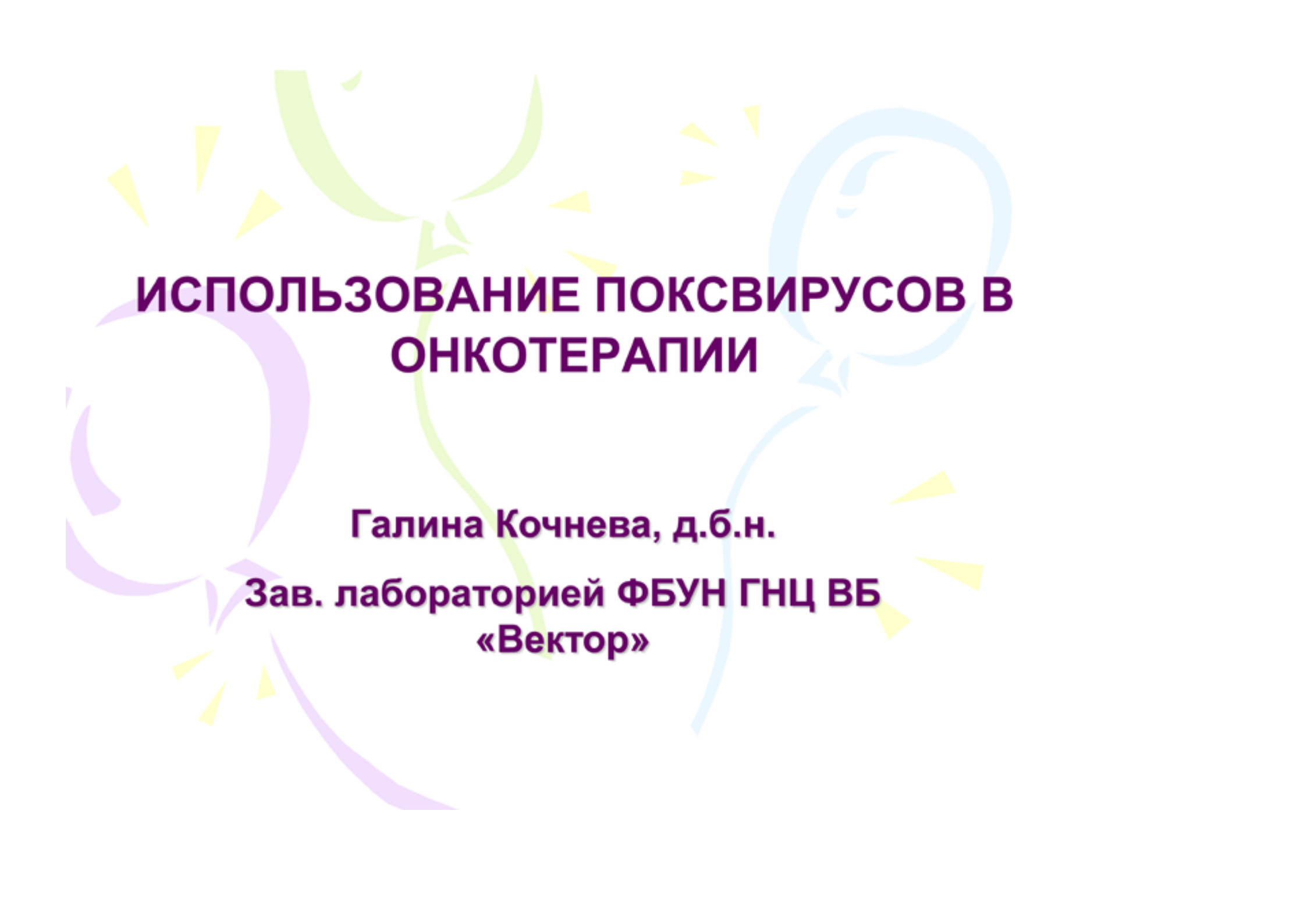


The background features abstract, flowing shapes in light green, light blue, and light purple. Interspersed among these shapes are several small, yellow, triangular rays or starbursts, creating a dynamic and modern aesthetic.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКСВИРУСОВ В ОНКОТЕРАПИИ

Галина Кочнева, д.б.н.

**Зав. лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор»**

Необходимые характеристики для онколитического вируса

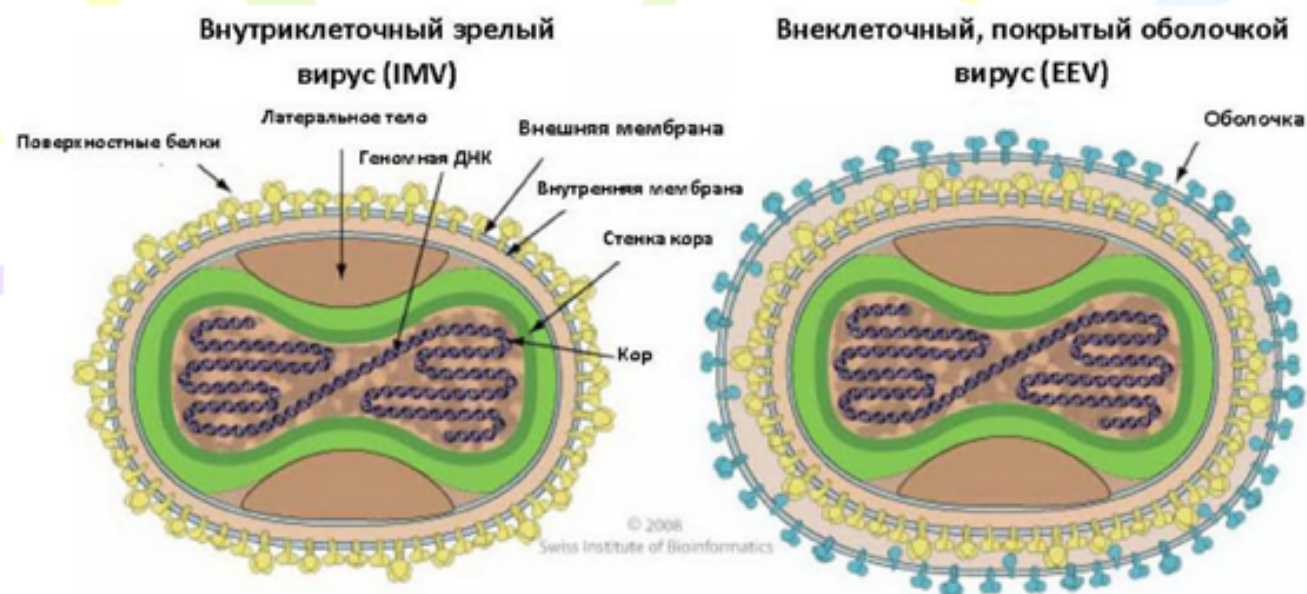
- ❖ возможность генетической модификации и продукции в больших количествах
- ❖ селективная тропность только к неопластическим клеткам
- ❖ минимальная токсичность для нормальных тканей
- ❖ способность к репликации внутри и системное уничтожение опухолевой ткани с высоким индексом пролиферации
- ❖ способность 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
- ❖ внутренний надежный механизм для инактивации
- ❖ отсутствие потенциального распространения в основной популяции
- ❖ стойкая эффективность несмотря на наличие иммунного ответа к реплицирующимся вирусам

