

Вирусы против рака: проблемы и решения

**Н.с. Лаборатории бионанотехнологий (НГУ) и
м.н.с. Отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и
вирусных гепатитов (ГНЦВБ «Вектор»),
к.б.н. Тарасова Маргарита Владимировна**

Современные методы лечения раковых заболеваний

```
graph TD; A[Современные методы лечения раковых заболеваний] --> B[РНК-интерференция]; A --> C[Наночастицы]; A --> D[Использование бактерий]; A --> E[Иммунотерапия]; A --> F[Виротерапия];
```

**РНК-
интерференция**

Наночастицы

Использование
бактерий

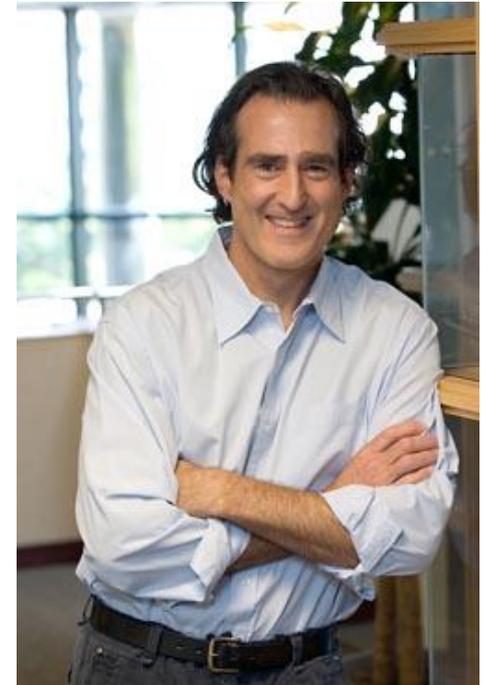
Иммунотерапия

Виротерапия

РНК- интерференция



Эндрю Файер



Крейг Мелло

Нобелевская премия 2006 года - американские ученые за работы по изучению РНК-интерференции у *Caenorhabditis elegans*, опубликованные в 1998 году

Современные методы лечения раковых заболеваний

```
graph TD; A[Современные методы лечения раковых заболеваний] --> B[РНК-интерференция]; A --> C[Использование бактерий]; A --> D[Наночастицы]; A --> E[Иммунотерапия]; A --> F[Виротерапия];
```

РНК-интерференция

Использование
бактерий

Наночастицы

Иммунотерапия

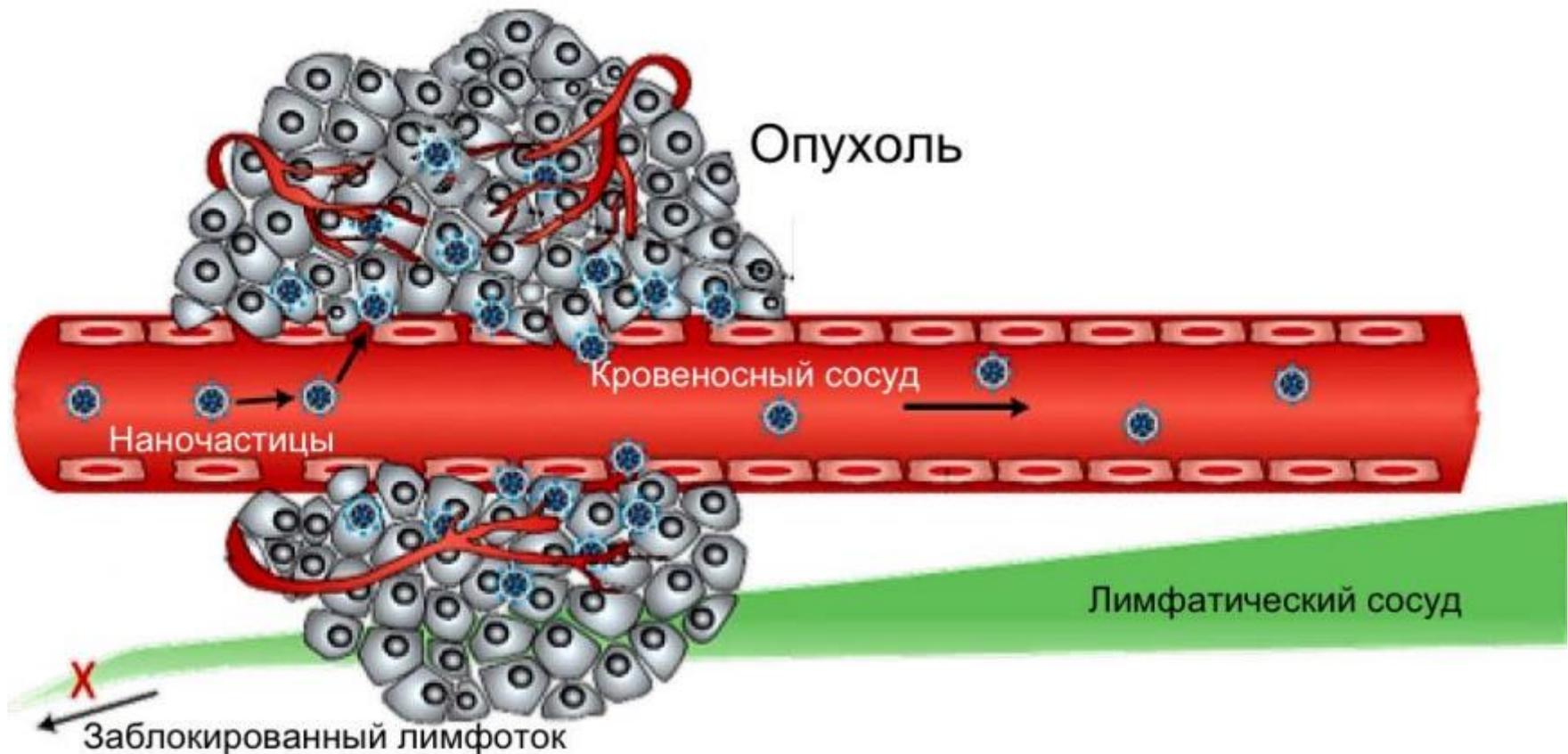
Виротерапия

Наночастицы

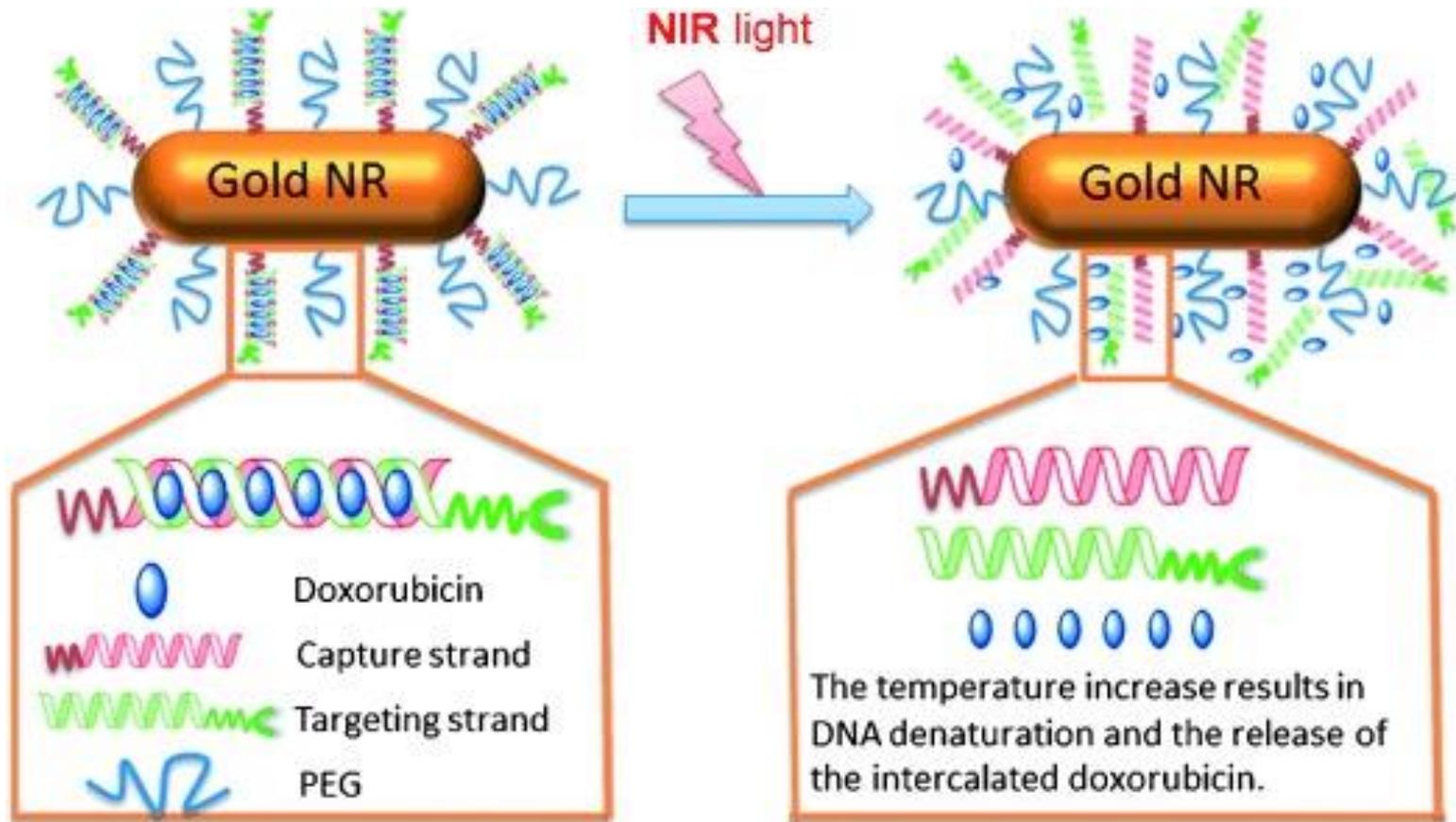
- Связывание противоопухолевых агентов (ФНО, интерлейкины/интерфероны, моноклональные антитела, хемотерапевтические агенты) с наночастицами <http://www.cytimmune.com/>
- «Нанопалочки» (Nanorods)
- Доставка вирусов

Наночастицы

Почему наночастицы попадают именно в опухоль?

