

УДК 616.24-006.6:577.245

О.О. Лихова<sup>1</sup>, Н.О. Безденежних<sup>1</sup>, К.О. Сауленко<sup>2\*</sup>, Л.І. Строковська<sup>3</sup>, Ю.І. Кудрявець<sup>1</sup>

## Пригнічення злоякісності клітин карциноми легені *in vivo* шляхом трансдукції пухлинних клітин геном інтерферону-β

UDC 616.24-006.6:577.245

О.О. Lykhova<sup>1</sup>, N.O. Bezdenezhnykh<sup>1</sup>, K.O. Saulenko<sup>2\*</sup>, L.I. Strokovska<sup>3</sup>, Yu.I. Kudryavets<sup>1</sup>

### Inhibition of Lung Cell Carcinoma Malignity *in Vivo* via Tumor Cell Transduction by Interferon-β Gene

**Ключові слова:** карцинома легені, генна терапія, β-інтерферон, бакуловірусний вектор.

**Ключевые слова:** карцинома легкого, генная терапия, β-интерферон, бакуловирусный вектор.

**Key words:** lung carcinoma, gene therapy, interferon-β, baculovirus vector.

Актуальне питання сучасної онкології – експериментальний пошук нових підходів до підвищення ефективності лікування онкологічних хворих. Таким підходом є генна терапія раку інтерфероном (ІФН) І типу – одним із найбільш розповсюджених генів, який сьогодні використовують із цією метою. Продукти експресії цих генів забезпечують потужний антипроліферативний, антиангіогенний, імуномодулюючий та противірусний ефекти [1]. Крім того, ІФН-генотерапія дає можливість створювати безпосередньо в пухлинній тканині високу терапевтичну концентрацію цитокіну упродовж тривалого часу.

Серед вірусних векторів, що несуть вбудовані в них гени цитокінів, зокрема інтерферону-β (ІФН-β), особливу увагу привертають бакуловіруси (віруси комах), оскільки вони ефективно проникають в різні клітини і тканини ссавців в умовах *in vitro* та *in vivo* без реплікації та вираженої цитопатогенної дії, мають великий геном, що дозволяє інтегрувати значний об'єм генетичної інформації, тощо [2].

Тим не менш, незважаючи на переваги, генна терапія бакуловірусами перебуває на початковому етапі розвитку, а проблема створення високоефективних векторних систем для цільової доставки терапевтичних білків полягає в тому, що вони повинні забезпечити транспорт цільового білка саме в той орган, тканину або пухлину, де він буде діяти.

An urgent task in current oncology is screening for new approaches to increase the therapeutic efficiency in cancer patients. Gene therapy for cancer is one of these approaches. The genes of type I interferon (IFN) are nowadays the most used genes for this purpose. The products of these genes expression provide the strong antiproliferative, antiangiogenic, immunomodulatory and antiviral effects [4]. In addition, the IFN-gene therapy enables creating a high therapeutic concentration of cytokine directly in tumor tissue for a long time.

Among the viral vectors, carrying built-in the cytokine genes, in particular interferon-β (IFN-β), of special attention are baculoviruses (insect viruses) because of their efficient penetration into different mammalian cells and tissues *in vitro* and *in vivo* conditions without replication and pronounced cytopathogenic effect, as well as a large genome, enabling the integration of a significant amount of genetic information, etc. [1].

However, despite some advantages the gene therapy with baculoviruses is at an initial stage, and the task to develop the highly efficient vector systems for a targeted delivery of therapeutic proteins mainly means the creation of the constructs able to provide the transport of target protein namely to that organ, tissue or tumor where it will act.