КЛАССИФИКАЦИЯ ПОКСВИРУСОВ

Семейство **Poxviridae** состоит из двух подсемейств:

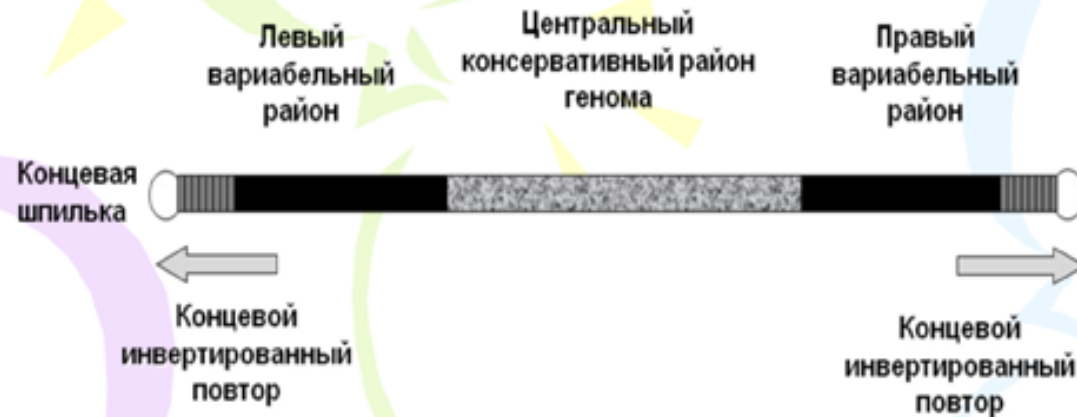
<i>Chordopoxvirinae</i> (позвоночные), 9 родов	<i>Entomopoxvirinae</i> (насекомые), 3 рода
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Betaentomopoxvirus</i>
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Gammaentomopoxvirus</i>
<i>Capripoxvirus</i>	
<i>Cervidpoxvirus</i>	
<i>Leporipoxvirus</i>	
<i>Suipoxvirus</i>	
<i>Molluscipoxvirus</i>	
<i>Yatapoxvirus</i>	

Морфология поксвирусов



- ❖ Вирионы кирпичеобразной или овальной формы размером 220-450 нм на 140-260 нм;
- ❖ Два вида инфекционных частиц: внутриклеточный зрелый вирус (IMV) и внеклеточный, покрытый оболочкой вирус (EEV);
- ❖ IMV покрыт липопротеиновой бислойной мембраной, окружающей плотную центральную часть – кор;
- ❖ Кор поксвирусов имеет двояковогнутую форму, в его углублениях расположены два латеральных белковых тела;
- ❖ EEV имеет дополнительную липопротеиновую оболочку и участвует в процессе распространения вирионов в организме инфицированного хозяина.

Геном поксвирусов



- ❑ Линейная двухцепочечная ДНК размером от 130 до 375 т.п.н. с концевыми инвертированными повторами;
- ❑ Две цепи ДНК ковалентно связаны, образуя концевые шпильки;
- ❑ Гены, расположенные в центральной области генома, высоко консервативны и кодируют жизненно важные белки вируса;
- ❑ В переменных районах генома расположены ОРТ, значительная доля которых направляет синтез разнообразных молекулярных факторов вирулентности, белков-иммуномодуляторов и белков круга хозяев.

Особенности поксвирусов, позволяющие рассматривать их в качестве перспективных онколитических агентов

- реплицируются и лизируют клетки с высокой скоростью
- обладают широким клеточным тропизмом. Для их проникновения не требуется определенных клеточных рецепторов и инфицирование происходит эффективно путем слияния клеточной и вирусной мембран
- реплицируются в цитоплазме в специфических структурах, так называемых вирусных фабриках, и никогда не интегрируют в хозяйскую хромосому
- размер генома (190-200 kb) позволяет встраивать до 25000 bp чужеродной ДНК, не нарушая инфекционности вируса
- системно распространяются по организму, что обеспечивает их эффективную доставку к отдаленным опухолям и метастазам
- имеется достаточное количество противовирусных препаратов, доступных для лечения поксвирусной инфекции и в случае возникновения поствакцинальных осложнений
- стабильность генома и низкая скорость спонтанного мутирования

Поксвирусы обладают природной селективностью к опухолевым клеткам

Попытки получения специфических онколитических агентов ведутся на основе трех представителей поксвирусов: **вирус миксомы** (род *Leporipoxvirus*), **танапоксвирус** (род *Yatapoxvirus*) и **вирус осповакцины** (род *Orthopoxvirus*).

Вирус миксомы является строго специфическим патогеном кроликов и не инфицирует другие виды позвоночных, включая человека. Недавно было показано, что вирус миксомы способен инфицировать и лизировать широкий диапазон раковых клеток человека *in vitro*, а также продемонстрировал онколитические свойства на мышинной модели глиомы человека *in vivo* (Liu et al., 2010).

Танапоксвирус, напротив, является природным патогеном человека и вызывает легкое лихорадочное заболевание, сопровождающееся появлением одной-двух оспин на коже конечностей. Этот вирус способен селективно реплицироваться в ряде клеточных линий опухолей человека, включая клетки глиобластомы, опухолей прямой кишки и молочной железы (Lee et al., 2010).

