

Бакуловирусные векторы в экспериментальной гено- и вакцинотерапии

А. П. Соломко, Е. А. Захарук, Л. И. Чащина, Л. И. Строковская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

solomko@imbg.org.ua

*Представлен краткий обзор данных литературы по целевому конструированию и исследованию свойств и эффективности применения в модельных системах *in vivo* рекомбинантных бакуловирусов. Проанализированы результаты экспериментов с использованием диких и рекомбинантных бакуловирусов в таких приоритетных областях биомедицины, как регенерация тканей, генотерапия рака, разработка вакцин против инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований.*

*Ключевые слова: бакуловирус, гено- и иммуновектор, млекопитающие, система *in vivo*.*

Интенсивное развитие исследований и достигнутый прогресс в области экспериментальной генной терапии во многом обусловлены разработкой эффективных способов и средств доставки генетического материала в культивируемые клетки млекопитающих *in vitro*. Однако решение одной из ключевых задач этой биотехнологии – эффективная доставка и экспрессия целевых генотерапевтических конструкций в организм – требует разработки новых векторных систем, обладающих определенными свойствами. Это связано с тем, что процесс транспорта генно-инженерных конструкций, как правило, – высокомолекулярных комплексов, таких как рекомбинантные вирусы или плазмидные ДНК, в организме весьма сложен и опосредован как необходимостью преодоления целого ряда физиологических и структурных барьеров, так и определенной защитой векторов от действия иммунной системы.

В связи с этим одной из важнейших задач развития указанного направления является создание це-

левых малотоксичных транспортных векторов – основного инструмента генной терапии. Весьма существенна при этом необходимость доставки нужного количества терапевтических генов или белков-антигенов в целевые клетки, органы и ткани при низкой токсичности вектора и оптимальном уровне экспрессии. Главным препятствием для широкого и эффективного применения большинства используемых векторов в генной терапии является индукция естественного иммунного ответа на системное введение подобных носителей. Решение этой проблемы лежит в создании продуктивных способов преодоления опосредованного вектором пролонгированного неспецифического иммунного ответа, выражающегося в активации синтеза ряда провоспалительных цитокинов, созревании антигенпрезентирующих клеток и повреждении тканей, что сокращает период экспрессии трансгена и приводит к серьезным побочным эффектам.

В настоящее время во многих лабораториях мира весьма интенсивно ведутся исследования в направлении использования вирусных и невирусных рекомбинантных векторов для целей генной тера-

Свойства векторов, используемых для целевой доставки генов

Вектор	Клонирующая емкость, тыс. п. н.	Тропизм	Интеграция в геном	Длительность экспрессии трансгена	Индукция иммунного ответа	Примечание
Ретровирус	8	Делящиеся клетки	Интегрирует	Пролонгирована	Слабая	Риск инсерционного мутагенеза, низкие титры
Лентивирус (Lentivirus)	8	Широкий тропизм	Интегрирует	Пролонгирована	Слабая	Риск инсерционного мутагенеза, высокая эффективность трансдукции
Аденовирус (Ad)	До 36	Широкий тропизм	Не интегрирует	Короткая	Высокая	Сильная иммуногенность, высокие титры
Аденоассоциированный вирус (AAV)	Менее 5	Широкий тропизм	Интегрирует	Пролонгирована	Слабая	Требует аденовирус в качестве помощника, низкие титры
Вирус герпеса (HSV)	До 30	Широкий тропизм	Не интегрирует	Пролонгирована	Высокая	Высокие титры, высокоинфекционен, сложная регуляция
Плазмидная ДНК	Более 20	Широкий тропизм	В зависимости от конструкции ДНК	До нескольких месяцев	Слабая	Легко продуцируется, низкая эффективность трансдукции
Вирус ядерного полиэдроза (NPV) насекомых	Более 30	Широкий тропизм	Не интегрирует	От 3 до 60 дней	Слабая	Высокие титры, дешевое масштабирование

пии и клеточной инженерии. Вирусные векторы обеспечивают более результативный и достаточно целенаправленный перенос функциональных генов по сравнению с невирусными системами. Имеется в виду сродство вирусных векторов к определенным тканям (скажем, векторы на основе вируса простого герпеса обладают тропностью к нервной ткани), а также наличие ядерного сигнала, обеспечивающего высокий уровень экспрессии вносимых генов в клеточном ядре. В многочисленных исследованиях наиболее активно используют ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные векторы, демонстрирующие хорошую клиническую перспективу. Детальное строение вышеперечисленных базовых вирусных векторов и область их применения в тканевой инженерии и противоопухолевой терапии описаны в обзорах [1, 2]. Однако они обладают некоторыми недостатками, сдерживающими их дальнейшую разработку (таблица).

Как видно из данных таблицы, сконструированные на основе вирусов человека векторы имеют ряд существенных недоработок, в том числе связанных с наличием предсуществующих к ним антител и довольно высокой токсичностью [3]. Эта ситуация активировала поиск и создание новых, непатогенных для человека и животных, вирусных векторов. Наиболее перспективным из них в настоящее время считают бакуловирус *Autographa californica* и некоторые родственные ему бакуловирусы. Они эффективно взаимодействуют с различными типами клеток млекопитающих, используя для проникновения в них механизмы, сходные с таковыми при проникновении в клетки насекомых [4, 5], и доступны для генно-инженерной и химической модификации поверхности вирусной частицы, что дает реальную возможность презентовать на ней целевые пептиды и белки.

Вирус ядерного полиэдроза (NPV) чешуекрылых является одним из новых, весьма интенсивно

разрабатываемых вирусных векторов для клеток и тканей млекопитающих. Наиболее детально изучен и широко используется для генно-инженерной модификации и в экспрессионных системах NPV калифорнийской совки *A. californica*. Вирус содержит двуспиральную геномную ДНК, размер нуклеокапсида варьирует от 40 до 50 нм в диаметре и от 200 до 400 нм в длину. Благодаря довольно широкому кругу инфицируемых насекомых этот бакуловirus эффективно применяют в качестве биоинсектицида и для конструирования высокоэффективных генно-инженерных экспрессионных систем наряду с другими бакуловirusами [6].

Бакуловirusную экспрессионную векторную систему часто используют для продуцирования в культуре клеток насекомых значительного количества эу- и прокариотических белков. Развитие технологии модификации поверхности бакуловirusа позволяет презентовать чужеродные пептиды или даже комплексы белков на оболочке или капсиде вируса [7]. Большая клонирующая емкость генома бакуловirusа, возможность получения рекомбинантного вируса в высоких титрах, способность с достаточно высокой эффективностью проникать в делящиеся и неделящиеся клетки млекопитающих и при этом не реплицироваться в них, а также низкая токсичность делают этот вектор весьма привлекательным для целей клеточной инженерии и генной терапии [4].

Рекомбинантные бакуловirusы в клеточной терапии и тканевой инженерии. Важной составной частью выполняемой вне организма тканевой инженерии является генная инженерия клеток. Генетически модифицированные клетки вводят в организм различными способами и целенаправленно имплантируют в нужное место. Особое внимание в этой связи исследователи уделяют стволовым клеткам (СК) различного происхождения, в первую очередь эмбриональным (ЭСК) и мезенхимальным (МСК). МСК костного мозга, обладающие свойством при соответствующих сигналах дифференцироваться в различных направлениях и мигрировать в организме к очагам повреждений, привлекают повышенное внимание ученых, работающих в области регенеративной медицины и противоопухолевой терапии.