This research was aimed to investigate the antitumor and anti-metastatic activities of the murine IFN-β gene

<sup>1</sup>Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, м. Київ, Україна

<sup>2</sup>ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», м. Київ, Україна

<sup>3</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ, Україна

<sup>1</sup>R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Traumatology and Orthopedics of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**\*Автор, якому необхідно надіслати кореспонденцію:**  
вул. Бульварно-Кудрявська, 27, м. Київ, Україна 01601;  
тел.: (+38 044) 486-32-03  
електронна пошта: icesatyr26@gmail.com

Надійшла 26.01.2018

Прийнята до друку 19.02.2018

**\*To whom correspondence should be addressed:**  
27, Bulvarno-Kudriavska str., Kyiv, Ukraine 01601;  
tel.: +380 44 486 3203  
e-mail: icesatyr26@gmail.com

Received January, 26, 2018

Accepted February, 19, 2018

© 2018 K.O. Saulenko et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Метою даної роботи було дослідження протипухлинної та антиметастатичної дії гена ІФН- $\beta$  миші в складі бакуловірусного вектора *in vivo* на моделі карциноми легені миші за умов використання в якості терапевтичного агента клітини раку легені людини А-549, трансдукованих генетичним конструктом.

Клітини лінії А-549 культивували у повному живильному середовищі RPMI-1640 («РАА», Австрія), 10% фетальної сироватки теляти («РАА») та 40 мкг/мл гентаміцину («Sigma», США). Досліджувані клітини культивували у пластиковому посуді («ГРР», Італія) у зволоженій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Зміну середовища та пересів клітин проводили за стандартною методикою.

У роботі використовували рекомбінантні бакуловірусні вектори (БВ), створені на основі вірусу множинного ядерного поліедроза *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus та бакуловірусної експресійної системи Vacto-Bac («Invitrogen», США). Рекомбінантний БВ, що містив ген ІФН- $\beta$  миші (рБВ/ІФН), використовували у якості терапевтичного агента. Вірус без гена  $\beta$ -ІФН використовували як контроль (рБВ).

Трансдукцію клітин проводили при множинності інфекції рБВ 100 (multiplicity of infection (МОІ) = кількість бляшкоутворюючих одиниць БВ на клітину). Для цього суспензію клітин А-549 у ростовому середовищі RPMI-1640 змішували з суспензією вірусу рБВ або рБВ/ІФН у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) у співвідношенні 1:1. У якості контролю використовували клітини, до яких додавали ФСБ без БВ. Клітини інкубували 2 години за кімнатної температури (23...25°C), надалі додавали повне живильне середовище і культивували у CO<sub>2</sub>-інкубаторі протягом 24 годин при температурі 37°C. Після цього повністю змінювали середовище в культурі і культивували клітини за стандартних умов протягом 24–72 годин або трансдуковані клітини знімали з субстрату розчином Версену («Біо Тест Лабораторія», Україна), переносили у фізіологічний розчин і вводили тваринам.

Титр ІФН миші в культуральному середовищі трансдукованих клітин визначали за його антивірусною активністю стандартним мікротестом, використовуючи в якості тест-системи клітини лінії L929 та вірус везикулярного стоматиту (ВВС). Наявність і рівень ІФН миші визначали в культуральному середовищі, яке збирали з клітин, трансдукованих рБВ або рБВ/ІФН. За одиницю активності брали показник, зворотній останньому розведенню препарату, який захищав 50% клітин від цитопатичної дії ВВС. Титр ІФН виражали у міжнародних одиницях на 1 мл рідини (МО/мл).

Штам карциноми легені Льюїс (3LL) перещеплювали підшкірно суспензією пухлинної тканини (50 мг) мишам лінії C57BL/6 в 0,3 мл фізіологічного розчину.

within baculovirus vector *in vivo* in murine lung carcinoma model, using the human lung cancer cell line A-549, transduced by genetic construct, as a therapeutic agent.

The A-549 cells were cultured in RPMI-1640 complete nutrient medium (PAA), 10% fetal bovine serum (PAA, Austria) and 40  $\mu$ g/ml gentamicin (Sigma, USA). The cells under study were cultured in a plastic dish (TPP, Italy), in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The medium change and cell reinoculation were carried out according to the standard technique.

We used here the recombinant baculovirus vectors (BVs), designed on the base of the multiple nuclear polyhedrosis virus *Autographa californica*, and baculoviral expression system Vacto-Bac (Invitrogen, USA). The recombinant BV, containing the murine IFN- $\beta$  gene (rBV/IFN) was used as a therapeutic agent. The IFN- $\beta$  gene-free virus was used as control (rBV).