Наиболее изученным среди онколитических поксвирусов является **вирус осповакцины (VV)**, онколитические препараты на основе которого в настоящее время проходят клинические испытания в США (Breitbach et al., 2011). Вирус осповакцины имеет длительную историю медицинского применения и сыграл ключевую роль в искоренении оспы.

Вспомним историю



- В 18 веке английский сельский врач Эдвард Дженнер обратил внимание на народное наблюдение о том, что люди, переболевшие коровой оспой, никогда не заболевали натуральной оспой.

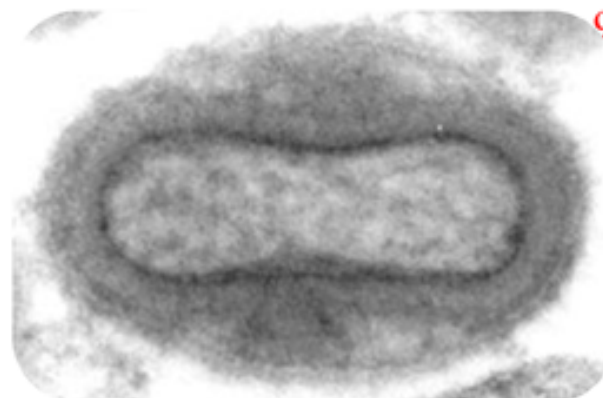


- В 1796 г. он показал эффективность использования вируса оспы коров для защиты человека от натуральной оспы, привив 8-летнему мальчику сначала оспу коров, а через 2 мес. – натуральную оспу.
- Эта процедура по аналогии с вариоляцией была названа вакцинацией (от лат. *vassa* – корова).



- По некоторым косвенным данным, уже к середине 19 века прививочным вирусом был вирус вакцины, а не вирус оспы коров. С этого времени эти два вируса стали рассматриваться как самостоятельные виды рода ортопоксвирусов.

Вирус осповакцины



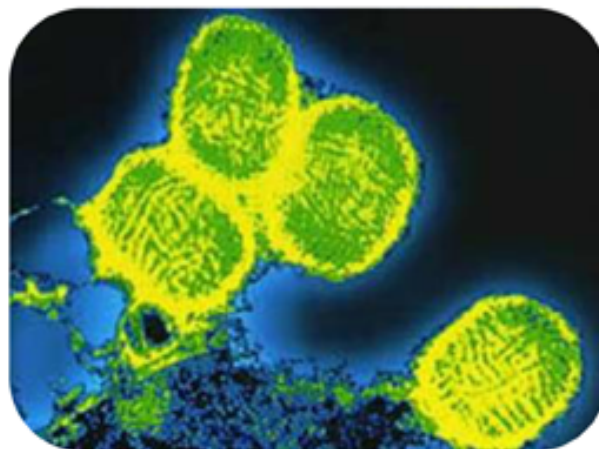
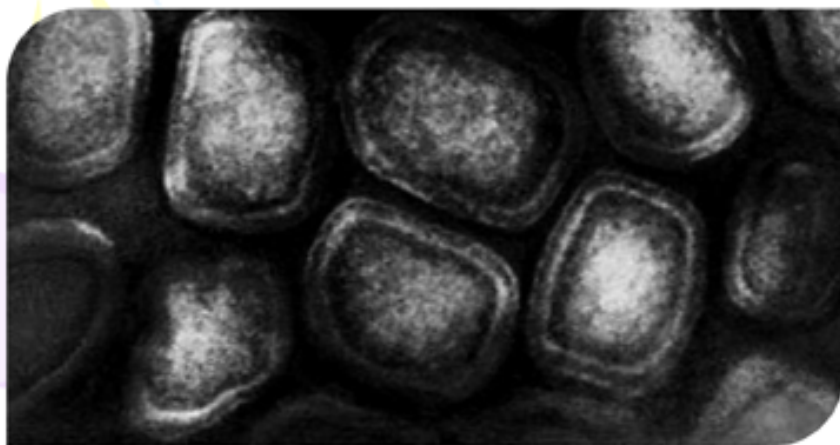
Семейство **Poxviridae**

Подсемейство **Chordopoxvirinae**

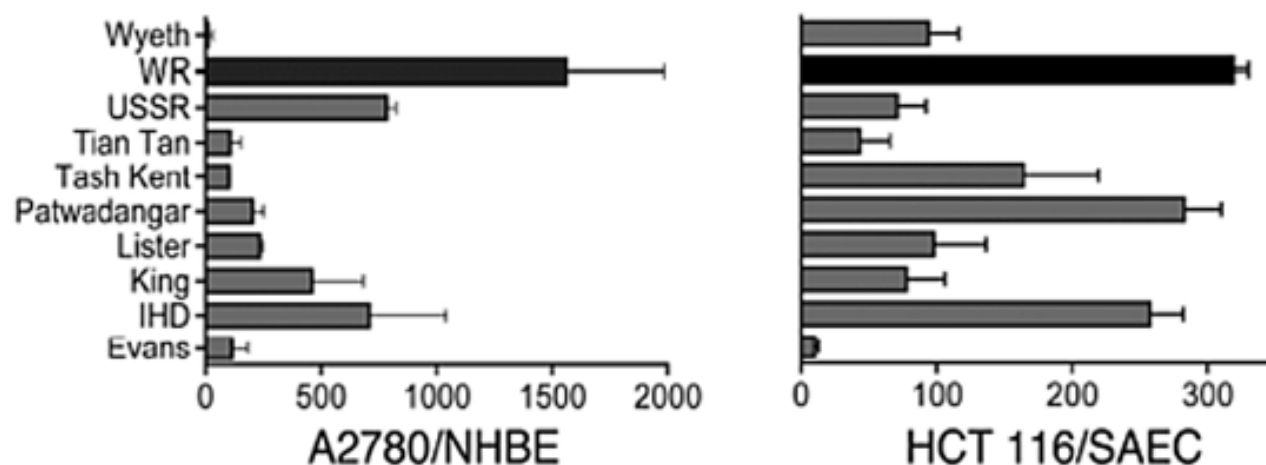
Род **Orthopoxvirus**

Вид **Vaccinia virus (вирус осповакцины)**

(подвиды: **buffalopox virus** (вирус оспы буйволов),
rabbitpox virus (вирус оспы кроликов))



Онколитические свойства штаммов вируса осповакцины



Отношение уровня репликации штаммов VV опухолевых клетках к уровню репликации в нормальных клетках. Нормальные клетки - первичная культура клеток бронхиального эпителия человека (normal human bronchial epithelial, NHBE) или эпителия малых воздушных путей (small airway bronchial epithelial, SAEC) и линии опухолевых клеток (A2780 или HCT 116). Множественность инфекции (MOI) во всех случаях составила 1.0 БОЕ/клетку. Вирус собирали через 48 часов и титровали методом бляшек. Представлено отношение числа бляшек на опухолевую клетку к числу бляшек на нормальную.

