

## ***Виротерапия глиом***

*Губанова Наталья*

*Институт цитологии и генетики СО РАН*

## **Классификация ВОЗ (Всемирной Организации Здравоохранения)**

В основе этой классификации лежит 4 основных признака:

- атипия клетки
- фигуры митозов
- наличие области некроза (отмирания тканей)
- разрастание эндотелия

<b>Степень злокачественности</b>	<b>Признаки злокачественности</b>	<b>Тип глиальной опухоли</b>
Первая степень злокачественности	Признаков злокачественности нет	Ювенильная астроцитома, субэпендимальная астроцитома, пилоцитарная астроцитома
Вторая степень злокачественности	Один признак злокачественного заболевания, чаще всего, атипия клеток. Эти опухоли хорошо дифференцируются, темп их роста медленный (low-grade), имеют доброкачественный характер	Диффузная астроцитома, фибриллярная астроцитома
Третья степень злокачественности	Присутствуют все признаки злокачественности, кроме некроза тканей. Быстрый рост образования (high-grade) , злокачественные, низко дифференцированные	Анапластическая астроцитома
Четвертая степень злокачественности	Все признаки злокачественного заболевания и некроз тканей	Глиобластома - агрессивная злокачественная опухоль, прогноз плохой

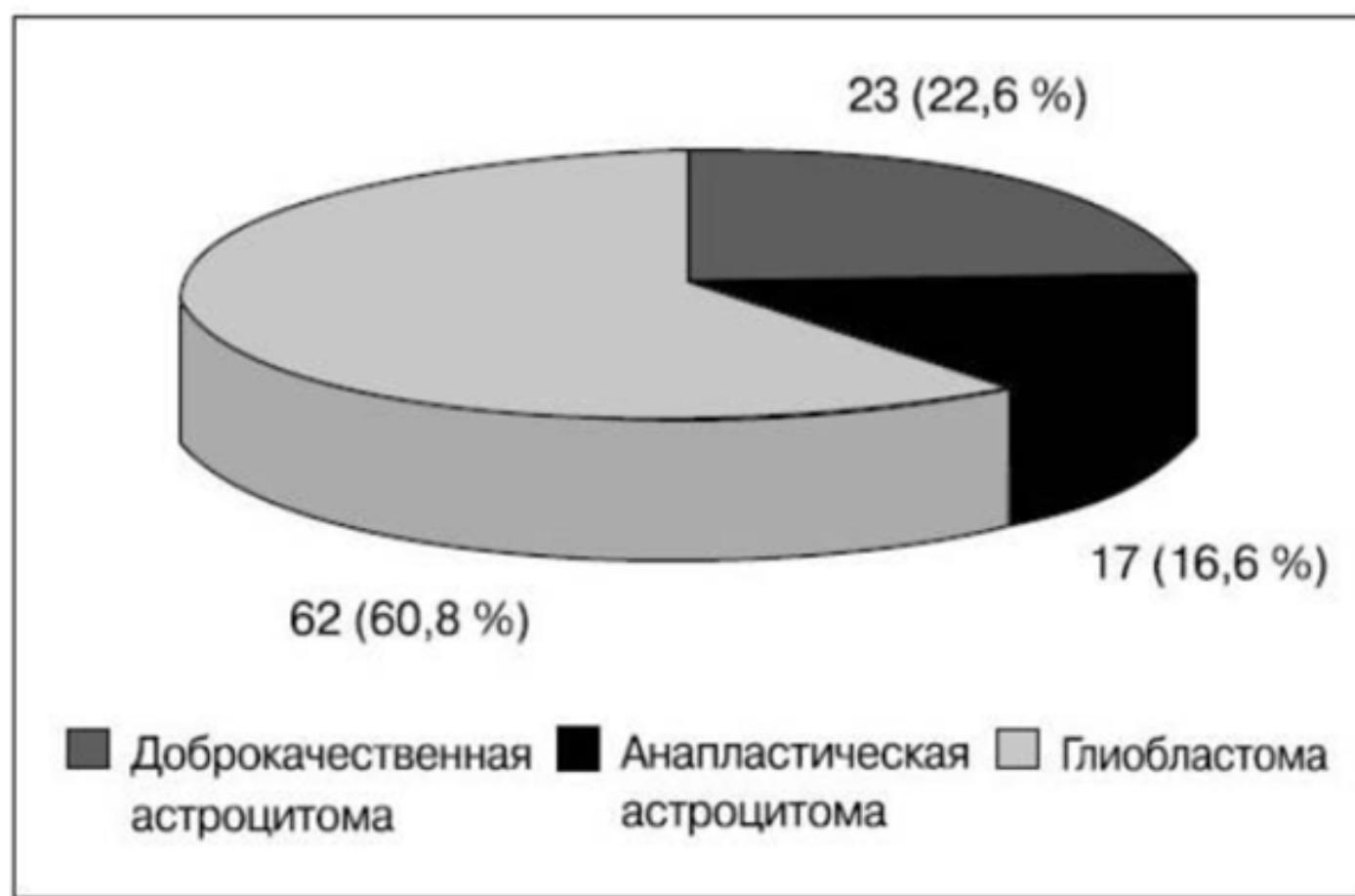
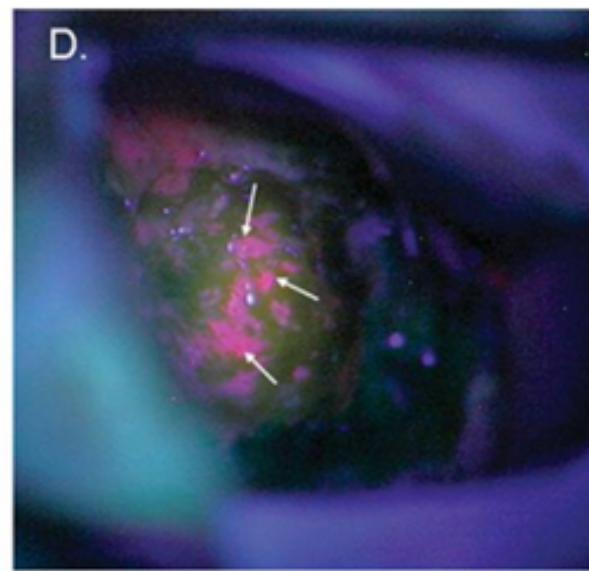
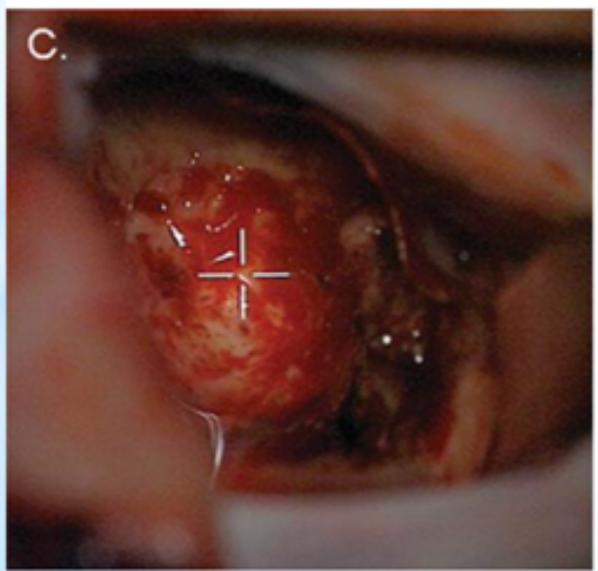
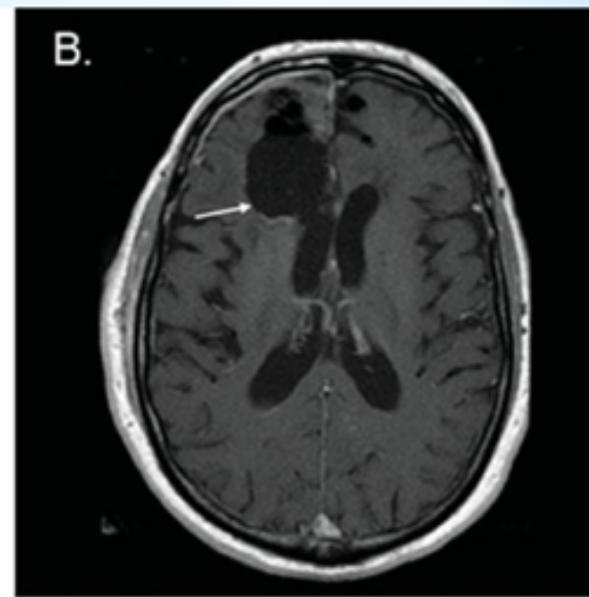
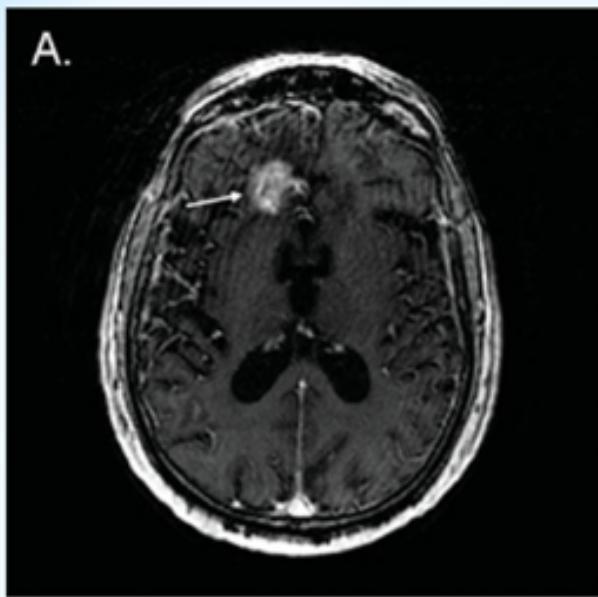
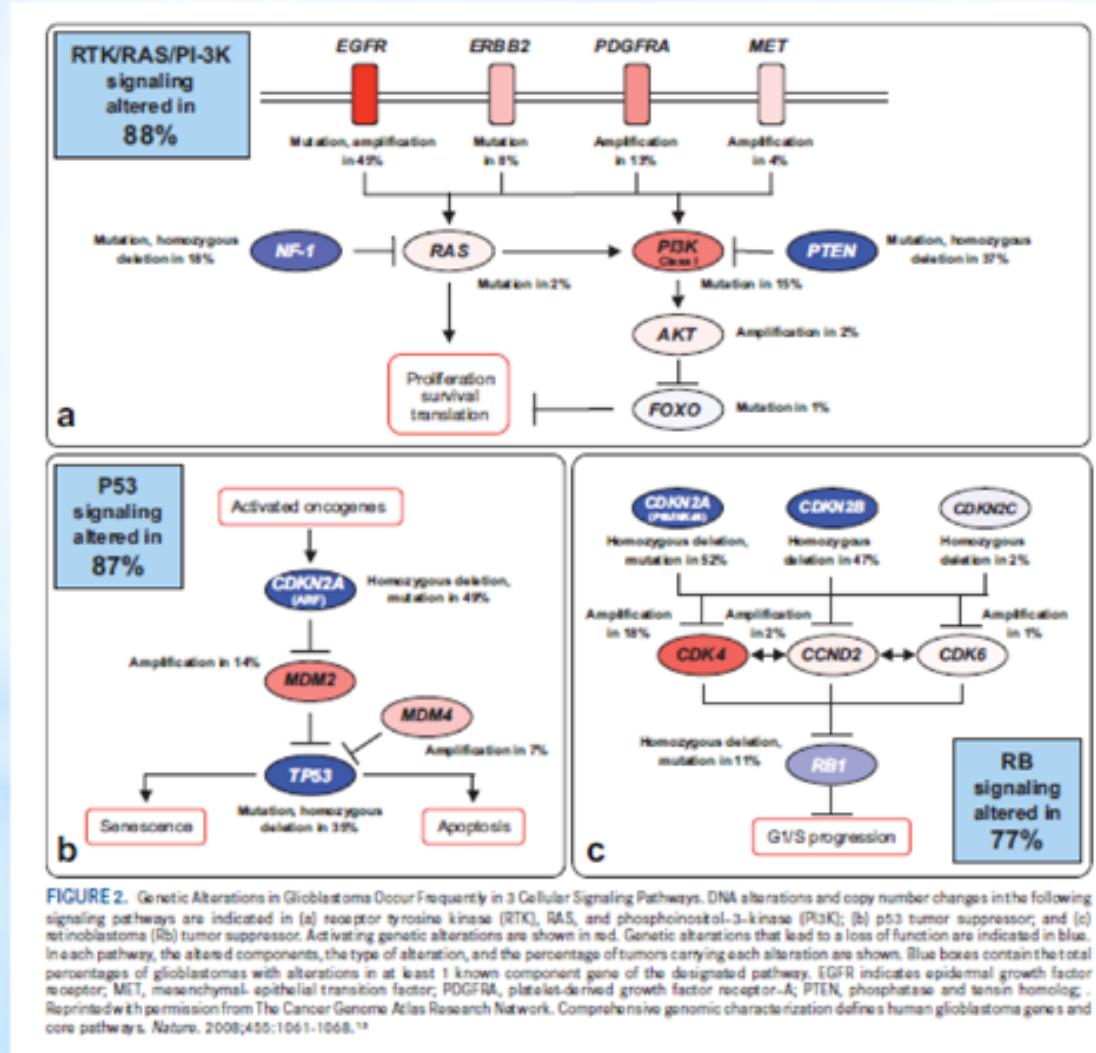


