

С. В. НЕТЕСОВ, Г. В. КОЧНЕВА, М. В. РОМАНЕНКО

КАК ВИРУСЫ ПОМОГУТ ВЫЛЕЧИТЬ РАК



В развитых странах онкологические заболевания являются второй причиной смертности после сердечно-сосудистых, но, судя по всему, скоро они станут лидерами. Это связано с тем, что причины сердечно-сосудистых патологий в основном выявлены, и со многими из них научились эффективно бороться. С онкозаболеваниями все гораздо сложнее: молекулярно-генетических и экологических причин их возникновения немало, профилактика возможна не всегда, а для целого ряда опухолей методов лечения либо не существует, либо они малоэффективны. Идея использовать против опухолей вирусы кажется на первый взгляд странной, ведь слово «вирус» само по себе ассоциируется с болезнью. Но при ближайшем рассмотрении эта идея оказывается многообещающей, если заставить болеть только раковые клетки

Ключевые слова: онколитические вирусы, вирусные онколитики, аденовирусы, поксвирусы.
Key words: oncolytic viruses, viral oncolytics, adenovirus, poxvirus

© С. В. Нетесов, Г. В. Кочнева, М. В. Романенко 2017



НЕТЕСОВ Сергей Викторович – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заведующий лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии Факультета естественных наук Новосибирского государственного университета. Автор более 180 публикаций в международно цитируемых журналах, более 10 учебных пособий и монографий, более 20 патентов. Дважды Лауреат Премии Правительства России в области биомедицинских наук



КОЧНЕВА Галина Вадимовна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор». Автор и соавтор 143 научных работ и 12 патентов



РОМАНЕНКО Маргарита Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологии и вирусологии факультета естественных наук Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор 28 научных публикаций, двух учебных пособий

В 2015 г. в арсенале онкологов официально появился принципиально не новый, но новаторский по сути метод разрушения опухолей с помощью вирусов. Назвать его новым нельзя потому, что первые официальные публикации по его использованию, в ряде случаев успешному, появились еще в 1904–1910 гг. (Dock, 1904; De Pace, 1912). Тогда ученые описали сначала случайное, а затем и намеренное использование для лечения онкологических больных ослабленного (вакцинного) препарата *вируса бешенства*. Правда, широкого применения этот метод не получил, так как вакцина имела побочные эффекты, а результаты лечения было трудно предсказать.

В течение следующей сотни лет к этому методу неоднократно пытались вернуться. В 1950–1970-е гг. для лечения рака применялись непатогенные штаммы вирусов лихорадки Западного Нила, желтой лихорадки, вируса бешенства, аденовирусов, вируса болезни Ньюкасла и др. Иногда больные полностью выздоравливали, нередко случались и временные ремиссии. Но плохая предсказуемость результатов, незнание

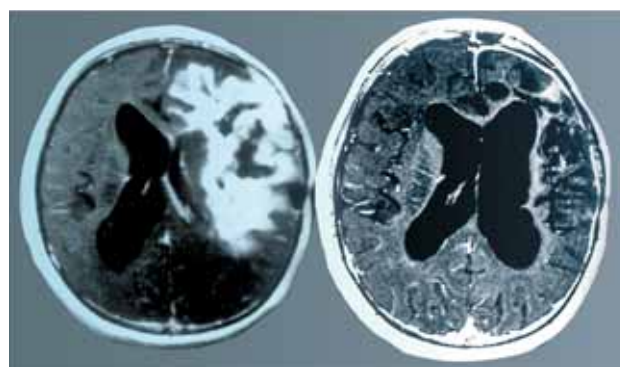
научно обоснованных механизмов действия вирусов на опухоль и предубеждения скептиков из контролирующих органов вынуждали врачей отступать.

Новая история онколитических вирусов

В 1990-е гг. начала развиваться более осознанная концепция создания онколитических вирусов. Произошло это после того, как удалось частично выяснить механизм противораковой активности полученного в США штамма аденовируса ONYX-015. Дело в том, что один из главных «стражей порядка» клетки – белок p53, обнаружив в ней вирус, запускает *апоптоз* (программируемую смерть), чтобы вирус не смог размножиться и заразить окружающие клетки. В клетках многих опухолей ген белка p53 поврежден, и размножение вируса ничего не сдерживает. У аденовируса, в свою очередь, имеется белок E1B-55K, который связывает p53 и не дает ему запускать апоптоз. Если ген, кодирующий этот белок, из вирусного генома удалить, то вирус сможет



Семейства онколитических вирусов, способных разрушать клетки опухоли. По: (Cattaneo, 2008)



Эти томограммы – свидетельство одного из самых поразительных случаев излечения рака с помощью вирусной терапии, описанного в Journal of American Medical Association (JAMA) в 1999 г. Больной – пятнадцатилетний подросток с глиобластомой, наиболее опасной и быстро развивающейся опухолью головного мозга. Лечение проводилось вирусом болезни Ньюкасла. Опухоль занимала значительный объем головного мозга, и никакое иное терапевтическое вмешательство было невозможно. По устному сообщению одного из авторов этой публикации, пациент в течение ряда лет был жив и успешно работал. По: (Csatoryand, Bakacs, 1999)

Существует несколько подходов в лечении онкозаболеваний: хирургическое удаление опухоли; радиотерапия, т. е. разрушение опухоли введенными в нее радиоактивными препаратами или направленным лучевым воздействием; химиотерапия – применение лекарств, разрушающих быстро размножающиеся раковые клетки. Есть и более новые методики, основанные на активации иммунитета, при которых используются высокоспецифичные моноклональные антитела к антигенам опухоли, «метящие» раковые клетки и привлекающие к ним внимание клеток иммунной системы, которые и разрушают опухоль. Наконец, существует иммунотерапия с применением особым образом активированных Т-лимфоцитов самого пациента. Возможно и сочетание разных подходов

размножаться только в клетках опухоли, где к тому же р53 в большинстве случаев не работает.