Для усиления адресности и противоопухолевых свойств поксвирусов необходима реконструкция генома

- Основная задача при конструировании онколитических поксвирусов состоит в том, чтобы, используя природные свойства вируса, получить штаммы, которые сохраняют высокую степень репликации в раковых клетках и высоко аттенуированы для нормальных клеток.
- Два пути реконструкции генома:
 - удаление генов вирулентности с сохранением направленной репликативной активности вируса в опухолевых клетках;
 - введение трансгенов, среди которых: гены цитокинов и других иммуномодуляторов и иммуностимуляторов; ингибиторов ангиогенеза; противоопухолевых белков; ферментов, превращающих нетоксичные про-драги в токсичные продукты внутри опухоли.

Аттенуированные штаммы вируса осповакцины (1)

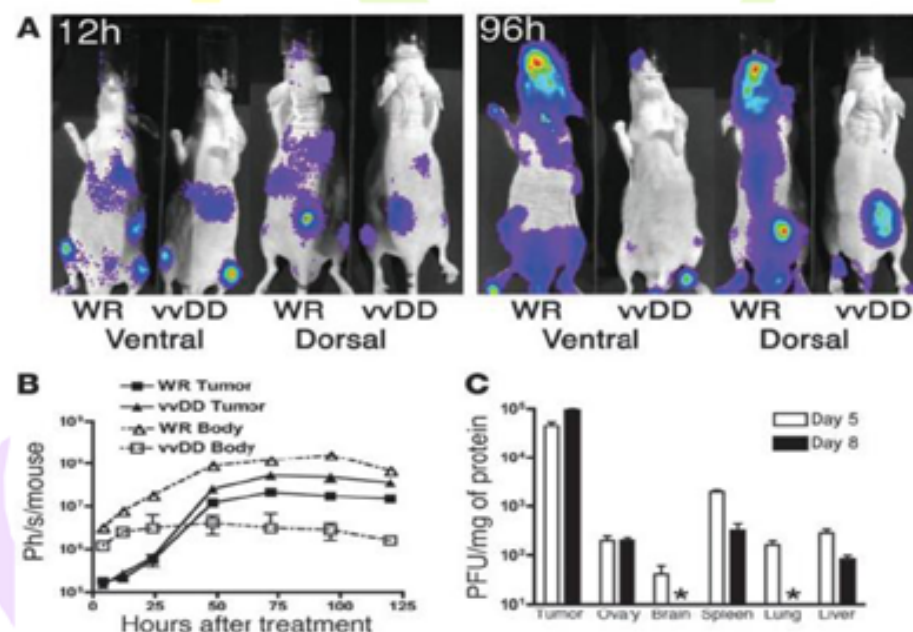
■ Одним из основных требований, предъявляемых к онколитическим препаратам, является их максимальная безопасность для иммунодефицитных раковых пациентов (возможные осложнения – вакцинальная экзема, нефрит, энцефалопатия и др.).

■ Показано, что инаktivация генов тимидинкиназы (ТК) и ростового фактора (VGF, virus growth factor) вируса осповакцины приводит к высокой аттенуации и практически полному отсутствию репликации вируса в неделящихся клетках.

- Ген тимидинкиназы (J2R) – фактор вирулентности, кодирует вирусную тимидинкиназу, которая фосфорилирует тимидин и уридин, обеспечивая эффективный синтез вирусных нуклеиновых кислот и избирательное преимущество при размножении вируса в нереплицирующихся клетках.

- Ген ростового фактора (C11R) – фактор вирулентности, кодирует секретируемый белок, который стимулирует метаболическую активность, рост и репликацию окружающих неинфицированных клеток, обеспечивая эффективное распространение инфекции.

Аттенуированные штаммы вируса осповакцины (3)



Сравнительная опухолевая селективность делеционного штамма vvDD и вируса осповакцины дикого типа, штамм WR, при внутривенном введении.

Штамм vvDD – делеция генов тимидинкиназы и фактора роста.

(A) В хвостовую вену безтимусных CD1 *nu/nu* мышей, несущих подкожно опухоль человека HCT 116 (стрелки), вводили 1×10^7 БОЕ вирусов vvDD и WR со встройкой репортерного гена люциферазы. Экспрессию гена люциферазы в органах мышей фиксировали люминесцентным изображением с помощью IVIS 100 системы (Xenogen: Caliper Life Sciences) (Thorne et al., 2007).

(B) Оценка экспрессии гена люциферазы в опухоли и остальных органах и тканях суммарно после инфекции 1×10^7 БОЕ вирусов vvDD и WR BALB/c мышей с подкожно привитой опухолью JC (группы по 5 мышей).

(C) Интраперитонеальное введение vvDD в дозе 1×10^9 БОЕ/мышь линии C57BL/6, несущих подкожно привитую опухоль MC38. Титр вируса анализировали в органах мышей на 5 и 8 дни после инфекции методом бляшек.

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (1)

Инактивация генов – факторов вирулентности

- Ген тимидинкиназы
- Ген ростового фактора
- Ген гемагглютинаина (A56R) – гликопротеин оболочки EEV и мембраны инфицированной клетки. Ингибирует слияние инфицированных клеток, протеолитически активирует инфекционность вирионов.
- Ген секретируемого из клеток интерлейкин-1 β -связывающего белка (B16R) – фактор вирулентности, участвует в подавлении развития воспалительной реакции организма в месте инфицирования, а также апоптоза инфицированной клетки.
- OPT F14L и F15L – модуляторы иммунного ответа, гены несут существенны при размножении вируса в культурах клеток, но вызывают аттенуацию *in vivo*, индуцируя более мелкие поражения, чем вирус дикого типа, при накожном заражении кроликов.

