

УДК 57.087

Репортерные трансгены для мониторинга противоопухолевой эффективности рекомбинантных онколитических вирусов

А. В. Семенова*, Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева, А. П. Агафонов, Г. В. Кочнева

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

*E-mail: tkacheva_av@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2022

Принята к печати 05.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11719

РЕФЕРАТ Точное измерение размеров опухоли, включая локализацию ее края, имеет существенное значение для успешной онкотерапии. За последнее десятилетие увеличилось число доступных неинвазивных методов визуализации внутренних структур организма, среди которых оптическая визуализация с использованием нерадиоактивных субстратов, визуализация глубоких тканей с использованием радиоактивных субстратов, магнитно-резонансная томография. Важнейшую роль среди инструментов визуализации играют репортерные гены, экспрессия которых в опухолях и метастазах позволяет отслеживать динамику опухолевого процесса, а также эффективность терапии. В качестве вектора для доставки репортерных генов в опухолевые клетки часто выбирают онколитические вирусы, поскольку они обладают онкоспецифичностью, инфицируют и лизируют опухолевые клетки, практически не повреждая нормальные. Выбор репортерных трансгенов для генно-инженерной модификации онколитических вирусов зависит от задач исследования и методов визуализации. Оптические методы визуализации подходят для исследований *in vitro* и на мелких животных, методы визуализации глубоких тканей применяют для оценки виротерапии у крупных животных и человека. Для оптической визуализации используются трансгены флуоресцентных белков, люцифераз и тирозиназ; для визуализации глубоких тканей наиболее перспективным считается трансген симпортера йодида натрия (NIS), который обеспечивает накопление радиоактивных изотопов в инфицированных вирусом опухолевых клетках. В настоящее время NIS является единственным репортерным трансгеном, показавшим свою эффективность в мониторинге виротерапии опухолей не только в доклинических, но также и в клинических исследованиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА онколитические вирусы, репортерные трансгены, оптическая визуализация, опухолевая клетка, визуализация глубоких тканей, NIS.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ADV – аденовирус; HSV-1 – вирус простого герпеса типа I; MV – вирус кори; NDV – вирус болезни Ньюкасла; NIS – симпортер йодида натрия; VACV – вирус осповакцины; VSV – вирус везикулярного стоматита; КТ – компьютерная томография; МРТ – магнитно-резонансная томография; ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день использование онколитических вирусов является одним из наиболее многообещающих направлений в лечении онкологических заболеваний. Большое преимущество онколитической виротерапии состоит в том, что онколитические вирусы способны специфически нацеливаться на опухолевые клетки и лизировать их, не повреждая при этом здоровую ткань, в течение всего курса лечения [1]. Онколитические вирусы преодолевают

гетерогенность клеток опухоли, они способны лизировать опухолевые стволовые клетки, которые практически не поддаются другим видам онкотерапии [2]. Иммуносупрессивное микроокружение опухоли, которое препятствует эффективной иммунотерапии, напротив, способствует репликации вируса, как и нарушение сигнальных путей интерфероновой защиты в опухолевых клетках [3]. При этом успешная репликация вируса в опухоли непреднамеренно делает опухоль более иммуногенной за счет испускаемых

инфицированными клетками патогенассоциированных сигналов опасности (PAMP, DAMP). При лизисе опухолевых клеток происходит также высвобождение опухолеассоциированных неоантигенов и формирование адаптивного Т-клеточного ответа на эти антигены [4]. Онколитические вирусы могут действовать синергично с другими противоопухолевыми препаратами, в частности, с ингибиторами контрольных точек (ипилимумаб, атезолизумаб, ниволумаб и др.) и CAR Т-клеточной терапией [1, 5, 6].

Онколитическими свойствами обладают как природные, так и генетически модифицированные штаммы вирусов разных таксономических групп. Встройка трансгенов позволяет направленно изменять свойства онколитических вирусов, усиливая их онкоспецифичность [7], способность к распространению внутри опухоли [8], иммуностимулирующую [9–11] и цитолитическую активность [12, 13]. Особое место в генетической модификации вирусов принадлежит трансгенам репортерных белков, которые могут использоваться для неинвазивного инструментального мониторинга противоопухолевой и антиметастатической активности вируса, а также его безопасности для других органов и тканей организма [14, 15].

Неинвазивные визуализирующие исследования имеют важнейшее значение в диагностике и ведении пациентов с онкологическими заболеваниями [16]. Эффективность противоопухолевой терапии напрямую зависит от того, насколько своевременно и точно будут выявлены опухолевые узлы и метастазы, а мониторинг реакции опухоли на терапию может помочь в выборе оптимальной схемы лечения. Поскольку экспрессия репортерного трансгена связана с вирусной репликацией, визуализация может использоваться в доклинических и клинических исследованиях в качестве раннего индикатора терапевтического действия онколитических вирусов [17]. Неинвазивная визуализация всего организма экспериментального животного в нескольких временных точках поможет оценить эффективность доставки вируса в интересующие ткани, а также позволит контролировать и количественно оценивать инфекцию и экспрессию терапевтических трансгенов на протяжении всего курса лечения.

Методы визуализации можно разделить на следующие категории: оптическая визуализация с использованием нерадиоактивных субстратов, визуализация глубоких тканей с использованием радиоактивных субстратов, магнитно-резонансная томография (рис. 1). В следующих разделах мы сосредоточимся на наиболее изученных репортерных трансгенах онколитических вирусов, используемых в разных методах неинвазивной визуализации.

ОПТИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

Оптическая визуализация основана на использовании света в инфракрасном, видимом или ультрафиолетовом спектре, поэтому она лучше всего подходит для визуализации поверхности, а не глубоких тканей. Методы оптической визуализации, применяемые для детекции репортерных трансгенов онколитических вирусов, включают флуоресцентную, биолюминесцентную и фотоакустическую визуализацию (рис. 1). Глубина возможной визуализации при использовании оптических методов варьирует в достаточно широких пределах – от долей миллиметра до нескольких сантиметров – и зависит как от выбранного метода, так и от поглощения и рассеяния возбуждающего и/или испускаемого света окружающими тканями.

Флуоресцентная визуализация

Для флуоресценции необходимо, чтобы падающий свет с соответствующей длиной волны возбуждения достиг флуорофора, в результате чего флуорофор испускает фотон с определенной длиной волны излучения. Испускаемые фотоны обнаруживают с помощью высокочувствительной CCD-камеры, установленной в светонепроницаемом боксе.

В качестве репортерных генов для флуоресцентной визуализации используются гены, кодирующие флуоресцентные белки, такие, как зеленый флуоресцентный белок (GFP) и его усиленные варианты, красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), mCherry и многие другие [18, 19].

GFP, впервые выделенный из медузы *Aequorea victoria* в 1960 г. [20], быстро стал одним из белков, наиболее широко изучаемых и используемых в биохимии и клеточной биологии [21]. Использование этого белка обусловлено его способностью генерировать хорошо видимый, эффективно излучающий внутренний флуорофор. Однако чувствительность репортерной системы GFP ограничена отсутствием усиления, поскольку каждая молекула GFP, продуцируемая репортерной системой, производит только один флуорофор. Подсчитано, что концентрация природных немодифицированных молекул GFP должна составлять 1 мкМ для того, чтобы сравняться с эндогенной аутофлуоресценцией типичной клетки млекопитающих [22]. Мутантные (усовершенствованные) GFP с улучшенными коэффициентами угасания увеличивают эффективность визуализации в 6–10 раз [23], что позволяет преодолевать ограничения, связанные с клеточной аутофлуоресценцией.

