

И.А. Разумов^{1,3}, В.А. Святченко¹, Е.В. Протопопова¹, Г.В. Кочнева¹, Н.Н. Киселёв¹, Н.В. Губанова³,
А.Г. Шилов³, В.А. Мордвинов³, С.В. Нетёсов², П.М. Чумаков^{2,4}, В.Б. Локтев^{1,3}

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

² Новосибирский государственный университет, Российская Федерация

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

⁴ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Российская Федерация

Оценка онколитической активности ряда ортопоксвирусов, аденовирусов и парвовирусов в отношении клеток глиом человека

В настоящее время одним из перспективных подходов к разработке средств лечения опухолей человека является виротерапия, базирующаяся на способности онколитических вирусов селективно инфицировать и убивать опухолевые клетки. Целью настоящей работы стали поиск и оценка перспективных онколитических вирусов, оказывающих избирательный литический эффект на клетки глиом человека. Пациенты и методы. Оригинальные клеточные культуры глиом GB2m, GA14m и GB22m, полученные от пациентов, были использованы для выявления онколитической активности некоторых типичных представителей ортопоксвирусов, аденовирусов и парвовирусов в экспериментах in vitro. Результаты. Обнаружена онколитическая активность in vitro штаммов ЛИВП и WR вируса осповакцины, а также аденовирусов Adel2 и Ad2del, представляющих собой делеционные варианты по гену E1B55K аденовирусов человека 2-го и 5-го серотипов, соответственно, в отношении клеток злокачественных глиом человека. Выводы. Эти онколитические вирусы, по-видимому, могут быть использованы для создания перспективных препаратов для лечения глиом человека.

Ключевые слова: глиальные опухоли, глиобластомы, онколитические вирусы.
(Вестник РАМН. 2013; 12: 4–8)

Введение

Онкологические заболевания представляют важнейшую проблему для общественного здравоохранения, так как приносят тяжелые страдания пациентам и являются одной из основных причин смертности населения в мире. Их лечение, далеко не всегда результативное,

требует больших финансовых затрат [1]. Лидирующее место в структуре нейроонкологической заболеваемости занимают глиомы головного мозга, заболеваемость которыми не имеет тенденций к снижению и продолжает расти [2, 3]. Совершенствование высокотехнологичных методов, направленных на улучшение эффективности хирургического и химиолучевого лечения,

I.A. Razumov^{1,3}, V.A. Syatchenko¹, E.V. Protopopova¹, G.V. Kochneva¹, N.N. Kiselev¹, N.V. Gubanova³,
A.G. Shilov³, V.A. Mordvinov³, S.V. Netesov², P.M. Chumakov^{2,4}, V.B. Loktev^{1,3}

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region; Russian Federation

² Novosibirsk State University, Russian Federation

³ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russian Federation

Oncolytic Properties of Some Orthopoxviruses, Adenoviruses and Parvoviruses in Human Glioma Cells

Currently one of the most promising approaches in development of cancer virotherapy is based on the ability of oncolytic viruses to selective infection and lysis of tumor cells. Aim. The goal of the study was to identify and evaluate perspective oncolytic viruses capable of selectively destroying human glioma cells. Patients and methods. Original GB2m, GA14m and GB22m glioma cell cultures derived from patients were used for evaluating in vitro oncolytic activity of some typical orthopoxviruses, adenoviruses and parvoviruses. Results. The oncolytic activity in the human glioma cell models was confirmed for LIVP and WR strains of vaccinia virus, Adel2 and Ad2del strains with deletions within E1B/55K gene and derived from human adenoviruses type 2 and 5, respectively. Conclusions. We consider these oncolytic viruses as promising agents for the treatment of human malignant glioma.

Key words: glioma cell, glioblastomas cell, oncolytic viruses.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 12: 4–8)

не приносит кардинальных успехов. Результаты лечения глиом, особенно глиобластом, составляющих более 50% глиом, остаются неудовлетворительными. Так, за последние 30 лет средняя продолжительность жизни пациентов с глиобластомой возросла всего лишь на 2 месяца [2].