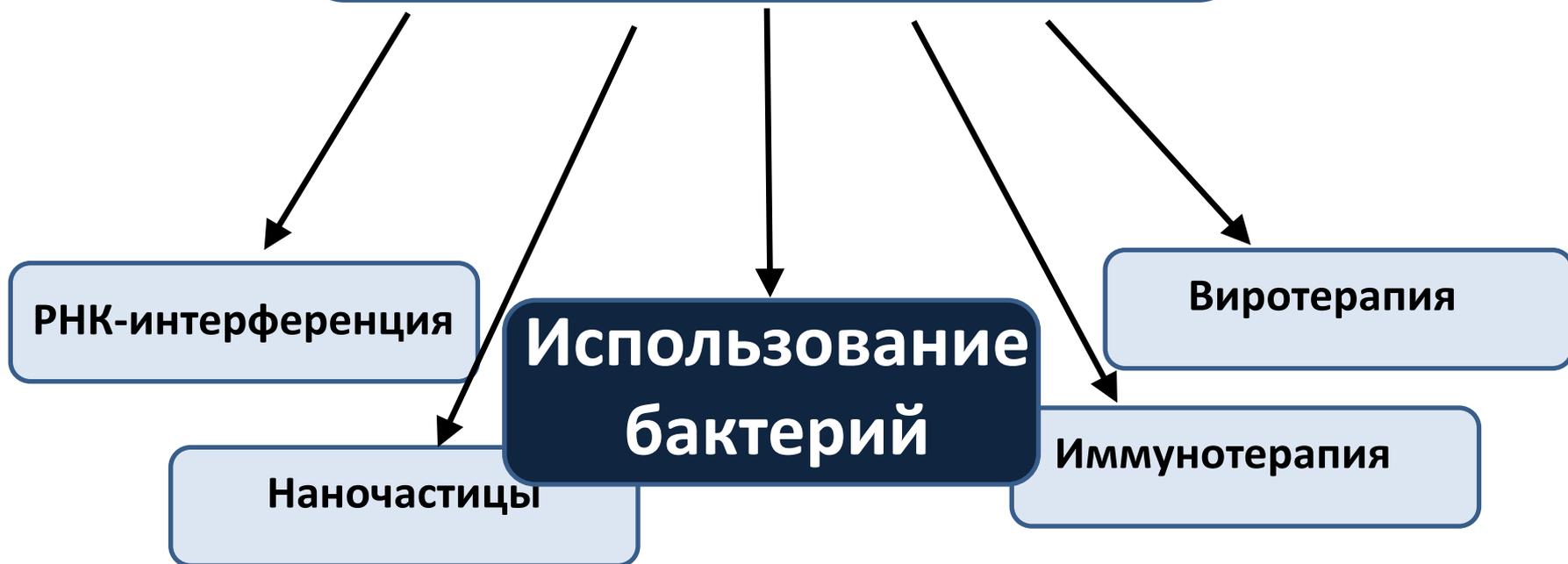


Наночастицы

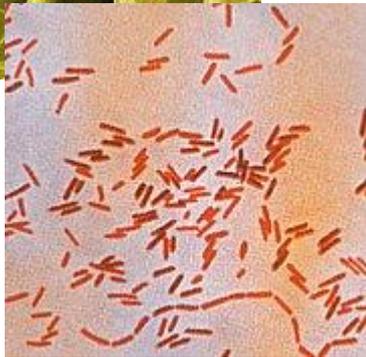
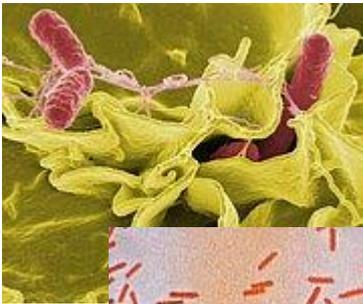


[Angew Chem Int Ed Engl. 2012; 51\(47\):11853-7.](#)

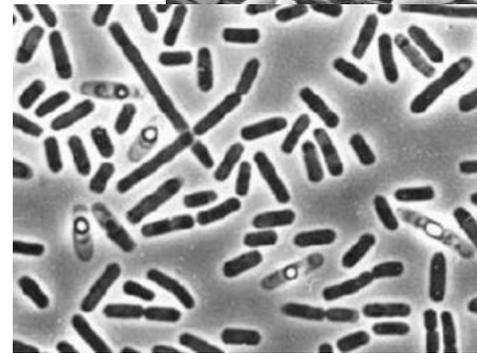
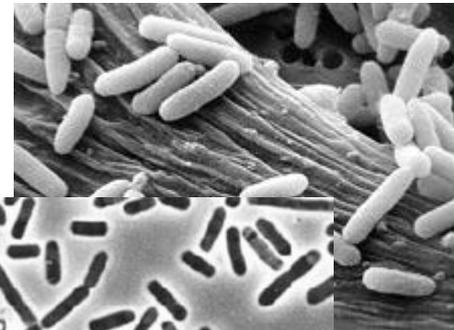
Современные методы лечения раковых заболеваний



Использование бактерий

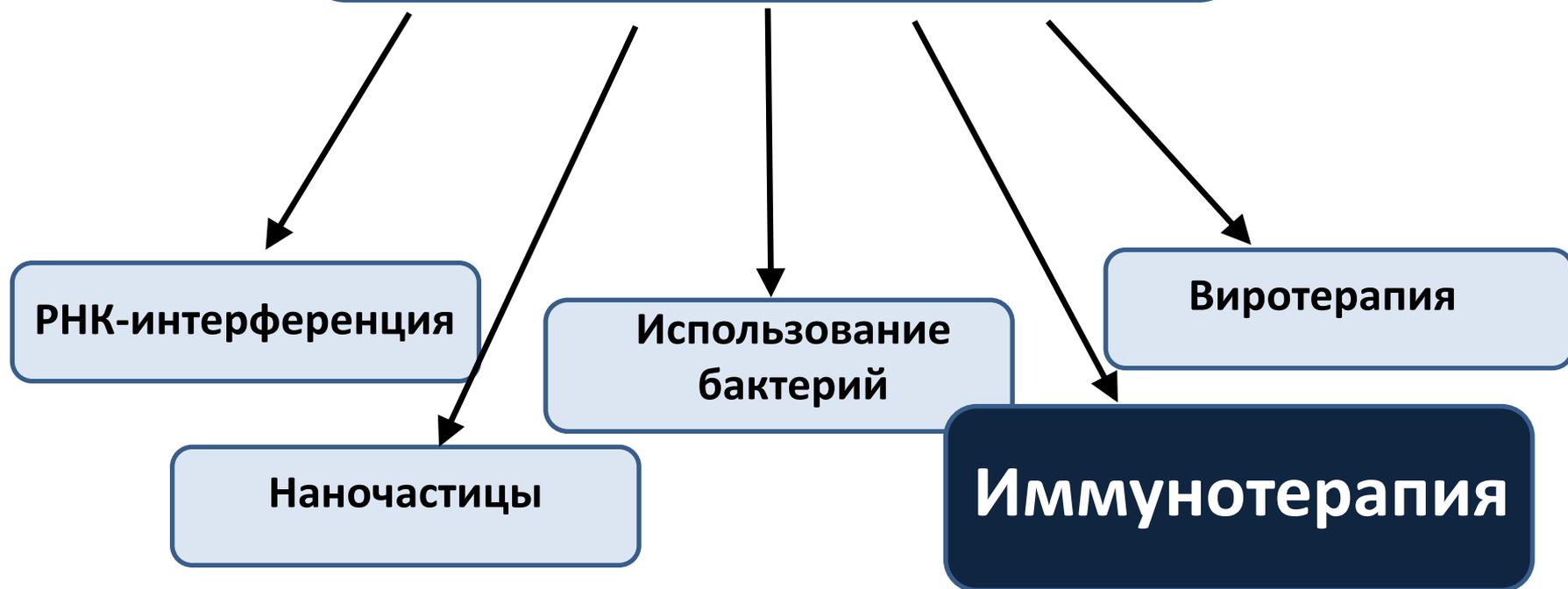


Бактерии рода Salmonella



Escherichia coli

Современные методы лечения раковых заболеваний



Иммунотерапия

Лаборатория индуцированных клеточных процессов



Влияние фрагментированной экзогенной ДНК на рост экспериментальных опухолей мыши и активацию антигенпрезентирующих дендритных клеток

Токсический эффект синергичного воздействия цитостатика циклофосфана и экзогенной ДНК

Современные методы лечения раковых заболеваний

```
graph TD; A[Современные методы лечения раковых заболеваний] --> B[РНК-интерференция]; A --> C[Использование бактерий]; A --> D[Иммунотерапия]; A --> E[Наночастицы]; A --> F[Виротерапия];
```

РНК-интерференция

Использование
бактерий

Виротерапия

Иммунотерапия

Наночастицы

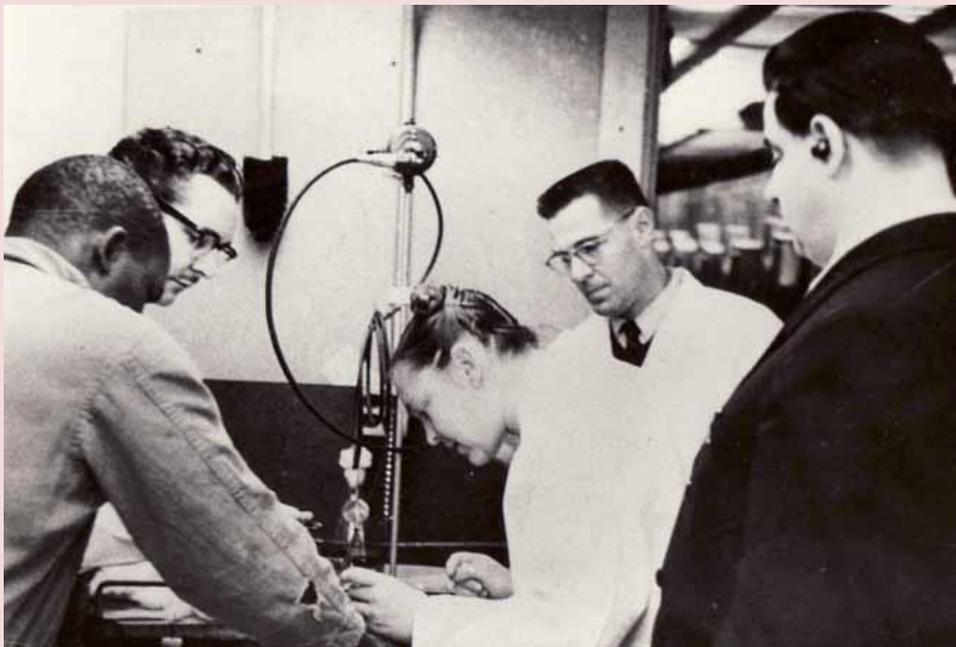
История вопроса

- **Спонтанная регрессия опухолей после введения антирабической вакцины или перенесенного вирусного заболевания (начало XX века).**
- **Сообщения об онколитических свойствах птичьего вируса болезни Ньюкасла и вируса гриппа (1950-е годы).**
- **Начаты работы с онколитическими вирусами на пациентах (конец 1940-х – начало 1950-х годов). Использование аденовирусов для лечения рака шейки матки.**

**Cancer 1954;7:106-118;
Cancer 1956;9:1211-1218**

История вопроса

• Исследования онколитических вирусов в России были начаты проф. М. К. Ворошиловой (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН) в 1960–1970 годах, и тогда же началось первое применение непатогенных штаммов энтеровирусов в онкотерапии.