Целью регенеративной медицины является восстановление функций поврежденных органов и тканей на основе применения стратегий трансплантации клеток либо сконструированных с их участием вне организма (*ex vivo*) на синтетических или природных матрицах «биоискусственных» органов и тканей. Новая, весьма интенсивно развивающаяся область биотехнологии, использующая достижения генной инженерии и являющаяся важной составной частью регенеративной медицины, – тканевая инженерия призвана восполнить недостатки традиционных подходов. Об этом прекрасно сказано в работе [8]: «Все процедуры, которые восполняют утраченные ткани пациента, требуют определенного типа замещающих структур в области дефекта или повреждения. Эти приспособления традиционно были полностью искусственными (суставы), преобразованной неживой тканью (сердечные клапаны), или тканью из другого места, взятой у самого пациента или у других пациентов (трансплантация). Теперь клиницистам стала доступна новая альтернатива, тканевая инженерия: замена живых тканей живыми тканями, которые разработаны и сконструированы в соответствии с индивидуальными потребностями каждого пациента».

Клеточная генотерапия является весьма перспективной стратегией для регенерации поврежденных скелетно-мышечных тканей. Ее экспериментальное применение показало высокую эффективность в исследованиях на модельных животных по сравнению с обычными подходами костной пластики. Удачным примером здесь является использование модифицированных стволовых клеток с генами костных морфогенетических белков. Одними из наиболее известных и используемых факторов индукции регенерации костной ткани являются костные морфогенетические белки (bone morphogenetic proteins – BMP), некоторые представители семейства факторов роста: трансформирующий фактор роста TGF- β , инсулиноподобный фактор роста IGF, фактор роста эндотелия сосудов VEGF.

Рекомбинантный человеческий остеоиндуктивный костный морфогенетический белок 2 (BMP2) широко применяют в клинической практике для восстановления поврежденной костной ткани. Наряду с положительными результатами, полученными

ми при применении рекомбинантного белка, обнаружилось и существенные недостатки такой терапии – достаточно короткий срок существования препарата. В этой ситуации требуется введение миллиграммовых количеств индуктора, что весьма токсично для организма. Преимуществом генотерапевтического подхода является возможность доставки физиологических количеств терапевтического белка непосредственно к месту повреждения с помощью различных векторных систем. Подобная технология позволяет применять гораздо более низкие дозировки фактора для достижения эффекта восстановления кости, эквивалентного достигнутому через системное введение рекомбинантного фактора.

МСК легко трансдуцируются вирусными векторами, что дает возможность использовать их для доставки терапевтического гена. Установлено, что белки BMP2, BMP4 и BMP7 иницируют и поддерживают остеогенез [9]. Так, показано, что BMP индуцируют быстрое восстановление черепных дефектов большого размера у приматов и грызунов [10]. МСК человека, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим BMP2, ускоряют регенерацию бедренной кости крыс [11].

Малотоксичный и непатогенный в отношении млекопитающих бакуловirus является перспективным кандидатом для работ в области регенеративной медицины. В экспериментах *in vitro* установлено, что бакуловirus *A. californica* достаточно эффективно трансдуцирует в культуре клеток суставных хондроцитов крыс и кроликов [12, 13]. И если в первой работе использовали рекомбинантный бакуловirus с маркерным флуоресцирующим белком EGFP, то во второй – рекомбинантные бакуловirus с генами ростовых факторов – TGF- β 1, IGF-1 и BMP2. Трансдуцированные клетки культивировали на двух- либо на трехмерной матрице. В результате проведенных экспериментов выяснено, что степень экспрессии ростовых факторов рекомбинантным бакуловirusом зависит, как и ответ клетки на них, от пассажа клеток и поддерживается на уровне, достаточном для проявления терапевтического эффекта. При этом отмечено, что экспрессия бакуловirusом ростового фактора BMP2 усиливает продуцирование межклеточного матрикса.

Дальнейшие исследования влияния ростовых факторов на редифференциацию хондроцитов кролика в клеточной культуре продемонстрировали ускорение этого процесса при совместной инъекции двух рекомбинантных бакуловirusов с генами факторов роста BMP2 и TGF- β 1 соответственно [14]. Однако при супертрансдукции – повторном введении рекомбинантного бакуловirusа – обнаруживается кратковременная дозозависимая активация синтеза интерферонов α и β , что в определенной степени подавляет экспрессию трансгена [15]. Тем не менее, и в этих условиях морфогенетический белок BMP2 синтезируется на достаточно высоком уровне, обеспечивая продуцирование межклеточного матрикса и возрастание дифференциации хондроцитов.

Использование специальных модифицированных биореакторов для получения полноценных имплантатов хрящевой ткани в результате трансдукции хондроцитов рекомбинантным бакуловirusом явилось следующим этапом в развитии регенеративной тканевой инженерии. Благодаря такой оптимизации технологического подхода удалось создать эффективные имплантаты, восстанавливающие гиалиновую структуру хрящевой ткани у экспериментальных животных [16].

Параллельно проводят исследования, связанные с развитием потенциала генетически модифицированных рекомбинантным бакуловirusом МСК для целей тканевой инженерии. Способность МСК при наличии соответствующих условий дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, миоциты и нервные клетки делает их весьма перспективным объектом для использования в регенеративной медицине и тканевой инженерии после генетической модификации [17].

Высокая эффективность трансдукции МСК рекомбинантным бакуловirusом (до 95 %) и неизменность их дифференционного потенциала после этой процедуры [18] позволили продемонстрировать индукцию дифференциации МСК в остеобласты с последующей регенерацией костного дефекта после трансдукции их бакуловirusом с геном белка BMP2 и трансплантации мышам [19].

Эта работа была продолжена для определения иммуностимулирующих свойств МСК, трансдуци-

рованных *ex vivo* нерекомбинантным бакуловирусом и трансплантированных животным. Важно было оценить пригодность трансдуцированных бакуловирусом стволовых клеток для целей клеточной генной терапии. Установлено, что, кроме локальной, слабой реакции, трансплантация трансдуцированных бакуловирусом СК не индуцирует моноциты и клетки CD8⁺T. Таким образом, важным результатом этих исследований является вывод о том, что бакуловирус индуцирует в МСК умеренный и краткосрочный ответ. Это позволяет рассчитывать на эффективную и безопасную модификацию их для применения в генной терапии [20].

Впечатляющие результаты получены при репарации достаточно большого (10 мм) костного дефекта у кроликов. Котрансплантация костномозговых МСК, трансдуцированных двумя рекомбинантными бакуловирусами: одного с геном, кодирующим белок BMP2, и второго – с геном VEGF, приводила к быстрому восстановлению дефекта у всех экспериментальных животных и активному ангиогенезу в области повреждения [21].

Для пролонгирования экспрессии трансгена рекомбинантным бакуловирусом авторами разработан гибридный бакуловирусный вектор на основе использования FLP/Frt-опосредованной рекомбинации с образованием эписомы. FLP/Frt является системой для искусственной гомологической рекомбинации из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Она основана на применении генно-инженерных конструкций, содержащих так называемые «горячие точки», или сайты митотической рекомбинации – Frt, и ген FLP-рекомбиназы, для которой эти сайты являются местом проявления ее активности. В результате образуется эписома, в которой для поддержания ее репликации и сегрегации между дочерними клетками использована последовательность oriP/EBNA1 вируса Эпштейна-Барра. Авторами работы сконструированы два рекомбинантных бакуловируса – один с геном *flp*, а второй с конструкцией, содержащей oriP/EBNA1 и фланкированной Frt-последовательностями. После трансдукции этими рекомбинантными бакуловирусами в результате процесса эксцизии/рекомбинации образуется самореплицирующаяся кольцевая эписома. Трансдукция МСК человека таким гибридным

вектором с геном *bmp2* позволяет существенно продлить время экспрессии трансгена (до 60 сут) и таким образом повысить эффективность дифференциации клеток костной ткани [22].