Позднее выяснилось, что в отсутствие гена E1B не реализуется и вторая функция белка E1B-55K (O'Shea *et al.*, 2004), которая состоит в переносе из ядра в цитоплазму вирусных РНК, кодирующих белки вирусной оболочки. В опухолевых клетках эту функцию берет на себя не установленный до сих пор фактор. Таким образом, механизм действия ONYX-015 еще нуждается в дальнейшем исследовании. Кроме того, за перерождение клеток в раковые могут отвечать не только дефекты белка р53. Есть и другие механизмы ракового перерождения клеток, и в этом случае аденовирусы будут неэффективны.



ВИРУСЫ: «ЗДОРОВАЯ» КОНКУРЕНЦИЯ

«До недавнего времени было общепринято мнение, что все вирусы являются возбудителями тех или иных болезней и должны рассматриваться в качестве вредных для общества патогенных агентов, требующих только мер борьбы с ними... В начале 50-х годов появились сомнения в правильности такого суждения. В процессе экспериментов по изоляции вирусов из фекалий у здоровых детей, а также при изучении их свойств в опытах на обезьянах, других животных и в культурах тканей начали накапливаться данные, свидетельствующие о том, что некоторые условно патогенные и полностью непатогенные кишечные вирусы (энтеровирусы) могут обладать определенными полезными для организма свойствами <...>

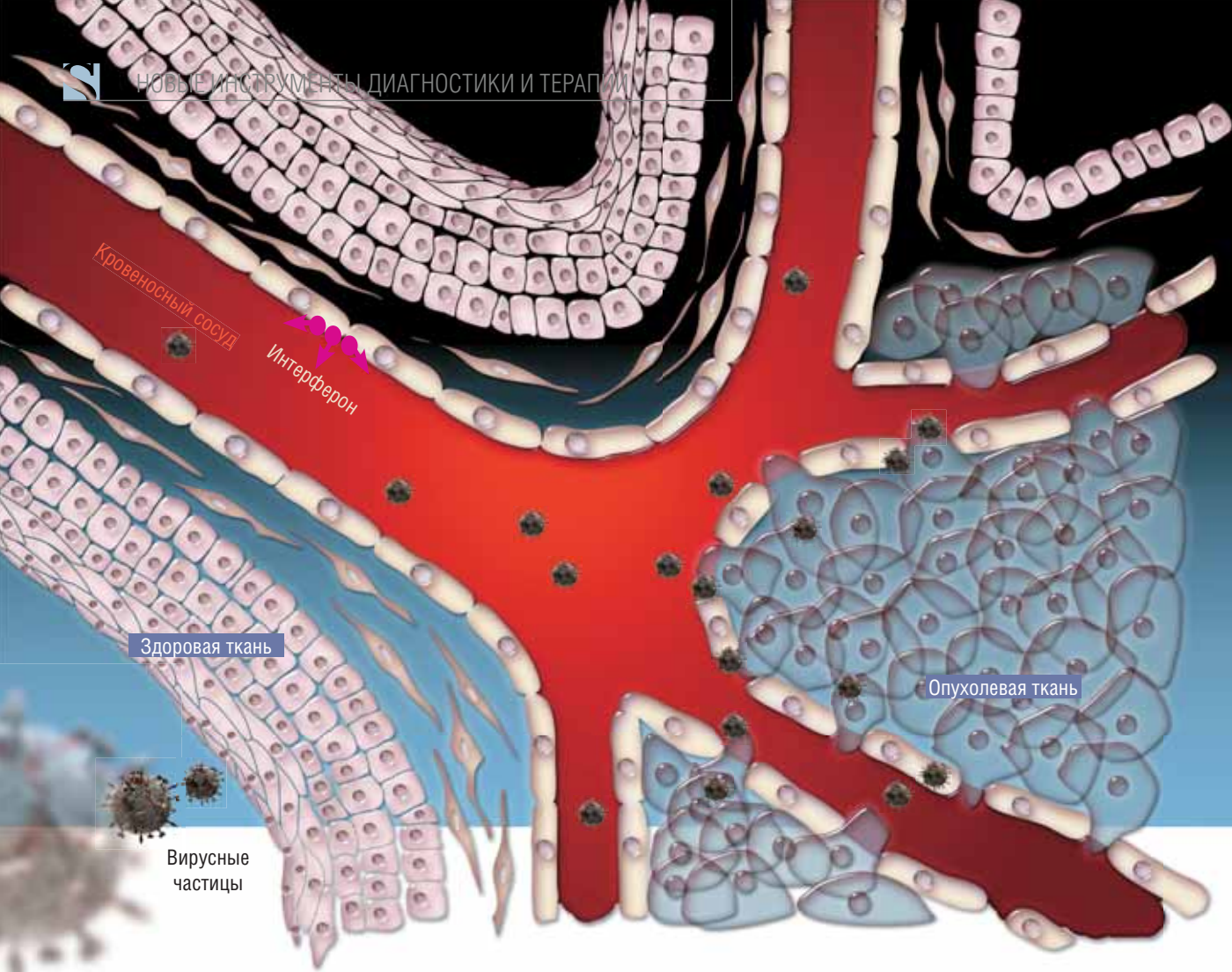
В наших наблюдениях у большинства вакцинированных* детей были получены хорошие результаты, но у некоторых из них вакцинный вирус не «прижился» в кишечнике и антитела в крови детей не появлялись. Вирусологические исследования, проведенные как в нашей, так и во многих других лабораториях, показали, что на успех пероральной иммунизации против полиомиелита живой вакциной Сэбина неблагоприятно влияет конкуренция со стороны неполиомиелитных типов энтеровирусов, обитающих в кишечнике у многих детей с момента рождения и не влияющих на состояние их здоровья. Этот факт дал нам возможность подтвердить наличие симбиоза с организмом человека некоторых рас непатогенных сапрофитных энтеровирусов, способных в среде обитания конкурировать с живой вакциной Сэбина, а также с болезнетворными вирусами при соответствующих условиях <...> Нами был предложен новый принцип борьбы с энтеровирусными болезнями путем вытеснения болезнетворных вирусов