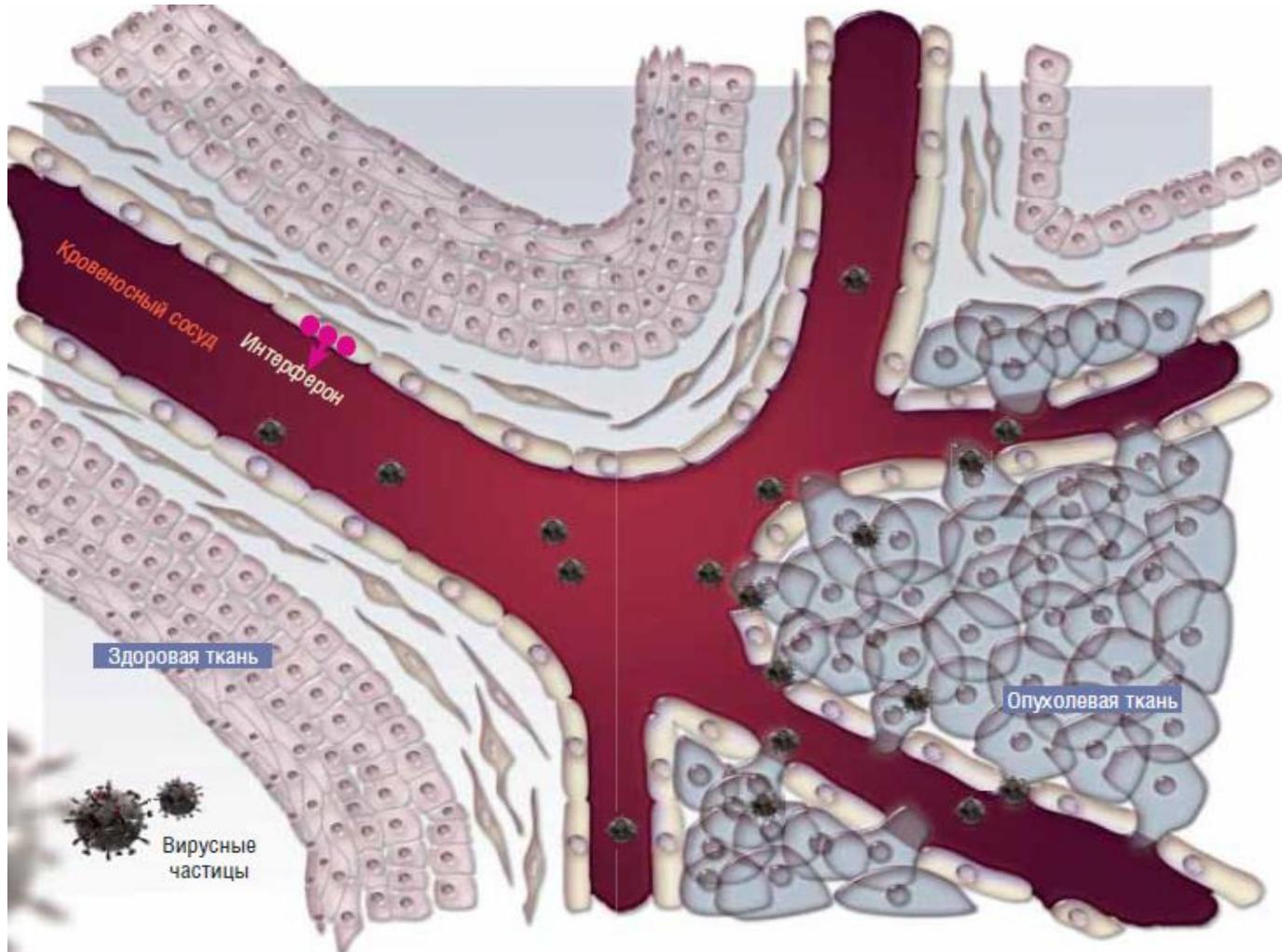
• Второе рождение в 1991 году после публикации по лечению глиобластомы модифицированным вирусом простого герпеса. *Science* 1991;252:854–856

• Новая волна – середина 90-х годов XX века, на основе выявленных механизмов противораковой избирательности вирусов.

Механизмы противоопухолевой активности онколитических вирусов

- Прямой лизис благодаря вирусной репликации**
- Цитотоксичность некоторых вирусных белков**
- Индукция противоопухолевого иммунитета**
- Повышение чувствительности опухоли к химио- и радиотерапии**

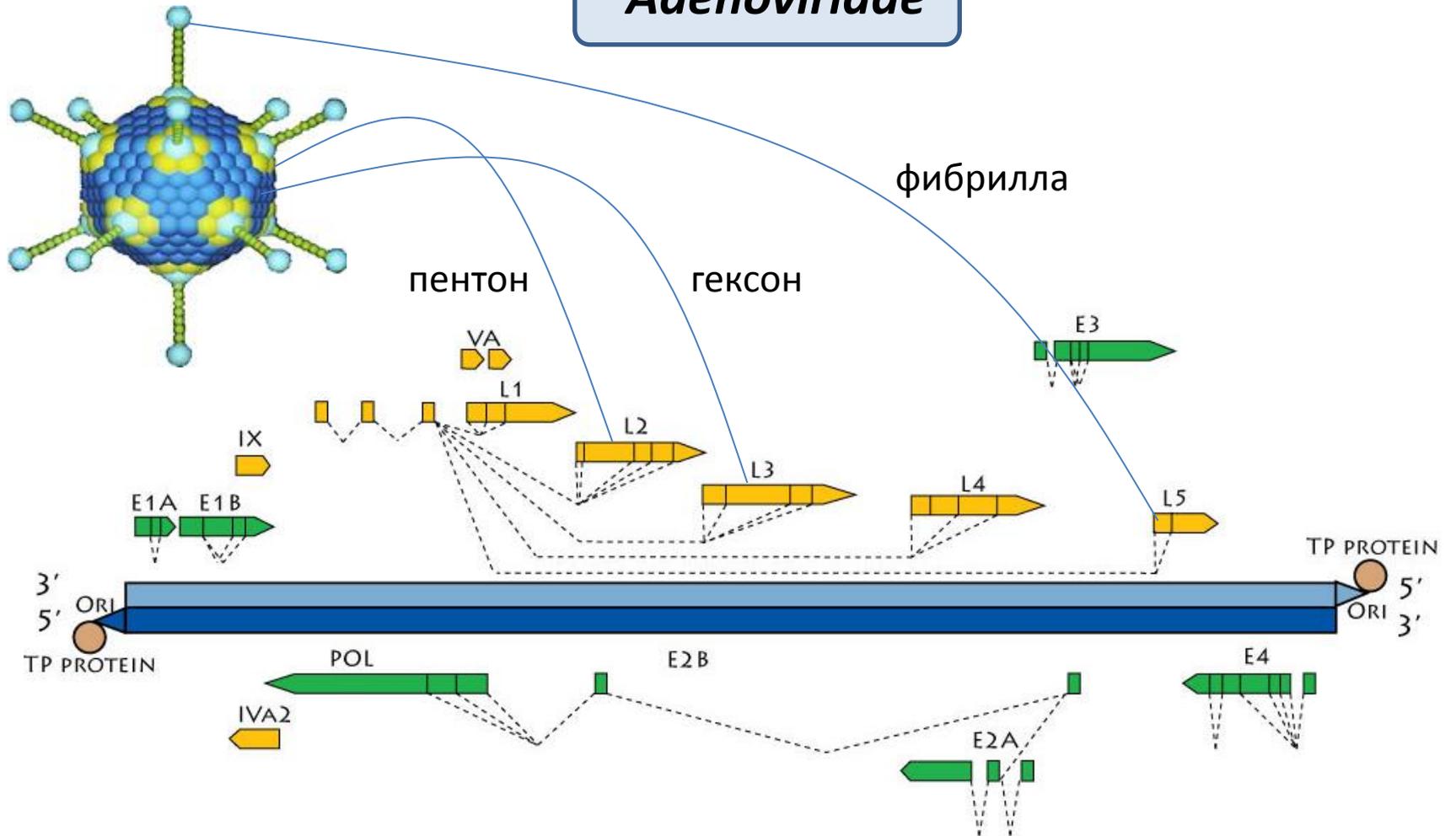
Почему же вирусы поражают в первую очередь именно опухолевую ткань?



Почему же вирусы поражают в первую очередь именно опухолевую ткань?