В последние годы началась разработка подходов к таргетной или целевой терапии глиом, основанной на направленном воздействии на злокачественные клетки-мишени, в частности с использованием онколитических вирусов [4, 5]. Первое сообщение о чувствительности опухолей глиального происхождения к вирусам было опубликовано в 1961 году [6]. Несколько позднее была показана онколитическая активность поксвирусов, парвовирусов и аденовирусов в отношении клеток глиом *in vitro* [7]. Онколитические вирусы в опытах на лабораторных животных с привитыми глиомными опухолями показали свою высокую эффективность и избирательность в отношении глиомных ксенотрансплантатов [5], а в ряде случаев достигалось полное разрушение опухолей и выздоровление животных.

В настоящее время ряд первых препаратов на основе онколитических вирусов находится на стадии доклинических или клинических испытаний [5, 8]. Они продемонстрировали свою безопасность, что особенно важно для вирусных онколитических препаратов, непосредственно вводимых в мозг пациента. Повышение эффективности онколитических вирусов, конструирование и создание генно-инженерными методами нового поколения онколитических рекомбинантных вирусов, а также разработка на их основе противоопухолевых препаратов, обладающих высокой степенью избирательной онколитической активности в отношении глиом человека, представляется крайне важной и актуальной задачей.

Для более полной оценки онколитической активности вирусных препаратов помимо широко используемых глиомных клеточных линий, по всей вероятности, необходимо использовать короткоживущие или малопассажные культуры клеток, полученные непосредственно из опухолей человека и культивируемые ограниченное количество (1–20) пассажей [9]. Неоспоримым преимуществом таких культур клеток является их наибольшее соответствие исходным клеткам опухоли пациента, что делает такие культуры перспективной моделью для оценки токсичности, избирательности, онколитической активности препаратов и адекватности противоопухолевой терапии как *in vitro*, так и *in vivo*.

Цель исследования: осуществить поиск перспективных штаммов вирусов, вызывающих селективный онколитический эффект на различные типы клеточных культур, происходящих из глиомных опухолей человека. Короткоживущие культуры глиомных клеток, полученные нами из опухолей головного мозга человека, были использованы в качестве новой модели для оценки онколитического воздействия различных вирусов на клетки опухоли *in vitro*.

Материалы и методы

Культуры клеток. В работе использовали следующие опухолевые культуры клеток человека: A431 (эпидермальная карцинома), U-87MG (глиобластома из коллекции ATCC), а также малопассажные культуры клеток — глиобластомы GB2m (23 пассажа) и GB22m (10 пассажей) и астроцитомы GA14m (11 пассажей), полученные нами ранее из опухолей головного мозга больных и позитивные по маркеру глиальных клеток — GFAP (глиальный

фибрилярный кислый белок). В качестве первичных или первично-перевиваемых культур клеток человека применяли диплоидные культуры клеток, ФЭЧ-15 (клетки кожно-мышечной ткани эмбриона человека), MRC-5 (клетки легких эмбриона человека), а также MCF-10A — нормальные или нетуморогенные эпителиальные клетки молочной железы человека. В работе также использовали культуры НЕК293 (клетки почки эмбриона человека, трансформированные генами *E1A* и *E1B* аденовируса человека 5-го серотипа), MDCK (перевиваемая культура клеток почек собаки) и CV-1 (перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой марьшишки).

Вирусы. В работе использовали штаммы ЛИВП и WR вируса осповакцины, которые культивировали, очищали методом дифференциального центрифугирования и определяли инфекционную активность, как описано ранее [10]. Аденовирусы человека 5-го и 2-го серотипов (Ad5 и Ad2) были получены из Государственной коллекции вирусных штаммов при Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (г. Москва). Рекомбинантные аденовирусы Adel2 и Ad2del, дефектные по гену *E1B*, были сконструированы, и их культивирование в культуре клеток НЕК293, очистку и титрование инфекционной активности осуществляли, как описано ранее [11]. Парвовирус собак (CPV), штамм «Лайка-1993», выделенный в ГНЦ ВБ «Вектор», культивировали на клетках MDCK в соответствии с рекомендациями [12]. Титр вируса определяли в реакции гемагглютинации с использованием эритроцитов макака-резус, как описано ранее [13].