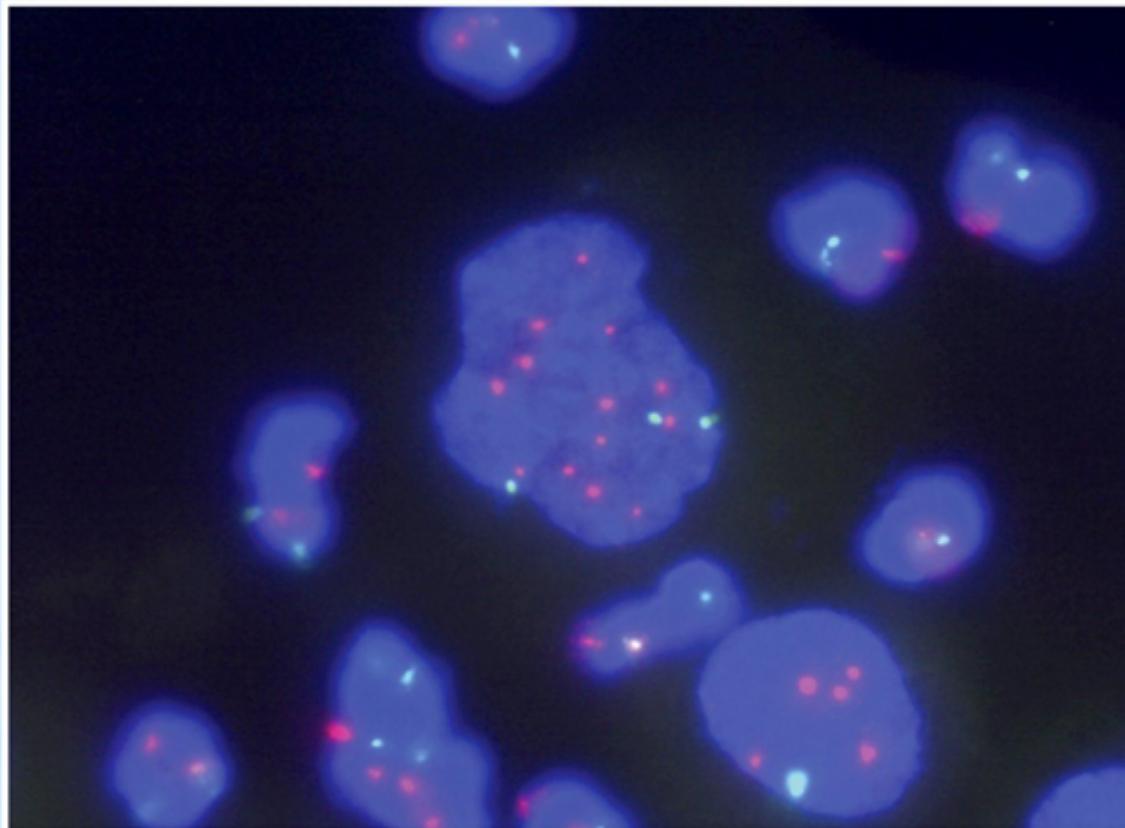
Рис. 1. Гистологическая характеристика материала



## Молекулярно-генетическая характеристика опухолей головного мозга - основные генетические нарушения, приводящие к злокачественной трансформации клеток



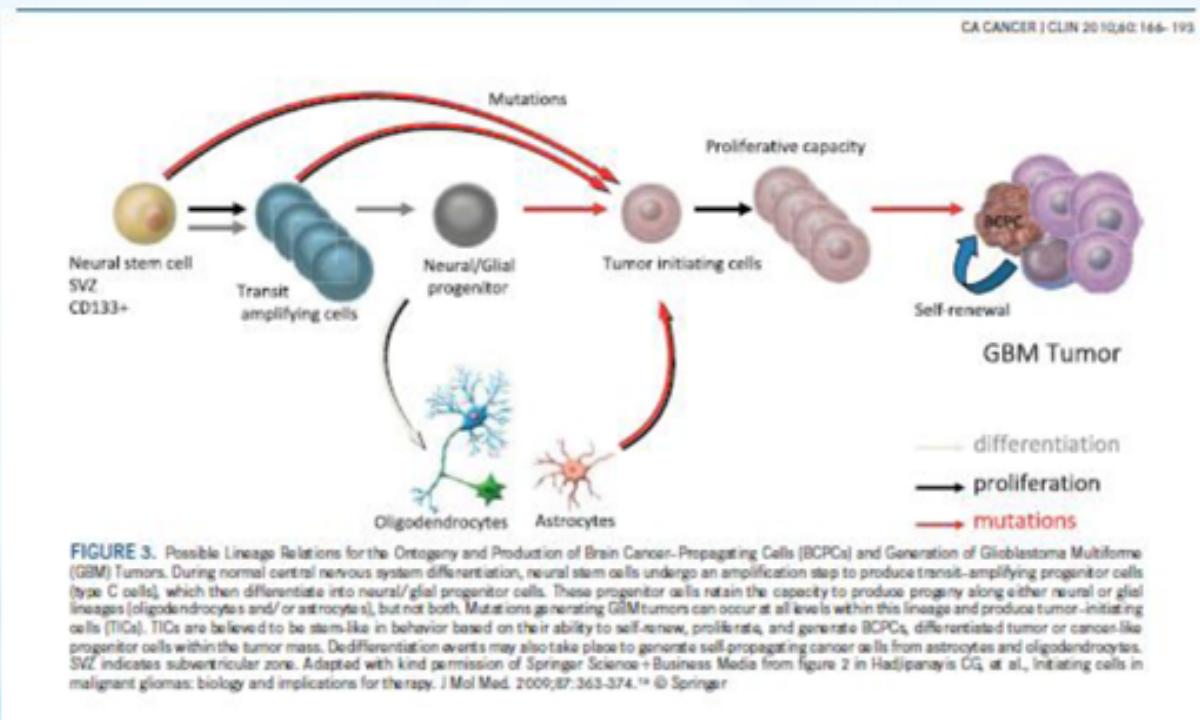
## Генетическое разнообразие в популяции клеток опухоли легкого