Весьма важными с точки зрения возможности применения трансдуцированных гибридным бакуловирусным вектором МСК в клинической практике являются результаты экспериментальной оценки степени их биобезопасности. Подтверждены данные о том, что трансдукция МСК гибридным бакуловирусом незначительно тормозит пролиферацию указанных клеток. Это, скорее всего, обусловлено вышеприведенными изменениями в экспрессии ряда клеточных генов и активации клеточного иммунного ответа, что, тем не менее, не влияет на степень жизнеспособности клеток и их дифференциацию. Подтверждены также данные об отсутствии интеграции трансгена в геном МСК и изменении их кариотипа. Не обнаружено и активации как протоонкогенов, так и генов опухолевых супрессоров. Трансдуцированные гибридным бакуловирусом МСК не индуцируют образования опухолей у бестимусных мышей. Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о безопасности использования МСК человека для клеточной терапии и перспективности применения генетически модифицированных гибридным рекомбинантным бакуловирусом МСК в терапии, где необходимо пролонгированное выражение целевого гена [23]. Инженерия клеток млекопитающих на основе вирусных векторов, в том числе бакуловируса, является одной из наиболее активно развивающихся генно-инженерных терапевтических стратегий. Использование генетически модифицированных клеток, в первую очередь стволовых, позволяет активно и целенаправленно внедряться в процессы регенерации тканей. Применение рекомбинантных бакуловирусов с целевыми генами ростовых факторов и индукторов дифференцировки имеет существенную перспективу и преимущества перед другими векторами в силу их низкой токсичности и значительного потенциала усиления экспрессии целевых белков за счет генно-инженерной и химической модификации поверхности вирусных частиц.

Экспериментальная вакциноterapia. Одно из первых упоминаний об использовании рекомби-

нантного бакуловируса в качестве иммуновектора датировано 1992 годом [24]. Авторы использовали в качестве вакцины как рекомбинантные бакуловирусы, экспрессирующие гены *gag* и *env* вируса лейкемии кошек (FeLV), так и клетки насекомых (линия Sf9), инфицированные ими (кстати, это одно из первых сообщений об использовании в качестве вакцины клеток насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловирусом). По данным авторов, итоги экспериментов были успешными. Однако в схеме эксперимента отсутствовал контроль – реакция на введение нереконбинантного, дикого вируса. Это оказалось существенным недостатком работы, так как позже в публикации [25] показано, что взаимодействие нереконбинантного бакуловируса *A. californica* с мышинными и человеческими клетками в культуре индуцирует синтез интерферонов α и β и обеспечивает таким образом противовирусную защиту *in vivo* при инфицировании мышей вирусом энцефаломиокардита. Авторы предположили, что индукция интерферонов осуществляется в результате белково-белковых взаимодействий, опосредованных вирусным белком слияния GP67 (GP64) и соответствующими клеточными рецепторами, поскольку антитела к белку слияния ингибируют индукцию интерферонов.

Во многих работах рекомбинантные бакуловирусы, несущие гены различных структурных компонентов вирусов млекопитающих, исследовали в качестве антиген-экспрессирующих иммуновекторов. В опытах на животных моделях показана индукция специфического гуморального иммунного ответа при введении трансдуцирующих бакуловирусов с генами гликопротеина В вируса псевдотуберкулеза (вызывает острое инфекционное вирусное заболевание, характеризующееся поражением нервной системы животных) [26], гемагглютинаина вируса гриппа [27], гликопротеина Е2 вируса гепатита С либо карциноэмбрионального антигена (СЕА) [28], поверхностного белка Е вируса японского энцефалита [29].

Особый интерес исследователей вызывает возможность создания на основе рекомбинантных бакуловирусов живых противогриппозных вакцин, разработка безыгольных способов их введения, а также технологии быстрой наработки боль-

ших количеств вакцинных препаратов. В ряде работ показана опосредованная бакуловирусом индукция системного и мукозного иммунных ответов при интраназальном и пероральном введении, что делает их перспективными в качестве основы для генотерапевтических манипуляций и создания живых малотоксичных иммуновекторных вакцин.

Различные группы исследователей в своих работах продемонстрировали высокую эффективность на модельных системах противогриппозных вакцин, разработанных на основе рекомбинантных бакуловирусов с геном гемагглютинаина вируса птичьего гриппа H5N1 [30, 31]. Преимущество векторных рекомбинантных бакуловирусов, экспрессирующих гемагглютинин и экспонирующих его молекулы на поверхности частицы вируса, заключается в том, что труднорастворимый высокогидрофобный белок представлен на вирусном дисплее в нативной функциональной конформации. Это, в свою очередь, обеспечивает максимальный специфический иммунный ответ на вводимый антиген.

Весьма обнадеживающие результаты получены при испытании на мышинной модели перорального введения рекомбинантного бакуловируса с геном гемагглютинаина вируса H5N1 под немедленноранним сильным промотором вируса синдрома белого пятна (WSSV). В результате получена 100 %-я защита мышей от смертельной дозы высокопатогенного штамма вируса птичьего гриппа, что обеспечивается значительным уровнем специфических сывороточных иммуноглобулинов и мукозных иммуноглобулинов IgA [32].

Высокая степень мутационной изменчивости вирусов гриппа (в основном это касается либо точечных, либо существенных модификаций последовательностей аминокислот в области антигенных детерминант гемагглютинирующей и нейроаминидазной субъединиц) обуславливает необходимость производства препаратов вакцин против все вновь возникающих вариантов вируса. Эта ситуация осложняется, когда необходимо быстро и в большом количестве приготовить новую вакцину, учитывая предыдущие разновидности вируса гриппа и его функционирование в популяции населения. Вирус гриппа ежегодно изменяется с преобладанием других штаммов возбудителя. Последовательности ге-

магглютинаина большинства вирусов птичьего гриппа H5N1, циркулировавших в прошлые несколько лет, попадают в две генетические группы, или клада. По причине высокой скорости мутации этого вируса каждый конкретный состав вакцины максимально эффективен около одного года. Выходом из такого положения является создание на основе новых биотехнологий поливалентных вакцин. Попытка осуществить это с помощью рекомбинантных бакуловирусов сделана в работе [33]. Проанализировав первичную структуру основных нейтрализующих эпитопов гемагглютинаина различных линий вируса птичьего гриппа авторы выбрали три вакцинных штамма, перекрывающих все нейтрализующие эпитопы гемагглютинаина известных линий вируса, и экспонировали отобранные гемагглютинаины на поверхности рекомбинантных бакуловирусов. Таким образом была создана поливалентная противогриппозная вакцина на основе рекомбинантного бакуловируса и бакулофаговой технологии. Испытание этой вакцины, проведенное на мышах, показало ее высокую эффективность в нейтрализации вирусной инфекции при использовании в качестве источника инфекции вируса птичьего гриппа шести различных генетических групп. При этом моновалентная бакуловирусная вакцина оказалась эффективной по отношению к гомологичному кладу и еще двум генетически близким группам.