Д. м. н., чл.-корр. АМН СССР М. К. Ворошилова впервые открыла онкотропизм у группы непатогенных штаммов энтеровирусов и обосновала учение о полезных для организма свойствах непатогенных энтеровирусов-симбионтов кишечника. Она организовала и свыше двадцати лет руководила лабораторией иммунологии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов, ныне носящего имя его основателя, академика РАН М. П. Чумакова. Фото из архива сына М. К. Ворошиловой П. М. Чумакова

конкурирующими в среде обитания непатогенными энтеровирусами-симбионтами, и на их основе М. К. Ворошиловой были разработаны так называемые живые энтеровирусные вакцины (ЖЭВ) <...> В результате наших наблюдений и ряда исследований впервые было доказано существование нового для науки феномена – эффективного подавления болезнетворных вирусов непатогенными расами энтеровирусов-симбионтов кишечника благодаря конкуренции за среду обитания и интерферирующему воздействию с одновременной стимулирующей нескольких защитных систем организма. Селекционированные полезные вирусы-симбионты оказались способными вызывать онколиз (разрушение некоторых видов опухолевых клеток) и, кроме того, защищать в некоторых случаях лейкоцитарную систему в организме от губительного действия радиоактивного излучения. Это открытие имеет как общебиологическое теоретическое, так и медицинское практическое значение, обеспечивая новые возможности для профилактики и лечения ряда заболеваний»

По: (Ворошилова, 1988)

* Вакцинация против полиомиелита производилась живой вакциной Сэбина.

