

УДК 578.226

Эффективный способ доставки гена интерлейкина-2 в гемопоэтические клетки человека с использованием рекомбинантного аденовируса с модифицированным фибером

В. Н. Рогожин^{1,2*}, Д. Ю. Логунов¹, Д. В. Щебляков¹, М. М. Шмаров¹, Е. Е. Ходунова³, И. В. Гальцева³, Р. В. Белоусова², Б. С. Народицкий¹, А. Л. Гинцбург¹

¹ФГБУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²ФГОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Ак. Скрябина, 23

³ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4

*E-mail: Rogojin_V@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2011 г.

РЕФЕРАТ Сконструирован рекомбинантный аденовирус человека серотипа 5 (Ad5/35F-IL2) с модифицированными фиберами, содержащими С-концевой knob-домен фибера аденовируса человека серотипа 35, и несущий ген рекомбинантного интерлейкина-2 человека. Благодаря модификации фиберов аденовирус способен эффективно доставлять генетическую информацию в клетки лейкоцитарной фракции красного костного мозга человека, а также в линии KG-1A (миелоцитарный лейкоз) и U937 (моноцитарный лейкоз) опухолевых клеток крови, в норме резистентных к инфекции аденовирусом человека серотипа 5. Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что модифицированный Ad5/35F эффективно проникает в популяции моноцитов, гранулоцитов и бластных клеток красного костного мозга человека. Показана экспрессия интерлейкина-2 в CAR-негативных костномозговых лейкоцитах (3682.52 ± 134.21 пг/мл) и клетках линий KG-1A (748.3 ± 32.8 пг/мл) и U937 (421.5 ± 59.4 пг/мл), трансдуцированных Ad5/35F-IL2. Аденовирус с модифицированным фибером может использоваться в качестве вектора для эффективной доставки гена интерлейкина-2 человека в нормальные и опухолевые клетки гемопоэтического ряда.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденовирусный вектор, псевдотипирование, интерлейкин-2, CD46, модификация капсида.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ad – аденовирус человека; Ad5 – Ad серотипа 5; Ad35 – Ad серотипа 35; Ad5/35F – рекомбинантный Ad5 с модифицированными фиберами; УФ – ультрафиолетовое излучение; ККМ – красный костный мозг; IL2 – интерлейкин-2 человека; CAR – рецептор коксакивируса-аденовируса; а.о. – аминокислотный остаток; БОЕ – бляшкообразующая единица.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время векторы на основе аденовируса человека серотипа 5 (Ad5) входят в число наиболее часто используемых для доставки генов в клетки человека и млекопитающих. К преимуществам таких векторов относятся: их способность трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки [1, 2]; аденовирусная ДНК не встраивается в геном клетки-хозяина и остается в экстрахромосомной форме; аденовирусы могут быть получены в титре более 10^{10} БОЕ/мл, что может позволить использовать их в качестве живых рекомбинантных вакцин;

обеспечение высокого уровня экспрессии целевого гена в клетке-мишени. Один из недостатков векторов на основе Ad5 – их низкая трансдуцирующая активность в отношении CAR-дефицитных и CAR-негативных клеток, среди которых важное место принадлежит клеткам гемопоэтического ряда. Эта проблема обусловлена тем, что для первичного взаимодействия Ad5 с клеткой необходимо связывание капсидного аденовирусного белка – фибера – с мембранным клеточным рецептором CAR (cox-sackievirus-adenovirus receptor). Поэтому дефицит или полное отсутствие этих рецепторов на поверхно-

сти клеток является фактором, лимитирующим эффективную доставку генов с помощью аденовекторов на основе Ad5.

Проблема решается с помощью генетической модификации фибров аденовируса. Стратегия такой модификации заключается в псевдотипировании, т.е. замене фибров или отдельных их доменов на фибры или аналогичные домены аденовирусов других серотипов, использующих для связывания с клеточной поверхностью рецепторы, отличные от CAR. Такой подход впервые применили в 1996 г. Gall J. и соавт., которые получили Ad5, экспрессирующий фибр Ad7, и показали изменение тропизма вектора [3]. Krasnykh V. и соавт. [4] и Stevenson S. и соавт. [5] описали получение химерных Ad5-векторов, содержащих N-концевой и центральный домены фибера Ad5 и C-концевой домен фибера Ad3.

Для эффективной трансдукции клеток гемопоэтического ряда предложена замена фибера Ad5 на фибр Ad35 (Ad5/35F) [6]. Модификация обусловлена тем, что Ad5 и Ad35 для связывания с поверхностью клетки используют различные рецепторы. В случае Ad5 это CAR, а у Ad35 – молекула CD46 [7], высокий уровень экспрессии которой зарегистрирован на поверхности гемопоэтических клеток. Такие химерные аденовирусы способны эффективно трансдуцировать гемопоэтические [6], а также дендритные клетки человека [8].

