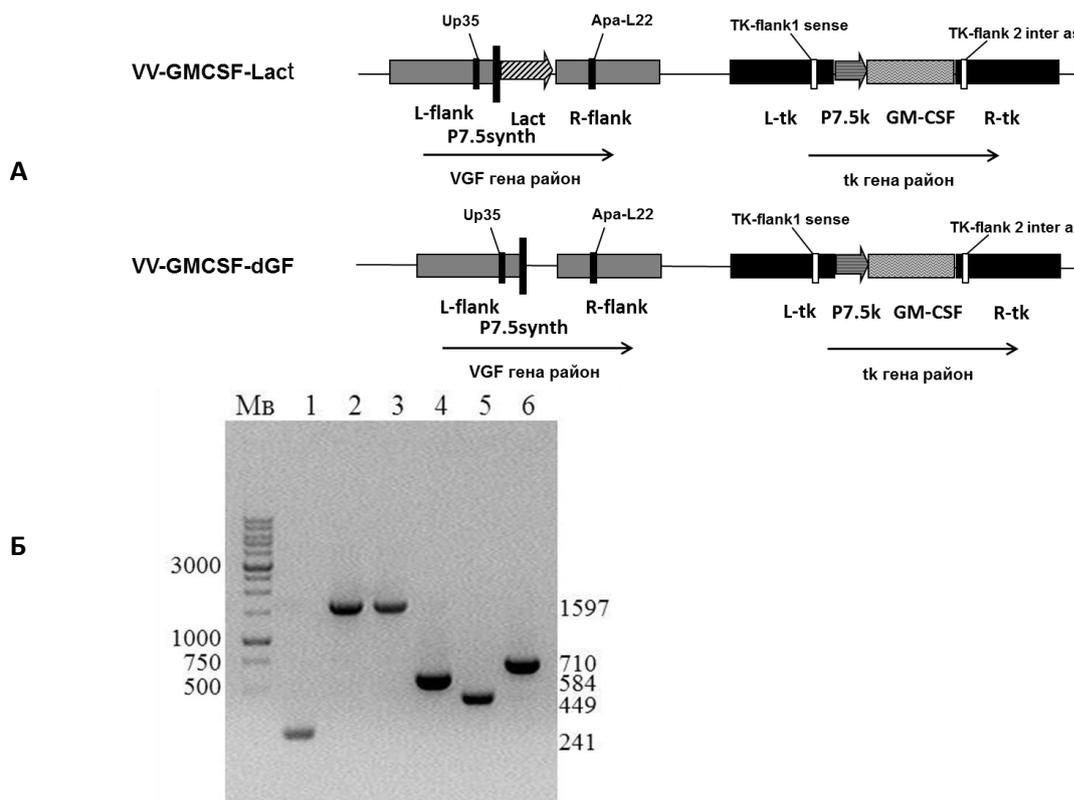


Рис. 8. Конструирование рекомбинантных вариантов ВОВ и анализ рекомбинантов. А. – структуры рекомбинантных вариантов VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF (контрольный вариант) с указанием позиций праймеров, использованных в ПЦР-анализе рекомбинантных вирусных ДНК. Б. – ПЦР-анализ рекомбинантных вариантов с использованием пар праймеров TK-flank1 sense и TK-flank 2 inter as (дорожки 1-3) и праймеров Up35 и Apa-L22 (дорожки 4-6). Дорожки 1 и 4 соответствуют дикому типу вируса (штамм Л-ИВП); 2 и 5 - VV-GMCSF-dGF; 3 и 6 - VV-GMCSF-Lact. М – ДНК-маркер молекулярного веса.

Поскольку в состав рекомбинантов входит полная копия ДНК матричной РНК ГМ-КСФ человека, экспрессируемый белок содержит сигнальную последовательность и секретируется в культуральную среду инфицированных рекомбинантными штаммами клеток. В связи с этим экспрессию и секрецию гена ГМ-КСФ целесообразно было подтверждать Вестерн-блот анализом культуральной среды инфицированных клеток. ГМ-КСФ выявляется только в культуральной среде клеток CV-1, инфицированных рекомбинантными штаммами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF (рис. 9А). В культуральной среде представлена зрелая секретированная форма ГМ-КСФ с молекулярным весом 25-32 кДа вследствие гликозилирования белка в эукариотических клетках. В качестве положительного контроля мы использовали негликозилированную форму ГМ-КСФ с молекулярным весом 14.4 кДа, полученную в клетках *E.coli*.