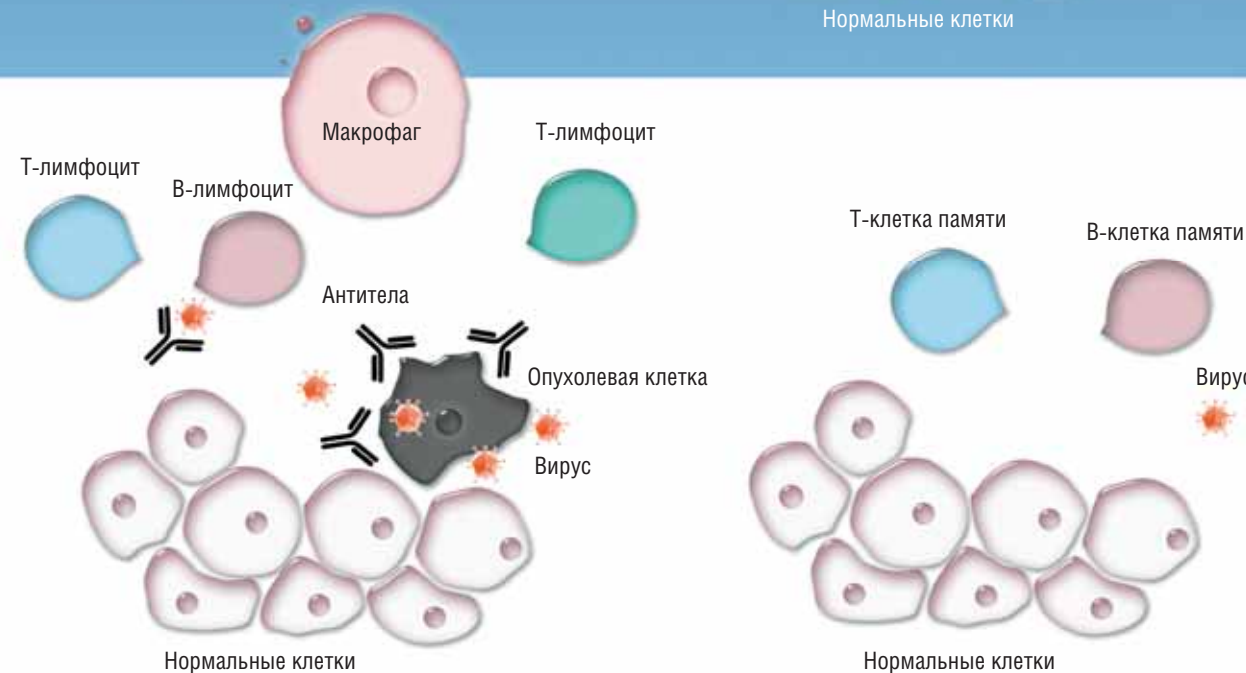
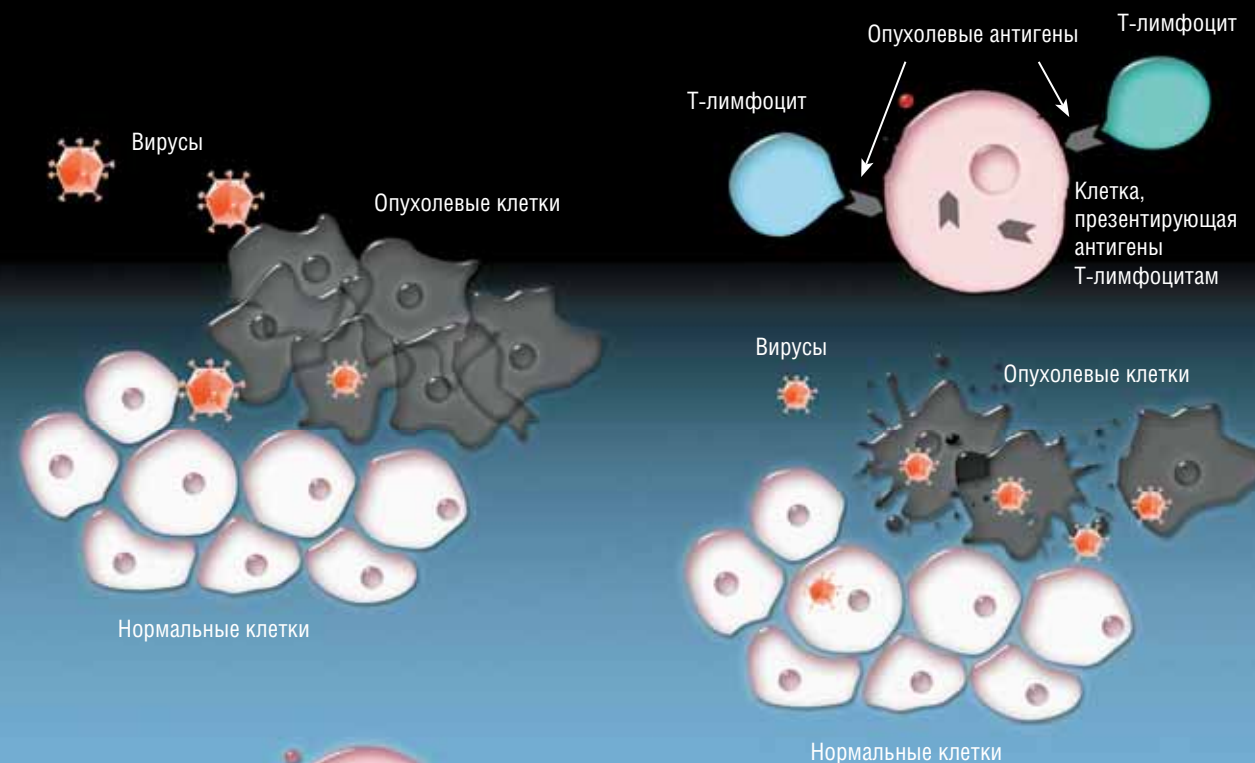


В норме мощным барьером против проникновения вируса и его распространения от клетки к клетке является сама архитектура живых тканей. Кроме того, здоровые клетки в ответ на инфекцию вырабатывают и секретируют противовирусный белок интерферон, придающий соседним клеткам невосприимчивость к вирусной инфекции. Опухоль же представляет собой хаотическое нагромождение плохо контактирующих друг с другом клеток, на которые могут легко адсорбироваться вирусные частицы, проникающие из кровотока. Кроме того, опухолевые клетки порой утрачивают механизмы противовирусной защиты, в том числе способность вырабатывать интерферон. Для вируса опухолевые клетки являются и преимущественным субстратом для размножения, так как они активно делятся и в них уже запущены процессы биосинтеза, необходимые для вирусной репликации