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (2)

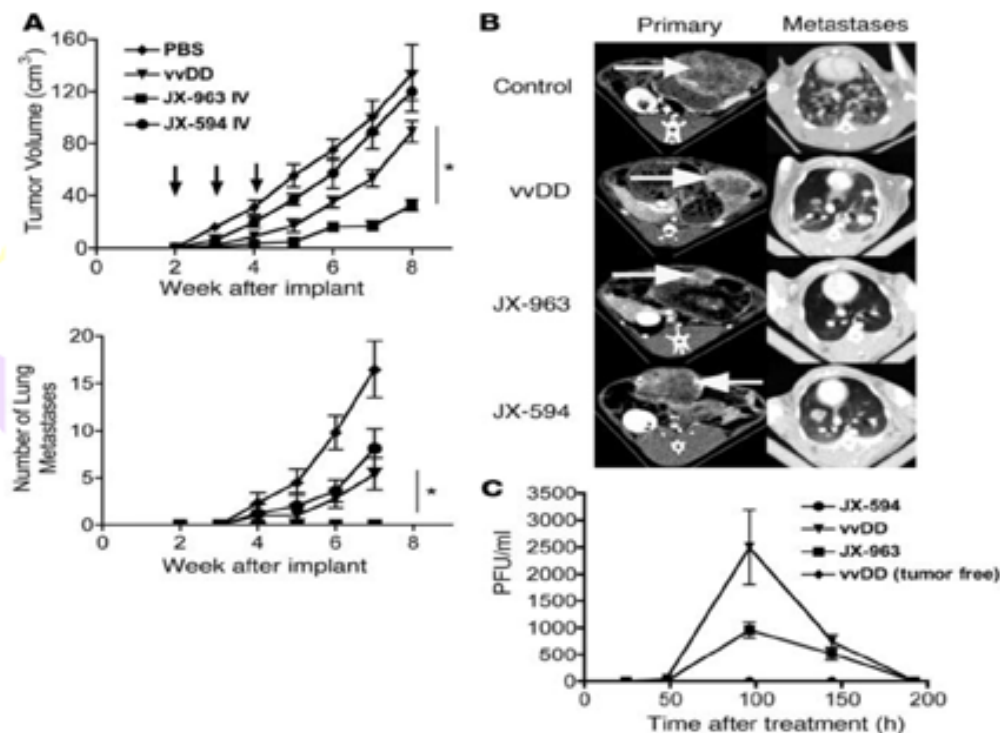
Встройка генов цитокинов:

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, GM-CSF)

ГМ-КСФ - стимулятор формирования гранулоцитов и макрофагов из мультипотентных клеток-предшественников. Это свойство делает перспективным его клиническое использование в комбинации вирусной и химиотерапии опухолей.

Ген ГМ-КСФ человека был встроен в геном двух штаммов вируса осповакцины WR (JX-963) и Wyeth (JX-594) в район TK-гена под контролем Р E/L. В случае JX-963 удален также ген VGF (исходный штамм VVdd).

ГМ-КСФ человека неактивен в грызунах, для определения активности рекомбинантов использовали кроликов с первичными опухолями печени и метастазами в легких. В качестве контроля использовали исходный штамм VVdd.



Анализ VX2 опухолей, имплантированных в печень кроликов, с использованием технологии CT imaging. (A) 1×10^8 БОЕ вирусов JX-594 (Wyeth штамм), vvDD и JX-963 (WR), было введено в ушную вену через 2,3 и 4 недели после имплантации опухоли (стрелки), когда она достигла $D=5 \text{ см}^2$. Рост опухоли (вверху) и число метастазов в легких (внизу, $n=6$). (B) Представлены СТ сканы первичной опухоли в печени (слева, указано стрелками) и метастазов в легких (справа) через 6 недель после имплантации. (C) Титр вирусов в крови.

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (3)

Встройка генов цитокинов:

Интерферон- β (ИФН- β , IFN- β)

Выбор этого цитокина был обусловлен его антираковыми свойствами: индукция цитотоксических Т лимфоцитов, антипролиферативный и антиангиогенный эффекты. ИФН- β ингибирует репликацию вируса в нормальных клетках, в то время как раковые клетки устойчивы к антивирусному действию интерферонов класса I, следовательно, репликация не будет в них ингибироваться.

Рекомбинантный вирус осповакцины получен на основе штамма WR, в котором делетирован ген B16R (его продукт нейтрализует секретируемые интерфероны класса I), а в ТК- ген под контролем ранне-позднего синтетического промотора вируса осповакцины (E/L) встроен ген IFN- β мыши (mIFN- β).

In vitro: на 2 порядка лучше реплицируется в раковых клетках.

In vivo: на мышах экспрессия гена mIFN- β регистрировалась преимущественно в клетках опухоли.

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (4)

Встройка генов цитокинов:

Интерлейкины-2 и -12 (ИЛ-2,-12; IL-2,-12).

Эти цитокины эффективны при лечении рака через их способность стимулировать цитотоксические Т лимфоциты, усиливать клеточную активность натуральных киллеров (NK), активизировать внутриопухолевую инфильтрацию лимфоцитов.

Рекомбинантные вирусы осповакцины получены на основе штамма Lister, встройка в ТК-ген мышинных ИЛ-2 и ИЛ-12 (mIL-2 и mIL-12), а также химеры mIL-2-mIL-12.

In vitro было показано, что рекомбинантные вирусы активно инфицируют раковые клетки, продукция IL-2 и IL-12 составляла 600 ng/млн клеток и 1,800 ng/млн клеток соответственно.

In vivo: на мышах с подкожной опухолью С6 глиомой оптимальна малодозовая терапия (I/V 10^2 - 10^3 БОЕ/мышь) – нет токсичности, индуцируют TNF в опухоли и через IFN- γ – NK. Наибольший противоопухолевый эффект оказывала химера mIL-2-mIL-12.

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (5)

Встройка генов противоопухолевых белков:

Белок p53 - опухолесупрессорный белок, который регулирует сигнальную цепочку факторов, необходимых для апоптоза. У 40-60% раковых больных регистрируются мутации в гене этого белка, что приводит к нарушению его супрессорной функции и неконтролируемому делению клеток.

Рекомбинантный вирус осповакцины VV(p53) , экспрессирующий ген p53 человека, получен на основе штамма Lister, встройка проведена в ТК-ген.