- 1. Опухоли физически доступны**
- 2. Клетки опухоли постоянно делятся**
- 3. У опухолевых клеток ослаблена противовирусная защита**

Adenoviridae



<http://www.lookfordiagnosis.com>

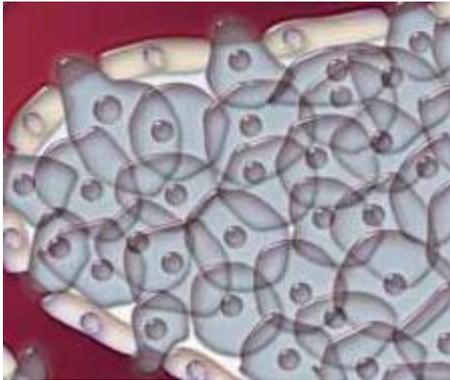
Механизмы противоопухолевой активности онколитических вирусов

- **Прямой лизис благодаря вирусной репликации**
- **Цитотоксичность некоторых вирусных белков (ADP – adenovirus death protein, E4ORF4)**
- **Индукция противоопухолевого иммунитета**
- **Повышение чувствительности опухоли к химио- и радиотерапии**

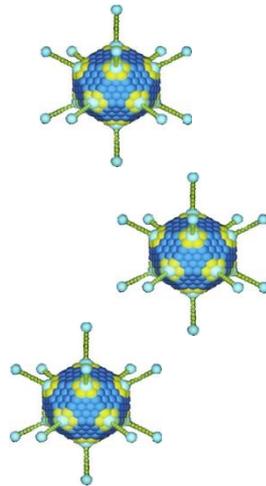
Механизмы противоопухолевой активности онколитических вирусов

- **Прямой лизис благодаря вирусной репликации**
- **Цитотоксичность некоторых вирусных белков**
- **Индукция противоопухолевого иммунитета**
- **Повышение чувствительности опухоли к химио- и радиотерапии**

Индукция противоопухолевого иммунитета



Опухолевые клетки – низкая иммуногенность, т.к. пониженная экспрессия МНС; низкая экспрессия цитокинов



При инфицировании опухоли аденовирусом:

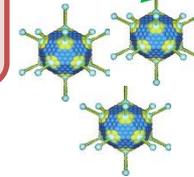
- экспрессия вирусного E1A => повышается чувствительность к ФНО-альфа

- инфильтрация лимфоцитами, АПК, повышение уровня цитокинов

Механизмы противоопухолевой активности онколитических вирусов

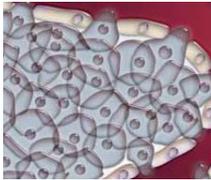
- Прямой лизис благодаря вирусной репликации**
- Цитотоксичность некоторых вирусных белков**
- Индукция противоопухолевого иммунитета**
- Повышение чувствительности опухоли к химио- и радиотерапии (E1A)**

Характеристика онколитических вирусов



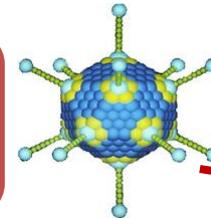
Возможность генетической модификации и продукции в больших количествах

Ням-ням



Способность эффективно лизировать опухолевые клетки, находить и уничтожать их по всему организму

Минимальная токсичность для нормальных тканей



опухоль

нормальные клетки

ATGCCTAGGCC



C

Стабильность генома

Продолжительная (до 3 недель) эффективность

Способы повышения противоопухолевой активности онколитических вирусов

```
graph TD; A[Способы повышения противоопухолевой активности онколитических вирусов] --> B[Повышение специфичности]; A --> C[Улучшение литических способностей]; A --> D[«Уход» от иммунной системы];
```

**Повышение
специ-
фичности**

**Улучшение
литических
способностей**

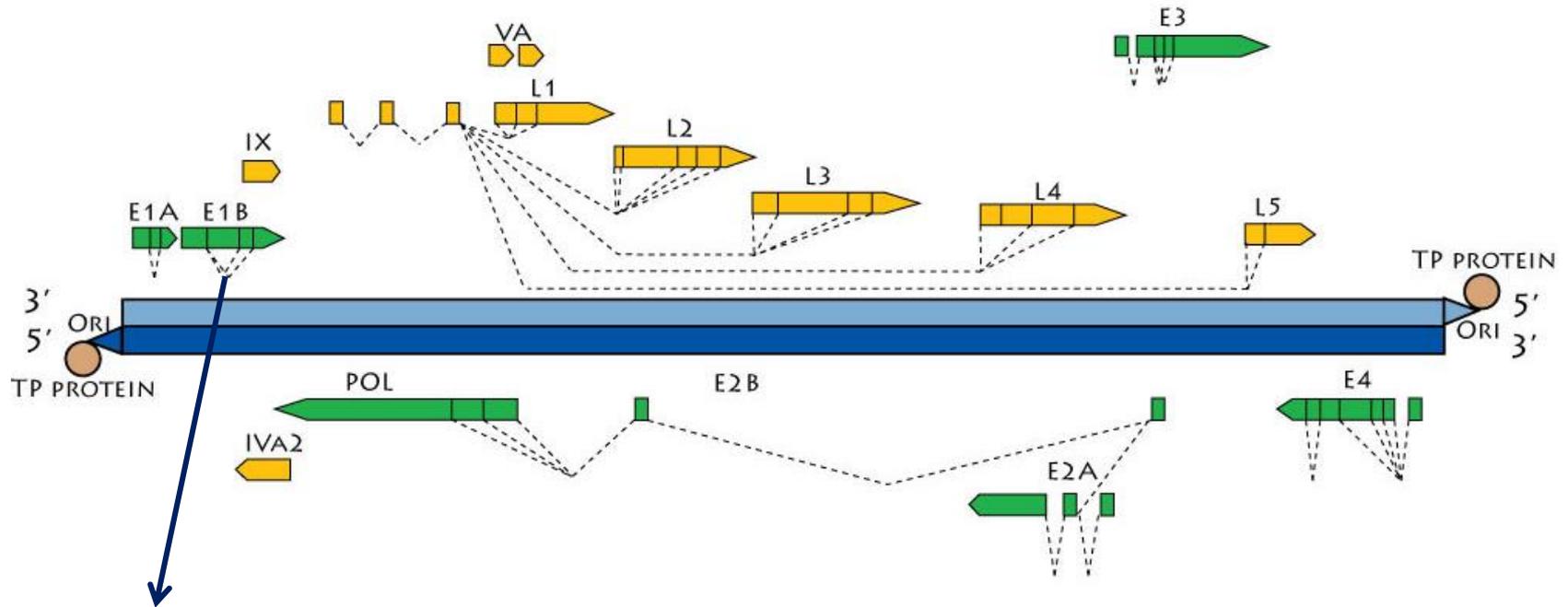
**«Уход» от
иммунной
системы**

Делеция вирусных генов

**Повышение
специ-
фичности**

**Аденовирус, делеция E1B 55K:
ONYX-015**

Делеция вирусных генов

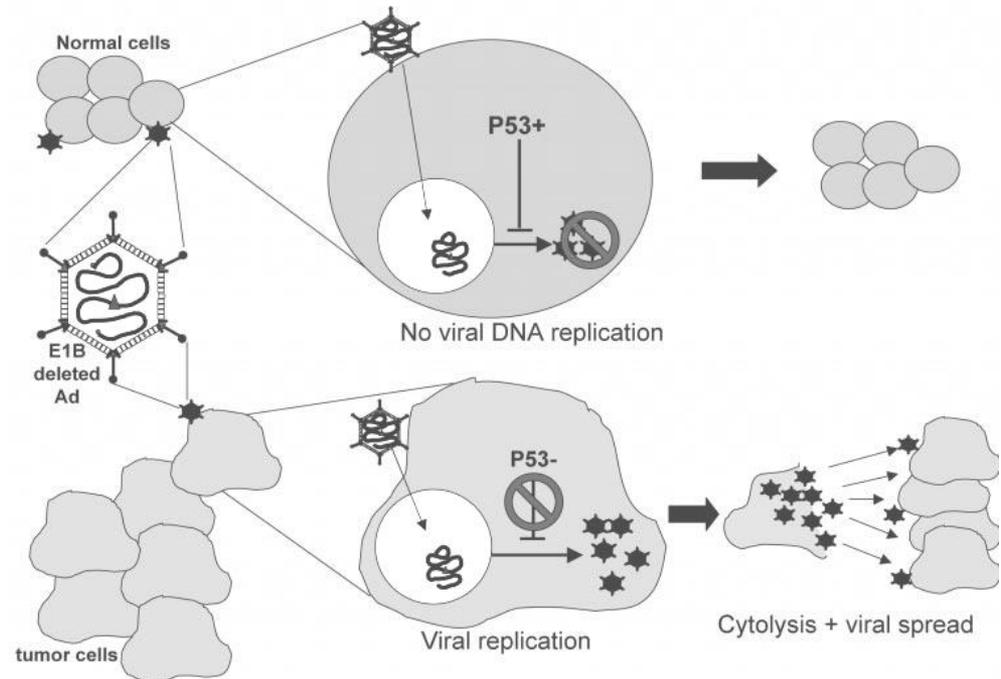


- Функции E1B 55K:**
- связывание и блокирование p53
 - перенос поздних мРНК из ядра в цитоплазму
 - ингибирование синтеза клеточных белков

Делеция вирусных генов

Повышение
специ-
фичности

Аденовирус, делеция E1B 55K:
ONYX-015 (1987 г.)



Делеция вирусных генов

Правда об ОНУХ-015



В 2001 году финансирование клинических испытаний в США фирмой Pfizer было прекращено по причине финансовых затруднений.

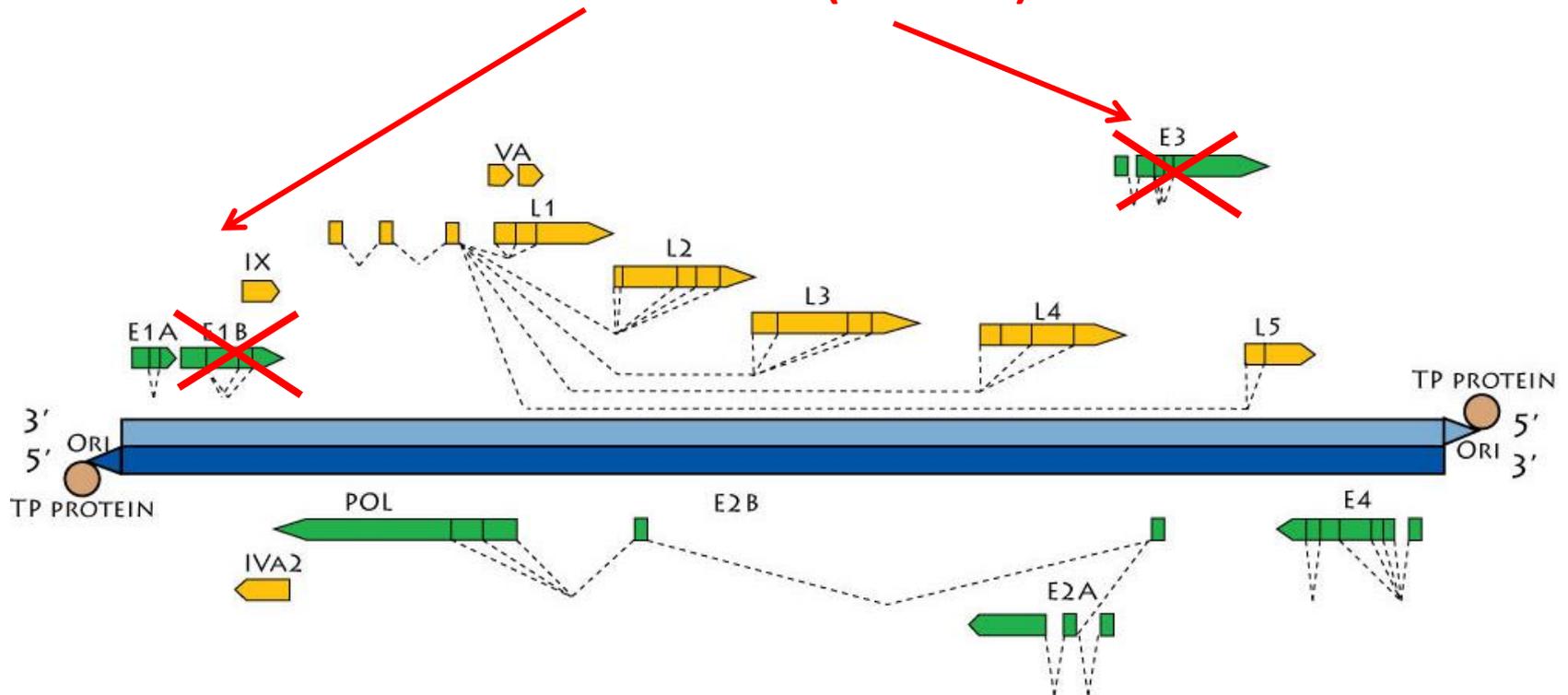


В 2011 году испытания Гендицина - производного ОНУХ 015 – было начато фирмой, США