При этом нужно отметить, что в качестве вектора использовали не только бакуловирус *A. californica*, но и NPV *Bombyx mori* – BmNPV. Китайские исследователи сконструировали рекомбинантный вирус Bm γ p64HA, несущий на вирусной поверхности частицы молекулу гемагглютинаина вируса птичьего гриппа. Рекомбинантный вирус размножали в куколках тутового шелкопряда – своеобразных биореакторах – и после выделения и очистки рекомбинантного вируса его использовали в экспериментах на обезьянах и мышах. Показано, что такой вирус предохраняет от гриппозной инфекции 50–67 % животных в зависимости от дозы вируса [34].

Продемонстрированная в предыдущих работах способность нерекомбинантных бакуловирусов индуцировать первичный (врожденный) иммунный

ответ на уровне активации синтеза провоспалительных цитокинов также привлекла внимание исследователей. Индукция клеточного иммунного ответа, опосредованная активацией синтеза ряда цитокинов – TNF- α , IL1- α , IL1- β – нерекомбинантным бакуловирусом в гепатоцитах крысы, показана в ранней работе авторов [35].

Эти исследования получили развитие в уже упоминавшейся публикации японских ученых [27], где выявлено, что введение не только рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего ген гемагглютинаина вируса гриппа H1N1, но и дикого типа бакуловируса активно препятствует развитию вирусной инфекции. При этом отмечено, что интраназальное введение бакуловируса было наиболее эффективным. Это наблюдение вместе с данными об активации вирусом мышинных макрофагов позволило авторам сделать предположение о возможных механизмах индукции бакуловирусом антивирусного иммунного ответа. Наличие в структуре белка слияния бакуловируса GP64 моносахарида маннозы обеспечивает тесное взаимодействие с участвующими в формировании иммунного ответа рецепторами маннозы на поверхности макрофагов и дендритных клеток, в значительных количествах представленных в лимфоидных тканях носоглотки и тканях легких, и таким образом индуцирует в них синтез провоспалительных цитокинов и антивирусный ответ. В дальнейшем эти же авторы показали, что взаимодействие бакуловируса с дендритными клетками костного мозга мышей усиливает экспрессию таких провоспалительных цитокинов, как IL12, IL16 и IL-1 β [36].

Весьма интересными в этой связи являются данные, демонстрирующие, что активация бакуловирусом синтеза интерферонов в экспериментах на мышах приводит к индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, усиливая действие вводимого антигена. Таким образом бакуловирус проявляет свойства весьма эффективного адьюванта. Более того, авторы утверждают, что присутствие даже отдельных вирусных частиц в препаратах рекомбинантных белков, полученных в бакуловирусной экспрессионной системе, существенно повышают их иммуногенность [37]. Детально изучая механизмы, благодаря которым бакуловирус вы-

полняет свою адьювантную роль, авторы работы пришли к выводу о том, что вирусный белок слияния GP64, скорее всего, не является ключевым фактором в этом процессе, они не исключают при этом участия в функционировании указанного механизма и других вирусных компонентов.

Такое заключение поддерживает и вывод, сделанный ранее Абе и др. [38], о том, что индукция бакуловирусом активации иммунной системы, вероятнее всего, осуществляется посредством сигнального пути MyD88/TLR9. В доказательство авторы приводят результаты своих исследований, в которых трансфекция геномной бакуловирусной ДНК мышинных макрофагов линии RAW264.7 активирует в них синтез проинфламаторного цитокина TNF α . Учитывая, что бакуловирусная ДНК содержит значительное количество потенциально активных CpG-динуклеотидов, а рецепторы Toll-like9 активно взаимодействуют с неметилированными CpG-динуклеотидами молекул бактериальной ДНК, этот вывод можно было бы признать вполне закономерным и логичным. Однако в более поздней работе [39] этих же авторов установлено, что наряду с участием Toll-like9 рецепторного сигнального пути в инициации синтеза интерферона β и активированных им хемокинов в иммунокомпетентных клетках индукция интерферона в клетках эмбриональных фибробластов мыши происходит независимо от этого сигнального пути и опосредуется интерферон-регуляторными факторами IRF7/IRF3. Авторы делают вывод о том, что, скорее всего, существует зависимость от функциональной специализации клеток система сигнальных путей индукции клеточного адаптивного и иммунного ответов.

В этой связи весьма интересны данные исследований, посвященных реакции генома клеток млекопитающих на внедрение бакуловируса. Так, показано, что в результате трансдукции вирусом ядерного полиэдроса тутового шелкопряда *B. mori* клеток НЕК293 существенно изменяется профиль экспрессии около 20 клеточных генов [40]. При этом реакция МСК человека на внедрение бакуловируса AcNPV еще более выражена и сопровождается кратковременной дерегуляцией активности примерно 800 генов, участвующих в функционировании пяти клеточных сигнальных путей, демонст-

рируя для разных генов отклонения в транскрипционной активности как в сторону ее индукции, так и снижения. Также отмечено транзиторное повышение синтеза двух цитокинов – IL6 и IL8, а общий профиль экспрессии цитокиновых генов весьма отличается от такового для специализированных иммунных клеток [41]. Авторами установлена активация Toll-like3 сигнального пути ДНК-содержащим вирусом в МСК человека, что весьма неспецифично для этого сигнального пути, индуцируемого в норме двуспиральными вирусными и синтетическими РНК. Результат эксперимента весьма интригующий и его необходимо подтвердить или опровергнуть более детальными исследованиями.

Результаты предыдущих работ, связанных с разными аспектами взаимодействия бакуловирусов с непермиссивными клетками и организмами, дали импульс активному развитию исследований, посвященных совершенствованию и использованию рекомбинантных бакуловирусов в качестве трансдуцирующих векторов и эффективных адьювантов для антигенных пептидов и белков [42, 43].

Стратегия совершенствования бакуловирусного вектора для целей вакцинотерапии заключается в изменении поверхности вирусной частицы двумя способами: 1) проводят генно-инженерные модификации дисплея вируса для повышения эффективности целевого транспорта, связывания и внедрения рекомбинантного бакуловируса, защиты вирусной частицы от действия комплемента при введении в организм и 2) генно-инженерным или химическим методом на вирусной частице экспонируют антигенные пептиды и белки для усиления специфического иммунного ответа *in vivo* [44].

Система генно-инженерной модификации бакуловирусного дисплея является аналогом бактериофаговой дисплейной системы и носит название «бакулофаговой». Модификацию при этом проводят, конструируя слитный ген, включающий последовательность бакуловирусного гена *gp64*, и гетерологичный белок или пептид под контролем сильного промотора одного из поздних бакуловирусных генов – гена полиэдрина [45–47].

Целый ряд работ выполнен с использованием генно-инженерной модификации вирусного дис-

плея вышеописанным способом для целей вакцинотерапии. Так, рекомбинантный бакуловирус, несущий на вирусной оболочке белок PbCSP малярийного плазмодия *Plasmodium berghei*, защищал 60 % экспериментальных мышей от последующего инфицирования [48]. Достаточно хороший результат не удовлетворил авторов работы, и в дальнейшем они сконструировали бакуловирус с двойной системой экспрессии – антиген плазмодия был встроен под цитомегаловирусную экспрессионную кассету в геном, а также через бакуловирусный промотор гена полиэдрина экспрессировался на поверхности вирусной частицы в клетках насекомых, что привело к усилению специфического гуморального и клеточного иммунного ответа при интрамушкульном введении иммуновектора [49].