Наибольшую прозрачность ткани млекопитающих имеют в так называемом «ближнем инфракрасном окне прозрачности» (near-infrared, NIR)

($\lambda \sim 650\text{--}900$ нм) [24]. Поглощение света гемоглобином, водой, липидами и меланином минимально в ближней инфракрасной области спектра, поэтому свет NIR-диапазона обладает большей проникающей способностью, чем видимый свет. Кроме того, аутофлуоресценция биологических тканей и светорассеяние также существенно меньше в области NIR по сравнению с видимой областью. В настоящее время получают флуоресцентные белки, излучающие свет NIR-диапазона, с целью улучшения глубины флуоресценции *in vivo* [25]. Один из примеров таких белков – новые флуоресцентные белки ближнего инфракрасного диапазона (iRFP), разработанные на основе бактериальных фитохромных фоторецепторов [26]. Белки iRFP обеспечивают тканеспецифический контраст без необходимости доставки каких-либо дополнительных веществ. По сравнению с обычными GFP-подобными флуоресцентными белками с красным смещением iRFP670 и iRFP720 демонстрируют более сильные фотоакустические сигналы на более длинных волнах, их можно спектрально отличить как друг от друга, так и от гемоглобина. Кроме того, для образования хромофоров белкам iRFP670 и iRFP720 не требуется кислород, что дает им преимущество при визуализации опухолей, для которых характерно состояние гипоксии [27, 28].

Сконструирован ряд рекомбинантных онколитических вирусов, включая вирус болезни Ньюкасла (NDV), вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус простого герпеса I типа (HSV-1, в новой таксономии вирусов – *Human alphaherpesvirus 1*), вирус кори (MV), аденовирус (ADV) и вирус осповакцины (VACV), кодирующих трансгены флуоресцентных белков. Эти вирусы с целью непосредственной оценки эффективности вирусной онкотерапии протестировали на различных модельных опухолях, а также использовали в качестве дополнительного контроля для оценки эффектов других технологий визуализации [29–31]. Один из онколитических вирусов, а именно вирус осповакцины, кодирующий трансген GFP (GLV-1h68), в настоящее время проходит фазы I и II клинических исследований, в которых флуоресценция GFP используется для подтверждения локализации вируса в поверхностных опухолевых поражениях, а также в биопсийном материале внутренних опухолей (табл. 1) [32].

Группа японских ученых использовала онколитический аденовирус, экспрессирующий трансген GFP (штамм ОВП-401), с целью изучения новой технологии хирургии под флуоресцентным контролем (Fluorescence-guided surgery, FGS) для точной навигации опухоли у мышей [33]. Известно, что хирургическая резекция по-прежнему остается наиболее

эффективным методом при большинстве солидных опухолей, однако даже при радикальном удалении злокачественных опухолей часто возникают рецидивы, что в ряде случаев может быть обусловлено сложностью правильной визуализации края опухоли [34, 35]. Предварительное введение флуоресцирующего онколитического вируса может обеспечить интраоперационный флуоресцентный контроль в режиме реального времени и идеально подходит для точного и полного удаления злокачественных клеток, а также позволяет дополнительно уменьшить область резекции за счет лизиса опухоли. Kishimoto и соавт. использовали ОВП-401 для резекции методом FGS ксенотрансплантата глиобластомы человека в ортотопической мышинной модели. Показано, что использование флуоресцирующего онколитического вируса способно обеспечить точную резекцию глиобластомы с нечетким контуром методом FGS с сохранением функции головного мозга и отсутствием рецидивов в течение более 120 дней, в то время как у 85% мышей с опухолью, удаленной стандартным хирургическим путем, наблюдались рецидивы. Штамм ОВП-401 использовали также для исследования эффективности технологии FGS в мышинных моделях диссеминированного рака толстой кишки, легкого и саркомы мягких тканей [36].

Биолюминесцентная визуализация

В отличие от флуоресценции, биолюминесцентная визуализация не требует возбуждающего света для испускания фотонов флуорофором. Свет образуется при окислении субстратов биолюминесцентным репортерным ферментом, ген которого можно клонировать в геном онколитического вируса. Метод биолюминесценции в сравнении с флуоресценцией обладает более высокой чувствительностью (достаточно всего 10^{-17} М люциферазы) и более низкой фоновой люминесценцией [37, 38].

Люцифераза светлячка (*Photinus pyralis*, FLuc) является наиболее широко используемым репортерным ферментом для биолюминесценции [39]. В качестве субстрата FLuc используется *D*-люциферин вместе с кофакторами АТФ, Mg^{2+} и O_2 . FLuc катализирует образование комплекса люциферин–АТФ, окисление которого приводит к образованию высокоэнергетического оксилуциферина. Оксилуциферин испускает фотоны желто-зеленого спектра ($\lambda_{max} \sim 560$ нм) [40]. Световое излучение достигает пика через 10–12 мин после инъекции люциферина и постепенно снижается в течение следующих 60 мин [41]. Кроме этого, известны АТФ-независимые люциферазы, такие, как люцифераза морских анютиных глазок (*Renilla reniformis*, RLuc) [42], морской копеподы (*Gaussia princeps*, GLuc) и жука-щелкуна

(*Pyrophorus plagiophthalmus*) [43]. RLuc и GLuc используют в качестве субстрата коэлютеразин (CTZ), испускают в основном синий свет ($\lambda_{\text{max}} \sim 460\text{--}480$ нм), который хуже проникает в ткани, чем желто-зеленый свет FLuc [44]. К дополнительным недостаткам АТФ-независимых люцифераз относятся их ограниченное распространение, быстрая кинетика и более высокий фоновый шум [37]. Постоянно продолжается разработка новых вариантов ферментов и субстратов с улучшенной биолюминесценцией. Примером нового варианта фермента является NanoLuc ($\lambda_{\text{max}} \sim 460$ нм), ген которого имеет уменьшенную кодирующую последовательность. Это единственный вариант биолюминесцентного трансгена для онколитических вирусов с маленькой емкостью генома, таких, как аденоассоциированный вирус и другие парвовирусы [45]. Использование нескольких типов люцифераз позволяет одновременно отслеживать различные, но связанные между собой, биологические события. В частности, широко используется прием маркировки опухолевых клеток и онколитического вируса люциферазами разного типа с целью выявления противоопухолевой и антиметастатической активности вируса в экспериментах *in vivo* [46].

Первым онколитическим вирусом, для изучения свойств которого применили биолюминесценцию, стал вирус простого герпеса I типа (HSV-1) [47]. С использованием рекомбинантных вариантов HSV-1, экспрессирующих трансгены FLuc или RLuc, на мышинных моделях показано, что FLuc обеспечивает более эффективный мониторинг вирусной инфекции, чем RLuc [48]. Лечение инфицированных вирусом мышей противовирусным препаратом валацикловир вызывало дозозависимое снижение сигнала FLuc, что показало возможность количественной оценки эффективности противовирусной терапии с помощью биолюминесценции на животных моделях [48]. Для получения более полных количественных данных биолюминесценцию сочетают с визуализацией органов животных *ex vivo* и определением

в них абсолютной вирусной нагрузки методом ПЦР/ОТ-ПЦР в реальном времени [49].