Культивирование и ростовая среда. Монослойное культивирование линий клеток и полученных культур клеток из опухолей головного мозга больных проводили с использованием среды ДМЕМ/F12, содержащей 10% фетальной сыворотки и 80 мкг/мл сульфата гентамицина. Для культуры клеток MCF-10A использовали среду MEGM (Clonetics) с набором факторов роста MEGM SingleQuots (Clonetics).

Определение цитолитической активности аденовирусов *in vitro*. Исследование цитолитической активности вирусов на панели нормальных и опухолевых клеток проводили микрометодом, согласно Chanas и соавт. [14]. Регистрацию индуцированного вирусами цитопатического эффекта проводили с помощью 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) или МТТ-теста [15]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan при длине волны 492 нМ. Литическую активность вирусов для соответствующих типов клеток выражали через IgТЦПД 50/мл (lg разведения 50% тканевой цитопатогенной дозы вирусной суспензии, вызывающей 50% лизис клеток).

Определение цитолитической активности вирусов осповакцины в культурах клеток (ХТТ-тест). Исследование цитолитической активности штаммов вируса осповакцины на культурах первичных, диплоидных и опухолевых клеток проводили микрометодом на 96-луночных культуральных планшетах (Costar) с использованием реагента 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид (ХТТ) [16]. Онколитическую активность выражали как 50% цитотоксическую дозу (ЦТД50), т.е. такую концентрацию вируса, которая вызывала гибель 50% клеток. Для этого определяли среднее значение и дисперсию для различных концентраций вируса, строили график зависимости ОП от множественности инфекции. По графику определяли ЦТД50, при которой величина ОП490/620, измеренная в зараженных лунках, составляет 50% от величины ОП490/620, вычисленной в лунках с незараженной культурой.

Результаты

Для определения инфекционной активности исследуемых вирусов мы использовали различные методы и подходы, что позволяло определять как вызываемый вирусами цитопатический эффект, так и накопление вируса в результате его репликации в культуре опухолевых клеток при отсутствии цитопатических проявлений инфекции. Эффективность накопления парвовируса собак в культурах клеток оценивали исходя из титра вируса, который определяли в реакции гемагглютинации (РГА) с использованием эритроцитов макак-резусов (табл. 1). Как видно из представленных данных, при размножении парвовируса собак (штамм «Лайка») в клетках глиом человека его накапливалось в 80–160 раз меньше, чем в культуре клеток MDCK. В то же время парвовирус собак реплицировался в клетках глиом человека с достоверно более выраженной эффективностью по сравнению с используемыми культурами диплоидных клеток человека ФЭЧ-15 и MRC-5 (в 16 и 8 раз, соответственно). Однако размножение парвовируса собак в клетках глиомы человека, к сожалению, не вызывало цитолитического эффекта, который наблюдался в клетках линии MDCK.

Результаты определения онколитической активности аденовирусных штаммов, выраженные через lgТЦПД₅₀/мл, представлены в табл. 2. Клетки глиомы человека культур U-87MG, GB2m, GA14F и GB22M были менее чувствительны к литической инфекции аденовирусными штаммами (как к природным «диким» типам аденовируса Ad5 и Ad2, так и к их делеციонным по гену *E1B55K* вариантам), чем высокочувствительная к аденовирусам культура клеток HEK293. Однако, как следует из приведенных результатов, делеციонные варианты Adel2 и Ad2del сохраняли онколитическую активность, близкую к таковой для «диких»

типов аденовируса в отношении клеток глиомы и в то же время имели существенные ограничения по этой активности для нетрансформированных клеток человека в сравнении с исходными штаммами. Наиболее избирательно чувствительной к аденовирусным штаммам из использованных культур клеток глиом оказалась короткоживущая культура GA14F. Так, например, делеციонный вариант Adel2 лизировал эти опухолевые клетки с эффективностью большей, чем используемые в качестве нормальных нетрансформированные клетки MRC5 и MCF10A, — в 100 и 10 000 раз, соответственно. Возможно, повышенный тропизм аденовирусов к глиоastroцитомным клеткам связан с более эффективным проникновением вируса в эти опухолевые клетки. Это может быть обусловлено высоким уровнем презентации на их клеточной поверхности коксаки-аденовирусного рецептора и клеточных интегринов (клеточный рецептор и корецептор для аденовирусов человека 5-го и 2-го серотипов, соответственно).