In vivo: использован для лечения глиобластомы, нет токсичности даже при высоких дозах вирусов (10^7 БОЕ/ мышь при внутривенном введении), наилучший эффект был получен в комбинации VV(IL-2 – IL-12)/ VV(p53) при количественном соотношении вирусов 10: 10^7 БОЕ/ мышь – индукция IFN- γ - NK (доклинические испытания).

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (6)

Встройка генов противоопухолевых белков:

TRAIL-ген (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand). TRAIL – белок, 281 а.к., относится к TNF – семейству цитокинов, нетоксичен и конститутивно экспрессируется во многих тканях человека. К нему обнаружено 5 рецепторов, два из которых TRAIL-R1 и TRAIL-R2 содержат функциональные «домены смерти» (DD, Death Domain), способные индуцировать p53 независимый апоптоз в большинстве раковых клеток, но не в нормальных клетках.

Рекомбинантный вирус осповакцины VV(TRAIL), экспрессирующий ген TRAIL человека, получен на основе штамма vvDD. Встройка проведена в ген тимидинкиназы.

In vitro: высокий уровень экспрессии TRAIL в культурах клеток.

In vivo: Исследования, проведенные на больных с раком шейки матки, показали, что TRAIL-R1 и TRAIL-R2 экспрессируются в основном в раковых клетках и апоптоз коррелировал с уровнем экспрессии этих белков (I фаза). На модели колоректального рака показан синергический эффект комбинированной терапии – oxaliplatin и VV(TRAIL).

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (7)

Встройка генов белков – блокаторов ангиогенеза:

Ключевым медиатором ангиогенеза является васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF, vascular endothelial growth factor), повышенная продукция которого выявлена во многих раковых клетках. Блокирование VEGF близко родственными молекулами ингибирует рост опухоли. Наиболее привлекательными для целей противоопухолевой терапии являются **рецепторы VEGF**.

Рекомбинантный вирус осповакцины VVdd-VEGFR-1-Ig , экспрессирующий ген секретируемого рецептора VEGF, получен на основе штамма vvDD. Встройка проведена в ген тимидинкиназы.

In vitro: ингибировал VEGF, содержание которого повышено в большинстве опухолевых клеток.

In vivo: на мышинных моделях рака почки был показан высокой адресный противораковый эффект при системном i/v введении

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (8)

Встройка генов белков – блокаторов ангиогенеза:

Ранее было показано, что химерный белок эндостатин - ангиостатин обладает значительными антиангиогенными и антираковыми свойствами.

Сконструировали онколитический вирус осповакцины, штамм Lister, несущий химерный ген эндостатин-ангиостатина (VWhEA). Встройка проведена в район генов F14L-F15L .

Экспрессия гена химерного белка в составе VWhEA была подтверждена *in vitro* и *in vivo*, а новый онколитический вирус VWhEA обладал большей противоопухолевой активностью по сравнению с исходным родительским штаммом.

In vivo: на примере рака поджелудочной железы мышей показан высокий ингибирующий эффект при интратуморальном введении. VWhEA прошел доклинические испытания и может рассматриваться как потенциальный препарат для лечения рака поджелудочной железы.

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (9)

Продраг-онкотерапия:

Продраги (Prodrug) – не токсичные даже при высоких дозах препараты, которые превращаются в токсичные цитолитические продукты под действием специфических ферментов. Гены специфических ферментов доставляются и экспрессируются в раковой клетке в составе онколитических вирусов.

Ген цитозиндезаминазы (CD) + продраг 5-фторцитозин = 5-фторурацил, который широко используется при лечении многочисленных форм рака, однако, является чрезвычайно токсичным. Продраг 5 фторцитидин не токсичен для людей.

Рекомбинант с геном CD JX929 получали на основе штамма WR vvDD. Встройку гена цитозиндезаминазы дрожжей проводили в ТК-ген.

In vitro: совместное введение вируса и продрага вызывает токсиколитическую гибель опухолевых клеток.

In vivo: на мышинных моделях рака яичников был показан высокой адресный противораковый эффект при системном i/v введении.

Реконструкция генома вируса осповакцины для онкотерапии (10)

Продраг-онкотерапия:

Экспрессия гена β -галактозидазы в инфицированных раковых клетках в комбинации с нетоксичным β -галактозидазо-активируемым продрагом препарата дуокармицина SA, применяемого в онкологии.

Рекомбинантный вирус осповакцины GLV-1h68 был сконструирован на основе штамма Lister с включением трех репортерных трансгенов: Renilla luciferase–Aequorea green fluorescent protein (RUC-GFP), β -galactosidase (LacZ) и β -glucuronidase (gusA), встроенных в гены F14-F15, TK и HA (гемагглютинин) соответственно.

In vitro: совместное введение вируса и продрага индуцировало апоптоз в клетках опухоли молочной железы GI-101A .

In vivo: GLV-1h68 высоко аттенуирован и вызывает регрессию ксенографтов опухоли молочной железы GI-101A у 95% мышей. Вирус элиминировался из организма после деструкции раковых тканей.

Онколитические штаммы вируса осповакцины

Название штамма	Фенотип (аттенуация)	Трансген (промотор)
JX-594 (Wyeth)*	TK ⁻	ГМ-КСФ человека (pE/L); lacZ (p7,5)
JX-963 (WR)*	TK ⁻ VGF ⁻	ГМ-КСФ человека (pE/L)
JX-795 (WR)	TK ⁻ B16R ⁻	ИФН-β мыши (p7,5); люцифераза (pE/L)
VV-mIL2, VV-mIL12, VV-mIL2-IL12 (Lister)	TK ⁻	ИЛ-2, ИЛ-12 (p7,5); lacZ (p11)
VV-hup53 (Lister)	TK ⁻	p53 (pE/L)
MVAhup53 (MVA)	Делеция 30% генома	p53 (pE/L); E. coli-glucuronidase (p7,5)
VVhEA (Lister)	F14L ⁻ F15L ⁻	Эндостатин-ангиостатин (pE/L)
VVddVEGFR-1-Ig (WR)	TK ⁻ VGF ⁻	Люцифераза (pE/L), VEGFR-1-Ig (p7,5)
JX929 (WR)*	TK ⁻ VGF ⁻	yCD (yest cytosine deaminase) (pE/L)
VV-TRAIL (WR)	TK ⁻	TRAIL
GLV-1h68 (Lister)*	F14L ⁻ F15L ⁻ TK ⁻ A56R ⁻	lacZ(p7,5), GFP(pE/L) β-glucoronidase(p11)

Онколитические штаммы вируса осповакцины, проходящие клинические испытания (США)

- JX-594 (Wyeth) – делеция ТК гена и последующая встройка гена GM-CSF человека. Успешно прошел I и II стадии клинических испытаний для первичного рака печени и стадию I для меланомы.
- JX-963 (WR) – делеция ТК и VGF генов, встройка ГМ-КСФ человека в область ТК-гена. Успешно прошел I стадию клинических испытаний для первичного рака печени.
- JX929 (WR) - делеция ТК и VGF генов, встройка гена цитозиндезаминазы дрожжей в область ТК-гена. Проходит I фазу клинических испытаний в лечении метастазированного рака яичников.
- GLV-1h68 (Lister) – инактивация генов F14L-F15L, ТК и НА, встройка гена β -galactosidase E. coli в ТК-ген. Проходит I фазу клинических испытаний в лечении рака молочной железы.