Биолюминесцентную визуализацию успешно использовали для определения эффекта комбинированной терапии мышинных опухолей онколитическим вирусом осповакцины совместно с блокадой иммунных контрольных точек [50], а также для отслеживания внутриопухолевой репликации онколитических парвовирусов, аденовирусов, HSV-1, вируса осповакцины, вируса кори и вируса везикулярного стоматита на мышинных моделях (табл. 1) [37].

Фотоакустическая визуализация

Фотоакустическая, или оптоакустическая визуализация, представляет собой недавно разработанный метод визуализации, который использует фотоакустический эффект, полученный от облучения ткани-мишени короткоимпульсным лазером. Ткань в зависимости от ее физических свойств поглощает различное количество света, что вызывает молекулярную вибрацию и возникновение термоупругого расширения [24, 51]. Акустические волны, возникающие в результате этого процесса, подвергаются меньшему рассеянию, чем фотоны, когда они проходят через ткань, что значительно увеличивает глубину изображения [24]. Иногда для повышения молекулярной специфичности фотоакустической визуализации используют контрастные агенты [52].

На сегодняшний день в экспериментах с фотоакустической визуализацией использовали только один онколитический вирус, вирус осповакцины, экспрессирующий ключевые гены выработки меланина – ген тирозиназы (Tyr) и гены родственных тирозиназе белков 1 (Tyrp1) и 2 (Tyrp2) (табл. 1) [53]. Меланин является идеальным контрастным веществом для фотоакустической визуализации, а экспрессия и накопление меланина в опухолях позволяют использовать фотоакустическую визуализацию в экспериментах по онкотерапии на животных моделях [53]. Однако высокие концентрации

Таблица 1. Репортерные трансгены онколитических вирусов

Метод визуализации		Репортерный трансген	Онколитические вирусы, кодирующие репортерный трансген	Ссылка
Оптическая визуализация	Флуоресцентная визуализация	Флуоресцентные белки (GFP, eGFP, iRFP)	NDV, MV, HSV-1, ADV, VACV (GLV-1h68), VSV	[14, 29, 55]
	Биолюминесцентная визуализация	Люциферазы (FLuc, RLuc и GLuc)	HSV-1, VACV, ADV, MV	[47, 50, 56, 57]
	Фотоакустическая визуализация	Ферменты меланогенеза (Tyr, Tyrp1, Tyrp2)	VACV	[53]
Визуализация глубоких тканей	ОФЭКТ и ПЭТ	Ферменты (HSV1-tk)	VSV, ADV, HSV-1	[58–60]
	ПЭТ	Рецепторы (SSTR2)	ADV, VACV	[61, 62]
	ОФЭКТ и ПЭТ	Белки-переносчики (NET, NIS)	ADV, VACV, HSV-1, MV	[63–70]
	МРТ	Ферменты меланогенеза (Tyr)	VACV	[53]

меланина ингибируют репликацию вируса, поэтому с целью уменьшения этого ингибирующего эффекта при конструировании онколитических вирусов для экспрессии трансенов группы Туг используется индуцибельная система, регулируемая доксициклином [54]. Сложность выбора трансенов для фотоакустической визуализации пока ограничивает использование этого метода в области онколитической виротерапии, несмотря на его высокую разрешающую способность.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГЛУБОКИХ ТКАНЕЙ

Переход от *in vitro* исследований и доклинических исследований к клиническим испытаниям требует соответствующих трансляционных моделей на животных для адекватной оценки безопасности и эффективности. С этой целью необходимо использовать крупных животных, физиологически близких к человеку, таких, как собаки, свиньи, приматы, поскольку они лучше предсказывают клиническую картину терапии, чем мелкие животные, такие, как мыши и крысы [71]. Методы оптической визуализации, используемые на мелких животных, не применимы к крупным животным, потому что видимый свет не может проникать в ткани крупных животных [18, 72]. Необходимы методы визуализации глубоких тканей, такие, как однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) (рис. 1) [73].

Получение изображений методами ядерной визуализации (ПЭТ, ОФЭКТ) основано на распознавании и локализации гамма-лучей, испускаемых при распаде радиоактивного индикатора, введенного в организм пациента и специфически накапливающегося в различных органах и тканях [74]. В результате наблюдений за тем, как клетка реагирует на введение радиоактивного препарата, как этот препарат накапливается и как выводится, специалисты могут сделать вывод о состоянии здоровья исследуемого органа и о его метаболической активности. Пространственно-временная картина распределения радиофармпрепарата дает представление о форме, размерах и положении органа, а также о наличии в нем патологических очагов [16].

В ОФЭКТ применяются радиофармпрепараты, меченные радиоизотопами, ядра которых при каждом акте радиоактивного распада испускают только один гамма-квант (фотон). В ПЭТ используются радиоизотопы, испускающие позитроны, которые, в свою очередь, при аннигиляции с электроном испускают два гамма-кванта, разлетающиеся в разные стороны вдоль одной прямой, что увеличивает чувствительность ПЭТ по сравнению с ОФЭКТ

[75]. ОФЭКТ и ПЭТ часто сочетаются с компьютерной томографией (КТ) для совместной регистрации анатомических и функциональных изображений. При этом большой набор детекторов, расположенных вокруг исследуемого объекта при ПЭТ, и компьютерная обработка сигналов с них позволяют выполнить более точную трехмерную реконструкцию распределения радионуклида в сканируемом объекте по сравнению с ОФЭКТ [16].

В МРТ используются сильные магнитные поля и радиоволны для возбуждения ядерно-спинового энергетического перехода молекул водорода. Ядра атомов водорода присутствуют в огромном количестве в человеческом теле в составе воды и других веществ. Скорость релаксации ядерных атомов водорода из возбужденного состояния зависит от плотности ткани, и это различие позволяет получать изображения с достаточно высоким разрешением [76]. К недостаткам МРТ относятся высокая стоимость аппаратов и время, необходимое для получения изображений (15–90 мин).

Большинство трансенов онколитических вирусов, используемых для визуализации глубоких тканей, можно тестировать различными методами в зависимости от субстрата. Эти трансены кодируют тимидинкиназу вируса герпеса (HSV1-tk), рецептор соматостатина 2 (hSSTR2), ферменты, катализирующие синтез меланина (тирозиназа), а также такие белки-переносчики, как транспортер норэпинефрина человека (hNET) и симпортер йодида натрия (NIS) [14, 63, 73].