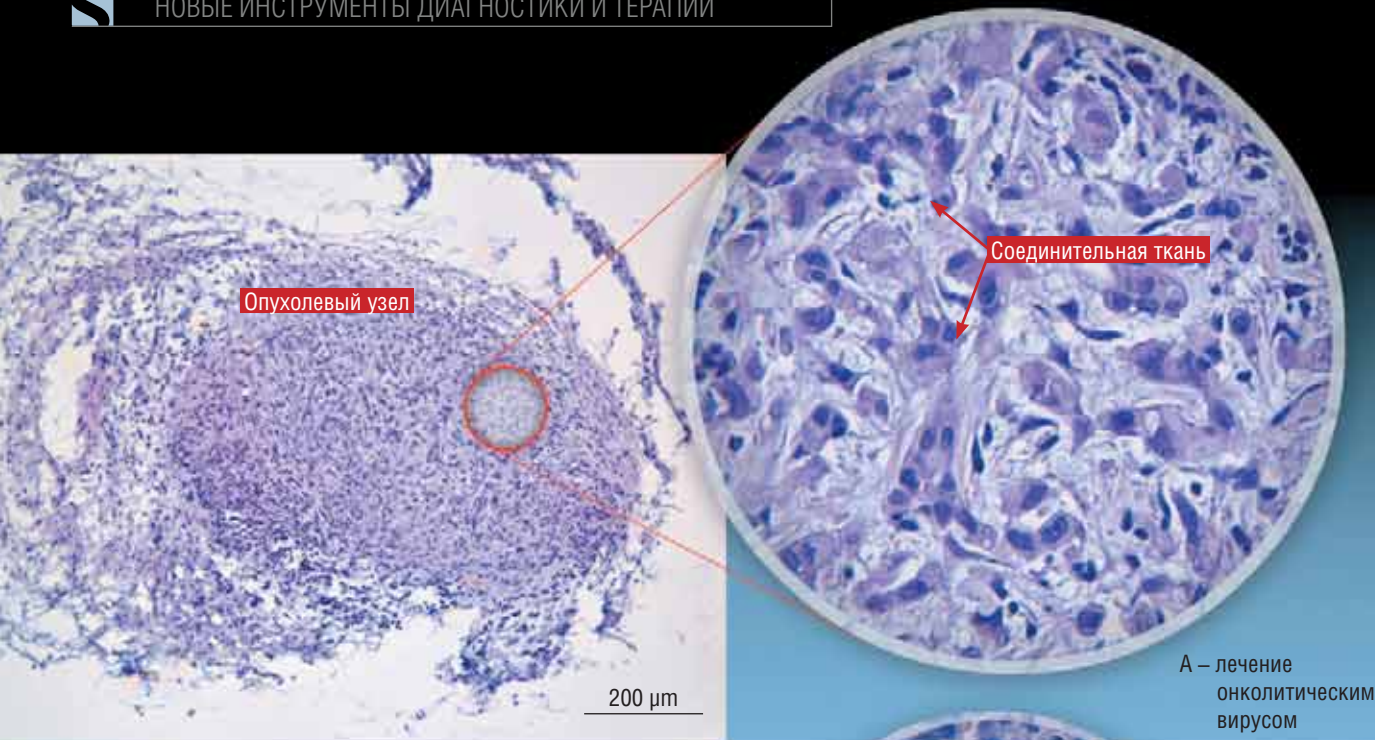
Все это привело к тому, что к концу 1990-х гг. разработки онколитических вирусов снова затихли. Однако аналог ONYX-015 под названием *онкорин* был разрешен для лечения некоторых типов онкобольных с опухолями головы и шеи в Китае, так же, как и рекомбинантный аденовирус с удаленным геном E1B и дополнительной вставкой гена p53 для усиления онколитических свойств (препарат *гендицин*) (Guo *et al.*, 2006).

В СССР исследования онколитических свойств вирусов были начаты в 1960–1970-х гг. в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР (Московская обл.). Кроме изучения вирусов полиомиелита и разработок вакцин против них, в институте проводились более широкие исследования, в результате которых вакцинные штаммы вируса полиомиелита были применены для лечения рака. Кроме того, были выделены и типированы несколько других непатогенных для людей энтеровирусов, у которых обнаружили онколитические свойства.

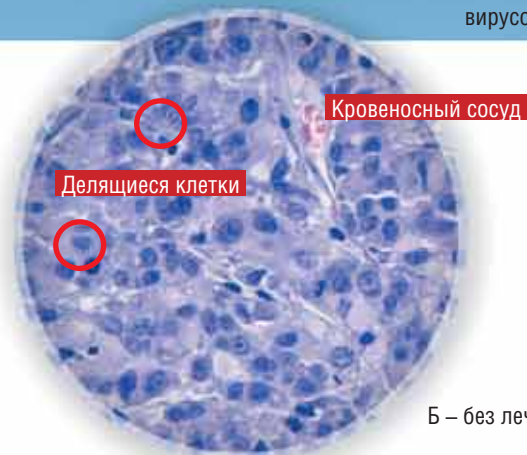
С онколитическими вирусами работала член-корр. АМН СССР доктор медицинских наук М. К. Ворошилова, и в ряде случаев ей удалось добиться серьезных успехов вплоть до полного исчезновения первичной опухоли и метастазов. Однако в 1970-х гг. ее эксперименты были запрещены. Поводом послужил недостаток данных о механизмах явления и молекулярной природе как вирусов, так и раковой опухоли. Уже после прекращения этих работ были



На сегодняшний день механизм действия онколитических вирусов представляется куда более сложным, чем просто лизис (разрушение) опухолевых клеток. Установлено, что в процессе такого разрушения высвобождается ряд опухолевых антигенов и различных факторов «опасности», что «пробуждает ото сна» клетки иммунной системы, которые начинают разворачивать против опухоли «боевые действия». При этом вирус активирует не только клеточный «фронт» иммунного ответа, но и другие молекулы, например провоспалительные цитокины, в результате чего иммунитет активизируется настолько мощно, что разрушиться может не только первичный очаг опухоли, в который была сделана инъекция вируса, но и метастазы (Matveeva *et al.*, 2015)



А – лечение онколитическим вирусом



Б – без лечения

В экспериментах, проводимых в НГУ, ГНЦ ВБ «Вектор» и ИХБФМ СО РАН, лабораторных мышей линии *Nude* с привитой аденокарциномой человека AsPc-1 заражали онколитическим вирусом Коксаки В-6. Морфологическое исследование опухолевых узлов показало, что у мышей, получавших лечение, в ткани узла уменьшается число опухолевых клеток, а между ними разрастаются прослойки соединительной ткани (А). У мышей, не получавших лечение, узлы были заполнены активно делящимися опухолевыми клетками, соединительная ткань отсутствовала (Б). Фото Е. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск)

опубликованы два ее обзора, оба – в малоизвестных изданиях: русскоязычном и зарубежном (Ворошилова, 1987; Voroshilova, 1989).