Делеция вирусных генов

Китай, компания Shanghai Sunway Biotech (с 1997 г.):

Oncorine (H101)

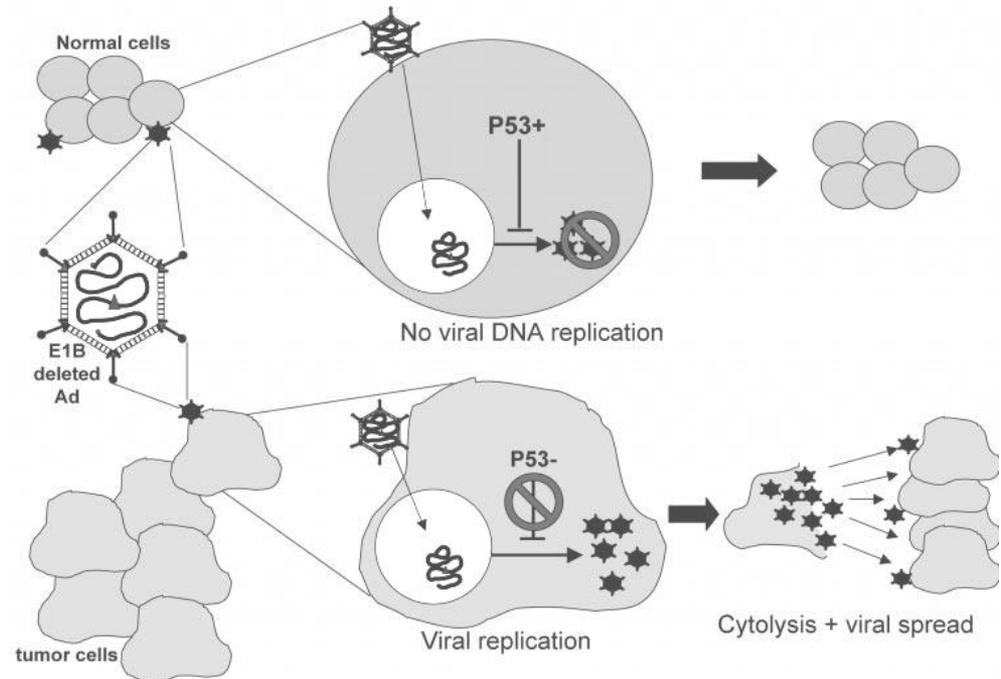


с 2005 года H101 используют для лечения поздних стадий рефракторного назофарингеального рака в сочетании с химиотерапией

Делеция вирусных генов

Повышение
специ-
фичности

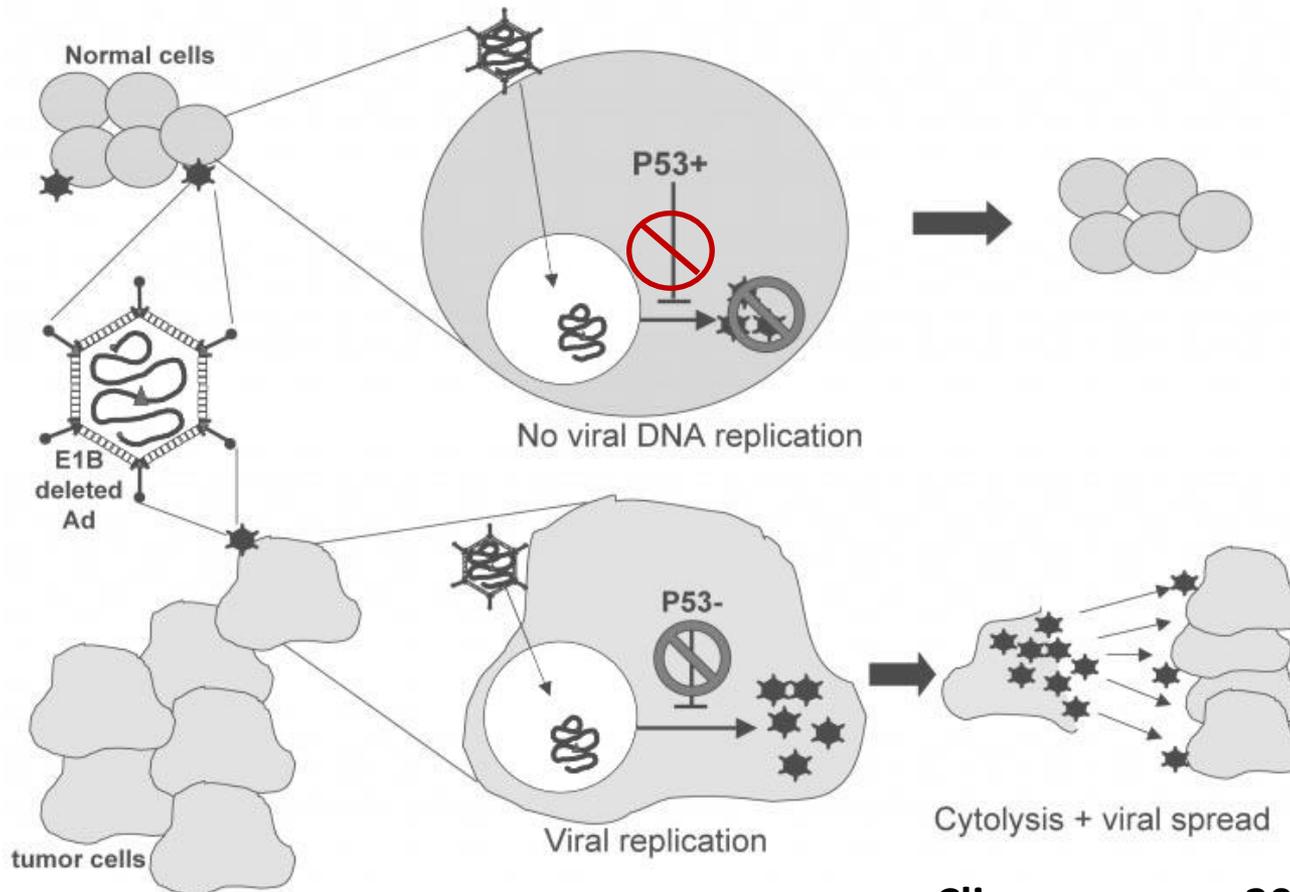
Аденовирус, делеция E1B 55K:
ONYX-015



Clin cancer res 2004; 10:5299-5312

Делеция вирусных генов

Правда об ONYX-015

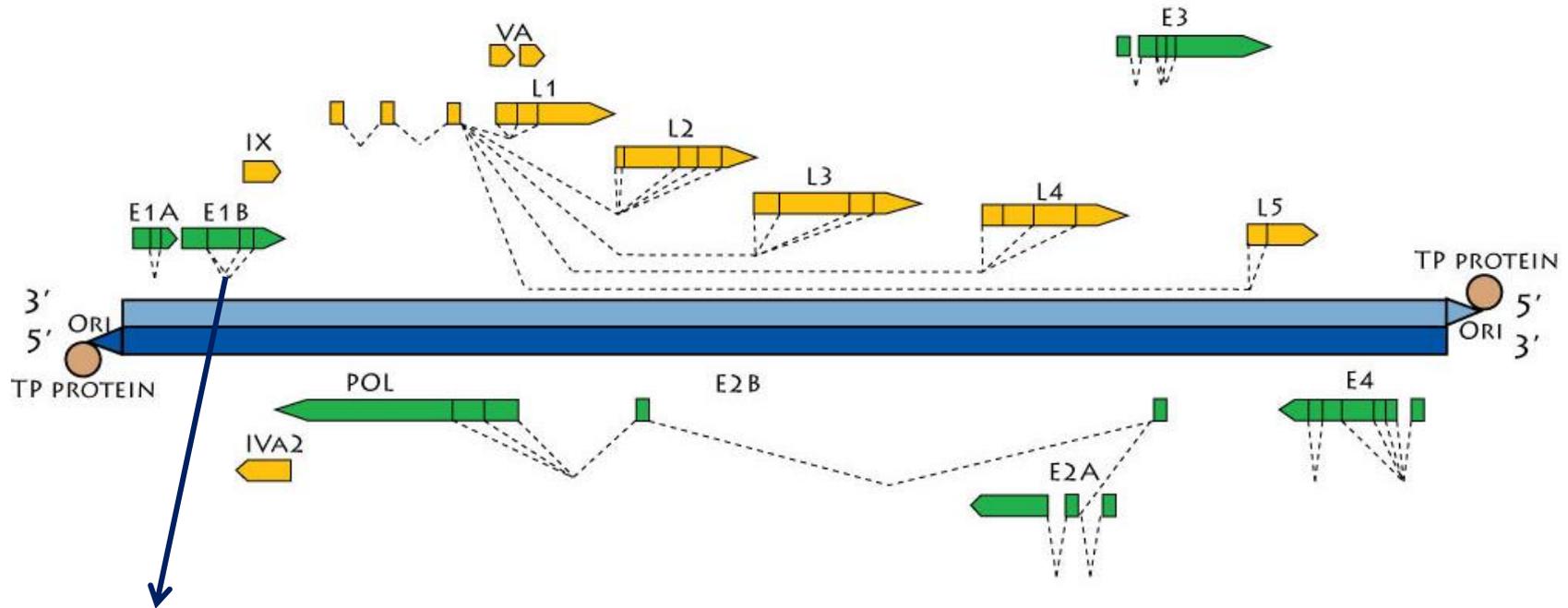


Оказалось, что ONYX-015 поражает некоторые опухоли с активным p53 и НЕ поражает некоторые опухоли с дефектным p53