Репортерные трансены ферментов

Одним из первых репортерных генов, предложенных для неинвазивной радионуклидной визуализации, был ген тимидинкиназы вируса простого герпеса 1-го типа (HSV1-tk), продукт которого, тимидинкиназа, фосфорилирует тимидин до тимидин-5'-монофосфата. В отличие от тимидинкиназы 1-го типа млекопитающих, которая имеет высокое сродство преимущественно к тимидину, HSV1-tk проявляет специфичность к различным нуклеозидам. Например, HSV1-tk способна фосфорилировать как пиримидиновые аналоги (5-йод-2-фтор-2'-дезоксид-β-D-арабинофуранозилурацил – FIAU, 2-фтор-2'-дезоксидарабинофуранозил-5-этилурацил – FEAU, бромвинилдезоксидуридин – BVdU), так и ациклоуанозиновые производные (ацикловир – ACV, ганцикловир – GCV, 9-[4-фтор-3-(гидроксиметил)-бутил]гуанин – FHBG). HSV1-tk специфически взаимодействует с радиоактивно меченными аналогами пиримидина, превращая их в метаболит, не способный выйти из клетки, в результате чего происходит накопление преобразованного радиоактивного

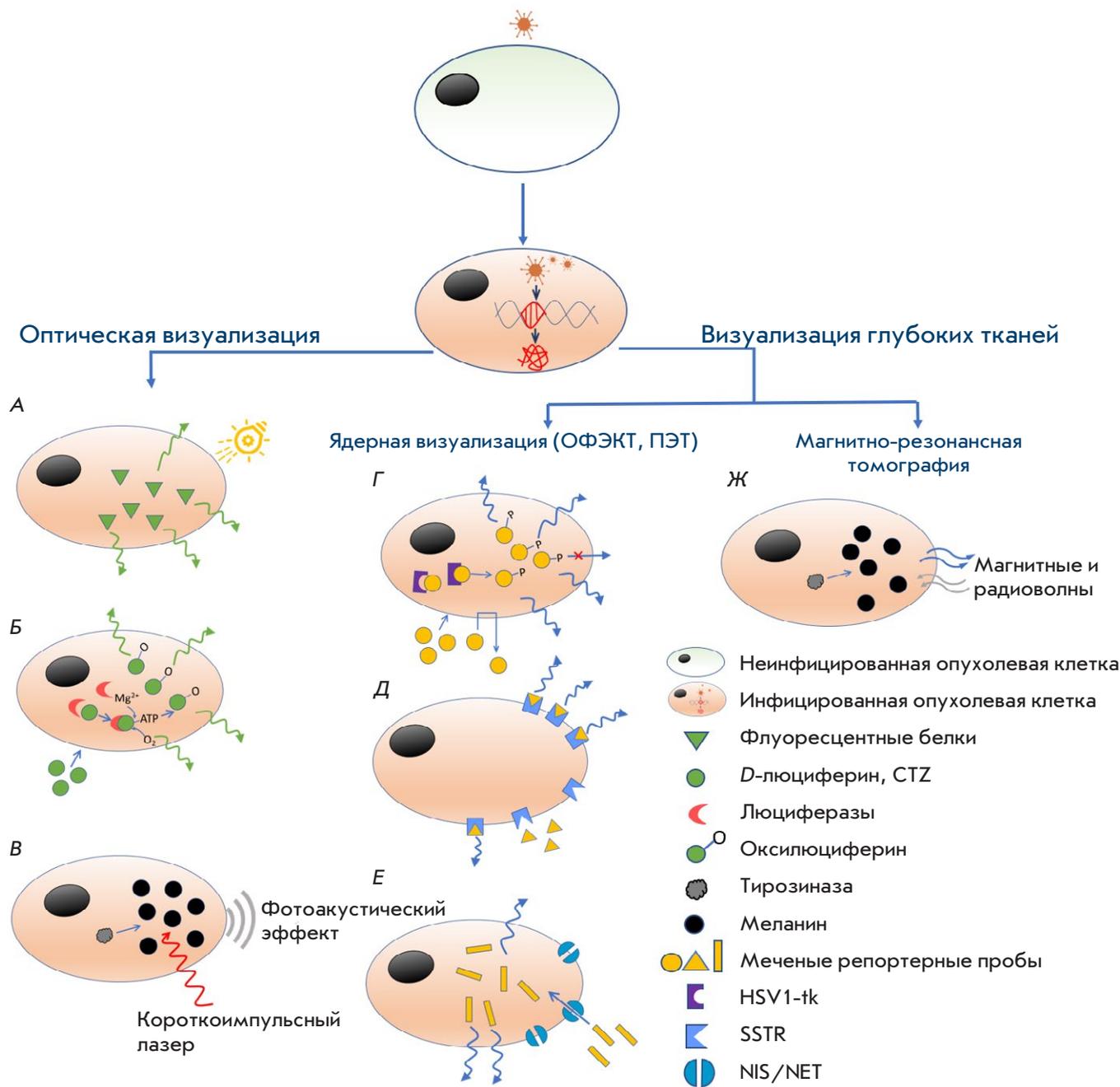


Рис. 1. Методы визуализации опухолевых клеток с использованием онколитических вирусов, экспрессирующих трансгены репортерных белков. Методы оптической визуализации: А – флуоресцентная визуализация, облучение светом с определенной длиной волны возбуждает флуоресценцию белка, способного испускать фотоны; Б – биOLUMИнесцентная визуализация, свет испускается при окислении экзогенных субстратов биOLUMИнесцентным репортерным ферментом; В – фотоакустическая визуализация, фотоакустический эффект, полученный от облучения ткани-мишени короткоимпульсным лазером. Методы визуализации глубоких тканей (Г–Е) – ОФЭКТ, ПЭТ; Ж – МРТ; Г – фермент HSV1-tk взаимодействует с радиоактивно мечеными субстратами, превращая их в метаболит, не способный выйти из клетки; Д – рецептор SSTR2 связывает радиоактивно меченные синтетические пептидные субстраты; Е – транспортеры NIS/NET обеспечивают поглощение и накопление радиоактивных субстратов внутри клетки; Ж – выработка меланина, индуцированная тирозинойзой, приводит к существенному улучшению контрастности МРТ

субстрата в клетках, экспрессирующих HSV1-tk [77, 78]. Поскольку HSV1-tk – один из первых хорошо изученных репортерных генов, он имеет широкий спектр субстратов для ПЭТ и ОФЭКТ, а также мутантные формы, такие, как HSV1-sr39tk, которые обладают повышенной активностью *in vivo* [73].

Трансген HSV1-tk использовали для оценки биораспределения онколитического рекомбинантного вируса везикулярного стоматита в моделях гепатоцеллюлярной карциномы у крыс [58]. Также получен аденовирус, экспрессирующий HSV1-tk, способный отображать локализацию вируса с помощью сканирования ПЭТ (табл. 1) [59]. Проведены первые клинические исследования, в которых оценивали возможность использования HSV1-tk онколитического рекомбинантного штамма HSV1716 в качестве репортерного трансгена для мониторинга репликации вируса в ходе лечения пациентов с глиомами [60]. Однако методом ОФЭКТ повышенное накопление субстрата (^{123}I -FIAU) в опухолевых клетках не было зарегистрировано, что может быть связано как с недостаточной репликацией вируса, так и с низкой чувствительностью метода. Кроме того, HSV1-tk, как чужеродный белок, может вызывать иммунный ответ, что делает его мало пригодным для долгосрочной визуализации, которая требуется для генной терапии.

Репортерные трансгены белков-рецепторов

SSTR2 – один из рецепторов пептидного гормона соматостатина, экспрессируется на нейроэндокринных и других клетках, где он участвует в нейротрансмиссии, секреции гормонов и пролиферации клеток [3, 72]. Белок hSSTR2 человека использовали для ОФЭКТ-визуализации с применением синтетических пептидных субстратов, меченных индием-111, таких, как октреотид, пентетреотид и ланреотид, или ПЭТ-визуализации с пептидами, меченными галлием-68 [79]. Трансген SSTR2 встроили в геномы онколитического аденовируса и вируса осповакцины и показали возможность длительного отслеживания локализации и персистенции этих вирусов на мышинных сингенных моделях нескольких типов опухолей [62, 73]. Экспрессия трансгена SSTR2 в составе аденоассоциированного вируса позволяет получать изображения с помощью ПЭТ даже через 6 месяцев после окончания лечения [61]. К недостаткам SSTR2 относится эндогенная экспрессия, которая может снизить диагностическую эффективность, а также то, что каждый рецептор может связывать только один радиоактивно меченый лиганд, делая невозможным усиление сигнала и тем самым ограничивая чувствительность визуализации [3, 18].