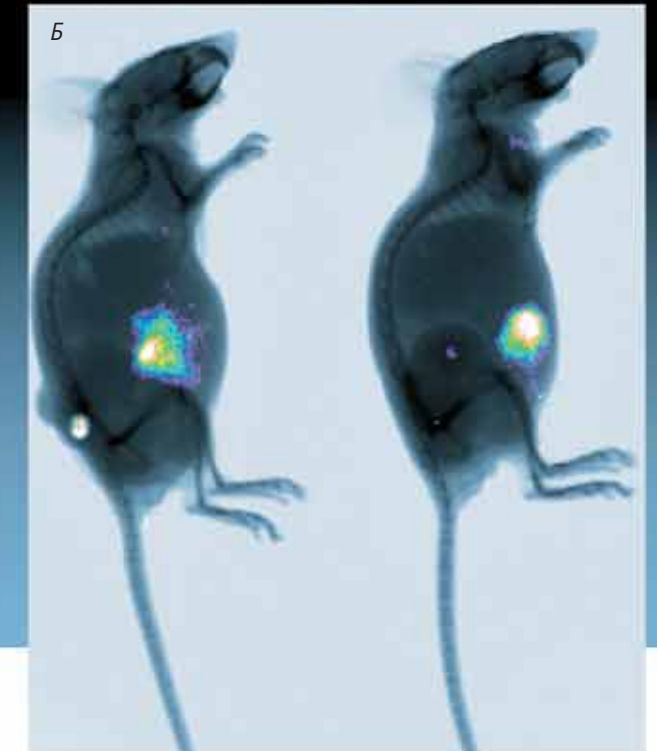
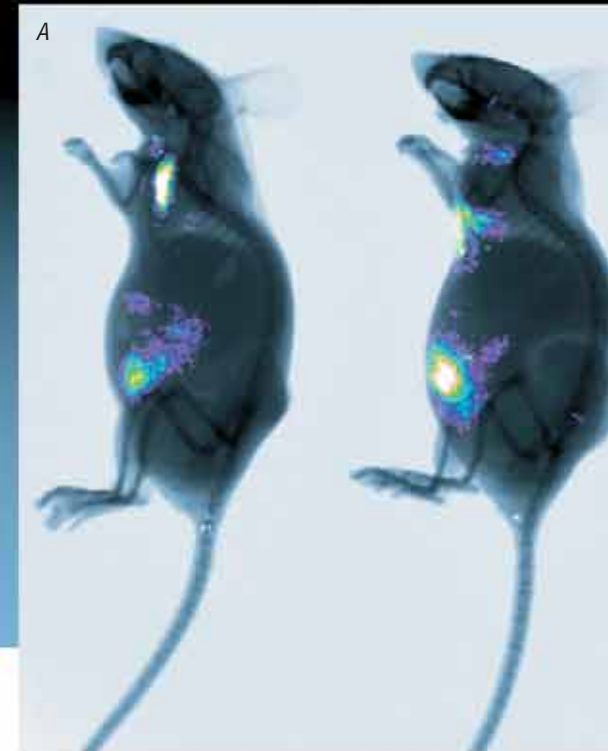
Позднее профессор В. В. Кешелова, работая в разных российских онкологических клиниках, использовал в терапии некоторых видов опухолей непатогенный для человека вирус болезни Ньюкасла (Keshelava *et al.*, 2009). Однако до широких клинических испытаний дело так и не дошло.

В 1998–2003 гг. в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск) был получен вариант аденовируса 5 серотипа с полностью удаленным геном E1B. Препарат на его основе был назван *канцеролизин* (Kashko *et al.*, 2003). Было показано, что он обладает онколитическими свойствами, сходными с ONYX-015 и онкорином. После проведения полного цикла доклинических испытаний этот штамм был допущен к клиническим испытаниям I фазы (Vdovichenko *et al.*, 2006), которые прошли

в 2007 г. в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина на восьми пациентах-добровольцах. Испытания показали хорошую переносимость препарата, а в одном случае наблюдался лечебный эффект, несмотря на то, что у всех больных была IV неизлечимая стадия болезни. Но найти источник финансирования последующих испытаний не удалось, а спустя несколько лет это стало неактуальным из-за появления вирусных онколитиков нового поколения.

Новейшая история: клинические испытания

За рубежом работы с онколитическими вирусами за последние десять лет получили мощное развитие. Вначале они в основном развивались в Канаде, и канадское Агентство здравоохранения даже финансировало некоторые проекты в США.



В октябре 2015 г. Управление по контролю качества пищи и лекарств США (FDA USA) официально разрешило клинические испытания III фазы генно-инженерного штамма герпесвируса под названием *имлиджик* (*Imlygic*) для лечения больных с рецидивирующей меланомой. Штамм герпесвируса, содержащий в геноме *аттенуирующие* (снижающие патогенные свойства) мутации и человеческий ген *гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующего фактора* для усиления противоопухолевого эффекта, был разработан американской компанией *Bio Vex, Inc.* Эту разработку и саму компанию вместе с правами на препарат в 2011 г. поглотил фармацевтический гигант *Amgen*. В конце 2015 г. препарат был официально разрешен к применению и в Европе.