Clin cancer res 2004; 10:5299-5312

Делеция вирусных генов

Правда об ОНУХ-015

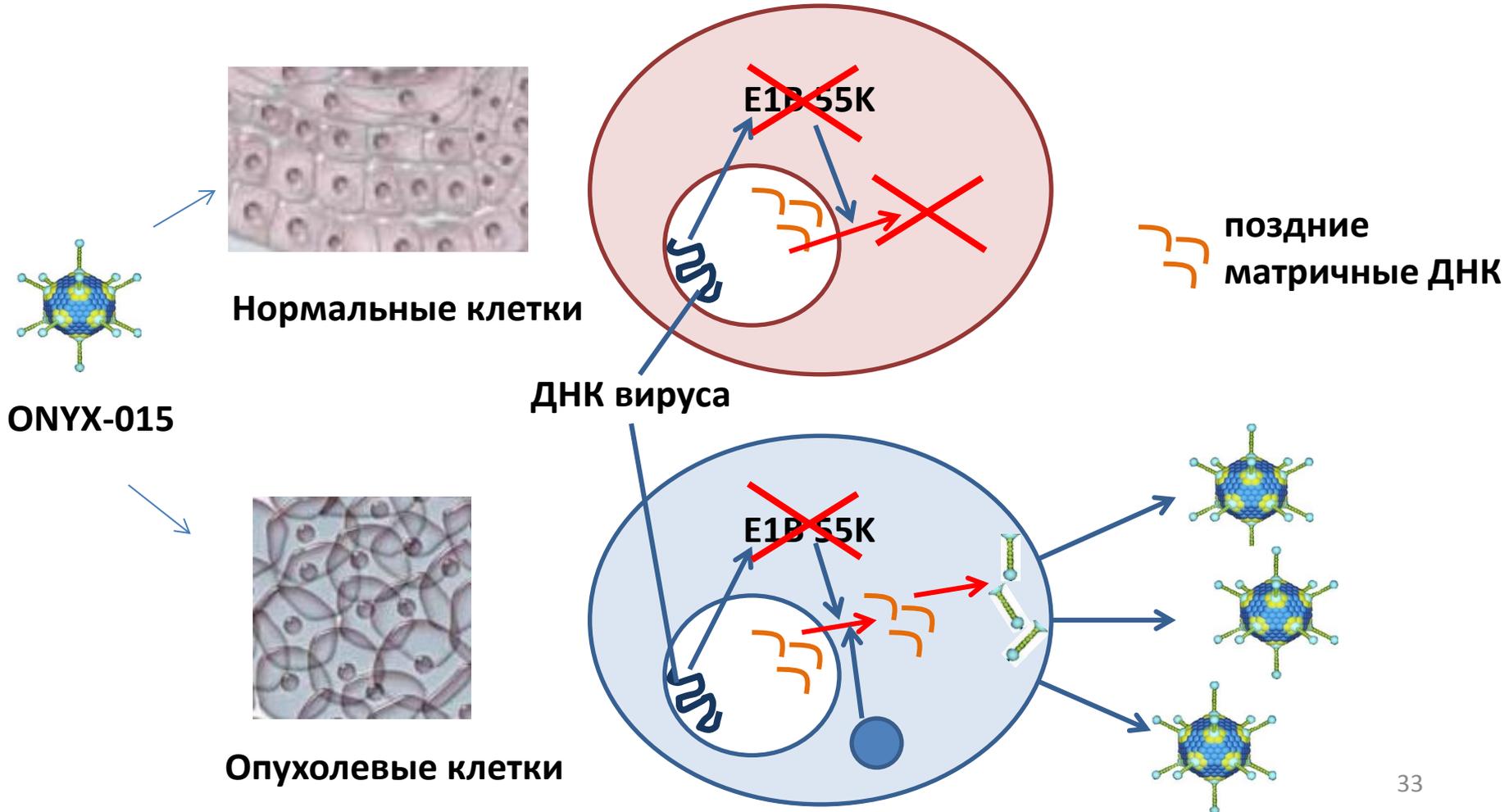


Функции E1B 55K:

- связывание и блокирование p53
- перенос поздних мРНК из ядра в цитоплазму
- ингибирование синтеза клеточных белков

Делеция вирусных генов

Правда об ONYX-015



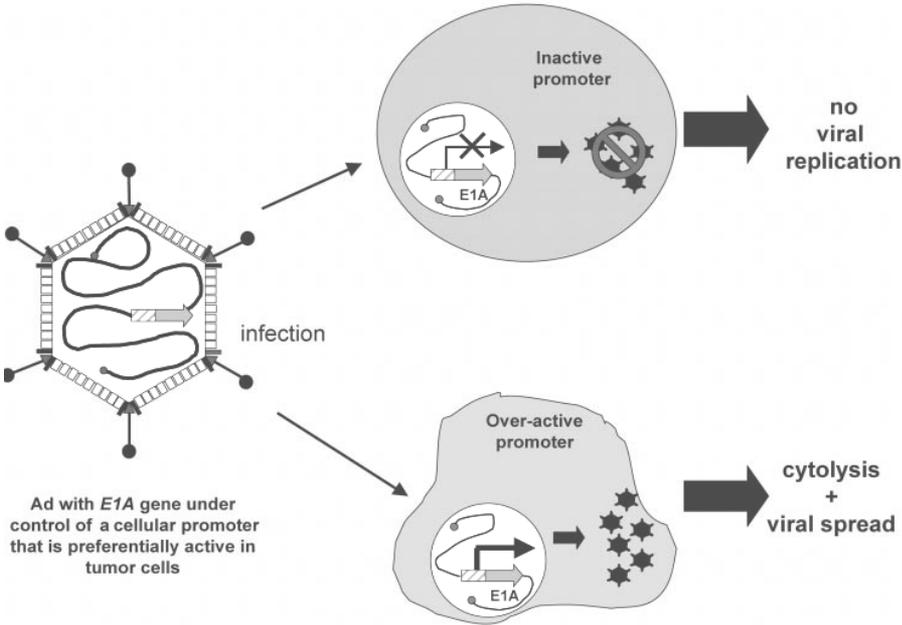
**Повышение
специ-
фичности**

Делеция вирусных генов

**Опухоль- и тканеспецифические
промоторы генов**

- TERT - теломераза
- Cox2 – циклооксигеназа
- E2F-1 – переход G1 -> S

- PSA – рак простаты
- AFP – рак печени
- Tyr – меланома

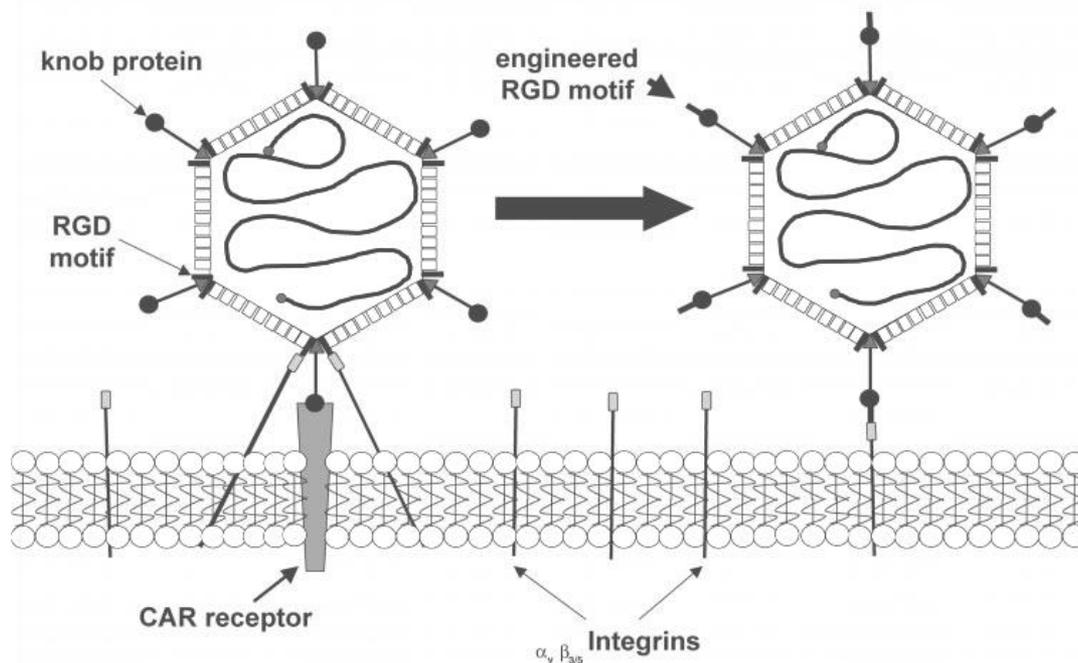


Повышение
специ-
фичности

Делеция вирусных генов

Опухоле- и тканеспецифические
промоторы

Модификация фибрилл



Псевдотипирование –
замена фибрилл на фибриллы вируса другого серотипа

Clin cancer res 2004, 10, 5299-5312

«Вооруженные» вирусы

**Цитотоксические белки:
апоптин, ADP, TRAIL**

**«Продраги»:
тимидинкиназа – ганцикловир
цитохром P450 - циклофосфамид**

**Иммуномодуляторы:
ГМ-КСФ, ФНО-альфа и другие цитокины**

**Малые интерферирующие РНК,
точнее – малые РНК, образующие
шпильки (shRNA)**

**Белки, влияющие на клеточный матрикс:
релаксин, декорин, гиалуронидаза**

**Улучшение
литических
способностей**

Альтернативный подход

БИОСЕЛЕКЦИЯ

мутаген

Эволюция «в миниатюре»

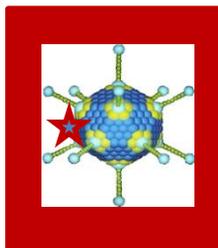
Пассирование –

отбор самых эффективных:

in vitro (на опухолевых культурах клеток)

in vivo (в опухолях, привитых мышам)

Клонирование



**ОБНАДЕЖИВАЮЩИЕ
ДАнные, ПОЛУЧЕННЫЕ В
ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА
КУЛЬТУРАХ ТКАНЕЙ И
МЫШАХ НЕ
ВОСПРОИЗВОДЯТСЯ НА
ЛЮДЯХ**

Почему?