Мы применили описанную модификацию фибера Ad5 для получения вектора, способного эффективно проникать в CAR-дефицитные гемопоэтические клетки с целью доставки в них гена интерлейкина-2 человека. Получение такого вектора расширяет возможности применения векторов на основе капсид-модифицированных аденовирусов человека, в частности в генной терапии лейкозов различной этиологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмидные векторы

pZ35 – плазида, содержащая геном Ad5 с knob-доменом фибера Ad35, и pShuttle-CMV-IL2 – челночный вектор, содержащий ген интерлейкина-2 человека под контролем промотора цитомегаловируса человека, сконструированы ранее в ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [9]; pShuttle-CMV-EGFP («Stratagene», США).

Вирусы и бактериальные штаммы

Рекомбинантный Ad5, экспрессирующий репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка (Ad5-EGFP), рекомбинантный Ad5, экспрессирующий ген интерлейкина-2 человека (Ad5-IL2), полученные ра-

нее в ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [9, 10], *Escherichia coli* штаммы DH5 α и BJ5183.

Клеточные линии

В работе использовали перевиваемые линии культур клеток человека: НЕК-293 (клетки эмбриональной почки, трансформированные областью E1 генома Ad5), KG-1A (клетки миелоцитарного лейкоза), U937 (клетки моноцитарного лейкоза), а также первичную культуру лейкоцитов красного костного мозга (ККМ), полученную от здорового донора.

Получение рекомбинантных аденовирусов

Плазмидные конструкции, несущие полноразмерный геном аденовируса с модифицированным фибром (Ad5/35F) и целевым геном в составе генома, получали с использованием гомологичной рекомбинации в *E. coli* BJ5183. С этой целью клетки *E. coli* котрансформировали парой плазмид: pZ35 и pShuttle-CMV-EGFP – для получения плазмиды с полноразмерным геномом Ad5/35F с репортерным геном зеленого флуоресцирующего белка (pAd5/35F-EGFP), и pZ35 и pShuttle-CMV-IL2 – для получения плазмиды с полноразмерным геномом Ad5/35F с геном интерлейкина-2 человека (pAd5/35F-IL2). Перед трансформацией плазмиды pZ35 и челночные векторы с целевыми генами (pShuttle-CMV-EGFP и pShuttle-CMV-IL2) линеаризовали рестриктазами PacI и PmeI соответственно. В челночных векторах целевые гены (EGFP и IL2) находились под контролем промотора цитомегаловируса человека. Рекомбинантные клоны анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рестрикционного картирования. Рекомбинантные модифицированные аденовекторы Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2 получали путем липофекции плазмидных конструкций (pAd5/35F-EGFP и pAd5/35F-IL2) в клетки пакующей линии НЕК-293 с использованием реагента Metafectene Pro («Biontex», Германия) согласно прилагаемой методике. Рекомбинантные аденовирусы накапливали в клетках линии НЕК-293 и детектировали по развитию характерного цитопатического эффекта. Присутствие целевых генов и модификацию фибера подтверждали методами ПЦР и рестрикционного картирования. Рекомбинантные модифицированные аденовирусы очищали и концентрировали ультрацентрифугированием лизатов зараженных клеток в градиенте плотности хлористого цезия. Концентрацию аденовируса в очищенном препарате определяли спектрофотометрически ($\lambda = 260$ нм), используя коэффициент пересчета 1 о.е. = 1.12×10^{12} вирусных частиц/мл. Титр аденовирусных препаратов определяли методом бляшкообразования на клетках линии НЕК-293.

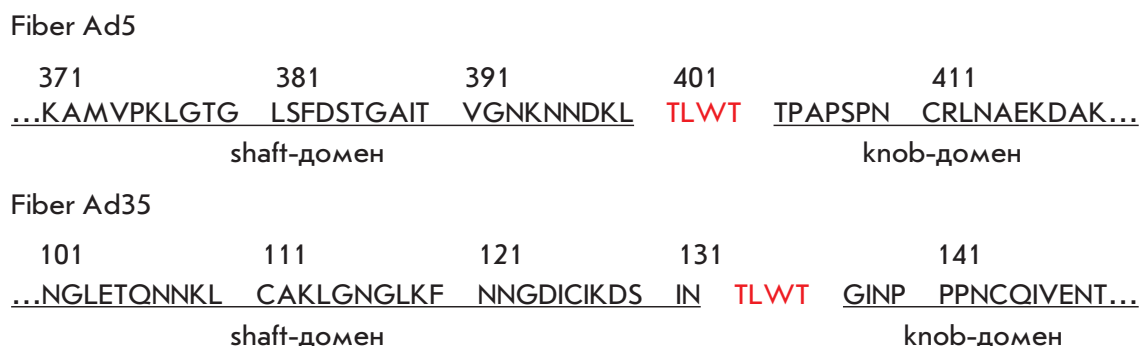


Рис. 1. Аминокислотные последовательности С-концевых областей фибров аденовирусов человека серотипов 5 и 35.