Также в 2015 г. получил разрешение на проведение III фазы клинических испытаний препарат на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины *Пекса-Век* (*Pexa-Vec*, JX-594) для лечения *гепатоцеллюлярной карциномы* (рака печени). Этот препарат был получен из штамма вируса осповакцины *Wyeth*, у которого для уменьшения побочных реакций удалили ген тимидинкиназы и добавили ген гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующего фактора человека. Препарат сейчас интенсивно исследуют на добровольцах (информация об этом – на сайте <http://www.pexavetrials.com>). Результаты

Мышам линии *Nude* подкожно прививали клетки карциномы человека A431 в двух удаленных друг от друга точках. Один из двух сформировавшихся «ксенографтов» использовали для лечения рекомбинантным вирусом осповакцины (А), а второй играл роль метастаза (Б). Лечение проводили путем однократного введения внутрь опухоли аттенуированного рекомбинантного вируса осповакцины с делециями (утратой) двух генов вирулентности – вирусного ростового фактора и тимидинкиназы, на место которого был встроен ген зеленого флуоресцентного белка GFP. Вирус обнаружился в клетках искусственного метастаза уже через 2 суток после инфицирования, а через 8 суток достигал концентраций, сравнимых с инфицированной опухолью (~ 10⁹ инфекционных вирионов/мкг). Исследование органов и тканей мышей показало избирательное размножение рекомбинантного вируса в опухолевых клетках. Полная деструкция ткани опухоли регистрировалась через 12, а метастаза – через 20 суток после инъекции вируса. Исследование показало, что аттенуированный рекомбинантный вирус осповакцины даже при локальном периферическом способе введения не только способен разрушать ткань первичного опухолевого узла, но и обладает отчетливым антиметастатическим действием (Kochneva *et al.*, 2016). На фото – прижизненные УФО-изображения мышей, демонстрирующие адресное накопление флуоресцентного белка GFP в узлах опухолей (А) и метастазах (Б) двух мышей

нескольких независимых клинических испытаний I и II фазы положительны, а испытания III фазы проводятся в клиниках нескольких десятков стран мира.

Сейчас онколитические препараты на основе вирусов разрабатываются и начинают применяться во многих странах. В Канаде это – аденовирусы и рекомбинантные вирусы осповакцины, в Финляндии – рекомбинантные аденовирусы, в Японии – рекомбинантные герпесвирусы, в Латвии – энтеровирусы. В США – целый ряд вирусов, включая рекомбинантный аттенуированный герпесвирус, вакцинный штамм вируса кори и вакцинные штаммы вирусов гриппа. В Великобритании начинаются клинические испытания вакцинного штамма вируса гриппа на больных раком печени.

В России подобные разработки также продолжаются. В 2010 г. Новосибирский государственный университет получил мегагрант, руководителем которого стал известный российский молекулярный биолог П. М. Чумаков (сын М. К. Ворошиловой), а ведущими исполнителями – авторы этой статьи (Нетесов и др., 2013). В результате в НГУ фактически с нуля была создана хорошо оборудованная научно-исследовательская лаборатория в комплексе с практикумом по микробиологии, опубликованы обзорные статьи по онколитическим вирусам (Kochneva *et al.*, 2012; Жираковская и др., 2012; Чумаков и др., 2012; Священко и др., 2012), получены и охарактеризованы первые кандидатные штаммы онколитических энтеровирусов, парамиксовирусов и ортопоксвирусов.

К сожалению, существенного финансирования в последующие годы добиться не удалось. Тем не менее усилиями неформального коллектива сотрудников НГУ, ГНЦ ВБ «Вектор» и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН уже вне рамок мегагранта получены рекомбинантные штаммы вируса осповакцины с противораковыми свойствами, показавшие перспективность на животных моделях (Kochneva *et al.*, 2014; Kochneva *et al.*, 2017). Охарактеризованы и паспортизованы онколитические штаммы парамиксовируса Сендай (Matveeva *et al.*, 2015), сконструированы плазмиды с геномом аденовируса 6 серотипа, крайне перспективные для получения новых рекомбинантных онколитических штаммов со встройками генов, усиливающих лизис опухоли.

Сегодня у отечественных исследователей есть все основания работать дальше, проводить полноразмерные доклинические исследования и клинические испытания онколитических вирусных штаммов. Очень важно, преодолев предубеждения, дать «зеленый свет» и финансирование исследованиям этих крайне перспективных препаратов, разработанных в России.

Но пока существует недоверие к потенциально полезным противораковым вирусам, боязнь их патогенных свойств превалирует. И это удивительно, потому что широко используемые в настоящее время для борьбы с онкозаболеваниями химиопрепараты вызывают массу вредных побочных эффектов. Механизм действия большинства из них таков, что эти лекарства поражают не только раковые, но и здоровые, активно делящиеся клетки. Хорошо известно, что химиотерапия иногда приводит к преждевременной гибели больных, но ее применяют, потому что зачастую другого способа лечения онкобольных нет.

Попутно возникает еще один интересный вопрос о роли вирусов в нашей жизни. Ведь некоторые из них, как и бактерии, обитают в нашем теле, не нанося ему вреда. Может быть, роль вирусов, по крайней мере некоторых из них, как раз и состоит в защите от раковых клеток? И они лишь иногда вызывают заболевания, выйдя из-под контроля? Ответы на эти вопросы должны стать предметом будущих исследований, если мы хотим добиться прорыва в борьбе с онкозаболеваниями.

Литература

Священченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В. и др. Онколитические аденовирусы в терапии злокачественных новообразований: современное состояние и перспективы // *Молекулярная биология*. 2012. Т. 46. С. 556–569.

Doek G. Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma // *Am. J. Med. Sci.* 1904. V. 127. P. 563–565.

Guo J.; Xin H. Chinese gene therapy. Splicing out the West? // *Science*. 2006. V. 314. N. 5803. P. 1232–1235.