Cells were transduced at multiplicity infection (MI) by rBV (MI = a number of plaque-forming units of BV per cell) equalled to 100. For this purpose the A-549 cell suspension in growth medium RPMI-1640 was mixed with either a suspension of rBV virus or rBV/IFN in a phosphate buffered saline (PBS) in 1:1 ratio. The cells, supplemented with PSB without BV were used as the control. Cells were incubated for 2 hrs at room temperature (23...25°C), then supplemented with a complete nutrient medium and cultured in a CO<sub>2</sub> incubator for 24 hrs at 37°C. Afterwards the medium was completely changed in the culture and the cells were either cultured under the standard conditions for 24 to 72 hrs or the transduced cells were removed from substrate with the Versen solution (Bio Test Laboratory, Ukraine), and then transferred to a physiological solution and injected into animals.

The murine IFN titer in the culture medium of transduced cells was determined by its antiviral activity by the standard micromethod, using the L929 cell line and the vesicular stomatitis virus (VSV) as test system. The presence and level of murine IFN were determined in the culture medium, collected from cells of either transduced by rBV or rBV/IFN. The reciprocal index to the final drug dilution, which protected 50% cells against cyto-pathic effect of VSV, was assumed as the activity unit. The IFN titer was expressed in international units per 1 ml of fluid (IU/ml).

Lewis lung carcinoma strain (3LL) was subcutaneously vaccinated with the tumor tissue suspension (50 mg) to C57BL/6 mice in 0.3 ml of physiological saline.

The tumorigenic and metastatic potentials of Lewis lung carcinoma were analyzed *in vivo* using the experimental oncology techniques.

The tumorigenic and metastatic tumour features of Lewis lung carcinoma when introducing to mice of hu-



Аналіз туморогенного та метастатичного потенціалу карциноми легені Льюїса *in vivo* проводили з використанням методів експериментальної онкології.

Туморогенні та метастатичні властивості пухлини карциноми легені Льюїса за умов введення мишам клітин людини трансдукованих рБВ або рБВ/ІФН в терапевтичному режимі і визначали у досліджах *in vivo* на мишах лінії С57В1/6 віком 7–8 тижнів масою 20–22 г розведення віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького. Евтаназію тварин здійснювали за допомогою ефірного наркозу. Експериментальні дослідження проводили із дотриманням відповідних вимог, викладених у Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідницьких та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Динаміку росту внутрішньом'язових пухлин карциноми легені Льюїса у мишей досліджували шляхом вимірювання діаметра пухлин у двох проєкціях кожні 2 доби. Для підрахунку кількості метастазів на 25–27 добу після внутрішньом'язового введення суспензії пухлинних клітин мишей присипляли, видаляли легені та фіксували їх у 4%-ого розчині формаліну у ФСБ. Кількість метастазів та їх діаметр визначали за допомогою стоматологічних шпательів (1–3 мм) і біокуляра. Тимус та селезінку мишей видаляли для подальшого вимірювання маси. Об'єм пухлин і метастазів у мм<sup>3</sup> визначали за формулою  $V = D3 \times 0,52$ , де  $D3$  – об'єм метастаз.

Результати досліджень, проведених нами раніше, показали, що трансдукція клітин меланоми та карциноми легені рБВ/ІФН *in vitro* призводить до пригнічення росту експериментальних пухлин меланоми миші В16 на 60%, а пухлин карциноми Льюїса на 77% та пригнічення їх метастатичної активності (зменшення кількості метастазів меланоми) на 90%, а карциноми в системі *in vivo* на 70%. Разом з тим інтрамуральне введення рБВ/ІФН не інгібувало ріст пухлин меланоми або карциноми легені Льюїса [3]. Відсутність терапевтичного ефекту спробували вирішити введенням у систему клітин-носіїв із рБВ/ІФН через трансдукцію їх генома ІФН- $\beta$  *in vitro*.

З метою пошуку кращих продуцентів рекомбінантного ІФН- $\beta$  миші було проведено трансдукцію пухлинних клітин людини, а саме клітин недрібноклітинного раку легені людини лінії А-549.