17 хромосома  
11 хромосома

Figure 11-19 The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

## Упрощенная схема развития опухоли



## Мультилональная схема образования опухоли

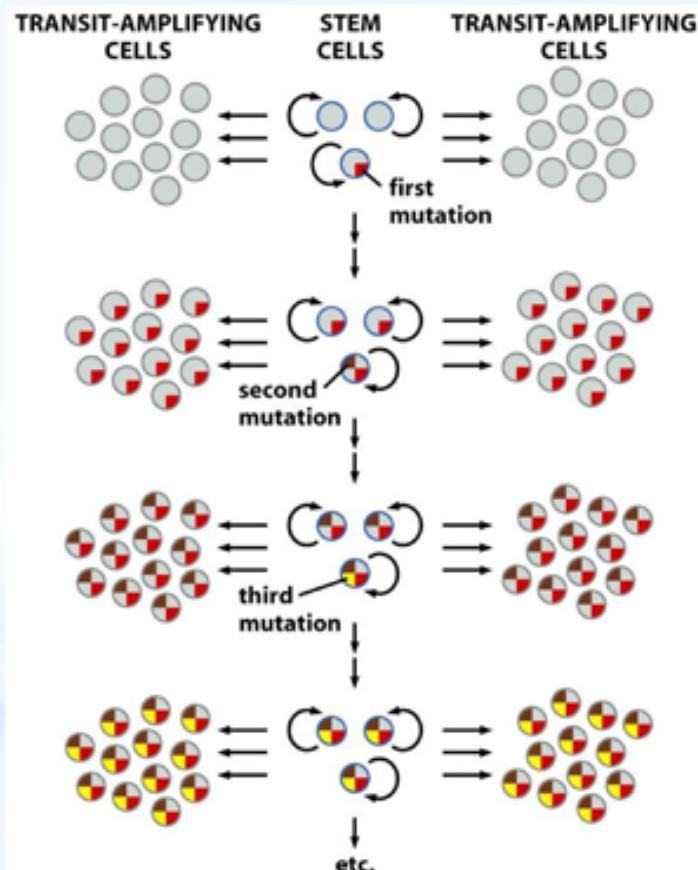
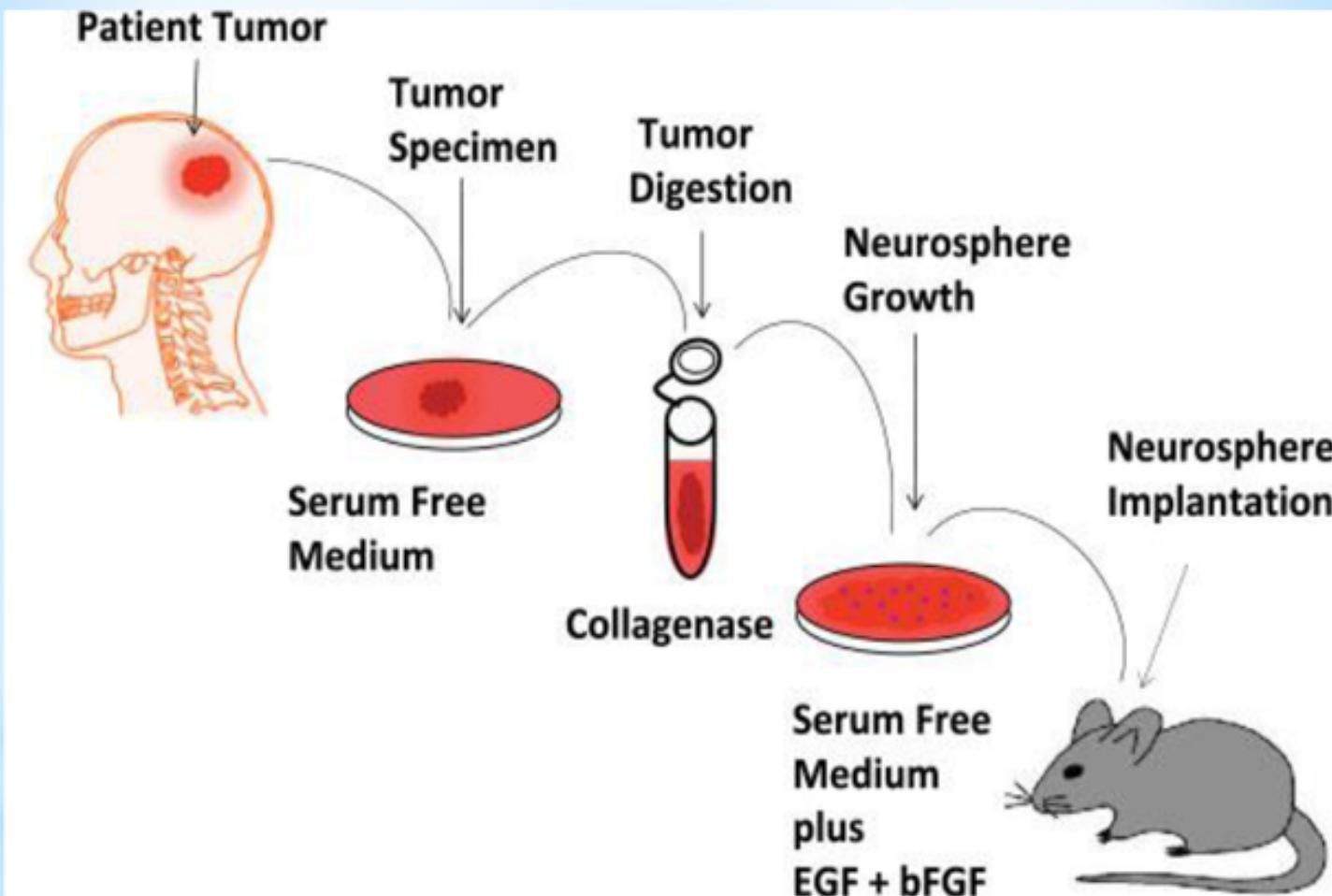
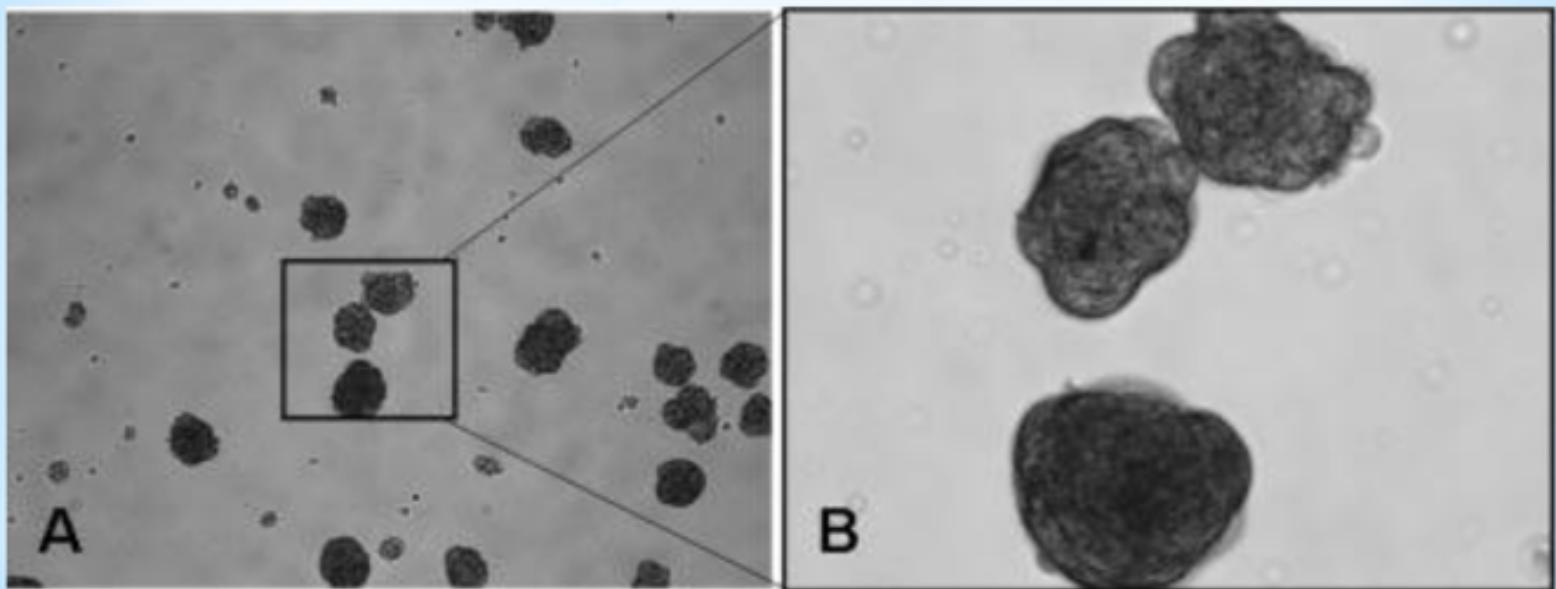
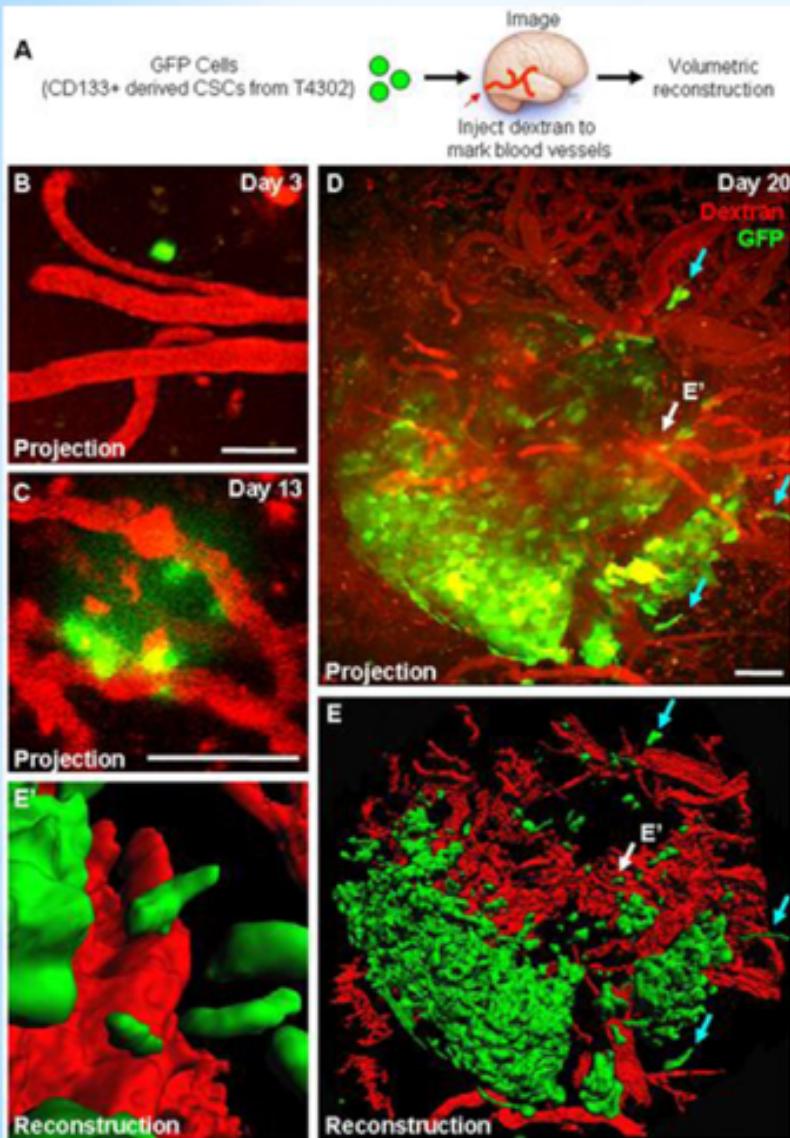


Figure 11-17 The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)





CHAICHANA et al., 2006



(Lathia et al., 2011)

Формирование опухоли при ксенотрансплантации CD133+ клеток, меченных GFP. А — схема эксперимента. В-Д — проекционное изображение, демонстрирующее формирование опухоли и реконструкция Е и Е', показывающая, что опухолевые клетки ассоциированы с кровеносными сосудами (белые стрелки) и на периферии опухоли (голубые стрелки). Флуоресцентный декстрозин инъецировался в кровеносную систему для выявления сосудов (красный цвет).