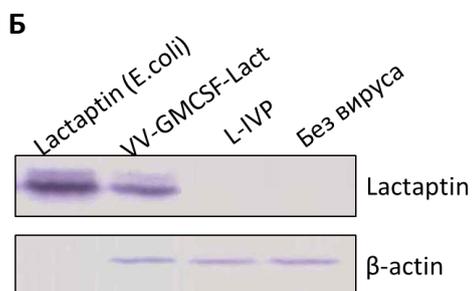
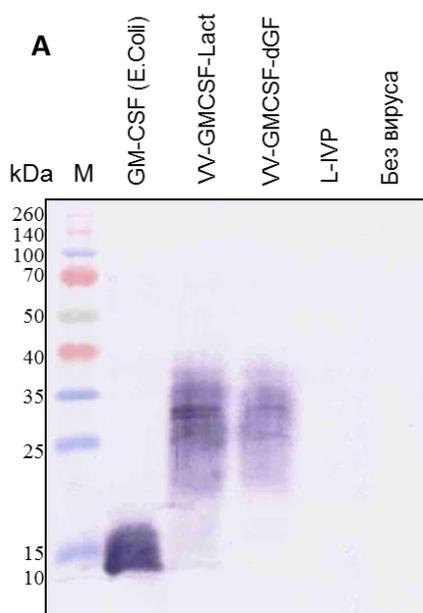


Рис. 9. А. – Вестерн-блот анализ клеточной культуральной среды с использованием антител к ГМ-КСФ. М – маркер молекулярного веса белков. Рекombинантный ГМ-КСФ, экспрессированный в *E.Coli* использовался в качестве положительного контроля. CV-1 клетки инфицировали VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-dGF. Исходный штамм Л-ИВП и неинфицированные клетки использовали в качестве негативного контроля.

Б. - Вестерн-блот анализ экспрессии гена лактаптина, а также экспрессии гена структурного белка β -actin (в качестве контроля) в клетках CV-1, инфицированных VV-GMCSF-Lact и исходным штаммом Л-ИВП (негативный контроль). Неинфицированные клетки CV-1 также использовались в качестве негативного контроля. Рекombинантный лактаптин, экспрессированный в *E.Coli*, использовался в качестве положительного контроля.

Лактаптин в составе рекombинантного штамма не имеет лидерной последовательности и не секретируется в культуральную среду, поэтому выявляется только в лизатах инфицированных рекombинантом VV-GMCSF-Lact клеток (рис. 9Б).

Онкоселективность полученных рекombинантных вариантов VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF была проверена на двух культурах клеток (нормальной и раковой) эпителия молочной железы: MCF 10A – нормальные клетки эпителия молочной железы; MCF7 – эпителиальные клетки аденокарциномы молочной железы. Рекombинант VV-GMCSF-Lact имеет более высокий индекс селективности в отношении раковых клеток эпителия

молочной железы в паре культур клеток MCF7/MCF 10A (200 против 100) по сравнению с аналогичным по структуре контрольным рекомбинантом VV-GMCSF-dGF, но не экспрессирующим ген лактапина (рис. 10А).