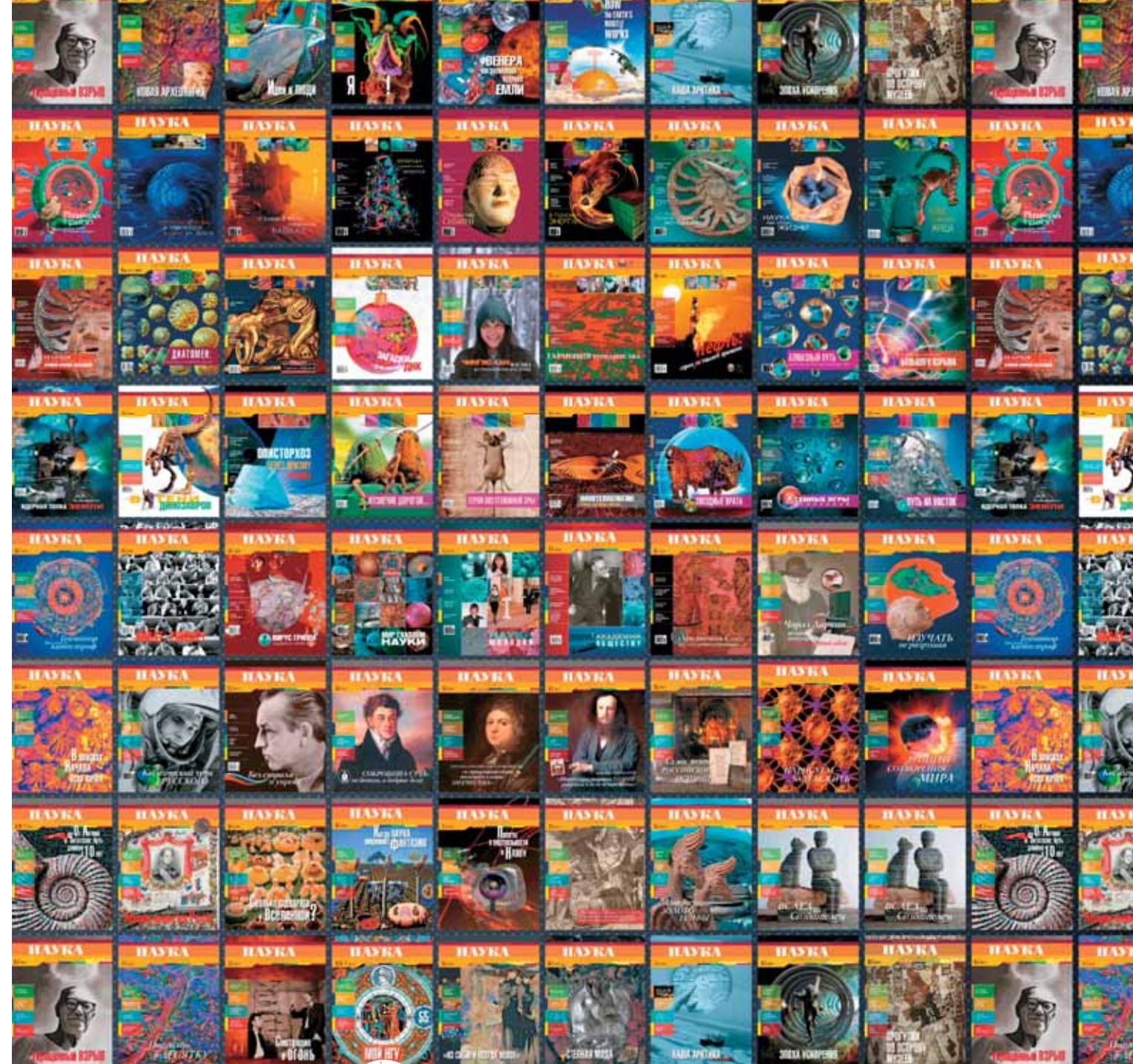
Kochneva G., Zonov E., Grazhdantseva A. et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression // *Oncotarget*. V. 5. N. 22. 2014. P. 11269–11280.

Kochneva G.V., Tkacheva A.V., Sivolobova G.F. et al. Antitumor potential of recombinant vaccinia virus strain, which produces a secreted chimera protein, composed of human GM-CSF and oncotoxic peptide lactaptin // *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2017. V. 9. N. 1. P. 11–21.

Tarasova M. V., Demidova E. V., Kochneva G.V. et al. The construction of adenovirus type 6 vector with replication control under the human telomerase reverse transcriptase promoter. Collaborative Congress of the European-Society-of-Gene-and-Cell-Therapy (ESGCT) and Finnish-Society-of-Gene-Therapy. Helsinki, Finland. SEP 17-20, 2015. HUMAN GENE THERAPY. V. 26. № 10. P. A101-A102.

Voroshilova M.K. Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease // *Prog. Med. Virol.* 1989. V. 36. P. 191–202.

Vdovichenko G.V., Petrishchenko V.A., Sergeev A.A. et al. Preclinical studies of the anticancer adenovirus cancerolysin preparation // *Vopr. Virusol.* 2006. V. 51. N. 6. P. 39–42.



НАУКА | **SCIENCE**
из первых рук | First Hand

Теперь Вы можете **ОФОРМИТЬ И ОПЛАТИТЬ ПОДПИСКУ** НА ЭЛЕКТРОННУЮ ВЕРСИЮ (pdf) на сайте журнала www.scfh.ru:

http://scfh.ru/sub_re/ на русском языке
http://scfh.ru/en/sub_re/ на английском языке

ВСЕ АРХИВ журнала с 2004 по 2016 гг. – на сайте: <http://scfh.ru/archive/> – на русском языке, <http://scfh.ru/en/archive/> – на английском языке