Исследование цитолитической активности штаммов ЛИВП и WR вируса осповакцины на культурах первичных, диплоидных и опухолевых клеток показало (табл. 3), что по сравнению с высокочувствительными клетками линии CV-1 и карциномы A431 клетки глиобластомы U-87MG приблизительно в 16,7 и 21,9, а GB2m — в 13,9 и 16,4 раз менее чувствительны к литической инфекции этих штаммов. Среди культур глиомных клеток наибольшая онколитическая активность штаммов ЛИВП и WR проявлялась на клетках U-87MG, в то время как клетки малопассажной культуры глиомы человека GB2m лизировались в 2,4 и 5,8 раз хуже. Вирусы осповакцины практически не обладали литической активностью в отношении первичных клеток эпителия молочной железы MCF-10A, что свидетельствует о высокой онкоселективности вируса осповакцины.

6

Таблица 1. Результаты оценки уровня репликации парвовируса собак в клетках опухолей человека

Наименование клеточной культуры	Происхождение клеточной культуры	Время накопления вируса в культуре	Наличие цитопатогенной дозы (ЦПД)	Титр вируса в реакции гемагглютинации
U-87MG	Глиобластома	5 суток	Нет	1:32
GB2m	Глиобластома	5 суток	Нет	1:32
GA14f	Астроцитомы	5 суток	Нет	1:32
GB22m	Глиобластома	5 суток	Нет	1:32
MDCK	Перевиваемая линия клеток почек собаки	2 суток	ЦПД	1:2560
ФЭЧ-15	Нормальный фенотип	5 суток	Нет	1:2
MRC-5	Нормальный фенотип	5 суток	Нет	1:4

Примечание. Диплоидные культуры ФЭЧ-15 и MRC-5 использовались в качестве сравнительного контроля на эффективность размножения парвовируса в нормальных тканях человека. В наименование культур GB2m, GA14f, GB22m заложена информация по четырем основным характеристикам: первая буква G для всех одинакова и означает Glioma; вторая буква имеет отношение к диагнозу: A – Astrocitoma, B – glioblastoma; на третьей позиции стоит порядковый номер образца; на четвертой позиции буквой обозначен пол пациента: m – male, f – female.

Таблица 2. Эффективность онкоселективной репликации аденовирусов в клетках глиом человека

Штаммы аденовирусов	Инфекционные титры аденовирусов на клеточных культурах, lg ТЦПД ₅₀ /мл						
	HEK293	U-87MG	GB2m	GA14f	GB22m	MRC-5	MCF10A
Adel2	9,0	6,5	6,0	7,0	6,5	5,0	3,0
Ad5	9,0	7,0	6,2	7,3	6,5	6,5	5,0
Ad2del	9,0	6,5	6,0	7,0	6,2	4,5	3,5
Ad2	9,0	7,0	6,0	7,5	н.о.	6,0	5,0

Примечание. Перед проведением опыта препараты аденовирусов титровали на клетках HEK293 и привели к одному титру (lg ТЦПД₅₀/мл- 9,0), н.о. - не определяли.

Таблица 3. Определение онкоселективной активности штаммов вируса осповакцины в отношении клеток глиом человека

Штаммы	ЦТД ₅₀ , БОЕ/клетка, на культурах клеток				
	A431	CV-1	U-87MG	GB2m	MCF 10A
ЛИВП	0,0042	0,0032	0,07	0,17	> 10
WR	0,0026	0,0022	0,036	0,21	> 10

Примечание. ЦТД₅₀ — доза вируса, лизирующая 50% клеток в лунке 96-луночного планшета через 72 часа после инфицирования. Для сравнения использовали высокочувствительные к вирусу осповакцины клеточные линии A431 и CV-1 и клетки MCF10A нормального фенотипа.