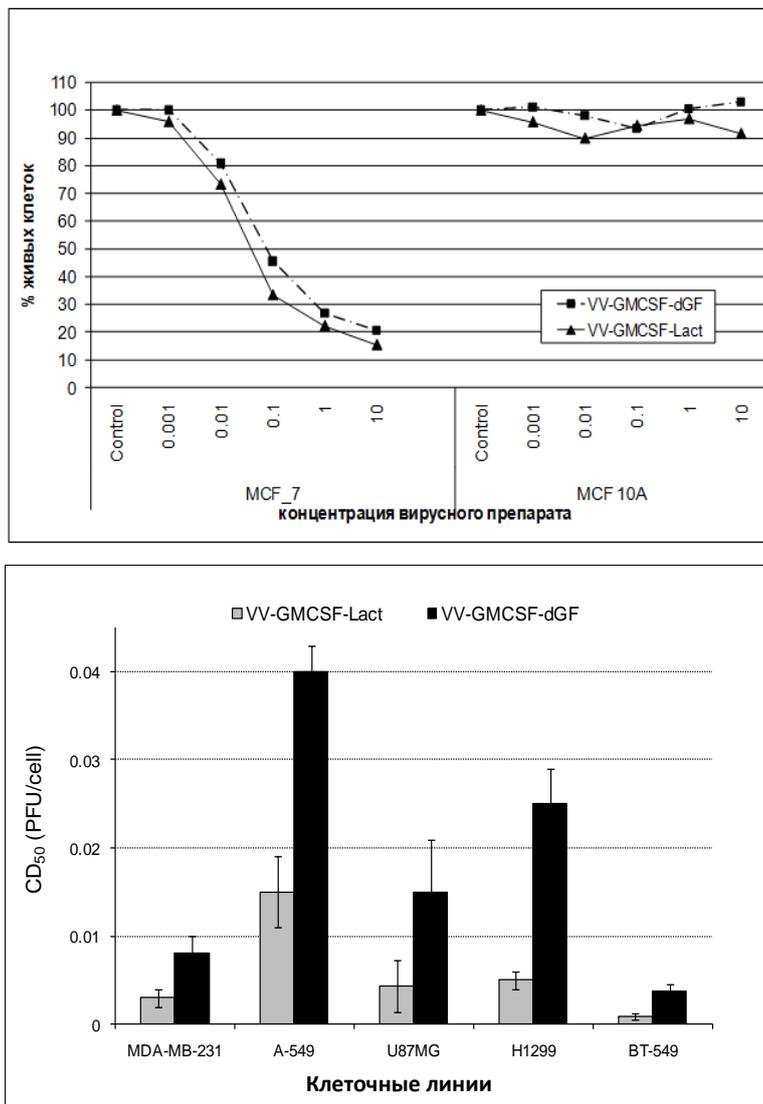


Рис. 10. А. – Онкоселективность рекомбинантных штаммов VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF на двух культурах клеток (нормальной и раковой) эпителия молочной железы: MCF10A – нормальный эпителий молочной железы; MCF7 – аденокарцинома молочной железы.

Б. - Сравнительная онколитическая активность рекомбинантных штаммов вируса осповакцины в раковых клетках человека различного генеза. На оси Y представлены значения 50%-ной цитотоксической дозы в единицах БОЕ/клетка, логарифмическая шкала. На оси X – культуры клеток.

Сравнительный анализ онколитической активности полученных нами рекомбинантных штаммов VACV проводили на пяти культурах клеток опухолей человека различного типа: карциномы молочной железы MDA-MB-231 и BT-549; карциномы легкого A-549 и мелкоклеточного рака легкого H1299; глиобластомы U87MG. Как следует из полученных данных (рис. 10Б), экспрессия гена лактапина значительно увеличивает цитотоксическую активность рекомбинантного вируса не только в клетках

рака молочной железы MDA-MB-231 и BT-549, но также в клетках рака легкого и мозга. Важно также отметить, что клетки карциномы молочной железы особенно чувствительны к обоим рекомбинантным вариантам VACV.

Противоопухолевую активность *in vivo* рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact оценивали на мышах линии SCID. Мышей с ксенографтами опухоли молочной железы человека MDA-MB-231 внутривенно инфицировали рекомбинантными вирусами в дозе 10^7 БОЕ/мышь на 20 и 40 сутки после введения опухолевых клеток. На 20-ый день после первой инъекции вируса было отмечено ингибирование роста опухоли штаммами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF в сравнении с контрольной группой (рис. 11). Динамика ингибирования опухолевого роста была одинаковой для VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF вплоть до 42 дня после первой инфекции, но после 42 дня VV-GMCSF-Lact ингибировал опухолевый рост в большей степени. К концу эксперимента на 74 сутки степень ингибирования опухолевого роста составляла 81% и 42% для VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF, соответственно.