Определение физической стабильности модифицированных аденовирионов

Физическую стабильность модифицированных аденовирусов оценивали на модели Ad5/35F-EGFP, определяя его термостабильность, как описано ранее [11].

Трансдукция рекомбинантными аденовирусами линий KG-1A и U937 опухолевых клеток крови человека

Линии клеток KG-1A и U937 рассеивали в 48-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 клеток на лунку. Клетки лейкоцитарной фракции ККМ человека, полученные от здорового донора, выделяли путем двойного центрифугирования в градиенте плотности коммерческого препарата Histopaque-1083 («Sigma-Aldrich», Германия) согласно прилагаемой методике и рассеивали в 48-луночные планшеты по 5×10^4 клеток на лунку. На следующий день клетки инфицировали рекомбинантными модифицированными аденовирусами Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2, а также контрольными аденовирусами с фибрами вируса дикого типа и с аналогичными целевыми генами – Ad5-EGFP и Ad5-IL2, в дозе 5×10^3 , 10^4 и 5×10^4 вирусных частиц на клетку.

Анализ эффективности проникновения аденовирусов в клетки и уровня экспрессии целевого гена

Эффективность проникновения рекомбинантных аденовирусов Ad5-EGFP и Ad5/35F-EGFP в клетки оценивали через 48 ч после заражения с помощью флуоресцентной микроскопии зараженных клеток по интенсивности флуоресценции EGFP.

Уровень экспрессии гена IL2 человека в клетках, инфицированных Ad5-IL2 и Ad5/35F-IL2, оценивали через 48 ч после заражения, определяя концентрацию IL2 в культуральной среде инфицированных клеток методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора «FlowCytomix BenderMedsys-

tems» (Австрия) согласно прилагаемой методике. Концентрацию IL2 в образцах рассчитывали, используя программу FlowCytomix Pro 2.2.

Определение популяций лейкоцитов ККМ человека, эффективно трансдуцируемых модифицированным аденовирусом

Для определения популяций лейкоцитов ККМ человека, в которые способен проникать модифицированный аденовирус, клетки инфицировали Ad5/35F-EGFP в дозе 10^4 вирусных частиц на клетку. Через 24 ч после заражения методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентно меченных антител против CD45 (общего лейкоцитарного антигена) определяли популяции лейкоцитов ККМ: моноциты, гранулоциты, Т- и В-лимфоциты, а также бластные клетки. Зараженные вирусом клетки детектировали по флуоресценции EGFP и соотносили с соответствующей популяцией лейкоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантных аденовирусов человека серотипа 5 с модифицированными фибрами

Первая технология получения рекомбинантного аденовируса Ad5/35F, описанная Shayakhmetov D.M. и соавт. [6], заключалась в замене центрального (shaft) и С-концевого (knob) доменов фибера Ad5 на аналогичные домены фибера Ad35. Для создания такого модифицированного вируса мы использовали новую технологию, основанную на замене лишь С-концевого knob-домена фибера Ad5 на knob-домен фибера Ad35, так как известно, что сайт связывания Ad35 с молекулой CD46 находится внутри knob-домена фибера [7]. С-Концевой knob- и центральный shaft-домены фибров аденовирусов соединены короткой аминокислотной последовательностью, обеспечивающей относительную подвижность наиболее удаленного