Обсуждение

Так как использование онколитических вирусов является одним из наиболее перспективных направлений в современной противоопухолевой терапии, в последние годы разрабатываются препараты, получаемые на основе либо природных и аттенуированных вирусов, либо рекомбинантных вирусов с использованием генно-инженерных технологий. Противоопухолевые свойства вирусов обусловлены как избирательностью заражения опухолевых клеток (онкоселективностью), которая проявляется также *in vitro* в культуре, так и большей доступностью и чувствительностью опухолевых клеток *in vivo* за счет стимуляции вирусами противоопухолевого иммунитета и отсутствием природных тканевых барьеров, препятствующих распространению вируса в организме. При создании новых онколитических вирусов большое значение уделяется именно онкоселективности, которую можно определить в культуре клеток при сравнении репликативных свойств вируса на панелях нормальных и опухолевых клеток. Так, онколитические свойства парвовируса крыс H1 в отношении глиобластом ранее были подробно изучены в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [17], и в настоящее время препарат ParvOgux, созданный на основе парвовируса H1, проходит клинические испытания в Германии с участием пациентов с мультиформной глиобластомой [18]. Исследованный нами парвовирус собак проявил *in vitro* сравнительно невысокое (в 8–16 раз) превышение своей способности к репликации на глиомных клетках человека в сравнении с нормальными или нетрансформированными клетками. Отчасти это может быть связано с видовой специфичностью парвовируса собак, хотя более вероятным объяснением может быть известная склонность парвовирусов реплицироваться преимущественно в клетках, находящихся на стадии G2 клеточного цикла. Появление таких клеток возможно лишь при условии активной пролиферации, что наблюдается в быстро делящихся клетках опухоли. В условиях *in vitro* в сформированных монослоях, когда большая часть клеток уже не делится вследствие контактного ингибирования, парвовирусы, по-видимому, не способны поддерживать свою репликацию и обеспечивать выраженный цитолитический эффект.

Эффективность противоопухолевой активности ортопоксвирусов обусловлена свойственной для них природной онкоселективностью. Три рекомбинантных штамма вируса осповакцины в настоящее время проходят клинические испытания в США в отношении широкого спектра опухолей прямой кишки, почек, легких, включая гепатокарциному и меланому [19]. Один из этих штаммов, JX-594, показал высокую онколитическую активность в отношении глиом при проведении доклинических испытаний [20]. Исследуемые нами штаммы вируса осповакцины ЛИВП и WR из российской коллекции также показали онкоселективность в отношении клеток глиом

человека. Данные штаммы, по-видимому, могут быть использованы в качестве векторов для получения вариантов рекомбинантных вирусов с более выраженной и направленной противоопухолевой активностью.

Большая серия работ, посвященная созданию и использованию онколитических вариантов на основе аденовирусов, подробно описана нами ранее [8]. Клинические испытания на глиобластомах прошел пока только один онколитический препарат ONYX-015 на основе рекомбинантного аденовируса штамма dl1520, способный избирательно реплицироваться в опухолевых клетках. Так, ONYX-015 эффективно уничтожал клетки глиомы линии U373, имеющие мутацию в гене *p53*, но не действовал на клетки глиобластомы линии U87, не имеющие повреждений в гене *p53*. Результаты клинических испытаний показали, что препарат не вызывает серьезных побочных явлений. У одного пациента наблюдалось прекращение роста опухоли, еще у одного скорость роста опухоли была замедлена, а три пациента, получившие терапию онколитическим вирусом в дозе 10⁹ или 10¹⁰ БОЕ, остались живы к моменту публикации более 19 месяцев [21]. В настоящее время препарат H101 (Oncorine) на основе штамма dl1520 впервые среди онколитических вирусов получил лицензию на применение в Китае [22]. Хотя изначально этот препарат предназначался для лечения глиом, наибольшую эффективность он продемонстрировал при терапии рака головы и шеи.