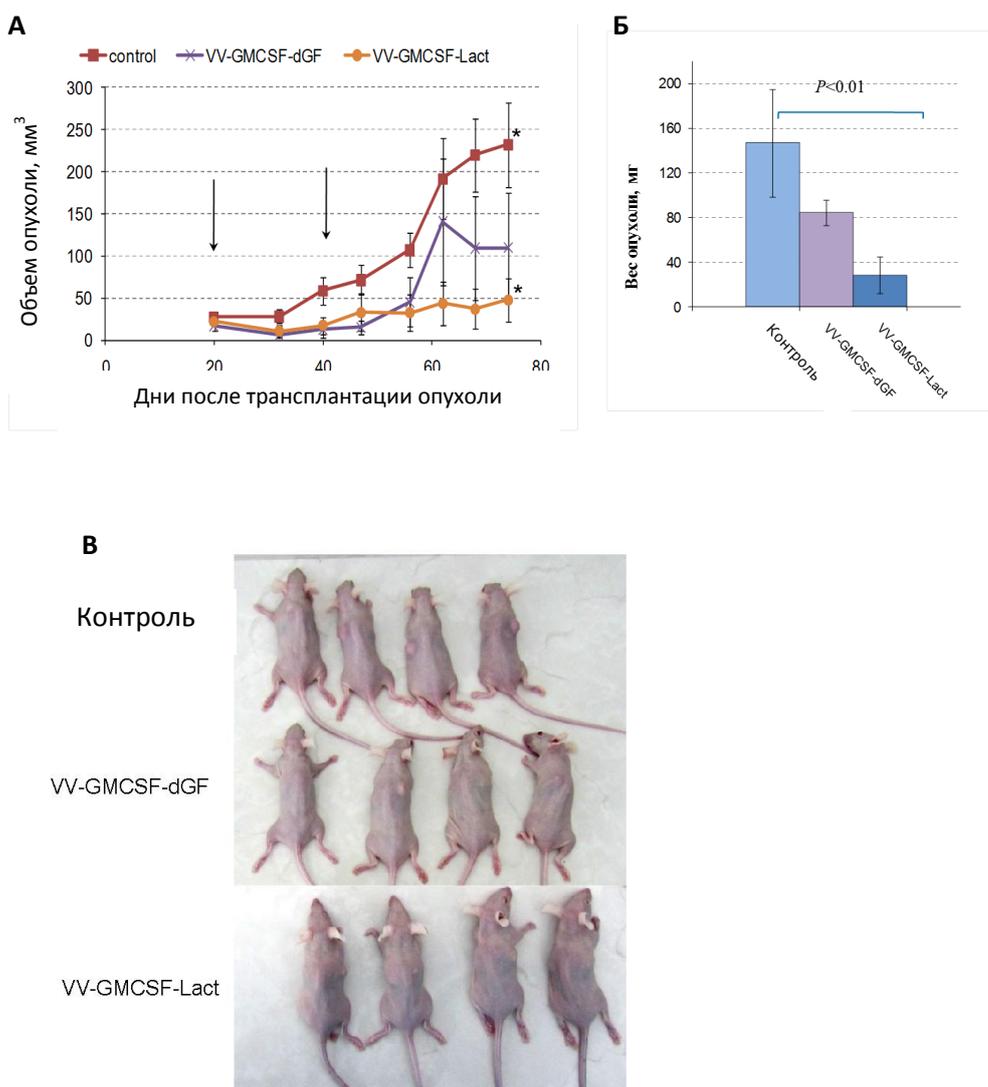


Рис. 11. А. – ингибирование роста ксенографтов опухоли молочной железы MDA-MB-231 штаммами VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-dGF. Мыши линии SCID. Вирус вводили дважды внутривенно (стрелки) в дозе 10^7 БОЕ/мышь. Рекомбинант VV-GMCSF-Lact ингибирует рост ксенографтов опухоли молочной железы человека MDA-MB-231 (индекс ТРО 82%). * различия достоверны при $P < 0.01$.

Б. – вес опухолей на 74 сутки (окончание эксперимента).

В. – фото мышей в заключительный день эксперимента.

Мы также показали, что штамм VV-GMCSF-Lact может быть эффективен при лечении лекарственно-устойчивых опухолей. В качестве модели использовали иммунокомпетентных мышей CBA/LacSto с трансплантированными в мышцу ноги опухолевыми клетками устойчивой к циклофосфамиду лимфосаркомы RLS. Вирус вводили однократно, внутриопухолево (10^7 БОЕ/мышь). В качестве контрольного лекарства использовали циклофосфамид, который был введен внутривенно в дозе 60 мг/кг. На 17 день эксперимента детектировали супрессию роста опухоли рекомбинантными штаммами, которая была значимо выше в случае штамма VV-GMCSF-Lact (93%) по сравнению с VV-GMCSF-dGF (36%) (рис. 12А). Рост опухолей, леченных циклофосфамидом, не отличался от контрольной группы. Для изучения влияния вирусного лечения на выживаемость мышей с ксенографтами лекарственно устойчивой лимфосаркомы RLS, мы продолжали наблюдать за мышами в течение 85 суток после трансплантации опухолей. Все мыши в группе контроля и в группе мышей, леченых циклофосфамидом, погибли к 24 дню эксперимента, в то время как 80% мышей, получивших лечение вирусом VV-GMCSF-Lact, были живы вплоть до 85 дня эксперимента. Уровень выживаемости мышей, леченых VV-GMCSF-dGF, был значимо ниже (рис. 12Б).