## **Стволовые клетки глиом**

- составляют от 5 до 30% опухолевой массы
- экспрессируют CD133 гликопротеин
- инициируют развитие опухоли при инъекции 100 клеток (не стволовые 1000 000) иммунодефицитным мышам
- находятся на периферии опухоли, активно мигрируют в окружающую ткань
- устойчивы к радио- и химиотерапии за счет более эффективной репарации ДНК (частота мутаций 1 на 1 млн) и амплификации генов лекарственного насоса
- медленно делятся
- при цитотоксическом воздействии увеличивают скорость пролиферации
- являются основной причиной рецидивов опухолей глиального происхождения

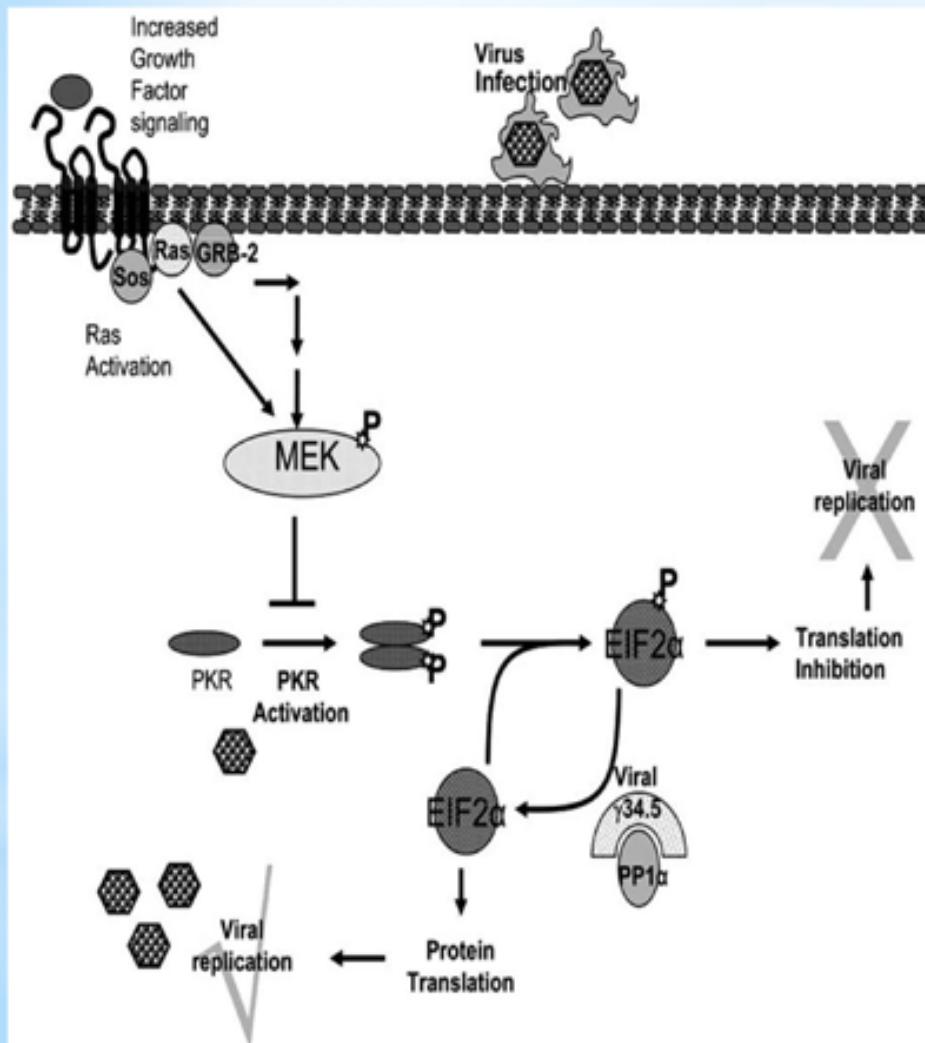
## **Рекомбинантные штаммы герпесвирусов**

*геном – линейная двухцепочечная молекула ДНК*

*рекомбинантные онколитические штаммы вирусов способны  
реплицироваться преимущественно в опухолевых клетках,  
используя генетические нарушения, характерные для клеток  
злокачественной опухоли*