В последующем авторы выдвинули гипотезу о том, что ограниченная эффективность традиционных вакцин вызвана индукцией плазмодием гибели активированных вакциной В-клеток, носителей иммунной памяти. Сконструированный ими новый рекомбинантный бакуловирусный вектор, презентующий на поверхности вирусной частицы фрагмент поверхностного белка PуMSP1 *Plasmodium yoelii*, при интраназальном введении индуцирует не только сильный иммунный ответ, но и способствует активации естественного иммунного ответа на инфекцию [50].

Здесь необходимо подчеркнуть, что рекомбинантный бакуловирус с двойной системой экспрессии был сконструирован и успешно применен для подобных исследований и ранее [51]. Особенностью указанной работы явилось использование плазмодия, вызывающего малярию у людей, что позволило авторам сопоставить результаты, полученные *in vivo* на мышах и *in vitro* – на человеческих клетках. В этих экспериментах антигеном служил поверхностный белок CS спорозоитов с удаленной с С-конца последовательностью для якорного гликолипида GPI, который, по некоторым сведениям [52], интерферирует с экспрессией и иммуногенностью этого белка. Из трех сконструированных векторов наиболее эффективным оказался бакуловирусный рекомбинантный вектор, сочетающий и экспрессию, и презентацию на поверхности вирусной частицы CS антигена. Этот вектор достаточно

хорошо индуцирует созревание CS-специфических CD4⁺- и CD8⁺ Т-клеток у мышей и активирует CS-специфические CD4⁺- и CD8⁺ Т-клеточные ответы в системе *in vitro* при использовании человеческих мононуклеарных клеток из периферической крови здоровых доноров. Авторы предположили, что такой вакцинный вектор может быть эффективно использован для торможения печеночной стадии заражения, эффективно ингибируя деление спорозоитов и элиминируя пораженные гепатоциты.

В целом, вышеприведенные результаты экспериментов с применением рекомбинантных и диких бакуловирусных векторов свидетельствуют о достаточно высокой эффективности их в индукции как адаптивного, так и антигенспецифического иммунного ответа.

Как известно, дендритные клетки представляют собой высокоспециализированные антигенпрезентирующие клетки, выполняющие функции активации и модуляции Т-клеточного иммунного ответа. Инициация адаптивного иммунного ответа в высшей степени зависит от активации, функционального созревания и миграции дендритных клеток. В связи с этим весьма важным является то, что взаимодействие с бакуловирусным вектором индуцирует фенотипическое преобразование и функциональное созревание дендритных клеток, увеличивая их возможность стимулировать Т-клетки и способствуя проявлению сильных адьювантных свойств [53, 54].

Представленный нами далеко не полный перечень работ, в которых изучали влияние как рекомбинантных, так и немодифицированных бакуловирусов на индукцию клеточного и гуморального иммунного ответа, свидетельствует о перспективности использования бакуловирусов в качестве малотоксичных профилактических вакцин.

Бакуловирусные векторы в экспериментальной терапии рака. Благодаря широкому спектру инфицируемых бакуловирусом клеток млекопитающих, среди которых и раковые клетки различного происхождения, открыта возможность использования рекомбинантных бакуловирусов и в генотерапии рака. Одной из первых в этом направлении стала работа, в которой сконструированы семь различных рекомбинантных бакуловирусов с геном А-цепи дифтерийного токсина. В качестве

промотора наиболее эффективным оказался клеточно-специфический промотор кислого глиального фибриллярного белка (glial fibrillary acidic protein – GFAP) в экспрессионной касете, содержащей энхансер цитомегаловирусного немедленнораннего гена и инвертированные концевые повторы адеиноассоциированного вируса. Такая комбинация обеспечивает существенное повышение уровня экспрессии целевого гена относительно низкой транскрипционной активности клеточно-специфического промотора. Этот рекомбинантный бакуловирус активно трансдуцирует раковые клетки и эффективно ингибирует рост злокачественной глиомы мозга у крыс [55].

Рекомбинантный бакуловирус, экспрессирующий ген теломеразы-обратной транскриптазы мыши (TERT), использован в качестве иммуновектора в работе [56]. Большинство злокачественных опухолей, в отличие от многих здоровых тканей, в той или иной мере экспрессируют TERT, вследствие чего этот фермент является достаточно хорошим антигеном для индукции противоопухолевой иммунной реакции. Действительно, спленоциты, полученные из внутримышечно вакцинированных мышей, содержат повышенное количество теломеразы-специфических и секретирующих IFN- γ Т-клеток, преимущественно CD4⁺. Отмечена также повышенная активность естественных киллерных клеток. Иммунизация мышей таким рекомбинантным бакуловирусом приводит к появлению противоопухолевого иммунного ответа и предохраняет мышей от возникновения опухоли мозга при последующем введении опухолевых клеток.

Противоопухолевый иммунный ответ, индуцируемый диким бакуловирусом, по мнению авторов [57], обусловлен активацией естественных киллерных клеток, опосредованной трансдуцированными бакуловирусом антигенпрезентующими дендритными клетками. PCR анализ показал, что бакуловирус не инфицирует клетки NK, T и NTK, но его геном обнаружен в лимфоцитах, аккумулированных в селезенке. Геном бакуловируса выявляется преимущественно в селезенке и печени животных при внутривенном введении. На модели мышей, инокулированных клетками меланомы B16, убедительно продемонстрировано ингибирование вирусом ме-

тастазирования в печень и высокий уровень выживаемости подопытных животных. Однако было неясно, действительно ли подобный противоопухолевый эффект обеспечивается индукцией как следствием введения бакуловируса именно приобретенного иммунитета?

Задавшись этим вопросом, авторы исследовали активацию опухолеспецифических цитотоксических лимфоцитов, которые, по мнению многих исследователей, играют важную роль в формировании противоопухолевого ответа. Определяли также титр специфических антител у мышей, инъецированных клетками B16 в селезенку, с последующей инокуляцией внутривенно бакуловируса через сутки. Показано, что у обработанных бакуловирусом мышей выявлен высокий уровень опухолеспецифических антител в сыворотке крови и индуцируется специфическая анти-B16-активность цитотоксических лимфоцитов [58].

Предполагаемые противоопухолевые механизмы, активируемые бакуловирусом, заключаются в первоначальной индукции специфической противоопухолевой активности NK-клеток посредством инициации синтеза цитокинов и NKG2D лигандов (лиганды для NKG2D являются молекулами, экспрессия которых запускается при раковой трансформации и инфицировании вирусными или бактериальными патогенами), и формирование приобретенного иммунитета осуществляется через индукцию опухолеспецифических цитотоксических лимфоцитов и антител [58].

В иммунотерапии рака одной из основных целей является появление иммунного ответа против опухолевых антигенов, который может быть вызван или усилен у пациентов. Для достижения этого проверяли несколько подходов, включая применение весьма мощных антигенпрезентующих клеток – дендритных клеток, способных эффективно активировать Т-клетки. Презентация пептидов, производных от опухолевых антигенов на поверхности дендритных клеток, может стимулировать сильный противоопухолевый иммунитет. Использование рекомбинантных вирусных векторов, кодирующих опухолевые антигены и эффективно экспрессирующих устойчивые уровни их на поверхности дендритных клеток, которые в свою оче-

редь индуцируют антиген-специфический Т-клеточный ответ, в настоящее время является одной из новых стратегий в иммунотерапии опухолей [59]. Эффективная трансдукция дендритных клеток бакуловирусом позволяет использовать его в качестве индуктора противоопухолевого ответа в плане развития новой стратегии иммунотерапии рака. Активно работающий в этой области Китаима с соавт., используя трансдуцированные бакуловирусом дендритные клетки костного мозга в модельных опытах на мышах с карциномой легких и меланомой, продемонстрировали повышенную выживаемость экспериментальных животных и существенную редукцию опухолей [60].