Среди российских разработок необходимо отметить препарат Канцеролизин, созданный в Научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» на основе штамма Adel2. Так же как и dl1520 (ONYX-015), этот штамм аденовируса дефектен по гену, кодирующему белок E1B-55k [11]. Доклинические исследования этого препарата показали его эффективность на культурах клеток и *in vivo*, а клинические испытания показали его безопасность и хорошую переносимость пациентами [23]. В настоящее время препарат проходит клинические испытания фазы II. Онколитическая активность штаммов Adel2 и AD2DEL на клетках опухолей головного мозга человека ранее не изучалась. Полученные нами данные демонстрируют активное размножение этих рекомбинантных аденовирусов на клетках глиобластомы U87, а также в малопассажных культурах клеток глиальных опухолей человека, что позволяет надеяться на терапевтическую эффективность в случае их применения на больных глиобластомой.

Заключение

Полученные нами короткоживущие или малопассажные культуры клеток глиом человека были использованы для испытания ряда ортопоксвирусов, аденовирусов и парвовирусов с целью оценки их онколитической активности *in vitro*. Была продемонстрирована выраженная онкоселективность вирусов в отношении исследованных клеток глиом человека, что указывает на перспективность разработанных клеточных моделей для будущих

испытаний онколитических вирусов в рамках создания новых подходов к терапии онкологических заболеваний человека. Разработанные модели могут быть востребованы также на этапе испытаний онколитических вирусов *in vivo*, на моделях лабораторных животных с привитыми ксенотрансплантатами клеток глиальных опухолей человека. По сравнению с установившимися культурами глиом, которые подверглись значительной селекции в ходе адаптации к росту в культуре, малопассажные культуры глиальных опухолей человека в большей степени отражают свойства опухолевых клеток в организме пациента. В связи с этим полученные результаты закладывают но-

вую методическую основу для разработки и испытания новых РНК- и ДНК-содержащих онколитических вирусов как средств терапии глиом человека.

Благодарности

Работа была частично поддержана грантом Президента Российской Федерации НШ-2996.2012.4, Договором Минобрнауки № 11.G34.31.0034, грантом программы президенту РАМН «Молекулярная и клеточная биология», грантом РФФИ 14-04-01323, ГК №14.512.11.0003, ГК № 14.512.11.0002, интеграционным проектом СО РАМН №52.

REFERENCES

- URL: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html; 23.11.2013.
- Ohka F., Natsume A., Wakabayashi T. *Neurol. Res. Int.* 2012 (ID 878425); 1–14.
- Van Meir E.G., Hadjipanayis C.G., Norden A.D., Hui-Kuo Shu., Wèn P.Y., Olson J.J. *CA Cancer J. Clin.* 2010; 60 (3): 166–193.
- Gubanova N.V., Gaitan A.S., Razumov I.A., Mordvinov V.A., Krivoschapkin A.L., Netesov S.V., Chumakov P.M. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular biology.* 2012; 46(6): 1–13.
- Wöllmann G., Ozduman K., van den Pol A.N. *Cancer J.* 2012; 18: 69–81.
- Aksel I.S., Aykan T.B. *World Neurol.* 1961; 2: 398–405.
- Urazova L.N., Kuznetsova T.I. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal – Siberian oncological journal.* 2003; 4: 28–35.
- Svyatchenko V.A., Tarasova M.V., Netesov S.V., Chumakov P.M. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular biology.* 2012; 46(4): 556–569.
- Farr-Jones M.A., Parney I.F., Petruk K.C. *J. Neurooncol.* 1999; 43 (1): 1–10.
- Serpinskii O.I., Kochneva G.V., Urmanov I.Kh., Sivolobova G.F., Ryabchikova E.I. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular biology.* 1996; 30: 1064–1073.
- Kachko A.V., Svyatchenko V.A., Ternovoi V.A., Kiselev N.N., Sorokin A.V., Kiselev S.L., Georgiev G.P., Netesov S.V. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular biology.* 2003; 37: 868–875.
- Parker J.S., Parrish C.R. *J. Virol.* 1997; 71: 9214–9222.
- Senda M., Hirayama N., Itoh O., Yamamoto H. *J. Gen. Virol.* 1988; 69 (Pt. 2): 349–354.
- Chanas A.C., Johnson B.K., Simpson D.I. *J. Gen. Virol.* 1976; 32: 295–300.
- Kirilyuk I.A., Svyatchenko V.A., Morozov D.A., Kazachinskaya E.I., Kiselev N.N., Bakunova S.M., Voinov M.A., Loktev V.B., Grigor'ev I.A. *Antibiotiki i khimioterapiya - Antibiotics and chemotherapy.* 2012; 57(1–2): 3–12.
- Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J. and Boyd M. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991; 83 (11): 757–766.
- Geletneky K., Hartkopf A.D., Krempien R. et al. *Bioeng. Bugs.* 2010; 1: 429–433.
- Geletneky K., Huesing J., Rommelaere J., Schlehofer J.R., Leuchs B., Dahm M., Krebs O., von Knebel Doeberitz M., Huber B., Hajda J. *BMC Cancer.* 2012; 12: doi: 10.1186/1471-2407-12-99.
- Kochneva G.V., Sivolobova G.F., Yudina K.V., Babkin I.V., Chumakov P.M., Netesov S.V. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya – Molecular genetics, microbiology and virology.* 2012; 1: 8–15.
- Lun X., Chan J., Zhou H. *Mol. Theor.* 2010; 18: 1927–1936.
- Chiocca E.A., Abbed K.M., Tatter S. *Mol. Ther.* 2004; 10: 958–966.
- Garber K. *J. Natl. Cancer.* 2006; 98: 298–300.
- Vdovichenko G.V., Petrishchenko V.A., Sergeev A.A., Svyatchenko V.A. *Voprosy virusologii – Issues of virology.* 2006; 6: 39–42.