Трансгены – контрастные агенты

В качестве репортерных генов для визуализации методом МРТ могут использоваться гены, отвечающие за меланогенез, такие, как ген тирозиназы (Tyr), который применяется также в фотоакустическом методе [73, 80]. Выработка меланина, индуцированная экспрессией Tyr, увеличивает хелатирование ионов металлов, что приводит к существенному улучшению контрастности МРТ. А за счет того, что контрастное вещество продуцируется непосредственно в трансдуцированных клетках, визуализация становится возможной без использования экзогенного контрастного вещества.

Использование рекомбинантного штамма вируса осповакцины, экспрессирующего трансгена сверхпродукции меланина, позволило провести МРТ-визуализацию опухоли и метастазов на модели ксенотрансплантатов линии клеток метастазирующего рака легкого человека A549, привитых иммунодефицитным мышам. Этот штамм вируса осповакцины также успешно применяли для фотоакустической визуализации (см. раздел «Фотоакустическая визуализация») [53].

Меланин представлен во всех царствах живых организмов, поэтому предполагается, что синтез меланина можно использовать в качестве диагностического/тераностического маркера для большинства известных видов, включая человека [14, 81].

Репортерные трансгены-транспортеры

Na^+/Cl^- -зависимый мембранный белок NET транспортирует норадреналин, адреналин, дофамин и другие структурно-родственные соединения в клетку. Известно, что большинство клеток нейробластомы (наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей, на которую приходится 15% смертей от всех детских онкологических заболеваний) экспрессируют на своей мембране белок NET [82]. Мета-иодобензилгуанидин (mIBG), также известный как иобенгуан, является структурным аналогом норадреналина (NE), естественного субстрата NET. mIBG был впервые разработан для визуализации мозгового вещества надпочечников методом сцинтиграфии в 1980-х годах [83]. Радиоактивно меченный mIBG (^{123}I -mIBG) можно эффективно использовать для визуализации нейробластом во всем теле. В настоящее время гамма-сканирование с использованием ^{123}I -mIBG считается предпочтительным для обнаружения первичных опухолей и идентификации метастатических клеток нейробластомы [84].

Трансген *NET* человека (*hNET*) ввели в геномы онколитических вирусов осповакцины, аденовируса и вируса герпеса и использовали для ядерной визу-

ализации не только нейроэндокринных, но и других опухолей человека на моделях мышей с иммунодефицитом [64–66]. Тем не менее, использование экзогенного NET для визуализации опухолей имеет пока крайне ограниченный характер, что, вероятно, связано с существованием других репортерных генов с лучшими профилями экспрессии и более доступными для радиоактивных индикаторов [85].

Симпортер йодида натрия (NIS) – это трансмембранный гликопротеин, который обеспечивает поглощение и концентрирование йодида для органификации в щитовидной железе, играет центральную роль в метаболизме гормонов щитовидной железы, а также экспрессируется в других тканях, включая слюнную железу, слизистую оболочку желудка и молочную железу [86]. Благодаря своей способности концентрировать йодид, NIS уже более 75 лет используется для выявления и лечения заболеваний щитовидной железы, демонстрируя клиническую универсальность и практичность опосредованного NIS-поглощения йодида [87]. Векторная доставка гена *NIS* позволяет сконцентрировать йодид в тканях других органов, в которых NIS обычно не экспрессируется. NIS переносит в клетки легкодоступные и одобренные к применению на человеке различные виды гамма-излучающих радиоизотопов, таких, как радиоактивный йод (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I), технеций в форме анионного пертехнетата ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) и перрената (186 , ^{188}Re), которые подходят для неинвазивной визуализации методами ОФЭКТ и ПЭТ [14]. Эктопическая экспрессия NIS обеспечивает накопление радиоактивного йодида на таком же уровне, как в клетках щитовидной железы или выше, не влияя на основные биохимические процессы в клетке [88]. Это расширяет сферу применения радиотерапии и визуализации с помощью NIS за пределы щитовидной железы.

Использование NIS имеет потенциальные преимущества перед другими системами репортерных генов. В отличие от репортеров на основе рецепторов, таких, как *hSSTR2*, со стехиометрическими связями (когда рецептор может связывать только один радиоактивно меченный лиганд, предотвращая усиление сигнала и ограничивая чувствительность визуализации), такие переносчики, как NIS, обеспечивают усиление сигнала посредством опосредованного транспортом концентрированного внутриклеточного накопления субстрата, повышая тем самым чувствительность обнаружения [73, 89]. Визуализация с NIS также оказалась более чувствительной и продолжительной, чем визуализация с *HSV1-tk* [90]. NIS способен отражать жизнеспособность клеток, поскольку его концентрирующая функция теряется при апоптозе клеток, в то время как ферменты и рецепторы

по-прежнему могут сохранять свою функциональную активность [63]. NIS представлен у всех позвоночных, что делает возможным использование видоспецифичного трансгена *NIS* в подавляющем большинстве модельных систем [91, 92].

NIS не только обладает описанными преимуществами, но и является наиболее распространенным репортерным трансгеном человека. Создано множество рекомбинантных вирусов, экспрессирующих NIS. Первым получен реплицирующийся аденовирус (Ad), кодирующий NIS, который протестировали на ксенографтах различных типов опухолей человека, включая рак шейки матки, рак молочной железы и рак предстательной железы (РПЖ), на моделях мышей с иммунодефицитом [67]. Вскоре после этого с помощью репликативно-компетентной платформы Ad (*Ad5-yCD/mutTK[SR39]rep-hNIS*), экспрессирующей симпортер NIS, получено изображение высокого разрешения тканей РПЖ собак методом ОФЭКТ [93]. Проведена также фаза 1 клинических испытаний *Ad5-yCD/mutTK[SR39]rep-hNIS* в группе мужчин с клинически локализованным РПЖ, что доказало возможность и безопасность неинвазивной визуализации методом ОФЭКТ для мониторинга эффективности опосредованной аденовирусами генной терапии у человека [94]. У мышей с трансплантированными подкожными миеломами 5TGM1 контролировали репликацию и распространение рекомбинантного онколитического вируса везикулярного стоматита (*VSVd51-NIS*) с помощью серийной ^{123}I - γ -сцинтиграфии после системной или внутриопухолевой инъекции [68]. В клинических испытаниях показана эффективность использования другого рекомбинантного штамма вируса везикулярного стоматита, *VSV-IFN β -NIS*, для визуализации метастатического колоректального рака и рака поджелудочной железы [95]. *VACV*, экспрессирующий трансген *hNIS*, успешно ингибировал рост несколько типов опухолей в доклинических моделях, включая рак поджелудочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак желудка и злокачественную мезотелиому плевры [96–98]. Рекомбинантный вирус кори (MV, штамм Edmonston), экспрессирующий трансген *hNIS*, прошел и проходит наибольшее количество клинических испытаний 1-й и 2-й фазы на различных типах опухолей, включая рак яичников (NCT02068794), плоскоклеточный рак головы и шеи и рак молочной железы (NCT01846091), злокачественную опухоль оболочки периферического нерва (NCT02700230), множественную миелому (NCT00450814) и уротелиальную карциному (NCT02364713) [3, 69, 70].