Результаты клинических исследований JX-594 (компания Jennerex, США)

- 1) Клинические испытания I фаза, 23 больных с раком прямой кишки, яичек, легкого, желудка, миосаркомой и меланомой
- 2) Введение внутривенное очень высоких доз вируса (10^5 - 10^7 БОЕ/кг веса), есть побочные эффекты, но все хорошо переносятся больными
- 3) Динамика накопления вируса в опухоли не зависит от наличия антител (исходных или индуцированных) в крови больных (преодолевает иммунный ответ)
- 4) Дозо-зависимый эффект накопления вируса в опухоли
- 5) Концентрация в клетках опухоли существенно выше, чем в окружающих здоровых клетках по материалу биопсии (иммуногистохимия).

- 1) Клинические испытания II фаза, 30 больных с раком печени IV стадии
- 2) Введение внутривенное очень высоких доз вируса (10^9 БОЕ/кг веса) снижает риск смерти через 14 месяцев на 60%

- 1) Сейчас - клинические испытания III фаза, 120 больных с раком печени, переставших реагировать на Nexavar (sorafenib)
- 2) Сначала внутривенное вируса (10^9 БОЕ/кг веса), затем многократно вирус будет вводиться в опухоль для преодоления сформировавшегося иммунного барьера

- 1) Планируется – прямое сравнительное исследование эффективности JX-594 с препаратом Nexavar (sorafenib) с разными типами рака на ранних стадиях.



Что мы делаем

- Инактивируем ТК и VGF гены вируса осповакцины
 - Встраиваем цитокины – ГМ-КСФ и ИЛ-2 (Л-ИБП и WR)
 - встройка генов апоптоз-индуцирующих белков –
 - 1) апоптин (неструктурный белок вируса анемии цыплят), индуцирует p53-независимый апоптоз
 - 2) NS1 – неструктурный белок парвовируса, индуцирует апоптоз раковых клеток
 - 3) p53, но химерный ген человек-курица для предотвращения образования олигомеров с мутантными формами в раковых клетках
 - продраг-онкотерапия – встройка гена β -galactosidase E. coli («гуманизированная форма») в ТК-ген вируса осповакцины
- 

Штаммы вируса осповакцины, с которыми мы работаем

- 1) WR – Western Reserve, нейровирулентный штамм с высоким индексом природной селективности в отношении опухолевых клеток. Получен из коллекции штаммов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва.
- 2) Л-ИВП - вариант штамма Lister, используемый в СССР для вакцинации детей против оспы в 1950-1970 е годы.

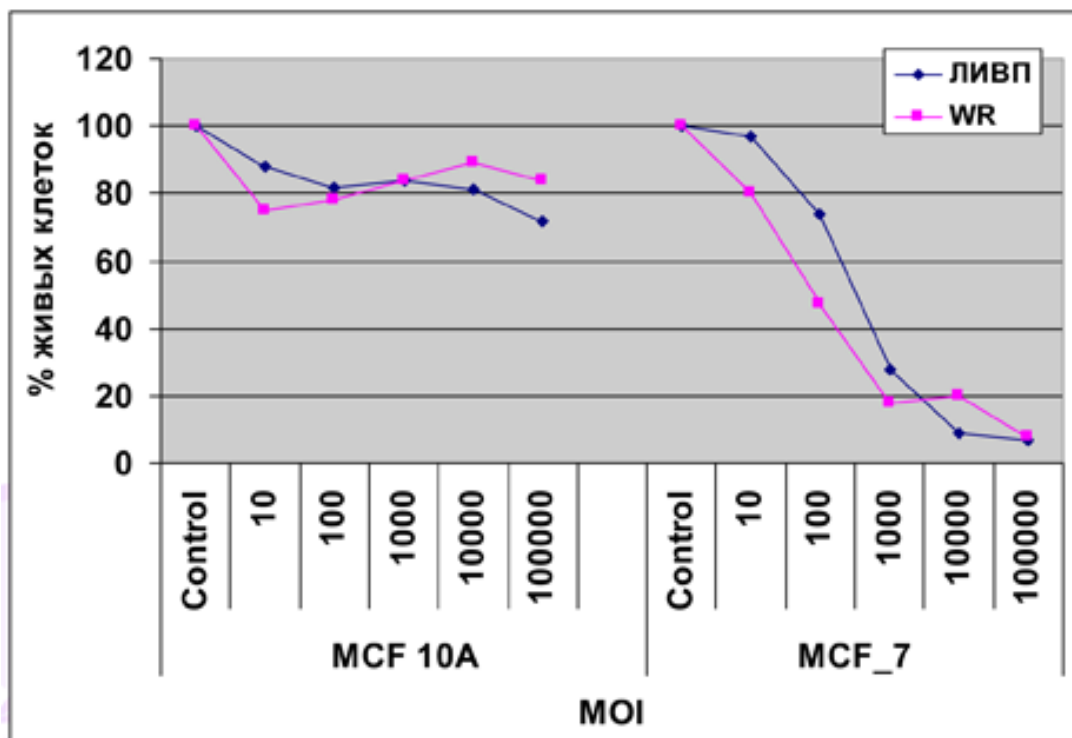
Преимущество Л-ИВП на первом этапе:

- 1) Л-ИВП имеет хорошую вакцинную историю на территории России,
- 2) менее патогенен, чем WR,
- 3) Имеет одну копию гена VGF, что облегчает конструкцию рекомбинантных вариантов.