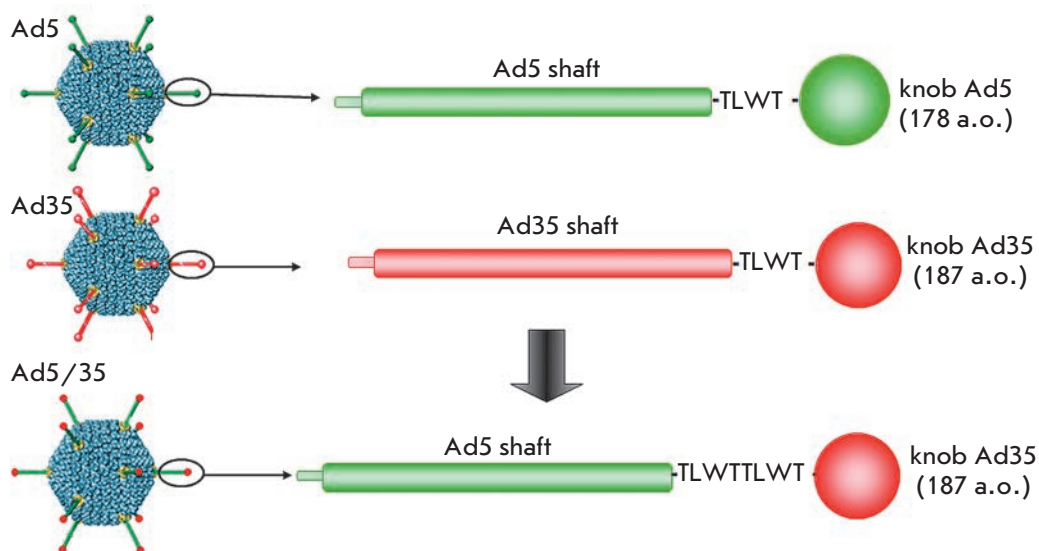


Рис. 2. Схема модификации фибров аденовируса человека серотипа 5 путем замены его С-концевого knob-домена на аналогичный домен фибера аденовируса человека серотипа 35.

от основания пентона knob-домена фибера. Большинство аденовирусов человека содержат в подвижной области между этими доменами консервативную последовательность – треонин–лейцин–триптофан–треонин (TLWT) [12]. На N-конце knob-домена фибров Ad5 и Ad35 также находится эта последовательность (рис. 1).

Таким образом, для корректного соединения shaft-и knob-доменов фибера мы заменили knob-домен фибера Ad5 (178 а.о.) на knob-домен фибера Ad35 (187 а.о.) после последовательности TLWT (рис. 2), чтобы расширить тропизм вируса в отношении CD46-позитивных клеток.

Характеристика рекомбинантных модифицированных аденовирусов Ad5/35F

Рекомбинантные модифицированные аденовирусы Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2 были охарактеризо-

ваны по следующим параметрам: концентрации вирусных частиц в препарате, титру аденовирусного препарата (таблица) и физической стабильности аденовирионов при нагревании (рис. 3). В качестве контроля использовали препараты немодифицированных Ad5, содержащих экспрессирующие кассеты с генами EGFP (Ad5-EGFP) и IL2 человека (Ad5-IL2). Как видно из таблицы, концентрации и титры препаратов модифицированных аденовирусов сопоставимы с аналогичными показателями контрольных препаратов немодифицированных аденовирусов. Таким образом, модификация фибера аденовируса Ad5/35F не повлияла существенно на его репродукцию.

Так как введенная нами модификация фибров аденовирусов могла каким-либо образом отразиться на физической стабильности аденовирионов, мы оценили устойчивость Ad5/35F-EGFP к нагреванию до +37 и +42°C в течение различного времени в сравнении с устойчивостью немодифицированного Ad5-EGFP. Показано, что термостабильность вирионов Ad5/35F-EGFP соизмерима с термостабильностью немодифицированных аденовирионов Ad5-EGFP. Прогревание образцов аденовирусов в течение 30 мин при +37°C не приводило к значимому снижению их инфекционности (рис. 3А). Инкубация аденовирусов при +42°C приводила к инаktivации аденовирионов в обоих образцах – на 11–19% через 15 мин и на 23–45% через 30 мин прогревания (рис. 3Б).

Данные о термостабильности аденовируса Ad5/35F-EGFP свидетельствуют о том, что представленная модификация фибров аденовируса не влияет значительно на его физическую стабильность.

Концентрация и титр рекомбинантных аденовирусов

Вирус	Концентрация, вирусные частицы/мл	Титр, БОЕ/мл
Ad5-EGFP	$(4.82 \pm 0.17) \times 10^{12}$	$(3.80 \pm 0.83) \times 10^{10}$
Ad5/35F-EGFP	$(2.54 \pm 0.21) \times 10^{12}$	$(1.22 \pm 0.34) \times 10^{10}$
Ad5-IL2	$(6.97 \pm 0.19) \times 10^{12}$	$(5.85 \pm 0.76) \times 10^{10}$
Ad5/35F-IL2	$(4.23 \pm 0.17) \times 10^{12}$	$(2.12 \pm 0.26) \times 10^{10}$