Весьма важной проблемой генной терапии канцерогенеза является поиск и использование генов, продукты экспрессии которых были бы токсичны для клеток опухоли и не повреждали нормальные клетки. Одним из таких генов является ген апоптина (апоптин представляет собой небольшой белок, полученный из вируса анемии цыплят, первое название – VP3). Особенностью апоптина является то, что он индуцирует апоптоз в трансформированных и злокачественных клетках человека, но не в нормальных [61, 62].

С использованием ряда рекомбинантных вирусов (аденовирус, парвовирус и поксвирус), содержащих ген апоптина, получены весьма обнадеживающие результаты, свидетельствующие об эффективной противоопухолевой активности рекомбинантных векторов и селективном действии экспрессируемого ими целевого белка [63]. Вполне ожидаемо, что ген апоптина использован для получения рекомбинантного бакуловируса и дальнейшего исследования его селективного апоптического действия на опухолевые клетки. Рекомбинантный бакуловирус с геном апоптина под промоторм цитомегаловируса эффективно индуцирует апоптоз *in vitro* в клетках HepG2 и H22 и *in vivo* – при интратуморальном введении у мышей с гепатокарциномой [64]. При этом показано, что наиболее эффективным оказалось двукратное введение бакуловектора с геном апоптина с интервалом в две недели – выживаемость экспериментальных животных относительно контрольных опухоленосителей увеличилась в два раза.

Весьма перспективным для генной терапии рака считают использование генов, кодирующих белки – супрессоры опухолевого роста. Одним из них является ген *pdc4*. Механизм его действия заключается в связывании продукта экспрессии гена с фактором инициации трансляции 4A1, что препятствует присоединению к нему РНК. Ранее установлено, что в клетках меланомы человека происходит суперэкспрессия мРНК этого фактора [65].

Для повышения эффективности трансдукции в экспериментах использован также фолат-пегилированный рекомбинантный бакуловирус с геном человека *pdc4* – F-P-Vac-Pdc4. Интратуморальная инъекция такого бакуловируса приводит к существенному подавлению роста опухоли и индукции апоптоза клеток эпителиальной карциномы, индуцированной подкожным введением суспензии клеток линии KB (линия клеток, происходящая из носоглоточной карциномы человека и являющаяся тестовой для определения эффективности противоопухолевых агентов) [66].

Применение генотерапевтического подхода для ингибирования развития раковых опухолей с использованием разнообразных генетических конструкций, включающих гены цитокинов, суицидные гены или гены, индуцирующие апоптоз, не гарантирует, к сожалению, максимального терапевтического эффекта. Что касается применения апоптических генов, то, на наш взгляд, необходимы принципиально другие векторные системы, которые бы обеспечивали доставку суицидных генов или лекарственных препаратов целенаправленно к раковым клеткам, где они могли бы вызывать их апоптоз. На сегодняшний день наиболее перспективными кандидатами на такую роль являются стволовые клетки, обладающие тропизмом к опухолевым клеткам и мигрирующие к опухолевым тканям. Такие генетически модифицированные стволовые клетки, несущие терапевтические гены, можно использовать для доставки генных продуктов к опухолям и метастазам.

Перспективным направлением развития исследований в области генной терапии является разработка новых систем доставки целевых генов на основе элементов вирусных и невирусных векторов и наночастиц, которые должны целенаправленно ми-

грировать к опухолевым клеткам, обеспечивая эффективный перенос целевых генов в основную массу этих клеток и пролонгированную экспрессию целевых генов без интеграции в их геном.

В связи с этим представляется оптимальным сочетание генотерапии с вакцинотерапией для достижения максимального терапевтического действия. Эффективность векторной вакцинотерапии может быть существенно повышена после преодоления иммуносупрессии у раковых больных, вызванной как наличием опухоли значительного размера, так и проведением предварительной химио- и радиотерапии. Кроме того, из-за гетерогенности экспрессии опухолевых антигенов у разных больных и даже в разных клетках опухоли и метастазов, оптимальным является использование поливалентных вакцин на основе рекомбинантных векторов.

Получение дополнительной информации о биологии бакуловирусов и их взаимодействии с неприродными хозяевами, несомненно, будет способствовать конструированию высокоэффективных рекомбинантных векторов для применения в клинике. Что же касается перспектив рекомбинантных бакуловирусов, то, скорее всего, их будут использовать в качестве иммуновекторных вакцин благодаря значительному удешевлению и созданию современных технологий масштабирования процесса накопления модифицированного вируса и эффективности применения для предупреждения инфекционных заболеваний, в первую очередь, гриппа. Использование их как иммуновакцин при лечении рака в значительной мере зависит от разработки новых эффективных клинических протоколов.

A. P. Solomko, O. A. Zaharuk, L. I. Chaschina, L. I. Strokovskaya

Baculovirus vectors in experimental gene- and vaccine therapy

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

The article provides a brief overview of the literature on target design, exploration properties and effectiveness of the application of recombinant baculoviruses in model systems in vivo. The results of experiments with wild and recombinant baculoviruses are analysed in regard to the priority areas of biomedicine such as tissue regeneration, gene therapy of cancer, development of vaccines against infectious diseases and malignancies.

Keywords: baculovirus, gene- and immunovector, mammals, system in vivo.

О. П. Соломко, О. А. Захарук, Л. І. Чащина, Л. І. Строчковська

Бакуловірусні вектори в експериментальній гено- та вакцинотерапії

Резюме

Представлено короткий огляд даних літератури стосовно цільового конструювання і дослідження властивостей та ефективності використано в модельних системах *in vivo* рекомбінантних бакуловірусів. Проаналізовано результати дослідів із застосуванням диких і рекомбінантних бакуловірусів у таких пріоритетних галузях сучасної біомедицини, як регенерація тканин, генотерапія раку, розробка вакцин проти інфекційних захворювань та злоякісних новоутворень.

Ключові слова: бакуловірус, гено- та імунувектор, ссавці, система *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang X., Godbey W. T. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering // *Adv. Drug Deliv. Rev.*—2006.—**58**, N 4.—P. 515–534.
2. Guo Z. S., Thorne S. H., Bartlett D. L. Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses // *Biochim. Biophys. Acta.*—2008.—**1785**, N 2.—P. 217–231.
3. Nayak S., Herzog R. W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors // *Gene Ther.*—2010.—**17**, N 3.—P. 295–304.
4. Hu Y. C. Baculoviral vectors for gene delivery: a review // *Curr. Gene Ther.*—2008.—**8**, N 1.—P. 54–65.
5. Solomko A. P., Zaharuk O. A., Chashchina L. I., Strokovskaya L. I. Baculovirus integration with the vertebrate cells in system *in vitro* // *Biopolym. Cell.*—2010.—**26**, N 6.—P. 441–449.
6. Luckow V. A., Summers M. D. Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors // *Virology.*—1988.—**167**, N 1.—P. 56–71.
7. Kim Y. K., Jiang H. L., Je Y. H., Cho M. H., Cho C. S. Modification of baculovirus for gene therapy // *Commun. Curr. Res. Edu. Topics and Trends Appl. Microbiol.* / Ed. A. Mendez-Vilas.—Badajoz, 2007.—Vol. 2.—P. 875–884.
8. Vacanti J. P., Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation // *Lancet.*—1999.—**354**, Suppl 1.—P. S32–S34.
9. Reddi A. H. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials // *Tissue Eng.*—2000.—**6**, N 4.—P. 351–359.
10. Nakashima M., Reddi A. H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering // *Nat. Biotechnol.*—2003.—**21**, N 9.—P. 1025–1032.
11. Peterson B., Zhang J., Iglesias R., Kabo M., Hedrick M., Benham P., Lieberman J. R. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue // *Tissue Eng.*—2005.—**11**, N 1–2.—P. 120–129.
12. Ho Y. C., Chen H. C., Wang K. C., Hu Y. C. Highly efficient baculovirus-mediated gene transfer into rat chondrocytes // *Biotechnol. Bioeng.*—2004.—**88**, N 5.—P. 643–651.
13. Sung L. Y., Lo W. H., Chiu H. Y., Chen H. C., Chung C. K., Lee H. P., Hu Y. C. Modulation of chondrocyte phenotype via bacu-