Сравнительный анализ цитотоксического эффекта наших штаммов Л-ИВП и WR на раковой и нормальной культурах клеток эпителия молочной железы

MCF 10A – нормальные клетки эпителия молочной железы

MCF7 – клетки аденокарциномы молочной железы (эпителиальные)



Культур а клеток	ЦТД ₅₀ , БОЕ/лунка	
	ЛИВП	WR
MCF 10A	>10 ⁵	>10 ⁵
MCF7	3,4×10 ²	80,7

Индекс онкоселективности составляет больше 1000 в паре гомологичных культур клеток эпителия молочной железы раковая/нормальная MCF7 / MCF 10A, при этом наибольшую селективность показал штамм WR.

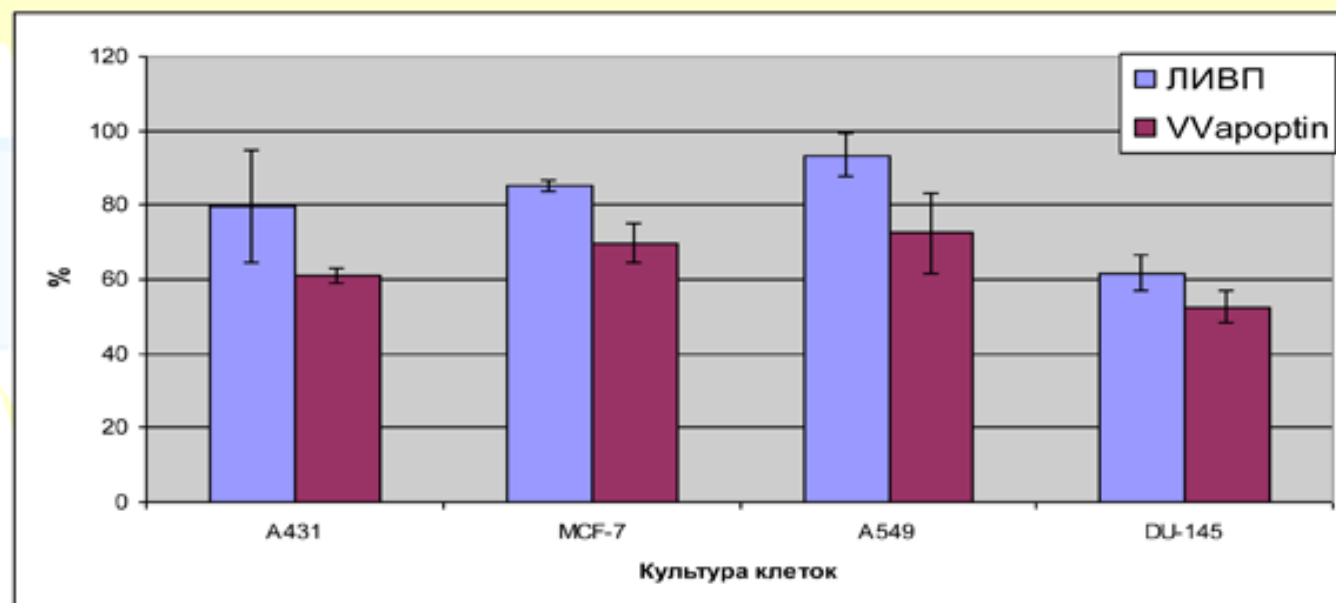
Жизнеспособность различных культур клеток (% по ХТТ тесту) при заражении вирусами ЛИВП и VVaroptin (0.001 БОЕ/клетка).

A431 – клетки эпидермоидной карциномы человека;

MCF-7 – клетки аденокарциномы молочной железы человека.

A549 – клетки карциномы легкого человека;

Du-145 – клетки карциномы простаты



Как следует из представленного рисунка рекомбинантный штамм вируса осповакцины со встройкой гена апоптоина имеет достоверно (на уровне значимости 95%) большую цитотоксическую активность для раковых клеток по сравнению с исходным родительским штаммом.

Анализ противоопухолевой активности рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 in vitro

	Выживаемость клеток (MOI=0,001 БОЕ/клетка), %					
Культура клеток	A431	MCF-7	A549	DU-145	MCF-10A	LECH- 240
Л-ИВП	79,9±15,1	85,0±1,5	93,5±6,0	61,7±4,7	>95	>95
VVdGF- ApoS24/2	61,0±1,8	69,8±5,4	72,4±11,0	52,7±4,2	>95	>95

В таблице приведены средние значения и стандартное отклонение, рассчитанное на 95% уровне значимости.

A431 – культура клеток эпидермоидной карциномы человека

MCF-7 – клетки аденокарциномы молочной железы человека

A549 – культура клеток карциномы легкого человека

DU-145 – клетки рака простаты

MCF 10A – нормальные клетки эпителия молочной железы

LECH-240 – диплоидная культура клеток легкого человека.

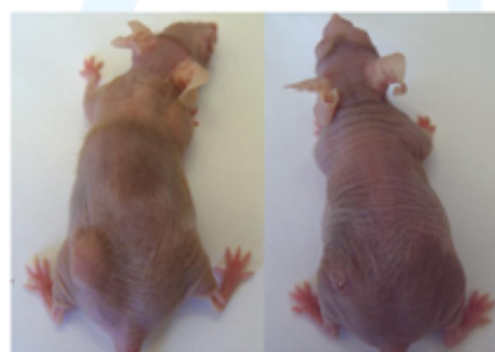
Анализ противоопухолевой активности рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 in vivo



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



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



Рек ($V=2 \times 10^2 \text{ мм}^3$ и 0)

В работе использовали самок nude, возраст 8-10 недель, вес 20-26 г

Опухоль – мышам прививали 5×10^6 клеток эпидермоидной карциномы А431 подкожно в левую заднюю часть тела.

Виротерапию начали через 7 дней после формирования хорошо видимых опухолей объемом $175-211 \text{ мм}^3$, введение препаратов осуществляли интратуморально на 7,9,11,15,17,19,21,23,25 и 27 сутки от начала эксперимента - введения клеток А431.

Контроль – мышам вводили физ. раствор в объеме 100 мкл.

Л-ИБП и VVdGF-ApoS24/2 – вводили 2×10^6 БОЕ/мышь в физ. растворе, объем инокулята – 100 мкл.



***БЛАГОДАРЮ
ЗА
ВНИМАНИЕ!***