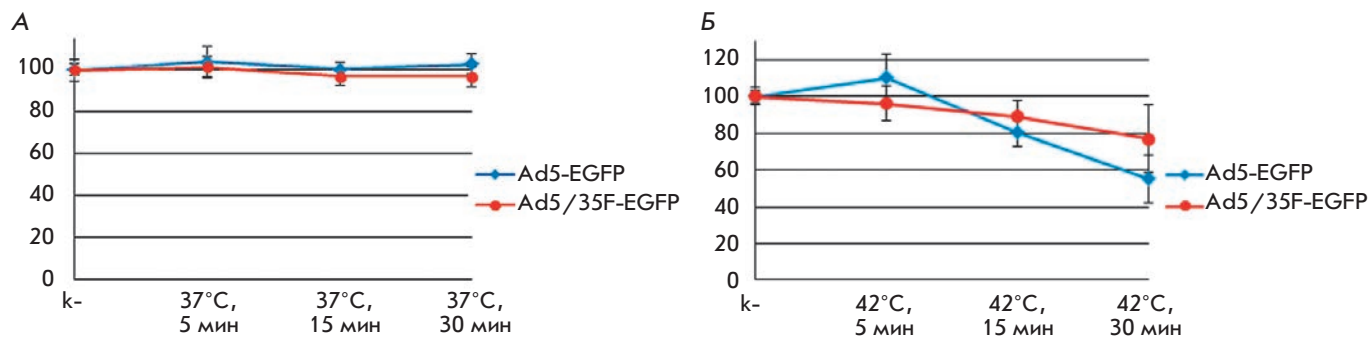


Рис. 3. Термостабильность аденовирионов с модифицированными фиберами (Ad5/35F-EGFP) в сравнении с немодифицированными аденовирионами (Ad5-EGFP). А – Прогревание образцов аденовирусов при +37°C в течение 5, 15 и 30 мин. Б – Прогревание образцов аденовирусов при +42°C в течение 5, 15 и 30 мин. По оси абсцисс – условия прогревания, по оси ординат – относительная эффективность проникновения аденовируса в клетки НЕК-293, оцененная по флуоресценции EGFP, %.

Оценка эффективности доставки генетической информации аденовирусами Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2 в гемопоэтические опухолевые клетки человека линий KG-1A и U937

Для оценки эффективности проникновения аденовирусов Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2 в опухолевые клетки крови человека *in vitro* и определения уровня экспрессии целевых генов в трансдуцированных вирусом клетках были выбраны линии KG-1A (клетки миелоцитарного лейкоза) и U937 (клетки моноцитарного лейкоза), характеризующиеся низким уровнем экспрессии первичного аденовирусного рецептора CAR [13], но высоким уровнем экспрессии CD46 [14]. Множественность инфекции составляла 5×10^3 , 10^4

и 5×10^4 вирусных частиц на клетку. Эффективность проникновения Ad5/35F-EGFP в клетки оценивали по количеству клеток, экспрессирующих репортерный ген EGFP и флуоресцирующих при УФ-облучении ($\lambda = 395$ нм). Показано, что благодаря модификации фибера модифицированный Ad5/35F-EGFP более эффективно, чем немодифицированный вирус, проникал в линии U937 и KG-1A опухолевых клеток гемопоэтического ряда (рис. 4). Полученные результаты согласуются с данными других авторов, изучавших эффективность проникновения модифицированного вируса Ad5/35F-EGFP в опухолевые клетки крови других линий [6] и в первичные клетки лимфоидного и миелоидного лейкоза [15].

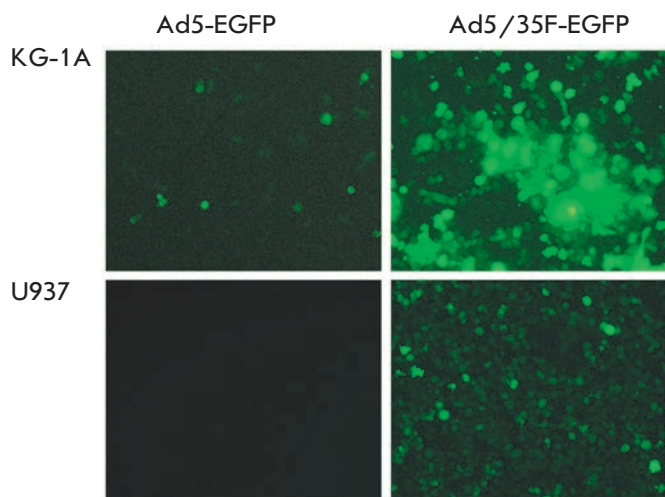


Рис. 4. Эффективность проникновения модифицированного вируса Ad5/35F-EGFP в линии KG-1A и U937 опухолевых клеток крови человека через 48 ч после заражения.