- lovirus-mediated growth factor expression // *Biomaterials*.—2007.—**28**, N 23.—P. 3437–3447.
14. Sung L. Y., Chiu H. Y., Chen H. C., Chen Y. L., Chuang C. K., Hu Y. C. Baculovirus-mediated growth factor expression in dedifferentiated chondrocytes accelerates redifferentiation: effects of combinational transduction // *Tissue Eng., Part A*.—2009.—**15**, N 6.—P. 1353–1362.
 15. Lee H. P., Matsuura Y., Chen H. C., Chen Y. L., Chuang C. K., Abe T., Hwang S. M., Shiah H. C., Hu Y. C. Baculovirus transduction of chondrocytes elicits interferon-alpha/beta and suppresses transgene expression // *J. Gene Med.*—2009.—**11**, N 4.—P. 302–312.
 16. Chen H. C., Chang Y. H., Chuang C. K., Lin C. Y., Sung L. Y., Wang Y. H., Hu Y. C. The repair of osteochondral defects using baculovirus-mediated gene transfer with de-differentiated chondrocytes in bioreactor culture // *Biomaterials*.—2009.—**30**, N 4.—P. 674–681.
 17. Kumar S., Chanda D., Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells // *Gene Ther.*—2008.—**15**, N 10.—P. 711–715.
 18. Ho Y. C., Lee H. P., Hwang S. M., Lo W. H., Chen H. C., Chung C. K., Hu Y. C. Baculovirus transduction of human mesenchymal stem cell-derived progenitor cells: variation of transgene expression with cellular differentiation states // *Gene Ther.*—2006.—**13**, N 20.—P. 1471–1479.
 19. Chuang C. K., Sung L. Y., Hwang S. M., Lo W. H., Chen H. C., Hu Y. C. Baculovirus as new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering // *Gene Ther.*—2007.—**14**, N 19.—P. 1417–1424.
 20. Chuang C. K., Wong T. H., Hwang S. M., Chang Y. H., Chen G. Y., Chiu Y. C., Huang S. F., Hu Y. C. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells: *in vitro* responses and *in vivo* immune responses after cell transplantation // *Mol. Ther.*—2009.—**17**, N 5.—P. 889–896.
 21. Lin C. Y., Chang Y. H., Lin K. J., Yen T. C., Tai C. L., Chen C. Y., Lo W. H., Hsiao I. T., Yu Y. C. The healing of critical-sized femoral segmental bone defects in rabbits using baculovirus-engineered mesenchymal stem cells // *Biomaterials*.—2010.—**31**, N 12.—P. 3222–3230.
 22. Lo W. H., Hwang S. M., Chuang C. K., Chen C. Y., Hu Y. C. Development of a hybrid baculoviral vector for sustained transgene expression // *Mol. Ther.*—2009.—**17**, N 4.—P. 658–666.
 23. Chen C. Y., Wu H. H., Chen C. P., Chern S. R., Hwang S. M., Huang S. F., Lo W. H., Chen G. Y., Hu Y. C. Biosafety assessment of human mesenchymal stem cells engineered by hybrid baculovirus vectors // *Mol. Pharm.*—2011.—Article ASAP, doi: 10.1021/mp100368d.
 24. Wardley R. C., Berlinski P. J., Thomsen D. R., Meyer A. L., Post L. E. The use of feline herpesvirus and baculovirus as vaccine vectors for the *gag* and *env* genes of feline leukaemia virus // *J. Gen. Virol.*—1992.—**73**, pt 7.—P. 1811–1818.
 25. Gronowski A. M., Hilbert D. M., Sheehan K. C., Garotta G., Schreiber R. D. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells // *J. Virol.*—1999.—**73**, N 12.—P. 9944–9951.
 26. Aoki H., Sakoda Y., Jukuroki K., Takada A., Kida H., Fukusho A. Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells // *Vet. Microbiol.*—1999.—**68**, N 3–4.—P. 197–207.
 27. Abe T., Takahashi H., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Matsuura Y., Takaku H. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice // *J. Immunol.*—2003.—**171**, N 3.—P. 1133–1139.
 28. Facciabene A., Aurisicchio L., La Monica N. Baculovirus vectors elicit antigen-specific immune responses in mice // *J. Virol.*—2004.—**78**, N 16.—P. 8663–8672.
 29. Li Y., Ye J., Cao S., Xiao S., Zhao Q., Liu X., Jin M., Chen H. Immunization with pseudotype baculovirus expressing envelope protein of Japanese encephalitis virus elicits protective immunity in mice // *J. Gene Med.*—2009.—**11**, N 1.—P. 57–65.
 30. Lu L., Yu L., Kwang J. Baculovirus surface-displayed hemagglutinin of H5N1 influenza virus sustains its authentic cleavage, hemagglutination activity, and antigenicity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—2007.—**358**, N 2.—P. 404–409.
 31. Wu Q., Fang L., Wu X., Li B., Luo R., Ju Z., Jin M., Chen H., Xiao S. A pseudotype baculovirus-mediated vaccine confers protective immunity against lethal challenge with H5N1 avian influenza virus in mice and chickens // *Mol. Immunol.*—2009.—**46**, N 11–12.—P. 2210–2217.
 32. Prabakaran M., Madhan S., Prabhu N., Qiang J., Kwang J. Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection // *J. Virol.*—2010.—**84**, N 7.—P. 3201–3209.
 33. Prabakaran M., He F., Meng T., Madhan S., Yunrui T., Jia Q., Kwang J. Neutralizing epitopes of influenza virus hemagglutinin: target for the development of a universal vaccine against H5N1 lineages // *J. Virol.*—2010.—**84**, N 22.—P. 11822–11830.
 34. Jin R., Lv Z., Chen Q., Quan Y., Zhang H., Li S., Chen G., Zheng Q., Jin L., Wu X., Chen J., Zhang Y. Safety and immunogenicity of H5N1 influenza vaccine based on baculovirus surface display system of *Bombyx mori* // *PLoS One*.—2008.—**3**, N 12.—e3933.
 35. Beck N. B., Sidhu J. S., Omiecinski C. J. Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes // *Gene Ther.*—2000.—**7**, N 15.—P. 1274–1283.
 36. Hashimoto K., Suzuki T., Sakai R., Miyazawa Y., Saito R., Yamamoto H., Nakayama T., Miyano-Kurosaki N., Takaku H. Innate immunity activation in mouse dendritic cells infected by baculovirus // *J. Immunol.*—2007.—**178**, suppl.—B188.
 37. Hervás-Stubbs S., Rueda P., Lopez L., Leclerc C. Insect baculovirus strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN // *J. Immunol.*—2007.—**178**, N 4.—P. 2361–2369.
 38. Abe T., Hemmi H., Miyamoto H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., Matsuura Y. Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus // *J. Virol.*—2005.—**79**, N 5.—P. 2847–2858.
 39. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K. J., Kawai T., Akira S., Matsuura Y. Baculovirus induces type I interferon production through Toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner // *J. Virol.*—2009.—**83**, N 15.—P. 7629–7640.
 40. Kenoutis C., Efroze R. C., Swevers L., Lavdas A. A., Gaitanou M., Matsas R., Latrou K. Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression // *J. Virol.*—2006.—**80**, N 8.—P. 4135–4146.
 41. Chen G. Yu., Shiah H. C., Su H. J., Chen C. Yu., Chuang Y. J., Lo W. H., Huang J. L., Chuang C. K., Hwang S. M., Hu Y. C. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells triggers the toll-like receptor 3 pathway // *J. Virol.*—2009.—**83**, N 20.—P. 10548–10556.