*Штаммы HSV1716 и G207 допущены к клиническим испытаниям*

## Подход, используемый для создания штамма HSV 1716

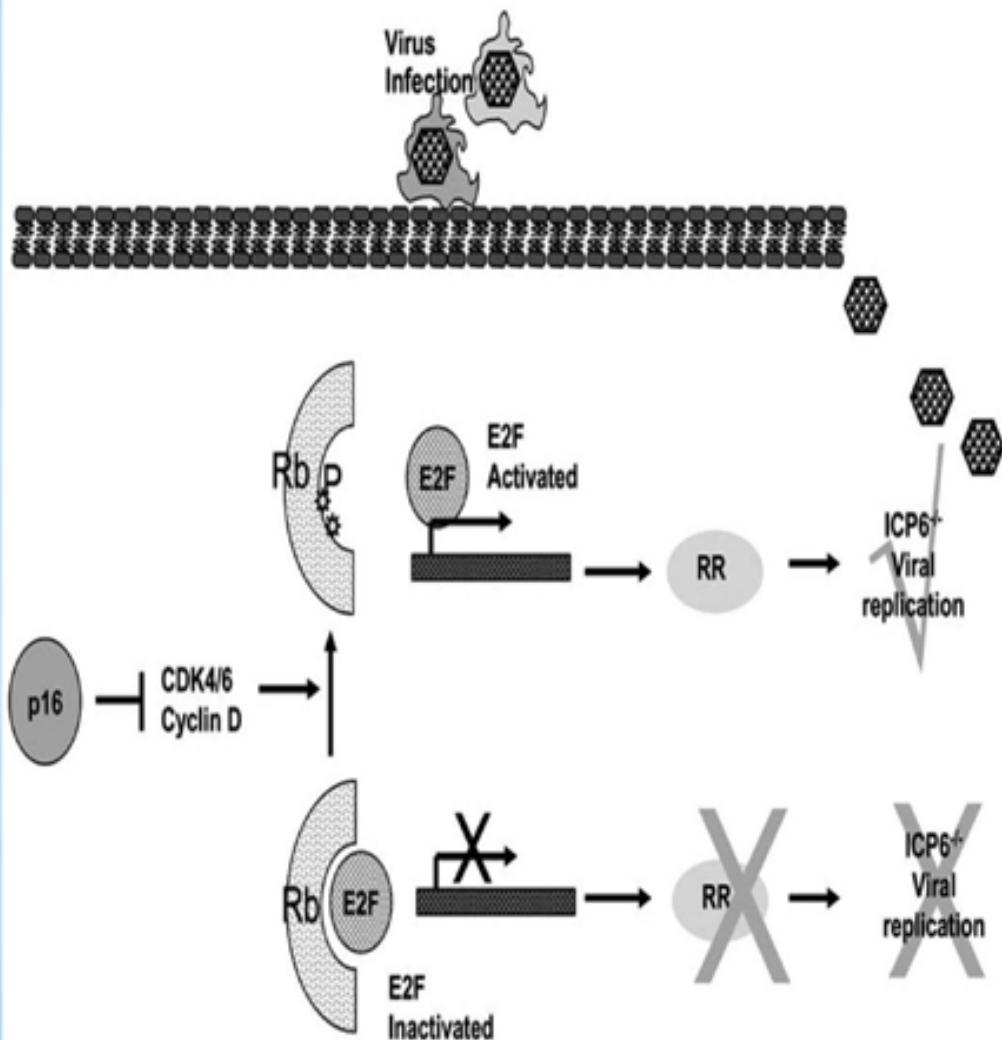


Вирусная инфекция вызывает гомодимеризацию, автофосфорилирование и активацию протеиновой киназы PKR. Активированная PKR фосфорилирует эукариотический фактор инициации белкового синтеза -2 $\alpha$  (EIF2 $\alpha$ ), что ведет к прекращению синтеза белков. Вирусный белок  $\gamma$ 34.5 взаимодействует с белковой фосфатазой PP1 и вызывает дефосфорилирование EIF2 $\alpha$ , что вызывает возобновление белкового синтеза в инфицированных клетках. Отсутствие  $\gamma$ 34.5 блокирует репликацию вирусов в нормальных клетках. В опухолевых клетках с активированным RAS/MEK сигнальным путем подавляется автофосфорилирование PKR, что обуславливает репликацию вируса с делецией по гену, кодирующему  $\gamma$ 34.5. [40]

## Результаты клинических исследований

Штамм/ тип введения	Токсичность	Эффективность	Потеря/репликация вируса	Иммунный ответ
HSV-1716 единично интрапатоморально	Не токсичен	5/9 стабилизация развития опухоли (МРТ); 1/9 уменьшение; 1/9 — 3 года без прогрессии опухоли; 3/9 стабилизация в течении 4 лет	Не обнаружены в сыворотке и слюне; 0/4 обнаружен в опухоли (PCR, ИИС)	8/9 серопозитивны
HSV-1716 единично интрапатоморально за 4-9 дней до операции	Не токсичен	Не определялась	1/9 обнаружен в крови; 10/12 в опухоли (PCR); 2/12 в опухоли (ИИС)	10/12 серопозитивны
HSV-1716 введение в смежную с опухолью область после операции	Не токсичен	3/12 более продолжительный срок жизни 15, 18 и 22 месяца	Не обнаружены в серологических и везикулярных жидкостях	9/12 серопозитивны

## Стратегия, реализованная при создании штамма G207



p16 блокирует формирование комплекса CDK4/6-cyclin-D, который вызывает гиперфосфорилирование Rb, что в свою очередь приводит к активации транскрипционных факторов семейства E2F. Активные E2F опосредуют транскрипцию генов, участвующих в инициации фазы синтеза ДНК, к которым относится ген, кодирующий рибонуклеотид редуктазу RR. В нормальных непролиферирующих клетках RR отсутствует, поэтому вирус герпеса содержит ген ICP6, который кодирует аналог клеточной RR. При делеции ICP6, вирус не может инициировать синтез ДНК и собственную репликацию. Потеря функционального p16 или Rb в результате мутации или делеции приводит к активации E2F и увеличению уровня рибонуклеотид редуктазы в трансформированных клетках. Это нарушение позволяет вирусам с мутантным ICP6 реплицироваться в опухолевых клетках.[40]

## Результаты клинических исследований

Штамм/ тип введения	Токсичность	Эффективность	Потеря/репликация вируса	Иммунный ответ
HSV-1 (G207) единично интрапутомально	Не токсичен	6/21 улучшение неврологического статуса; 8/21 уменьшение объема опухоли (МРТ) 1/21 увеличение продолжительности жизни до 5,5 лет	Не обнаружены в сыворотке и слюне; 2/6 обнаружен в опухоле (PCR, ИHC)	14/19 серопозитивны
HSV-1 (G207) единично интрапутомально	Неблагоприятные эффекты: лихорадка (22%); гемипарез (44%)	Не обнаружена	Не обнаружены в сыворотке и слюне; 6/6 обнаружен в биопсии опухоли (PCR,)	3/6 серопозитивны 1/1 повышение инфильтрации иммуноцитов

## **Семейства парамиксовирусов**

*геном - однонитевая нефрагментированной (-) РНК*

*жизненный цикл – в цитоплазме*

*перспективные онколитики этого семейства :*

- вирус кори
- вирус болезни Ньюкасла (ВБН)