Основное ограничение для визуализации с помощью NIS – накопление радиоизотопов в тканях,

не являющихся мишенями, которые экспрессируют NIS, таких, как щитовидная железа, слюнные железы и желудок. Если трансдуцированная ткань находится рядом с эндогенными тканями, экспрессирующими NIS, то это технически затрудняет интерпретацию и количественное определение сигналов NIS. В нескольких работах изучены способы улучшения экспрессии NIS или блокирования экспрессии эндогенного NIS для решения указанных проблем [99, 100].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из представленных данных, введение репортерных трансгенов в геном онколитических вирусов представляет перспективный инструмент неинвазивной молекулярной визуализации опухолевой ткани для оценки ее локализации, размеров и эффективности терапии. Выбор репортерных трансгенов зависит от методов визуализации, которые можно разделить на две основных категории: оптическая визуализация и визуализация глубоких тканей.

Методы оптической визуализации привлекательны благодаря короткому времени сбора данных, низкой стоимости, высокой пропускной способности, отсутствию токсичности в моделях на животных, возможностям мультиспектральной визуализации и удобству использования по сравнению с радиоизотопами, которые необходимы для визуализации глубоких тканей. Эти свойства делают оптическую визуализацию чрезвычайно популярным подходом к исследованиям *in vitro* или доклиническим исследованиям у мелких животных.

Для оптической визуализации противоопухолевых свойств онколитических вирусов используют трансгены флуоресцентных белков (флуоресцентная визуализация), ферментов люциферазы (биолюминесцентная визуализация) и тирозиназы (фотоакустическая визуализация).

К ограничениям оптических методов формирования изображения относятся небольшая глубина пропускания света, поглощение и рассеяние возбуждающего и/или испускаемого света, особенно в глубоких тканях; аутофлуоресценция клеток, в том числе аутофлуоресценция мертвых клеток, что имеет особое значение при использовании онколитических вирусов, которые лизируют опухолевые клетки. Несмотря на то что процессы ослабления светового потока и аутофлуоресценции можно минимизировать в пределах инфракрасного «окна»; методы оптической визуализации имеют низкое пространственное разрешение и ограниченную чувствительность. Эти проблемы, а также возможность развития иммунных ответов на чужеродные репор-

терные белки, кодируемые трансгенами онколитических вирусов, препятствуют переносу оптической визуализации на модели крупных животных и человека и, соответственно, использованию в клинике.

Наибольшим трансляционным потенциалом обладают методы визуализации глубоких тканей (ОФЭКТ, ПЭТ и МРТ), которые обеспечивают тестирование животных любого размера, а также человека. Одни и те же репортерные трансгены онколитических вирусов могут использоваться для визуализации глубоких тканей различными методами в зависимости от контрастирующего субстрата. Идеальным контрастным субстратом для МРТ является меланин, поэтому в качестве трансгенов онколитических вирусов используются гены выработки меланина – тирозиназы. Однако меланин в высоких концентрациях ингибирует репликацию вируса, что существенно ограничивает использование данных методов визуализации в виротерапии опухолей. В методах ядерной визуализации (ОФЭКТ и ПЭТ) в качестве субстрата применяют радиоактивные изотопы, для накопления которых в опухолевых клетках разработан целый ряд трансгенов онколитических вирусов. Эти трансгены кодируют: ферменты (HSV1-tk и его модификации); рецепторы (hSSTR2); а также такие белки-переносчики, как транспортер норэпинефрина человека (hNET) и симпортер йодида натрия (NIS).