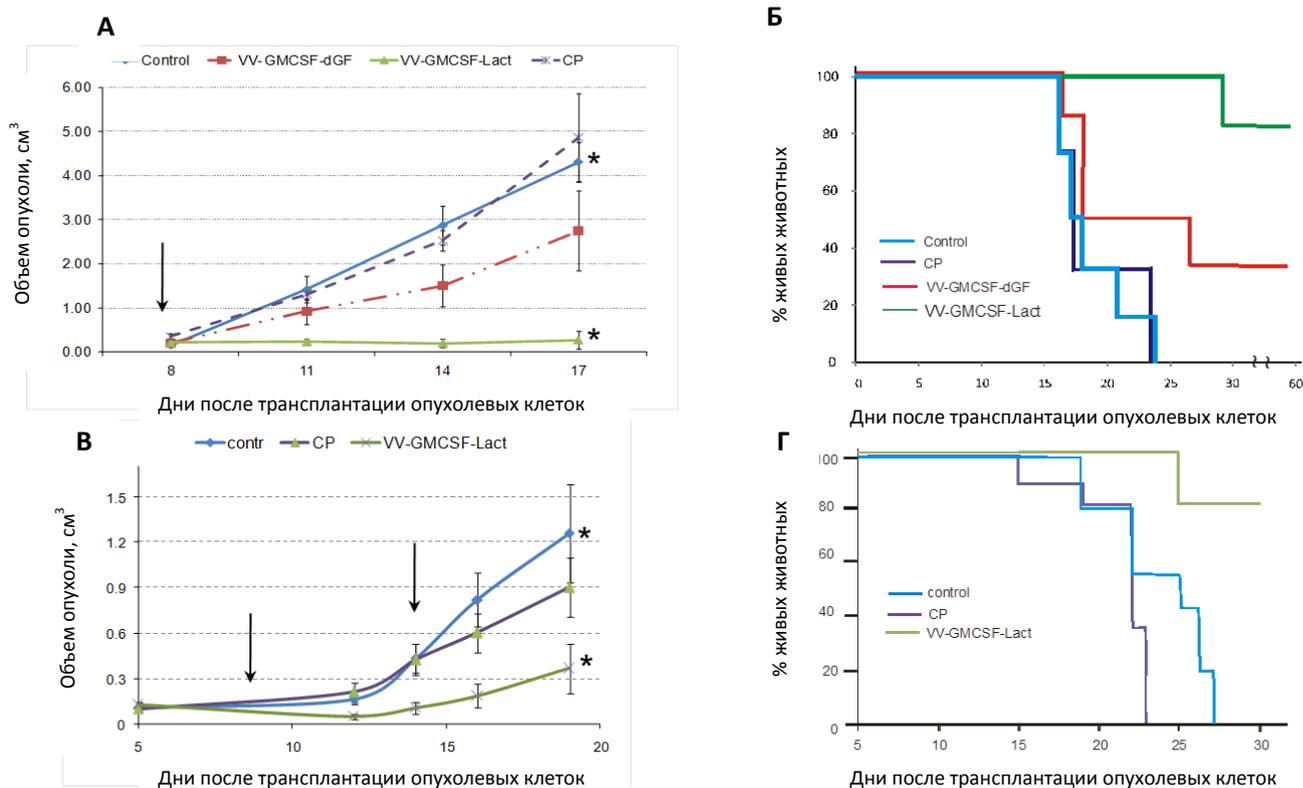


Рис. 12. Штамм VV-GMCSF-Lact увеличивает продолжительность жизни мышей и подавляет рост сингенной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS (индекс ТРО 93%). А, Б – внутриопухолевое введение вирусов; В, Г – внутривенное введение вируса и циклофосфамида. * различия достоверны при $P < 0.01$.

Для сравнения терапевтического эффекта внутривенного и внутриопухолевого введения штамма VV-GMCSF-Lact, внутривенно вводили 1×10^7 БОЕ вируса VV-GMCSF-Lact мышам с опухолями RLS на 8 и 14 день после трансплантации опухолевых клеток. Ингибирование роста опухоли было 70% при лечении штаммом VV-GMCSF-Lact, при этом рост опухолей в контрольной группе и группе мышей леченых циклофосфамидом не отличался друг от друга (рис. 12В).

ВЫВОДЫ

- 1) Сконструированы рекомбинантные варианты вируса осповакцины VV-NS1-dGF и MVA-NS1, экспрессирующие трансген онкотоксического белка NS1 парвовируса крыс H-1. VV-NS1-dGF сконструирован на основе репликативно-компетентного штамма вируса осповакцины Л-ИВП, аттенуированного путем удаления гена вирулентности VGF. MVA-NS1 сконструирован на основе высокоаттенуированного штамма MVA, репликативно-некомпетентного в отношении клеток млекопитающих.
- 2) Встройка трансгена NS1 значительно усиливает литическую активность вируса осповакцины в отношении клеток глиобластомы человека U87MG *in vitro* независимо от уровня аттенуации исходных штаммов вируса.
- 3) Рекомбинантный вариант VV-NS1-dGF значительно эффективнее разрушает подкожные и ортотопические ксенографты клеток U87MG, привитых иммунодефицитным мышам, по сравнению с рекомбинантом MVA-NS1 при внутриопухолевом и системном введении.
- 4) На основе штамма Л-ИВП сконструирован рекомбинантный вариант VVdGF-GFP2 с делециями двух генов вирулентности – VGF и ТК и встройкой репортерного трансгена GFP2 для визуализации селективного накопления вируса в клетках опухолевого узла и метастаза.
- 5) Рекомбинантный вариант VVdGF-GFP2 продемонстрировал высокую противоопухолевую и антиметастатическую активность на модели искусственного метастазирования с использованием двух удаленных ксенографтов карциномы человека A431. Однократное введение вируса в ксенографт, имитирующий первичный опухолевый узел, обеспечивало его быстрое проникновение (на 2-е сутки) в удаленный ксенографт, имитирующий метастаз, и полную деструкцию обоих ксенографтов к 20-м суткам после начала лечения.
- 6) При внутриопухолевом введении VVdGF-GFP2 происходит первичная диссеминация вируса в организме мышей. На 2-12 сутки после введения вирус в небольшой концентрации (10^2 - 10^4 БОЕ/мл) регистрируется в крови, селезенке, легких, печени и почках, однако к 14-м суткам вирус регистрируется только в ксенографтах карциномы A431, где сохраняется длительное время (до 35 суток) и достигает высоких концентраций (10^9 БОЕ/мл).
- 7) Адресное накопление экспрессированного рекомбинантом GFP2 в узлах опухоли и метастаза подтверждено на УФО-изображениях мышей, полученных с использованием *In vivo* Multispectral Imaging System (Bruker, Германия).