Встановлено, що трансдукція цих клітин рБВ/ІФН *in vitro* призводила до продукції біологічно активного рекомбінантного ІФН- $\beta$  миші. Рівень продукції рекомбінантного ІФН- $\beta$  прямо залежав від МОІ рБВ/ІФН та часу культивування клітин після їх трансдукції в межах одного пасажу. Отримані нами результати показали, що трансдукція клітин А-549 рБВ/ІФН призводила через 48 та 72 години до продукції ними 6250 та 15 000 МО/мл ІФН- $\beta$ , відповідно.

man cells transduced by rBV or rBV/IFN in a therapeutic regimen, were determined in the *in vivo* studies in 7–8-week-old C57Bl/6 mice weighing 20–22 g, bred at the vivarium of R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology. The animals were sacrificed using ether anesthesia. The experimental studies were implemented in compliance with the relevant requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The growth dynamics of intramuscular tumours of Lewis lung carcinoma in mice was investigated by measuring tumour diameter in two projections every 2 days. To days 25–27 after intramuscular administration of tumour cell suspension the mice were sacrificed, their lungs were removed and fixed in 4% formalin solution in PBS for metastase calculation; a number of metastases and their diameter were determined using dental spatula (1–3 mm) and binocular. The murine thymus and spleen were also removed to measure their mass. The volume of tumours and metastases in mm<sup>3</sup> was determined by the formula  $V = D3 \times 0.52$ , where  $D3$  is the volume of metastase.

Our previous findings demonstrated the transduction of melanoma and lung carcinoma cells by rBV/IFN *in vitro* to result in growth inhibition of experimental tumours of murine melanoma B16 and Lewis carcinoma tumours by 60 and 77%, respectively, and in suppression of their metastatic activity, *i. e.* a decrease in a number of melanoma and carcinoma metastases by 90 and 70%, respectively *in vivo*. However, an intratumoral administration of rBV/IFN caused no inhibition of melanoma or Lewis lung carcinoma tumour growth [2]. We tried to solve the problem of no therapeutic effect by introducing into the system of cells-carriers with rBV/IFN via transduction by IFN- $\beta$  gene *in vitro*.

In order to find the best producers of a recombinant murine IFN- $\beta$ , there was performed the transduction of human tumour cells, namely the cells of A-549 human non-small cell lung cancer.

The transduction of these cells by rBV/IFN *in vitro* was established to result in a production of biologically active recombinant murine IFN- $\beta$ . The level of recombinant IFN- $\beta$  production was directly dependent on MOI rBV/IFN and the time of cell culture after transduction within a single passage. Our findings showed the A-549 cell transduction by rBV/IFN as resulted in production by them of 6250 and 15,000 IU/ml of IFN- $\beta$ , 48 and 72 hrs after transduction, respectively. Taking into account these finding the use of A-549 cell line as carriers of therapeutic agent: rBV/IFN *in vivo* was a well-considered and grounded decision.

The development of the novel and efficient approaches in lung cancer therapy, especially at late stages,



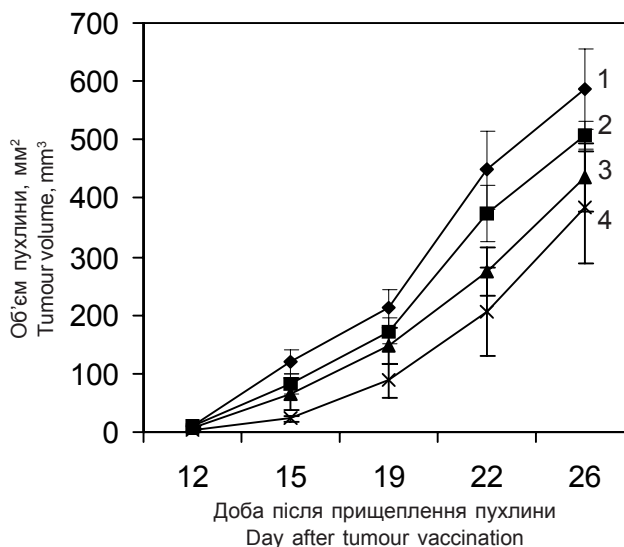
Враховуючи отримані дані використання клітин лінії А-549 у якості носіїв терапевтичного агенту – рБВ/ІФН *in vivo*, було виваженим і обґрунтованим рішенням.