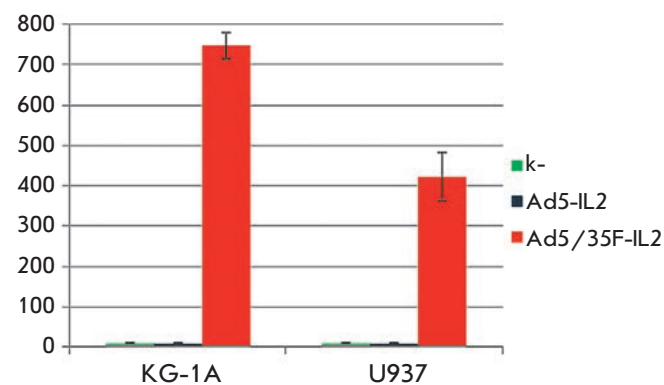


Рис. 5. Уровень экспрессии гена интерлейкина-2 человека в линиях KG-1A и U937 опухолевых клеток крови человека, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами, через 48 ч после заражения. По оси ординат – концентрация интерлейкина-2 в культуральной среде зараженных клеток, пг/мл.

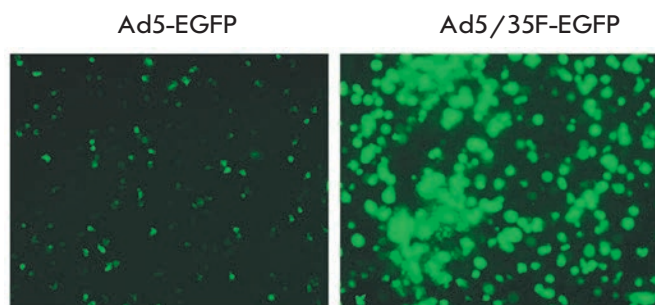


Рис. 6. Эффективность проникновения модифицированного вируса Ad5/35F-EGFP в лейкоциты ККМ человека через 48 ч после заражения.

Эффективность экспрессии гена интерлейкина-2 человека в использованных клеточных линиях, трансдуцированных рекомбинантным модифицированным аденовирусом Ad5/35F-IL2, оказалась значительно выше, чем в клетках, трансдуцированных немодифицированным Ad5-IL2 (рис. 5). Наибольшая концентрация IL2 отмечена в культуральной среде клеток линии KG-1A (748.3 ± 32.8 пг/мл), инфицированных Ad5/35F-IL2. Клетки линии U937, трансдуцированные модифицированным аденовирусом, экспрессировали ген IL2 на уровне 421.5 ± 59.4 пг/мл. Клетки, трансдуцированные немодифицированным вирусом Ad5-IL2, экспрессировали следовые количества IL2.

Эти результаты согласуются с данными об уровне молекул CAR и CD46 – первичных рецепторов для адгезии Ad5 и Ad35, на поверхности исследованных клеточных линий. Известно, что клетки гемопоэтического ряда, в том числе клетки линий KG-1A и U937, являются CAR-негативными [13]. Поэтому вполне логично, что немодифицированные Ad5 практически не проникали в эти клетки, а экспрессия целевых генов в них детектировалась в следовых количествах. В то же время, благодаря высокому уровню экспрессии CD46 на поверхности клеток линий KG-1A и U937 [14] модифицированные Ad5/35F обладали повышенной способностью проникать в эти клетки, что обеспечивало высокий уровень экспрессии целевых генов в них.

Оценка эффективности доставки генетической информации в нормальные лейкоциты красного костного мозга (ККМ) человека рекомбинантными модифицированными аденовирусами

Модифицированный аденовирус Ad5/35F эффективно трансдуцирует CAR-негативные опухолевые клетки крови и обеспечивает экспрессию в них целевых генов, введенных в его геном, поэтому мы реши-

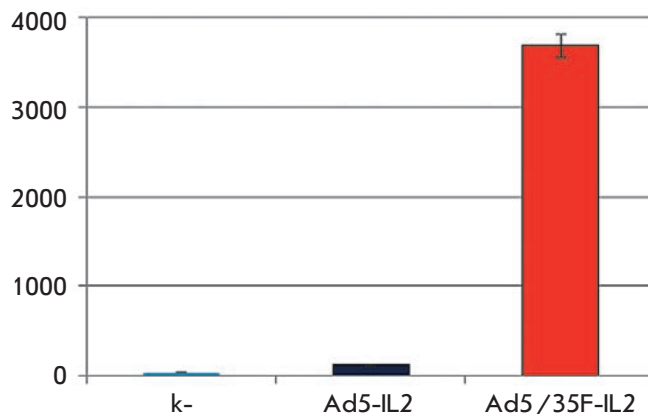


Рис. 7. Уровень экспрессии интерлейкина-2 в лейкоцитах ККМ человека, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами, через 48 ч после заражения.