- 8) Низкий уровень репликации, быстрый клиренс VVdGF-GFP2 из нормальных органов мышей, а также его строгая внутриопухолевая локализация обеспечивают отсутствие вторичной вирусемии и безопасность использования аттенуированного по двум генам (VGF и ТК) штамма Л-ИВП для лечения иммунодефицитных раковых больных.
- 9) На основе аттенуированного штамма Л-ИВП с делециями генов VGF и ТК сконструирован рекомбинантный вариант VV-GMCSF-Lact, экспрессирующий трансгены цитокина ГМ-КСФ человека и онкотоксического пептида лактапина. VV-GMCSF-Lact продуцирует секретлируемую форму биологически активного ГМ-КСФ человека в клетках млекопитающих на уровне 1-40 мкг на мл культуральной среды.
- 10) Индекс онкоселективности штамма VV-GMCSF-Lact составляет больше 200 в паре культур клеток эпителия молочной железы раковая/нормальная MCF7 / MCF 10A.
- 11) Экспрессия трансгена лактапина в составе VV-GMCSF-Lact значительно увеличивает цитотоксическую активность рекомбинантного вируса не только в клетках рака молочной железы MDA-MB-231 и BT-549, но также в клетках рака легкого и мозга.
- 12) Рекомбинант VV-GMCSF-Lact эффективно ингибирует рост ксенографтов опухоли молочной железы человека MDA-MB-231, привитых подкожно мышам линии SCID, при двукратном системном введении с интервалом 20 дней. Индекс торможения роста опухоли составил 82%.
- 13) Рекомбинант VV-GMCSF-Lact увеличивает продолжительность жизни мышей и подавляет рост сингенной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS. Индекс ТРО составил 93%.
- 14) Совокупность проведенных исследований показывает, что рекомбинантные штаммы VV-NS1-dGF и VV-GMCSF-Lact являются перспективными препаратами для лечения опухолей мозга и молочной железы человека, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтетический ген NS1 парвовируса крыс Н-1 был использован нами в качестве трансгена для встройки в геном двух аттенуированных штаммов VACV, VV-NS1-dGF и MVA-NS1, с целью усиления их противоопухолевой активности. Рекомбинант VV-NS1-dGF сконструирован на основе репликативно-компетентного для клеток млекопитающих штамма Л-ИВП, имеет делецию гена VGF (фактор вирулентности) и на месте этой делеции – встройку трансгена белка NS1. В качестве исходного для конструирования рекомбинанта MVA-NS1 был взят высоко-аттенуированный репликативно-некомпетентный для клеток млекопитающих штамм MVA, в геном которого в район

делеции II мы встроили аналогичный трасген белка NS1. Оба рекомбинантных штамма VACV эффективно экспрессируют белок NS1 в клетках глиобластомы человека U87MG. Молекулярная масса рекомбинантного белка NS1 составляет 100кДа, что соответствует форме, наиболее близкой к его природной полноразмерной модификации. Такая модификация позволяет сохранить многочисленные и разнообразные онкотоксические активности белка [Nüesch et al., 2012; Marchini et al., 2015].

Встройка трансгена NS1 значимо усиливает литическую активность VACV в отношении клеток глиобластомы человека U87MG *in vitro*. При этом литическая активность вариантов штамма MVA (MVA-NS1 и контроль MVA) не отличалась от соответствующих показателей вариантов вирусов на основе более вирулентного штамма Л-ИВП (VV-NS1-dGF и контроль VVdGF2/6). Это для нас явилось сюрпризом, потому что известна отрицательная связь между аттенуацией VACV и его онколитической активностью – чем больше аттенуация вируса, тем меньше его онколитическая активность [Thorne et al., 2007]. Очевидно, что клетки U87MG являются высокочувствительными для штамма MVA и, в отличие от нормальных клеток млекопитающих, могут эффективно поддерживать его репликацию. Однако в экспериментах *in vivo* разница онколитических свойств рекомбинантных штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1 оказалась существенной.

Рекомбинантный штамм VV-NS1-dGF более эффективно разрушает подкожные ксенографты клеток U87MG у мышей линии Nu/Nu по сравнению со штаммом MVA-NS1 при однократном введении вирусов в район опухоли. Оба штамма избирательно размножаются в опухолевых клетках, сравнительно быстро элиминируются из кровотока и демонстрируют свою безопасность для организма в целом. Однако противоопухолевой активности штамма MVA-NS1 достаточно только для торможения роста опухоли, но недостаточно для ее деструкции. Введение же штамма VV-NS1-dGF приводит к значимому уменьшению размеров ксенографтов и, в конечном счете, к полной их деструкции.