Розробка нових і ефективних підходів терапії раку легені, особливо на пізніх стадіях, залишається на сьогодні важливою терапевтичною задачею. На моделях пухлин тварин було показано, що генна терапія злоякісних новоутворень із використанням різних вірусних векторів, що містять гени цитокінів, може ефективно зменшити ріст пухлини [4].

Саме тому наші дослідження були спрямовані на вивчення туморогенного і метастатичного потенціалу карциноми легені Льюїса *in vivo* за умов використання клітин раку легені людини лінії А-549, трансдукованих рБВ/ІФН *in vitro*, в якості терапевтичного агенту.

Було показано, що п'ятикратне інтратуморальне введення клітин А-549, трансдукованих рБВ/ІФН *in vitro*, призводить до інгібіції росту пухлин карциноми легені Льюїса миші в середньому на 57% ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контролем, але при цьому не впливає на їх спонтанну метастатичну активність у системі *in vivo* (рис. 1).

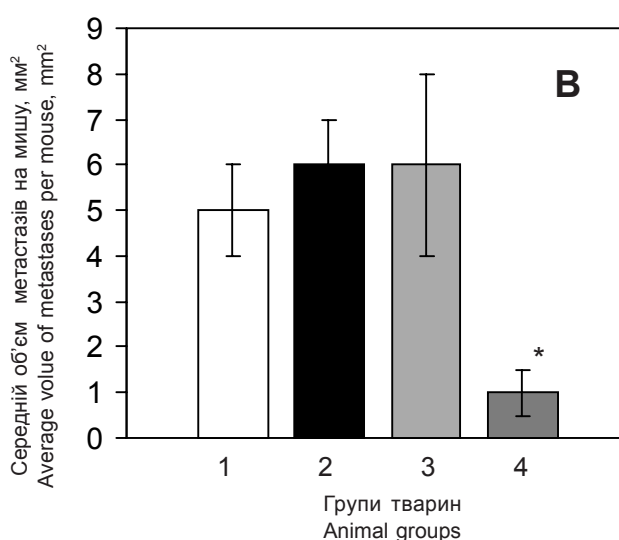
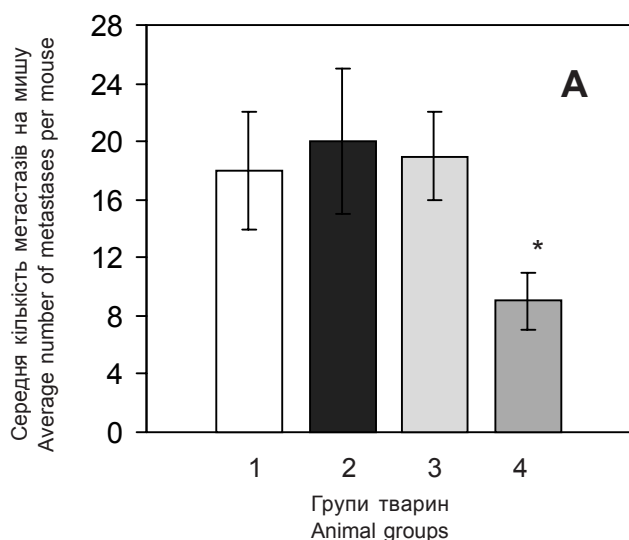
Внутрішньовенне введення клітин А-549, трансдукованих рБВ/ІФН *in vitro*, у терапевтичному режимі мишам з експериментальними пухлинами карциноми легені призвело до зменшення кількості в 2 рази ( $p < 0,05$ ) та об'єму в 6 разів ( $p < 0,05$ ) спонтанних метастазів 3LL у легенях мишей в порівнянні з контролем. Разом із тим така схема терапії не



**Рис. 1.** Кінетика росту пухлини карциноми легені Льюїса за умов терапії (інтратуморальний спосіб введення) клітинами трансдукованими рБВ та рБВ/ІФН. 1 – 3LL (контроль), 2 – 3LL та А-549, 3 – 3LL та А-549\рБВ, 4 – 3LL та А-549\рБВ/ІФН.