42. Tani H., Abe T., Matsunaga T. M., Moriishi K., Matsuura Y. Baculovirus vector for gene delivery and vaccine development // *Fut. Virol.*—2008.—**3**, N 1.—P. 35–43.
43. Hu Y. C., Yao K., Wu T. Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens // *Expert Rev. Vaccines.*—2008.—**7**, N 3.—P. 363–371.
44. Wilson S., Baird M., Ward V. K. Delivery of vaccine peptides by rapid conjugation to baculovirus particles // *Vaccine.*—2008.—**26**, N 20.—P. 2451–2456.
45. Boublik Y., Di Bonito P., Jones I. M. Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface // *Biotechnology.*—1995.—**13**, N 10.—P. 1079–1084.
46. Mottershead D., van der Linden I., von Bonsdorff C. H., Keinanen K., Oker-Blom C. Baculoviral display of the green fluorescent protein and rubella virus envelope proteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—1997.—**238**, N 3.—P. 717–722.
47. Makela A. R., Oker-Blom C. Baculovirus display: a multifunctional technology for gene delivery and eukaryotic library development // *Adv. Virus Res.*—2006.—**68**.—P. 91–112.
48. Yoshida S., Kondoh D., Arai E., Matsuoka H., Seki C., Tanaka T., Okada M., Ishii A. Baculovirus virions displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection // *Virology.*—2003.—**316**, N 1.—P. 161–170.
49. Yoshida S., Kawasaki M., Hariguchi N., Hirota K., Matsumoto M. A Baculovirus dual expression system-based malaria vaccine induces strong protection against *Plasmodium berghei* sporozoite challenge in mice // *Infect. Immun.*—2009.—**77**, N 5.—P. 1782–1789.
50. Yoshida S., Araki H., Yokomine T. Baculovirus-based nasal drop vaccine confers complete protection against malaria by natural boosting of vaccine-induced antibodies in mice // *Infect. Immun.*—2010.—**78**, N 2.—P. 595–602.
51. Strauss R., Huser A., Ni S., Tuve S., Kiviat N., Sow P. S., Hofmann C., Lieber A. Baculovirus-based vaccination vectors allow for efficient induction of immune responses against *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein // *Mol. Ther.*—2007.—**15**, N 1.—P. 193–202.
52. Bruna-Romero O., Rocha C. D., Tsuji M., Gazzinelli R. T. Enhanced protective immunity against malaria by vaccination with a recombinant adenovirus encoding the circumsporozoite protein of *Plasmodium* lacking the GPI-anchoring motif // *Vaccine.*—2004.—**22**, N 27–28.—P. 3575–3584.
53. Schutz A., Scheller N., Breinig N., Meyerhans A. The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus AcNPV induces functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells // *Vaccine.*—2006.—**24**, N 49–50.—P. 7190–7196.
54. Suzuki T., Chang M. O., Kitajima M., Takaku H. Baculovirus activates murine dendritic cells and induces non-specific NK cell and T cell immune responses // *Cell Immunol.*—2010.—**262**, N 1.—P. 35–43.
55. Wang C. Y., Li F., Yang Y., Guo H. Y., Wu C. X., Wang S. Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy // *Cancer Res.*—2006.—**66**, N 11.—P. 5798–5806.
56. Kim C. H., Yoon J. S., Sohn H. J., Kim C. K., Paik S. Y., Hong Y. K., Kim T. G. Direct vaccination with pseudotype baculovirus expressing murine telomerase induces anti-tumor immunity comparable with RNA-electroporated dendritic cells in a murine glioma model // *Cancer Lett.*—2007.—**250**, N 2.—P. 276–283.
57. Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Taniguchi M., Nakayama T., Takaku H. Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus // *Mol. Ther.*—2008.—**16**, N 2.—P. 261–268.
58. Kitajima M., Takaku H. Induction of antitumor acquired immunity by baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice // *Clin. Vaccine Immunol.*—2008.—**15**, N 2.—P. 376–378.
59. Mossoba M. E., Medin J. A. Cancer immunotherapy using virally transduced dendritic cells: animal studies and human clinical trials // *Expert. Rev. Vaccines.*—2006.—**5**, N 5.—P. 717–732.
60. Suzuki T., Chang M. O., Kitajima M., Takaku H. Induction of antitumor immunity against mouse carcinoma by baculovirus-infected dendritic cells // *Cell Mol. Immunol.*—2010.—**7**, N 6.—P. 440–446.
61. Danen-Van Oorschot A. A., Fischer D. F., Grimbergen J. M., Klein B., Zhuang S., Falkenburg J. H., Backendorf C., Quax P. H., Van der Eb A. J., Noteborn M. H. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1997.—**94**, N 11.—P. 5843–5847.
62. Pietersen A. M., Rutjes S. A., van Tongeren J., Vogels R., Wesseling J. G., Noteborn M. H. The tumor-selective viral protein apoptin effectively kills human biliary tract cancer cells // *J. Mol. Med.*—2004.—**82**, N 1.—P. 56–63.
63. Pietersen A. M., van der Eb M. M., Rademaker H. J., van den Wollenberg D. J., Rabelink M. J., Kuppen P. J., van Dierendonck J. H., van Ormondt H., Masman D., van de Velde C. J., van der Eb A. J., Hoeben R. C., Noteborn M. H. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene // *Gene Ther.*—1999.—**6**, N 5.—P. 882–892.
64. Pan Y., Fang L., Fan H., Luo R., Zhao Q., Chen H., Xiao S. Antitumor effects of recombinant pseudotype baculovirus expressing Apoptin *in vitro* and *in vivo* // *Int. J. Cancer.*—2010.—**126**, N 11.—P. 2741–2751.
65. Eberle J., Krasagakis K., Orfanos C. E. Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells *in vitro* // *Int. J. Cancer.*—1997.—**71**, N 3.—P. 396–401.
66. Kim Y. K., Kwon J. T., Choi J. Y., Jiang H. L., Arote R., Jere D., Je Y. H., Cho M. H., Cho C. S. Suppression of tumor growth in xenograft model mice by programmed cell death 4 gene delivery using folate-PEG-baculovirus // *Cancer Gene Ther.*—2010.—**17**, N 11.—P. 751–760.

UDC 578.841.1:578.233

Received 21.02.10