Один из старейших и наиболее успешных репортерных генов, NIS, применяется для молекулярной визуализации и направленной радионуклидной терапии. NIS присутствует у всех позвоночных, что делает возможным использование видоспецифичного трансгена NIS в подавляющем большинстве модельных систем. Не только доклинические, но и клинические исследования подтверждают, что NIS, экспрессируемый в составе онколитических вирусов, можно использовать для точного определения локализации опухоли, реакции опухоли на лечение, а также для обнаружения метастазов методами ядерной визуализации глубоких тканей. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lawler S.E., Speranza M.-C., Cho C.-F., Chiocca E.A. // *JAMA Oncol.* 2017. V. 3. № 6. P. 841.
2. Romanenko M.V., Dolgova E.V., Osipov I.D., Ritter G.S., Sizova M.S., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Potter E.A., Taranov O.S., et al. // *Anticancer Res.* 2019. V. 39. № 11. P. 6073–6086.
3. Pelin A., Wang J., Bell J., Le Boeuf F. // *Oncolytic Virotherapy.* 2018. V. 7. P. 25–35.
4. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Ткачева А.В., Горчаков А.А., Кулемзин С.В. // *Молекуляр. биология.* 2020. Т. 54. № 1. С. 3–16.
5. Watanabe N., McKenna M.K., Rosewell Shaw A., Suzuki M. // *Mol. Ther.* 2021. V. 29. № 2. P. 505–520.
6. Evgin L., Vile R.G. // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. № 5. P. 1106.
7. Montaña-Samaniego M., Bravo-Estupiñan D.M., Méndez-Guerrero O., Alarcón-Hernández E., Ibáñez-Hernández M. // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. P. 60538.
8. Guedan S., Grases D., Rojas J.J., Gros A., Vilardell F., Vile R., Mercade E., Cascallo M., Alemany R. // *Gene Ther.* 2012. V. 19. № 11. P. 1048–1057.
9. Stephenson K.B., Barra N.G., Davies E., Ashkar A.A., Lichty B.D. // *Cancer Gene Ther.* 2012. V. 19. № 4. P. 238–246.
10. Li J., O'Malley M., Urban J., Sampath P., Guo Z.S., Kalinski P., Thorne S.H., Bartlett D.L. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 4. P. 650–657.
11. Zamarin D., Holmgaard R.B., Ricca J., Plitt T., Palese P., Sharma P., Merghoub T., Wolchok J.D., Allison J.P. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 14340.
12. Kochneva G., Zonov E., Grazhdantseva A., Yunusova A., Sibolobova G., Popov E., Taranov O., Netesov S., Chumakov P., Ryabchikova E. // *Oncotarget.* 2014. V. 5. № 22. P. 11269–11282.
13. Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A., Grazhdantseva A., Troitskaya O., Nushtaeva A., Tkachenko A., Kuligina E., Richter V., Koval O. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 45. P. 74171–74188.
14. Haddad D., Fong Y. // *Mol. Ther. – Oncolytics.* 2014. V. 1. P. 14007.
15. Kirn D.H., Thorne S.H. // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. V. 9. № 1. P. 64–71.
16. Histed S.N., Lindenberg M.L., Mena E., Turkbey B., Choyke P.L., Kurdziel K.A. // *Nucl. Med. Commun.* 2012. V. 33. № 4. P. 349–361.
17. Luker K.E., Hutchens M., Schultz T., Pekosz A., Luker G.D. // *Virology.* 2005. V. 341. № 2. P. 284–300.
18. Serganova I., Blasberg R.G. // *J. Nucl. Med.* 2019. V. 60. № 12. P. 1665–1681.
19. Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23. № 12. P. 605–613.
20. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. V. 59. № 3. P. 223–239.
21. Remington S.J. // *Protein Sci.* 2011. V. 20. № 9. P. 1509–1519.
22. Niswender K.D., Blackman S.M., Rohde L., Magnuson M.A., Piston D.W. // *J. Microsc.* 1995. V. 180. Pt 2. P. 109–116.
23. Patterson G.H., Knobel S.M., Sharif W.D., Kain S.R., Piston D.W. // *Biophys. J.* 1997. V. 73. № 5. P. 2782–2790.
24. Pirovano G., Roberts S., Kossatz S., Reiner T. // *J. Nucl. Med.* 2020. V. 61. № 10. P. 1419–1427.
25. Klohs J., Wunder A., Licha K. // *Basic Res. Cardiol.* 2008. V. 103. № 2. P. 144–151.
26. Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 8. P. 751–754.
27. Krumholz A., Shcherbakova D.M., Xia J., Wang L.V., Verkhusha V.V. // *Sci. Rep.* 2015. V. 4. № 1. P. 3939.
28. Wilson A., Wilson K., Bilandzic M., Moffitt L., Makanji M., Gorrell M., Oehler M., Rainczuk A., Stephens A., Plebanski M. // *Cancers (Basel).* 2018. V. 11. № 1. P. 32.
29. Rojas J.J., Thorne S.H. // *Theranostics.* 2012. V. 2. № 4. P. 363–373.
30. Patel M.R., Jacobson B.A., Ji Y., Drees J., Tang S., Xiong K., Wang H., Prigge J.E., Dash A.S., Kratzke A.K., et al. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 32. P. 33165–33177.
31. Jun K.-H., Gholami S., Song T.-J., Au J., Haddad D., Carson J., Chen C.-H., Mojica K., Zanzonico P., Chen N.G., et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2014. V. 33. № 1. P. 2.
32. Khan K.H., Young A.-M., Mateo J., Tunariu N., Yap T.A., Tan D.S.P., Mansfield D., Wong M., Riisnaes R., Harrington K.J., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2013. V. 31. № 15_suppl. P. 3062.
33. Yano S., Tazawa H., Kishimoto H., Kagawa S., Fujiwara T., Hoffman R.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 2. P. 1–13.
34. Esposito I., Kleeff J., Bergmann F., Reiser C., Herpel E., Friess H., Schirmacher P., Büchler M.W. // *Ann. Surg. Oncol.* 2008. V. 15. № 6. P. 1651–1660.
35. Vos E.L., Gaal J., Verhoef C., Brouwer K., van Deurzen C.H.M., Koppert L.B. // *Eur. J. Surg. Oncol.* 2017. V. 43. № 10. P. 1846–1854.
36. Kishimoto H., Zhao M., Hayashi K., Urata Y., Tanaka N., Fujiwara T., Penman S., Hoffman R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 34. P. 14514–14517.
37. Coleman S.M., McGregor A. // *Future Virol.* 2015. V. 10. № 2. P. 169–183.
38. Sandhu G.S., Solorio L., Broome A.M., Salem N., Kolthammer J., Shah T., Flask C., Duerk J.L. // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2010. V. 2. № 4. P. 398–421.
39. de Wet J.R., Wood K.V., Helinski D.R., DeLuca M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 23. P. 7870–7873.
40. Luker G.D., Luker K.E. // *J. Nucl. Med.* 2008. V. 49. № 1. P. 1–4.
41. Paroo Z., Bollinger R.A., Braasch D.A., Richer E., Corey D.R., Antich P.P., Mason R.P. // *Mol. Imaging.* 2004. V. 3. № 2. P. 117–124.
42. Lorenz W.W., McCann R.O., Longiaru M., Cormier M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 10. P. 4438–4442.
43. Venisnik K.M., Olafsen T., Gambhir S.S., Wu A.M. // *Mol. Imaging Biol.* 2007. V. 9. № 5. P. 267–277.
44. Love A.C., Prescher J.A. // *Cell Chem. Biol.* 2020. V. 27. № 8. P. 904–920.
45. Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 11. P. 1848–1857.
46. Power A.T., Wang J., Falls T.J., Paterson J.M., Parato K.A., Lichty B.D., Stojdl D.F., Forsyth P.A.J., Atkins H., Bell J.C. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 1. P. 123–130.
47. Summers B.C., Leib D.A. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 14. P. 7020–7029.
48. Luker G.D., Bardill J.P., Prior J.L., Pica C.M., Piwnicka-Worms D., Leib D.A. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 23. P. 12149–12161.
49. Burgos J.S., Guzman-Sanchez F., Sastre I., Fillat C., Valdivieso F. // *Microbes Infect.* 2006. V. 8. № 5. P. 1330–1338.
50. Rojas J.J., Sampath P., Hou W., Thorne S.H. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 24. P. 5543–5551.
51. Zhang H.F., Maslov K., Stoica G., Wang L.V. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 7. P. 848–851.
52. Upputuri P.K., Pramanik M. // *WIREs Nanomed.*