FOR CORRESPONDENCE

Razumov Ivan Alekseevich, PhD, leading research scientist of the Institute of Cytology and Genetics under Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS).

Address: 10, Akademik Lavrent'ev Avenue, Novosibirsk, RF, 630090; tel.: +7 (383) 363-49-01 (add. 2208); e-mail: razumov@bionet.nsc.ru

Svyatchenko Viktor Aleksandrovich, MD, Head of the Laboratory of State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".

Address: 10, SRCVB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, RF, 630559; tel.: +7 (383) 363-47-53; e-mail: Svyatchenko@vector.nsc.ru

Protopopova Elena Viktorovna, MD, leading research scientist of State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".

Address: 10, SRCVB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, RF, 630559; tel.: +7 (383) 363-47-53

Kochneva Galina Vadimovna, PhD, Head of the Laboratory of State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".

Address: 10, SRCVB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, RF, 630559; tel.: +7 (383) 363-47-53; e-mail: kochneva@vector.nsc.ru

Kiselev Nikolai Nikolaevich, senior research scientist of State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".

Address: 10, SRCVB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, RF, 630559; tel.: +7 (383) 363-47-53

Gubanova Natal'ya Vladimirovna, MD, research scientist of the Institute of Cytology and Genetics under Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Address: 10, Akademik Lavrent'ev Avenue, Novosibirsk, RF, 630090; tel.: +7 (383) 363-49-01; e-mail: nat@bionet.nsc.ru

Shilov Aleksandr Gennad'evich, senior research scientist of the Institute of Cytology and Genetics under Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Address: 10, Akademik Lavrent'ev Avenue, Novosibirsk, RF, 630090; tel.: +7 (383) 363-49-01; e-mail: alxshilov@mail.ru

Mordvinov Vyacheslav Alekseevich, PhD, Deputy Director of the Institute of Cytology and Genetics under Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Address: 10, Akademik Lavrent'ev Avenue, Novosibirsk, RF, 630090; tel.: +7 (383) 363-49-98; e-mail: mordvin@bionet.nsc.ru

Netesov Sergei Viktorovich, professor, correspondent member of RAS, Vice-Principal of Novosibirsk State University.

Address: 2, Pirogov Street, Novosibirsk, RF, 630090; tel.: +7 (383) 363-40-01

Chumakov Petr Mikhailovich, PhD, professor, Head of the Laboratory of V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences (IMB RAS).

Address: 32, Vavilova Street, Moscow, RF, 119991; tel.: +7 (499) 135-23-31; e-mail: chumakovpm@yahoo.com

Loktev Valerii Borisovich, PhD, professor, Head of the Department of State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".

Address: 10, SRCVB "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, RF, 630559; tel.: +7 (383) 363-47-53; e-mail: valeryloktev@gmail.com