Исследование противоопухолевых свойств рекомбинантных штаммов в ортотопической модели установившейся глиобластомы U87MG продемонстрировало увеличение продолжительности жизни мышей и значимое уменьшение объема опухолей при лечении штаммом VV-NS1-dGF. Виротерапию проводили, начиная с 21 суток после прививки клеток U87MG, и только для мышей с установившимися ксенотрансплантатами, средний объем которых к этому времени составлял 5,7 мкл. Такой подход моделирует опухоли мозга человека достаточно поздних стадий, на которых чаще всего заболевание и выявляется. Важно отметить, что в данном случае использовалось системное введение вируса, что наиболее предпочтительно для терапии труднодоступных опухолей мозга.

Считается, что вирус осповакцины вследствие своего большого размера не преодолевает гемато-энцефалический барьер [Kaufman et al., 2015]. Однако аномальная структура и повышенная проницаемость сосудов опухолей [De Vock et al., 2011] снимает эти ограничения и обеспечивает дополнительную онкоселективность вируса осповакцины.

Полученные результаты показали, что рекомбинант VV-NS1-dGF, сконструированный на основе репликативно-компетентного штамма Л-ИВП, обладает более высоким противоопухолевым потенциалом в сравнении со штаммом MVA-NS1, сконструированным на основе репликативно-некомпетентного штамма MVA, и может рассматриваться в качестве перспективного препарата для лечения опухолей мозга человека.

Из первого этапа работы мы сделали вывод, что онколитические варианты VACV предпочтительно получать на основе аттенуированного штамма Л-ИВП. Для дополнительной аттенуации литически активного (вирулентного) штамма Л-ИВП мы ввели делецию ТК-гена, который также как ген VGF является фактором вирулентности VACV. Кроме того, для визуализации селективного накопления вируса в опухоли и метастазах в район делеции ТК-гена был введен репортерный трансген зеленого флюоресцентного белка GFP2. Полученный рекомбинант обозначили VVdGF-GFP2.

Изучение диссеминации рекомбинанта VVdGF-GFP2 в организме иммунодефицитных мышей при интратуморальном введении показало, что он, также, как и ранее изученный VV-NS1-dGF, проникает в нормальные органы и ткани, однако накапливается в них в очень маленькой концентрации и быстро элиминируется. В то же время на примере двух удаленно расположенных модельных ксеногрфтов карциномы человека A431 (опухоль и метастаз), привитых мышам Nu/Nu, мы показали, что рекомбинант VVdGF-GFP2 даже при однократном локальном введении не только способен адресно накапливаться и разрушать ткань первичного опухолевого узла, но также обладает отчетливым антиметастатическим действием.

На следующем этапе мы провели дальнейшую модификацию двойного делеционного варианта штамма Л-ИВП, «вооружив» его встройкой трансгенов противоопухолевого цитокина ГМ-КСФ и онкотоксического пептида лактапина, который специфически индуцирует апоптоз клеток рака молочной железы человека.

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее частой формой рака среди женщин, поражающий в течение жизни от 1/13 до 1/9 женщин в возрасте от 13 до 90 лет. Также является ведущей онкопатологией женского населения России (21,2%). По данным Российского онкологического научного центра количество новых случаев рака молочной железы в России – более 100 тысяч в год. При этом уровень 5-летней выживаемости

россиянок с РМЖ весьма низок и составляет 58,5%. Поэтому разработка новых противоопухолевых препаратов и подходов терапии РМЖ и подавления метастазирования по-прежнему являются важнейшими задачами биомедицины и фармацевтики.

Был создан двойной рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact, содержащий встройки трансгенов ГМ-КСФ и лактапина в районе делеций вирусных генов ТК и VGF, соответственно. В экспериментах *in vitro* выяснилось, что экспрессия гена лактапина значительно увеличивает цитотоксическую активность рекомбинантного вируса не только в клетках рака молочной железы MDA-MB-231 и BT-549, но также в клетках рака легкого и мозга. Однако наиболее чувствительными к литическому действию VV-GMCSF-Lact остаются все же клетки карциномы молочной железы. Индекс онкоселективности штамма VV-GMCSF-Lact составляет больше 200 в паре культур клеток эпителия молочной железы раковая/нормальная MCF7 / MCF 10A.

Рекомбинант VV-GMCSF-Lact ингибирует рост ксенографтов опухоли молочной железы человека MDA-MB-231, привитых мышам линии SCID. Важно отметить, что в данном случае использовалось системное введение вируса, что важно при сложной и труднодоступной локализации опухоли. Индекс ТРО в конечной точке эксперимента (74 сутки) составил 82%. Штамм VV-GMCSF-Lact также увеличивает продолжительность жизни мышей и подавляет рост сингенной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS при системном и внутриопухолевом введении. Таким образом, полученный нами двойной рекомбинант VV-GMCSF-Lact может рассматриваться в качестве перспективного препарата для лечения РМЖ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Основные статьи:

- 1) Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Shvalov A.N., Unusova A.Yu., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. A model of the artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for examination of the oncolytic activity of vaccinia virus. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2016, Vol. 6, No. 4, pp. 469-476. doi: 10.1134/S2079059716040109
- 2) Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A., Grazhdantseva A., Troitskaya O., Nushtaeva A., Tkachenko A., Kuligina E., Richter V., Koval O. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. 2016 Sep 30. doi: 10.18632/oncotarget.12367.