ли определить эффективность доставки генетической информации аденовекторами – Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2, в клетки лейкоцитарной фракции ККМ, полученного от здорового донора. Этот интерес объясняется возможностью использования модифицированного аденовируса в качестве вектора для эффективной селективной доставки генетической информации в гемопоэтические и иммунокомпетентные клетки человека *ex vivo*. Для этого лейкоциты, выделенные из образца ККМ здорового донора, трансдуцировали модифицированными (Ad5/35F-EGFP и Ad5/35F-IL2) и немодифицированными (Ad5-EGFP и Ad5-IL2) аденовекторами в различных дозах. В результате было показано, что модифицированный вектор Ad5/35F-EGFP более эффективно, чем Ad5-EGFP, проникал в лейкоциты ККМ, о чем свидетельствует интенсивная флуоресценция 80% всех клеток, обусловленная экспрессией EGFP (рис. 6). При трансдукции клеток векторами с целевым геном IL2 в культуральной среде клеток, инфицированных модифицированным Ad5/35F-IL2, концентрация IL2 составила 3682.52 ± 134.21 пг/мл, что приблизительно в 30 раз превысило концентрацию IL2 в культуральной среде лейкоцитов, трансдуцированных немодифицированным Ad5-IL2 (рис. 7).

Учитывая, что клетки лейкоцитарной фракции ККМ содержат множество разнородных популяций клеток, мы решили определить популяции лейкоцитов, в которые эффективно проникает модифицированный аденовирус.

Лейкоциты ККМ были инфицированы модифицированным Ad5/35F-EGFP в дозе 5×10^4 вирусных частиц на клетку. Спустя 24 ч после заражения методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентно меченных антител против общего

лейкоцитарного антигена – CD45, по распределению популяций лейкоцитов по размеру клеток и по уровню экспрессии антигена CD45, а также по флуоресценции инфицированных клеток, обусловленной экспрессией репортерного гена *EGFP*, были выявлены популяции клеток, эффективно трансдуцируемые модифицированным аденовирусом (рис. 8). Как и ожидалось, Ad5/35F-EGFP хорошо проникал в моноциты ККМ (32.66% EGFP-положительных клеток), что подтверждает ранее полученные данные [16], а также трансдуцировал гранулоциты (42.86% EGFP-положительных клеток) и бластные клетки (27.24% EGFP-положительных клеток), что показано впервые. В то же время эффективность проникновения модифицированного аденовируса Ad5/35F-EGFP в субпопуляции Т- и В-лимфоцитов ККМ человека была низкой (0.71% EGFP-положительных клеток). Данные об эффективной трансдукции модифицированным аденовирусом Ad5/35F-EGFP популяций моноцитов, гранулоцитов и бластных клеток согласуются с сообщениями о высоком уровне экспрессии CD46 в популяциях этих клеток [17]. Однако, несмотря на данные об уровне транскрипции гена *CD46* в Т- и В-лимфоцитах, сравнимом с уровнем в клетках миелоцитарной ветви дифференцировки [17, 18], модифицированный аденовирус не проникал эффективно в лимфоциты. Возможно, этот факт может быть обусловлен специфической регуляцией экспрессии *CD46* на уровне белка.

ВЫВОДЫ

С использованием оригинальной модификации, заключающейся в замене С-концевого knob-домена фибера Ad5 на аналогичный домен фибера Ad35, получен рекомбинантный Ad5, содержащий модифицированный фибер и несущий ген *IL2* человека. На культурах линий KG-1A и U937 опухолевых клеток крови человека показано многократное увеличение эффективности проникновения этого вектора в клетки по сравнению с немодифицированным вектором. В опытах по трансдукции первичной культуры лейкоцитов ККМ здорового донора впервые показано 30-кратное увеличение эффективности проникновения модифицированного вектора в сравнении с немодифицированным, что обеспечивает в них экспрессию гена интерлейкина-2 челове-

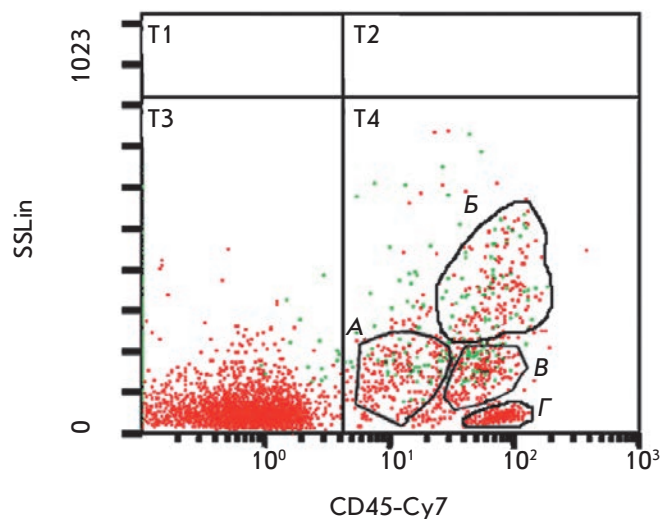


Рис. 8. Определение популяций лейкоцитов ККМ человека, эффективно трансдуцируемых рекомбинантным модифицированным аденовирусом Ad5/35F-EGFP. Зеленым отмечены инфицированные аденовирусом клетки (флуоресцирующие). А – Бластные клетки; Б – гранулоциты; В – моноциты; Г – лимфоциты.