Проблема: предсуществующий иммунитет

**«Уход» от
иммунной
системы**

- **использование редко-встречающихся серотипов Ad человека**
- **использование вирусов животных, непатогенных для человека**
- **псевдотипирование**

**Проблема: быстрый
вывод из крови**

**«Уход» от
иммунной
системы**

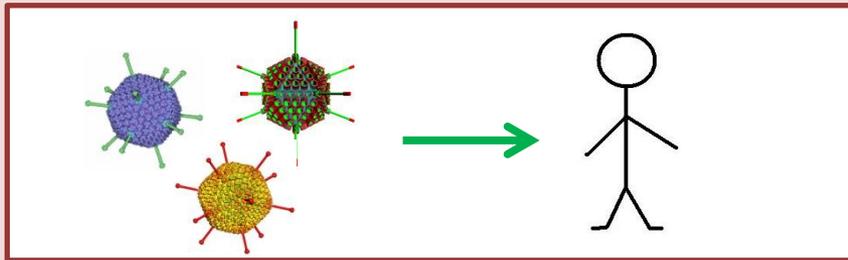
**Создание «депо»
через использование
разнообразных
«оберткок»:**

- полимеры,
- липиды,
- наночастицы,
- МСК,
- НСК

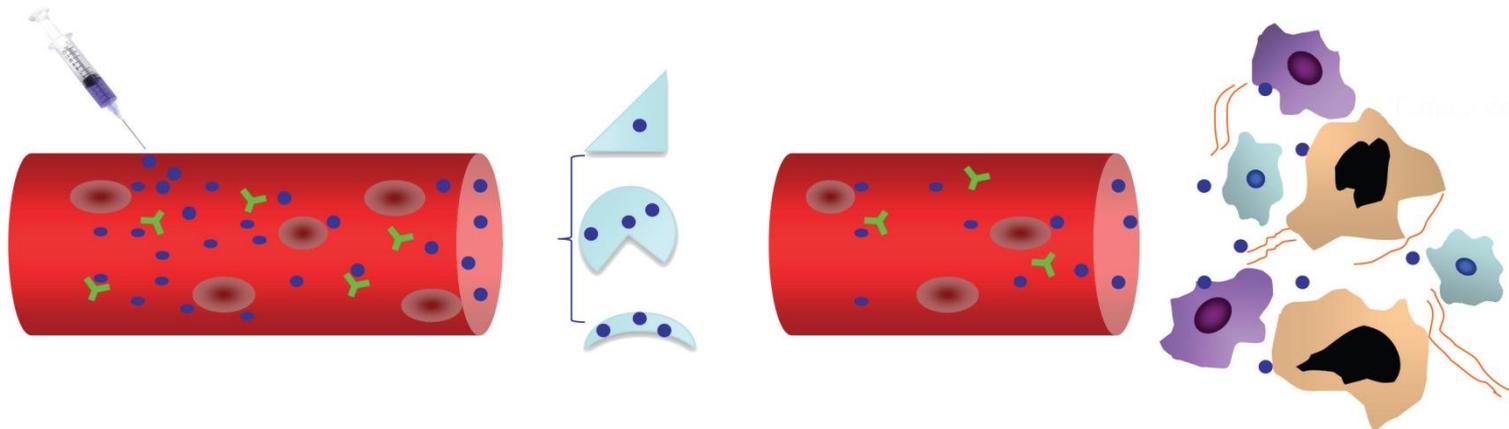
Проблема: приобретаемый иммунитет

**«Уход» от
иммунной
системы**

**Использование различных
вариантов вирусов для одного
пациента**



ПРОБЛЕМА: поглощение вирусов «нецелевыми» органами



● вирус

● клетки крови

Y нейтрализующие антитела

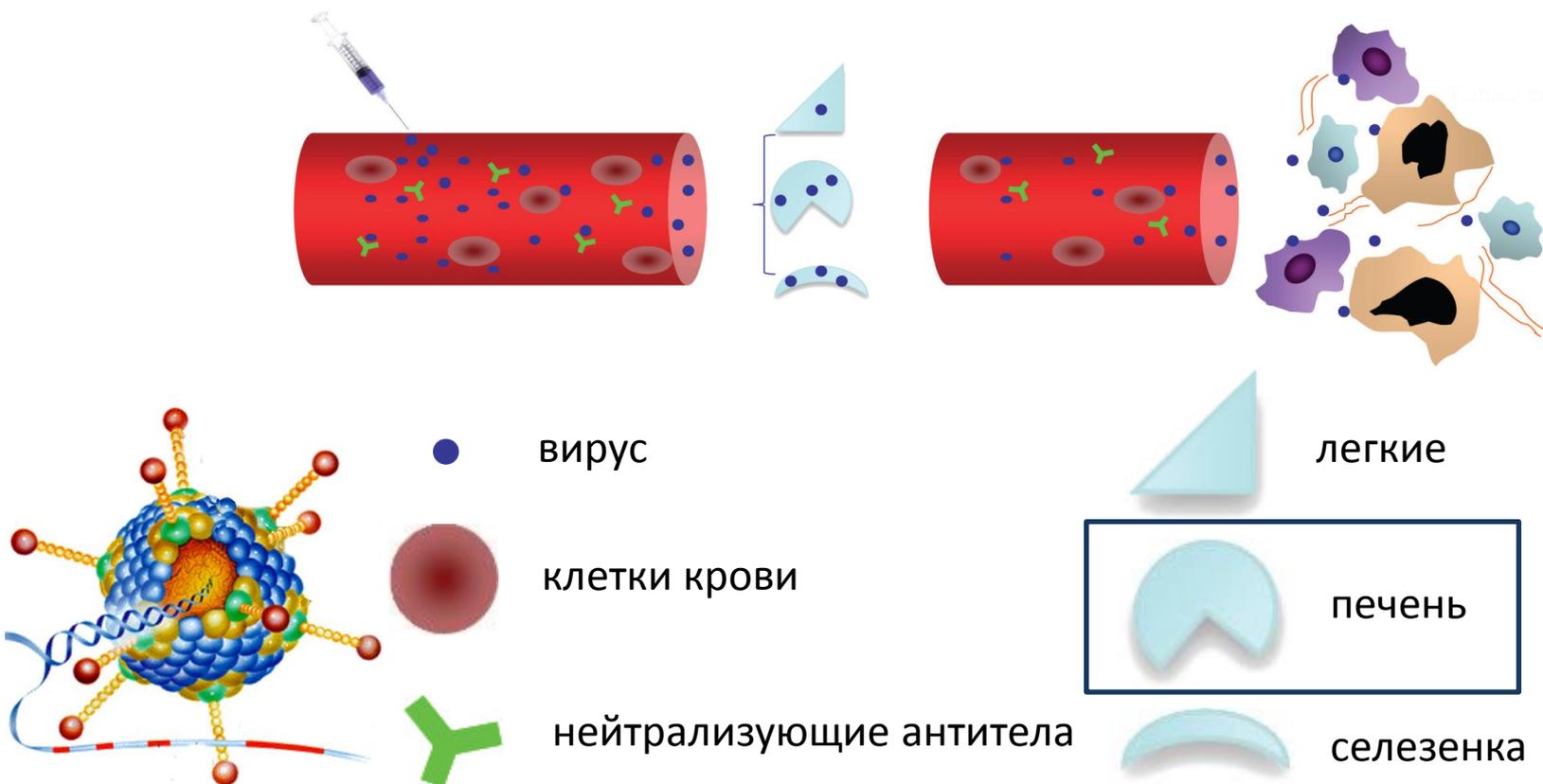
▲ легкие

◩ печень

◪ селезенка

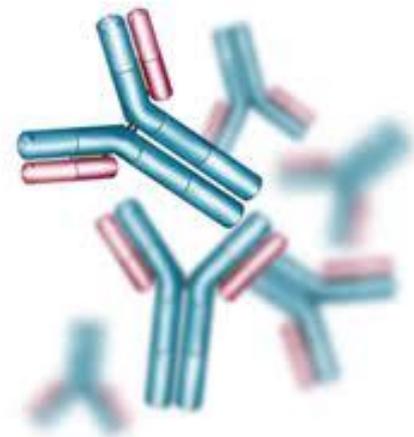
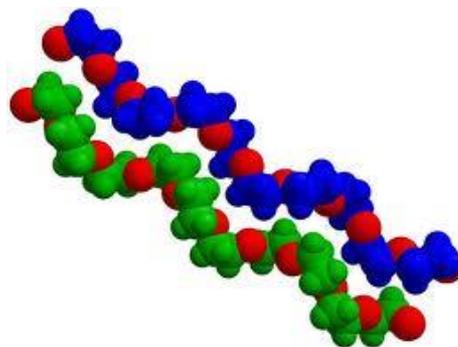
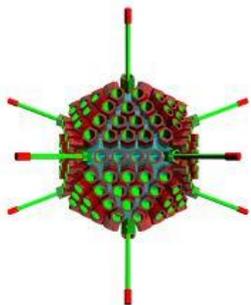
Adv Virol Epub 2012 Jan 31

ПРОБЛЕМА: поглощение вирусов «нецелевыми» органами

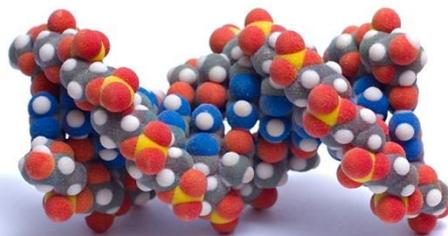


Определены конкретные аминокислоты в белке гексоне, отвечающие за гепатотропизм => заменяем их!