Патенты:

- 1) Кочнева Г.В., Сиволобова Г. Ф., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Ткачева А.В., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Рихтер В.А. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, обладающий онколитической активностью и продуцирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека и онкотоксический белок лактаптин. // Патент РФ. – 2016. - № 2604187. - Бюл. № 34.
- 2) Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф., Локтев В.Б., Гражданцева А.А., Кочнева Г.В. Рекомбинантный штамм VV-NS1-dGF вируса осповакцины, продуцирующий белок NS1 парвовируса Н-1 и обладающий онколитической активностью в отношении глиобластомы человека. // Заявка на изобретение. – 2018. - № 2018124583.

Отчет о проверке текста
научно-квалификационной работы
на объем заимствования

Ткачёва Анастасия Викторовна

«Конструирование и изучение свойств онколитических ортопоксвирусов,
экспрессирующих гены репортерных, иммуностимулирующих и апоптоз-
индуцирующих белков»

Оценка оригинальности: 87.03%

Заимствования: 12.97%

№ документа: 995665

Имя исходного файла: Научный_доклад_Ткачева.doc

Размер файла: 2.3 МБ

Размер текста: 39858

Слов в тексте: 5728

Число предложений: 144

Источники (доля в тексте – ссылка):

15.3% <https://www.rusprofile.ru/id/1451999>

15.3% <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/about>

15.3% <http://www.list-org.com/company/814678>

5.0%

<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/education/postgraduate/students/%D1%81%D0%BF%D0%...>

5.0% <http://present5.com/sovremennye-problemy-onkologii-organizaciya/>

10.8% <http://www.physiol.ru/>

5.4% <https://каталог-нп.пф/organize/1149>

5.3% <http://bakalavr-info.ru/work/621531/Onkoliticheskie-poksvirusy>

13.0875% <http://www.findpatent.ru/patent/263/2630672.html>

9.3% <http://bankpatentov.ru/node/706897>

23.025% <http://www.findpatent.ru/patent/262/2621861.html>

8.3% http://www.vechnayamolodost.ru/articles/biomedicin/protivoopuholevie_dnk_vaktsini/

22.4% <http://bankpatentov.ru/node/662074>

33% <https://patents.google.com/patent/RU2621861C1/ru>

10.05% <https://4science.ru/conference2015/theses/14.604.21.0057>

6.6% <http://www.freepatent.ru/patents/2492238>

17.3% <http://konf.x-pdf.ru/19biologiya/190612-6-ii-mezhdunarodnaya-konferenciya-molodih-uch...>
16.0% <https://edrid.ru/rid/216.012.67df.html>
7.9% <https://medi.ru/info/189>
20.35% <http://www.findpatent.ru/patent/260/2604187.html>
21.1% <https://edrid.ru/rid/217.015.d25d.html>
5.8% <https://edrid.ru/rid/217.015.8b3b.html>
17.1% <https://patents.google.com/patent/RU2565544C2/ru>
12.2% <http://bankpatentov.ru/node/635445>
8.6% <https://pharmjournal.ru/articles/stati/rekombinantnye-mikroorganizmy-i-kletochnye-kul...>
7.9% <https://edrid.ru/rid/216.013.8495.html>
5.6% <http://www.dslib.net/citologia/mehanizmy-onkoliticheskogo-dejstvija-rekombinantnogo-a...>
7.5% https://нэб.рф/catalog/000224_000128_0002621861_20170607_C1_RU/
6.8% <https://nauchforum.ru/studconf/med/xlv/21979>
8.6%
https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B0%D0%BA_%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D1%87%D0%BD...
13.4% <https://www.scienceforum.ru/2017/2278/26308>
8.1%
http://medviki.com/%D0%A0%D0%B0%D0%BA_%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%BE%D0%B...
7.8% <http://femina-health.com.ua/pacziendam/zhenskoe-zdorove/dostupno-o-zdorove-i-boleznya...>
6.8% <https://iz.ru/news/539519>
8.2% <https://www.nkj.ru/archive/articles/10218/>
8.1% <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/517/>
5.3% <https://link.springer.com/article/10.1134/S2079059716040109>
9.6% <http://www.biopharmj.ru/ojs238/index.php/biopharmj/article/view/469>
12.5% <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequest/publications/users/2016>
5.5% https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-62870-7_61
16.6% <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/labs/ric>
5.1% <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5342044/>
9.6% <http://submit.biopharmj.ru/ojs238/index.php/biopharmj/article/view/469>

Оригинальность работы составляет 87.03 % , что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» на сайте www.antiplagius.ru
06.09.2018 г.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. К.В. Разум