ка. Наряду с эффективной трансдукцией моноцитов ККМ [16] впервые показано, что модифицированный Ad5/35F эффективно трансдуцирует гранулоциты и бластные клетки ККМ человека, в то время как в субпопуляции Т- и В-лимфоцитов этот вектор не проникает.

Основываясь на результатах нашей работы, можно полагать, что полученный нами модифицированный аденовирус Ad5/35F-IL2 может использоваться в качестве вектора для эффективной доставки гена интерлейкина-2 человека и применения его в генной терапии лейкозов различного типа, а также для создания генно-инженерных вакцин, которые способны эффективно доставлять гены антигенов различных патогенов непосредственно в иммунокомпетентные клетки, в том числе и дендритные, являющиеся профессиональными антиген-презентирующими клетками [19]. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (ГК № 02.512.11.2320).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tang D.C., Jennelle R.S., Shi Z., Garver R.I., Carbone D.P., Loya F., Chang C.H., Curiel D.T. // Hum. Gene Ther. 1997. V. 8. № 17. P. 2117–2124.
2. Tang D.C., Johnston S.A., Carbone D.P. // Cancer Gene Ther. 1994. V. 1. № 1. P. 15–20.
3. Gall J., Kass-Eisler A., Leinwand L., Falck-Pedersen E. // J. Virol. 1996. V. 70. № 4. P. 2116–2123.
4. Krasnykh V.N., Mikheeva G.V., Douglas J.T., Curiel D.T. // J. Virol. 1996. V. 70. P. 6839–6846.
5. Stevenson S.C., Rollence M., Marshall-Neff J., McClelland A. // J. Virol. 1997. V. 71. № 6. P. 4782–4790.

6. Shayakhmetov D.M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G., Lieber A. // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 2567–2583.
7. Zhang Y., Bergelson J.M. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 19. P. 12125–12131.
8. Melief C.J., Offringa R. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 5236–5244.
9. Shmarov M.M., Cherenova L.V., Shashkova E.V., Logunov D.Iu., Verkhovskaia L.V., Kapitonov A.V., Neugodova G.L., Doronin K.K., Naroditskii B.S. // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2002. V. 2. P. 30–35.
10. Logunov D.Y., Zubkova O.V., Karyagina-Zhulina A.S., Shuvalova E.A., Karpov A.P., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Alyapkina Y.S., Grezina N.M., Zinovieva N.A., Ernst L.K., Gintsburg A.L., Naroditsky B.S. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 18. P. 9641–9652.
11. Рогожин В.Н., Белоусова Р.В., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Лунин В.Г., Народицкий Б.С. // *Вет. медицина.* 2011. № 2. С. 10–13.
12. Guardado-Calvo P., Llamas-Saiz A.L., Fox G.C., Langlois P., van Raaij M.J. // *J. Gen. Virol.* 2007. № 88. Pt 9. P. 2407–2416.
13. Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T. // *Mol. Ther.* 2003. V. 8. № 5. P. 813–821.
14. Gaggar A., Shayakhmetov D.M., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Lieber A. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 12. P. 7503–7513.
15. Nilsson M., Ljungberg J., Richter J., Kiefer T., Magnusson M., Lieber A., Widegren B., Karlsson S., Fan X. // *J. Gene Med.* 2004. V. 6. № 6. P. 631–641.
16. Segerman A., Lindman K., Mei Y.F., Allard A., Wadell G. // *Virology.* 2006. V. 349. № 1. P. 96–111.
17. Christmas S.E., de la Mata Espinosa C.T., Halliday D., Buxton C.A., Cummerson J.A., Johnson P.M. // *Immunology.* 2006. V. 119. № 4. P. 522–528.
18. Wang G., Liszewski M.K., Chan A.C., Atkinson J.P. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. № 4. P. 1839–1846.
19. Wang H., Liu Y., Li Z., Tuve S., Stone D., Kalyushniy O., Shayakhmetov D., Verlinde C.L., Stehle T., McVey J., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 21. P. 10567–10579.