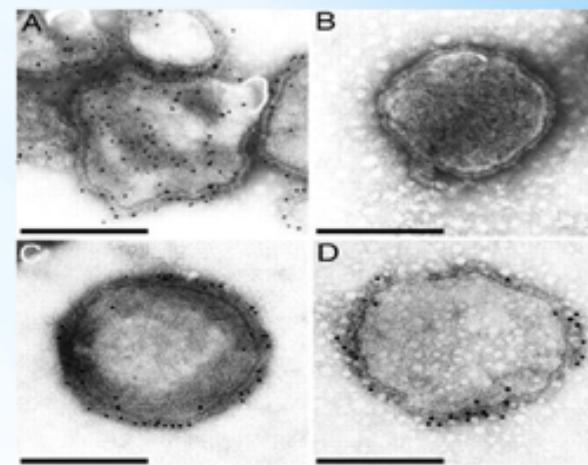
## ВИРУС КОРИ

*Рекомбинантный онколитический штамм MV-CEA экспрессирует раковый эмбриональный антиген – секрецируемый белок, по уровню которого в сыворотке больного можно оценивать активность вируса в организме.*

*В октябре 2006 года началась первая фаза клинических испытаний штамма MV-CEA на больных глиобластомой, которую планируется завершить в 2013 году.*

## ВИРУС БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА

- патоген для большинства видов птиц,
- у человека вызывает легкую форму лихорадки
- проявляет высокую избирательность в отношении опухолевых клеток.
- для репликации вируса требуется активация сигнального пути онкогена *Ras* (88% глиом), его ветви, связанной с малой ГТФ-азой *Rac1*



В 1996 два аттенуированных штамма ВБН НиJ (аттенуированный селекцией) и МТН-68/Н (природно-аттенуированный) были допущены к клиническим испытаниям

## Результаты клинических исследований

Штамм/ тип введения	Токсичность	Эффективность	Потеря/репликация вируса	Иммунный ответ
NDV (MTH-68/Y)/ ежедневно внутривенно в течении нескольких лет	Не токсичен	Уменьшение опухоли на 95% с последующей стабилизацией состояния, один пациент (мальчик 14 лет)	Не определялась	Не определялась
NDV (MTH-68/Y)/ ежедневно внутривенно в течении нескольких лет	Не токсичен	4/4 случая долгосрочного выживания	Не определялись	Не определялись
NDV (MTH-68/Y)/ ежедневно внутривенно в течении нескольких месяцев	Не токсичен	Значительная регрессия	Не определялись	Не определялись
NDV (NDV-HUJ)/ внутривенно 1-2 недели перерыв 55 дней — 8 циклов	Лихорадочное состояние в 5/14 случаях	1/14 полная регрессия опухоли; 3/14 увеличение продолжительности жизни	5/5 обнаружен в моче, слюне и крови; в 1 из 2 опухолей	12/14 серопозитивны

## **Реовирусы**

- геном представлен двунитевыми фрагментированными РНК
- низкая патогенность
- на основе реовирусов был создан онколитический препарат *Reolysin (Oncolytic Biotech)*

вариант реовируса с низкой  
репликационной способностью  
имеет способность инфицировать  
и уничтожать опухолевые клетки

## Результаты клинических исследований

Штамм/ тип введения	Токсичность	Эффективность	Потеря/репликация вируса	Иммунный ответ
Reolysin	Не токсичен	10/12 прогрессия опухоли; 1/12 стабилизация заболевания. Средняя продолжительность жизни 22 недели, в одном случае 54 недели	Не определялось	Не определялась

## **Рекомбинантные штаммы аденоовирусов**

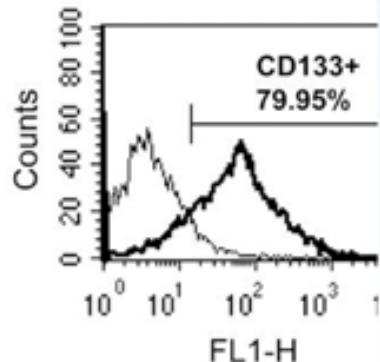
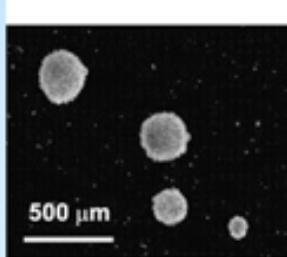
*Штамм dl1520, также известный как ONYX-015, способный реплицироваться только в опухолевых клетках. Селективный онкологический эффект достигается за счет делеции гена, кодирующего белок E1B. Этот белок, взаимодействуя с опухолевым супрессором p53, препятствует запуску апоптоза в инфицированной клетке [49]. В случае делеции E1B, репликация вируса будет происходить успешно только в том случае, если p53 отсутствует или является мутантным, но не в клетках с нормальным p53*

## Результаты клинических исследований

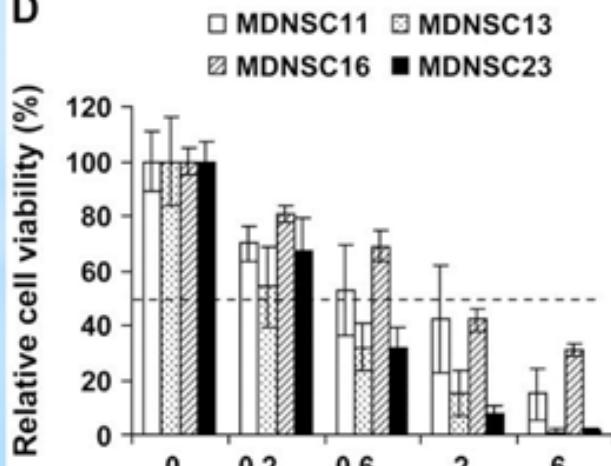
Штамм/ тип введения	Токсичность	Эффективность	Потеря/репликация вируса	Иммунный ответ
AdV (ONYX-015)	Не токсичен	1/24 стабилизация заболевания; 1/24 – замедление роста опухоли 3/24 увеличение продолжительности жизни до 19 недель	Не определялось	2/24 серопозитивны; 2/2 инфильтрация лимфоцитов и плазмоцитов в периваскулярное пространство

## Стволовые клетки глиомы перспективные мишени для виротерапии опухолей головного мозга

A



D



© The Author 2007. Published by Oxford University Press.  
*bmj*/cell

Штаммы аденоовирусов Ad5, Ad11p, Ad16p, CV23 [115] и delta-24-RGD продемонстрировали высокую эффективность против стволовых клеток глиом на модели *in vitro*. Обнадеживающие результаты показали исследования штамма на основе герпесвируса G47Delta (делеции ICP6, ICP34.5 и ICP47) и особенно Delta68H-6, который специально сконструирован для преимущественного размножения в стволовых клетках опухолей.

Jiang H et al. JNCI J Natl Cancer Inst 2007;99:1410-1414

JNCI

Спасибо за внимание