**Fig. 1.** Kinetics of tumour growth in Lewis lung carcinoma under therapy (intratumoral administration) with cells, transduced by rBV and rBV/IFN. 1 – 3LL (control), 2 – 3LL and A-549, 3 – 3LL and A-549\rBV, 4 – 3LL and A-549\rBV/IFN.

has still remained the main therapeutic task. Animal tumour models demonstrated the gene therapy of malignant neoplasms using different viral vectors, comprising cytokine genes, as capable to effectively reduce tumour growth [3].



**Рис. 2.** Середні показники кількості (А) та об'єму (В) спонтанних метастазів карциноми легені Льюїса у мишей досліджуваних груп після внутрішньовенного введення клітин А-549/рБВ/ІФН. 1 – 3LL (контроль), 2 – 3LL та А-549, 3 – 3LL та А-549\рБВ, 4 – 3LL та А-549\рБВ/ІФН; \* – різниця статистично значуща в порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Average value of number (A) and volume (B) of spontaneous Lewis lung carcinoma metastases in mice of the studied groups at intravenous administration of A-549/rBV/IFN cells. 1 – 3LL (control), 2 – 3LL and A-549, 3 – 3LL and A-549\rBV, 4 – 3LL and A-549\rBV/IFN; \* – significant differences if compared to the control,  $p < 0.05$ .



впливала на ріст пухлин солідної карциноми легені Льюїса (рис. 2).

Результати проведених досліджень обґрунтовують доцільність розробки нового експериментального напрямку генної терапії раку з використанням бакуловірусного вектора з геном  $\beta$ -інтерферону та системи клітин-транспортерів терапевтичного агенту.

### Література

1. Воронцова А.Л. Роль интерферона в противоопухолевой резистентности. Экспериментальная онкология 1989; 11(6): 49–54.
2. Boyce F.M., Bucher N.L. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(6): 2348–2352.
3. Lykhova A., Kudryavets Yu., Stokovska L., Bezdenezhnykh N. Suppression of proliferation, tumorigenicity and metastasis of lung cancer cells after their transduction by interferon- $\beta$  gene in baculovirus vector. Cytokine 2014; 71(2): 318–326.
4. Khalighinejad N., Hariri H., Behnamfar O., Yousefi A., Momeni A. Adenoviral gene therapy in gastric cancer. A review. World J Gastroenterol 2008; 14(2): 180–184.

That is why our research was aimed to study a tumorigenic and metastatic potential of Lewis lung carcinoma *in vivo* under condition of using A-549 human lung cancer cells, transduced by rBV/IFN *in vitro*, as a therapeutic agent.

A 5-fold intratumoral administration of A-549 cells, transduced by rBV/IFN *in vitro* was demonstrated to result in inhibition of tumour growth of Lewis lung carcinoma of mice by 57% on average ( $p < 0.05$ ) as compared with control, but herewith it had no effect on their spontaneous metastatic activity *in vivo* (Fig. 1).

An intravenous administration of A-549 cells, transduced by rBV/IFN cells *in vitro*, in therapeutic regimen into the mice with experimental tumours of lung carcinoma resulted in a two- and six-fold ( $p < 0.05$ ) decrease in a number and volume of spontaneous metastases in murine lungs, respectively, as compared with the control. However, such a therapeutic protocol caused no effect on tumour growth of solid Lewis lung carcinoma (Fig. 2).

Our findings substantiated the expediency of designing a novel experimental direction in cancer gene therapy using baculovirus vector with interferon- $\beta$  gene and the system of cell-transporters of therapeutic agent.

### References

1. Boyce F.M., Bucher N.L. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(6): 2348–2352.
2. Lykhova A., Kudryavets Yu., Stokovska L., Bezdenezhnykh N. Suppression of proliferation, tumorigenicity and metastasis of lung cancer cells after their transduction by interferon- $\beta$  gene in baculovirus vector. Cytokine 2014; 71(2): 318–326.
3. Khalighinejad N., Hariri H., Behnamfar O., Yousefi A., Momeni A. Adenoviral gene therapy in gastric cancer. A review. World J Gastroenterol 2008; 14(2): 180–184.
4. Vorontsova A.L. Interferon and antitumor resistance. Eksperimentalnaya onkologiya 1989; 11(6): 49–54.