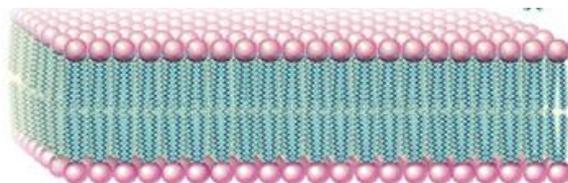
«Активное нацеливание»



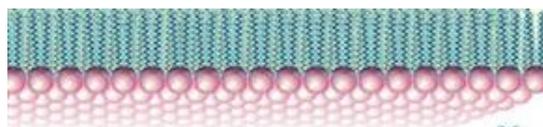
Комбинация с невирусными системами доставки



www.vision-science.ru



Липосомы/ниосомы



SLN (твердые липидные наночастицы)

положительно-
заряженные
полимеры

ПРОБЛЕМА: отсутствие адекватной модели

Культура тканей

Не всегда отражает взаимодействие рецептор-фибрилла *in vivo*,
отсутствие взаимодействия с иммунной системой



NUDE мыши

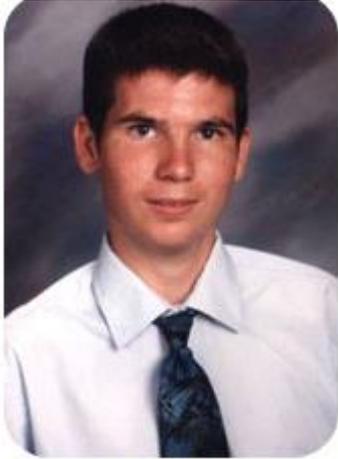
опухоль человека, но нет взаимодействия с
иммунной системой



Сирийские хомячки

Есть взаимодействие с иммунной системой, но опухоль только хомяка

ПРОБЛЕМА: индивидуальная непереносимость



Jesse Gelsinger умер при попытке генной терапии наследственной недостаточности орнитинтранскарбамилазы с помощью рекомбинантного аденовируса, в 1999 году.

НЕОБХОДИМ ТЕСТ НА ПЕРЕНОСИМОСТЬ!

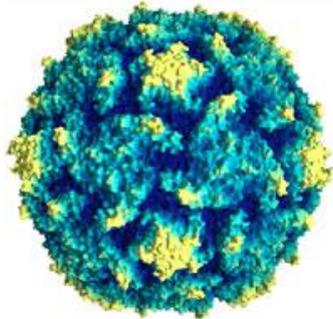
Семейства вирусов, используемых в виротерапии

Poxviridae



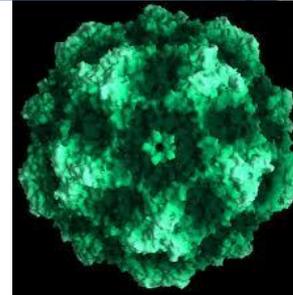
Orthopoxvirus

Picornaviridae



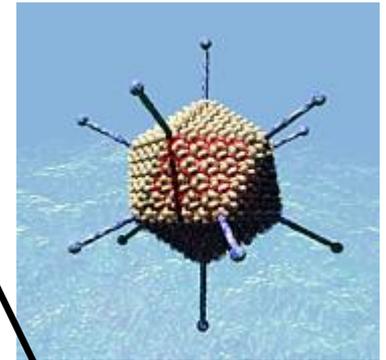
Enterovirus

Parvoviridae



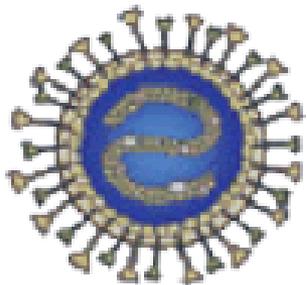
Parvovirus

Adenoviridae

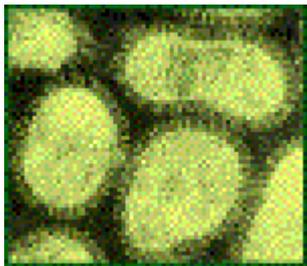


Adenovirus

Paramyxoviridae

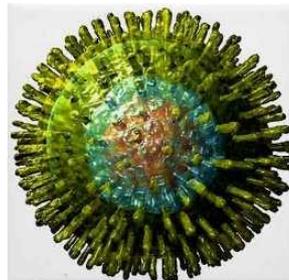


Respirovirus



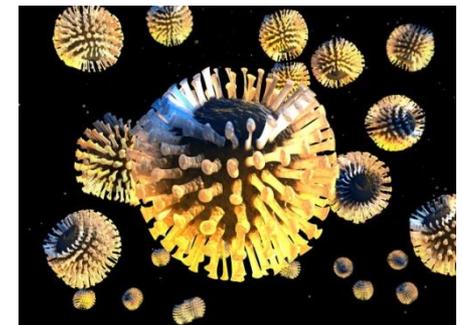
Avulavirus

Herpesviridae



Simplexvirus

Reoviridae



Orthoreovirus

МеГА грант

**университета по онколитическим
вирусам**

**ТО, ЧТО ВЫ ХОТЕЛИ ЗНАТЬ,
НО БОЯЛИСЬ СПРОСИТЬ**

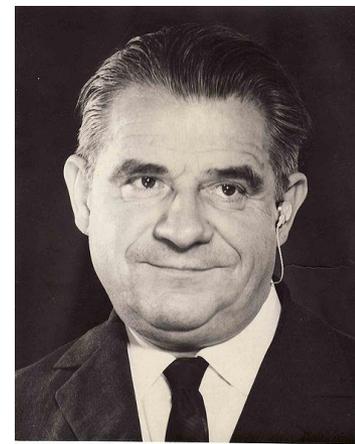
**«Новые подходы к разработке лекарств:
скрининг и конструирование непатогенных
для человека штаммов вирусов,
перспективных для использования в
качестве онколитических препаратов»**

2010-2012 гг

**Руководитель: д.б.н., проф.
Петр Михайлович Чумаков**



**Руководитель проекта –
д.б.н., проф. П.М. Чумаков**



М.П. Чумаков



**Заместитель руководителя проекта –
член-корр. РАН, д.б.н., проф.
С.В. Нетесов**

Лаборатории-участники проекта по онколитическим вирусам под руководством д.б.н., проф. П.М. Чумакова

*Лаборатория микробиологии и вирусологии
д.б.н. Чумаков
Петр Михайлович*

*Лаборатория вирусологии флавивирусов
к.б.н. Святченко
Виктор Александрович*

*Лаборатория молекулярной эпидемиологии особо опасных инфекций
к.б.н. Терновой
Владимир Александрович*

*Лаборатория иммунологии вирусных инфекций
д.б.н. Локтев
Валерий Борисович*

Adenoviridae

Picornaviridae

Parvoviridae

Herpesviridae

Poxviridae

Paramyxoviridae

Коллекция опухолевых культур клеток

*Лаборатория вирусных гепатитов
д.б.н. Кочнева
Галина Владимовна*

*Лаборатория молекулярной микробиологии
д.б.н. Тикунова
Нина Викторовна*

Лаборатория молекулярных механизмов патологических процессов и Лаборатория морфологии и функции клеточных структур

Adenoviridae

Канцеролизин (Adel2)

как и ONYX-015 имеет делецию E1B 55K

**По результатам 1-й фазы клинических
«Канцеролизин» оценен как перспективный
для дальнейшей разработки и проведения 2-
й фазы клинических испытаний**



*к.б.н. Святченко
Виктор Александрович*

Paramyxoviridae

Энтеровирус

*Лаборатория
вирусологии
флавивирусов,
ГНЦВБ «Вектор»*

ЖЭВ-15

(живая энтеровирусная вакцина)



контрольные животные



внутрипухоловое введение ЖЭВ-15



Д.б.н. Кочнева Галина Вадимовна

Poxviridae

Вирус осповакцины

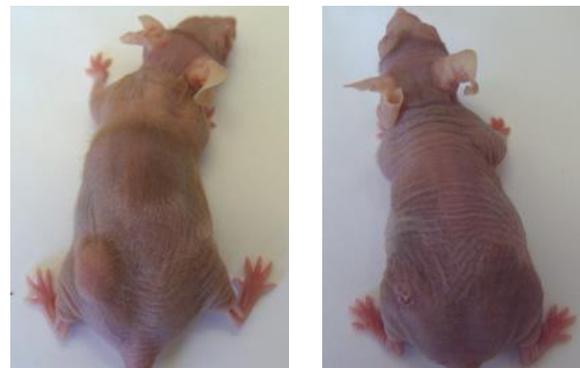
Штамм

**Л-ИВП +
апоптин**

Лаборатория
вирусных гепатитов
ГНЦВБ «Вектор»



Контроль ($V=7-8 \times 10^3 \text{мм}^3$)



Рекомбинантный штамм Л-ИВП со встроенным геном апоптина ($V=2 \times 10^2 \text{мм}^3$ и 0)



Штамм Л-ИВП ($V=4-6 \times 10^2 \text{мм}^3$)

Несколько слов о новой лаборатории в НГУ



Вирусологическая лаборатория находится в лабораторном корпусе НГУ и по своим техническим характеристикам позволяет работать с патогенами III-IV группы

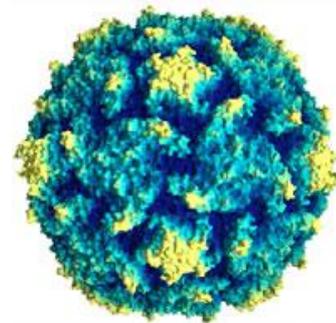


- Обособленная приточно-вытяжная вентиляция с HEPA-фильтрами
- Направленное движение воздуха (в бокс)
- Разделение помещений на чистую и заразную зоны
- Санпропускник, разделяющий зоны
- Передаточный шлюз
- Дез. душ
- Специальная мебель в заразной зоне, выдерживающая обработку дез. средствами
- Боксы биобезопасности II класса

**Лаборатория бионанотехнологии,
зав.лаб. член-корр., д.б.н., проф. С.В. Нетесов**
**Лаборатория микробиологии и вирусологии,
зав. лаб. д.б.н., проф. П.М. Чумаков**



Paramyxoviridae



Enterovirus

Латвия и эховирус

С 60-х гг исследования вели в Институте микробиологии им. Кирхенштейна АН Латвийской ССР.

С 2004 г. в Латвии применяется **Rigvir**

опухоли органов и тканей, которые в ходе эмбриогенеза образовались из **ЭНТОДЕРМЫ**: меланома, а также рак желудка, рак прямой и толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, а также различные виды сарком

Характеристика онколитических вирусов

- ❖ возможность генетической модификации и продукции в больших количествах;
- ❖ селективная тропность только к неопластическим клеткам;
- ❖ минимальная токсичность для нормальных тканей;
- ❖ способность к репликации внутри опухолевых тканей с высоким индексом пролиферации и их системное уничтожение;
- ❖ способность диссеминировать в опухолевой массе и, возможно, к отдаленным пораженным местам от места начального введения;
- ❖ стабильность генома, которая помогает избегать генерации токсичных, нежелательных мутаций, увеличивающих патогенность;
- ❖ надежный механизм для инактивации или уничтожения раковых клеток;
- ❖ продолжительная эффективность несмотря на наличие иммунного ответа к реплицирующимся вирусам