- Nanobiotechnol. 2020. V. 12. № 4. P. e1618.
53. Stritzker J., Kirscher L., Scadeng M., Deliolanis N.C., Morscher S., Symvoulidis P., Schaefer K., Zhang Q., Buckel L., Hess M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 9. P. 3316–3320.
 54. Kirscher L., Deán-Ben X.L., Scadeng M., Zaremba A., Zhang Q., Kober C., Fehm T.F., Razansky D., Ntziachristos V., Stritzker J., et al. // *Theranostics*. 2015. V. 5. № 10. P. 1045–1057.
 55. Le Boeuf F., Diallo J.-S., McCart J.A., Thorne S., Falls T., Stanford M., Kanji F., Auer R., Brown C.W., Lichty B.D., et al. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 5. P. 888–895.
 56. Guse K., Dias J.D., Bauerschmitz G.J., Hakkarainen T., Aavik E., Ranki T., Pisto T., Särkioja M., Desmond R.A., Kanerva A., et al. // *Gene Ther.* 2007. V. 14. № 11. P. 902–911.
 57. Msaouel P., Opyrchal M., Domingo Musibay E., Galanis E. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013. V. 13. № 4. P. 483–502.
 58. Muñoz-Álvarez K.A., Altomonte J., Laitinen I., Ziegler S., Steiger K., Esposito I., Schmid R.M., Ebert O. // *Mol. Ther.* 2015. V. 23. № 4. P. 728–736.
 59. Abate-Daga D., Andreu N., Camacho-Sánchez J., Alemany R., Herance R., Millán O., Fillat C. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 10. P. e26142.
 60. Dempsey M.F., Wyper D., Owens J., Pimlott S., Papanastassiou V., Patterson J., Hadley D.M., Nicol A., Rampling R., Brown S.M. // *Nucl. Med. Commun.* 2006. V. 27. № 8. P. 611–617.
 61. Cotugno G., Aurilio M., Annunziata P., Capalbo A., Faella A., Rinaldi V., Strisciuglio C., Tommaso M.Di, Aloj L., Auricchio A. // *Hum. Gene Ther.* 2011. V. 22. № 2. P. 189–196.
 62. Andrea McCart J., Mehta N., Scollard D., Reilly R.M., Carrasquillo J.A., Tang N., Deng H., Miller M., Xu H., Libutti S.K., et al. // *Mol. Ther.* 2004. V. 10. № 3. P. 553–561.
 63. Montiel-Equihua C.A., Martín-Duque P., de la Vieja A., Quintanilla M., Burnet J., Vassaux G., Lemoine N.R. // *Cancer Gene Ther.* 2008. V. 15. № 7. P. 465–473.
 64. Jia Z.-Y., Deng H.-F., Huang R., Yang Y.-Y., Yang X.-C., Qi Z.-Z., Ou X.-H. // *Cancer Gene Ther.* 2011. V. 18. № 3. P. 196–205.
 65. Chen N., Zhang Q., Yu Y.A., Stritzker J., Brader P., Schirbel A., Samnick S., Serganova I., Blasberg R., Fong Y., et al. // *Mol. Med.* 2009. V. 15. № 5–6. P. 144–151.
 66. Sorensen A., Mairs R.J., Braidwood L., Joyce C., Conner J., Pimlott S., Brown M., Boyd M. // *J. Nucl. Med.* 2012. V. 53. № 4. P. 647–654.
 67. Boland A., Ricard M., Opolon P., Bidart J.M., Yeh P., Filetti S., Schlumberger M., Perricaudet M. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. № 13. P. 3484–3492.
 68. Goel A., Carlson S.K., Classic K.L., Greiner S., Naik S., Power A.T., Bell J.C., Russell S.J. // *Blood*. 2007. V. 110. № 7. P. 2342–2350.
 69. Msaouel P., Opyrchal M., Dispenziera A., Peng K.W., Federspiel M.J., Russell S.J., Galanis E. // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2018. V. 18. № 2. P. 177–187.
 70. Dispenziera A., Tong C., LaPlant B., Lacy M.Q., Laumann K., Dingli D., Zhou Y., Federspiel M.J., Gertz M.A., Hayman S., et al. // *Leukemia*. 2017. V. 31. № 12. P. 2791–2798.
 71. Ribitsch I., Baptista P.M., Lange-Consiglio A., Melotti L., Patruno M., Jenner F., Schnabl-Feichter E., Dutton L.C., Connolly D.J., van Steenbeek F.G., et al. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. P. 972.
 72. Wu Z.J., Tang F.R., Ma Z.-W., Peng X.-C., Xiang Y., Zhang Y., Kang J., Ji J., Liu X.Q., Wang X.-W., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2018. V. 29. № 2. P. 204–222.
 73. Concilio S.C., Russell S.J., Peng K.-W. // *Mol. Ther.* – Oncolytics. 2021. V. 21. P. 98–109.
 74. Maurer A.H. // *Health Phys.* 2008. V. 95. № 5. P. 571–576.
 75. Cherry S., Sorenson J., Phelps M. *Physics in Nuclear Medicine*. 4th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2012. 683 p.
 76. McRobbie D.W., Moore E.A., Graves M.J., Prince M.R. *MRI from picture to proton*. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2017.
 77. Serganova I., Ponomarev V., Blasberg R. // *Nucl. Med. Biol.* 2007. V. 34. № 7. P. 791–807.
 78. Keshavarz M., Sabbaghi A., Miri S.M., Rezaeyan A., Arjeini Y., Ghaemi A. // *Cancer Cell Int.* 2020. V. 20. № 1. P. 1–17.
 79. Xu C., Zhang H. // *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 1–14.
 80. Paproski R.J., Forbrich A.E., Wachowicz K., Hitt M.M., Zemp R.J. // *Biomed. Opt. Express*. 2011. V. 2. № 4. P. 771.
 81. Yang C., Tian R., Liu T., Liu G. // *Molecules*. 2016. V. 21. № 5. P. 580.
 82. Park J.R., Eggert A., Caron H. // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2010. V. 24. № 1. P. 65–86.
 83. Wieland D.M., Wu J., Brown L.E., Mangner T.J., Swanson D.P., Beierwaltes W.H. // *J. Nucl. Med.* 1980. V. 21. № 4. P. 349–353.
 84. Parisi M.T., Eslamy H., Park J.R., Shulkin B.L., Yanik G.A. // *Semin. Nucl. Med.* 2016. V. 46. № 3. P. 184–202.
 85. Zhang Y., Wang J. // *Acta Pharm. Sin. B*. 2020. V. 10. № 1. P. 79–90.
 86. Spitzweg C., Nelson P.J., Wagner E., Bartenstein P., Weber W.A., Schwaiger M., Morris J.C. // *Endocr. Relat. Cancer*. 2021. V. 28. № 10. P. T193–T213.
 87. Miller A., Russell S.J. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2016. V. 16. № 1. P. 15–32.
 88. Dadachova E., Carrasco N. // *Semin. Nucl. Med.* 2004. V. 34. № 1. P. 23–31.
 89. Haddad D., Chen N.G., Zhang Q., Chen C.-H., Yu Y.A., Gonzalez L., Carpenter S.G., Carson J., Au J., Mittra A., et al. // *J. Transl. Med.* 2011. V. 9. № 1. P. 36.
 90. Miyagawa M., Anton M., Wagner B., Haubner R., Souvatzoglou M., Gansbacher B., Schwaiger M., Bengel F.M. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2005. V. 32. № 9. P. 1108–1114.
 91. Concilio S.C., Zhekova H.R., Noskov S.Y., Russell S.J. // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 2. P. 1–25.
 92. Portulano C., Paroder-Belenitsky M., Carrasco N. // *Endocr. Rev.* 2014. V. 35. № 1. P. 106–149.
 93. Barton K.N., Tyson D., Stricker H., Lew Y.S., Heisey G., Koul S., de la Zerda A., Yin F.-F., Yan H., Nagaraja T.N., et al. // *Mol. Ther.* 2003. V. 8. № 3. P. 508–518.
 94. Barton K.N., Stricker H., Brown S.L., Elshaikh M., Aref I., Lu M., Pegg J., Zhang Y., Karvelis K.C., Siddiqui F., et al. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. № 10. P. 1761–1769.
 95. Merchan J., Patel M.R., Powell S.F., Strauss J., Cripe T.P., Old M.O., Diaz R.M., Russell S.J., Bexon A.S., Suksanpaisan L., et al. // *Ann. Oncol.* 2018. V. 29. P. 479–480.
 96. Belin L.J., Ady J.W., Lewis C., Marano D., Gholami S., Mojica K., Eveno C., Longo V., Zanzonico P.B., Chen N.G., et al. // *Surgery*. 2013. V. 154. № 3. P. 486–495.
 97. Gholami S., Chen C.-H., Lou E., Belin L.J., Fujisawa S., Longo V.A., Chen N.G., Gönen M., Zanzonico P.B., Szalay A.A., et al. // *FASEB J.* 2014. V. 28. № 2. P. 676–682.
 98. Gholami S., Haddad D., Chen C.-H., Chen N.G., Zhang Q., Zanzonico P.B., Szalay A.A., Fong Y. // *Surgery*. 2011. V. 150. № 6. P. 1040–1047.
 99. Suksanpaisan L., Pham L., McIvor S., Russell S.J., Peng K.-W. // *Cancer Gene Ther.* 2013. V. 20. № 11. P. 638–641.
 100. Kim Y.-H., Youn H., Na J., Hong K.-J., Kang K.W., Lee D.S., Chung J.-K. // *Theranostics*. 2015. V. 5. № 1. P. 86–96.