

Ю.И. Аммур, Т.К. Борисова, В.В. Зверев

ВИРУС КОРИ КАК ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ АГЕНТ

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва

Вирус кори давно известен как возбудитель тяжелой инфекции, а аттенуированный вирус кори входит в состав вакцин от этого заболевания. Однако недавно появились данные, что вирус кори способен избирательно заражать и разрушать злокачественные ткани при минимальном токсическом воздействии на окружающие здоровые клетки. Таким образом, он представляет собой многообещающий онколитический агент для лечения злокачественных новообразований. В обзоре подробно изложены механизмы, лежащие в основе избирательности вируса, и обсуждены безопасность и эффективность лечения с помощью аттенуированного вируса кори.

Ключевые слова: *вирус кори, онколитическая виротерапия.*

Y.I. Ammour, T.K. Borisova, V.V. Zverev

MEASLES VIRUS AS AN ONCOLYTIC AGENT

I.I. Mechnikov Moscow Scientific Research Institute of Vaccines and Sera,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Measles virus is a well known causative agent of measles, while attenuated measles virus composes measles vaccines. Recently, it was shown that measles virus selectively infects and kills cancer tissues, leaving normal cells unharmed. Therefore, measles virus is a promising oncolytic agent for cancer treatment. This review summarizes the mechanisms underlying of measles virus tumor selectivity and discusses the safety and efficiency of attenuated measles virotherapy.

Key words: *measles virus, oncolytic virotherapy.*

Несмотря на значительный прогресс в борьбе со злокачественными новообразованиями, всё ещё актуальна необходимость новых, менее токсичных и более точечных методов лечения. Онколитическая виротерапия – один из таких подходов, в основе которого лежит способность некоторых вирусов избирательно заражать и разрушать раковые клетки [1]. Многолетняя история адаптации вирусов к защитным механизмам хозяина привела к появлению различных естественных механизмов проникновения в клетку, контроля её биосинтетического аппарата и, в конечном итоге, её гибели с последующим вирусным распространением на соседние клетки. Таким образом, в сравнении с другими терапевтическими подходами антинеопластический эффект онколитических векторов амплифицируется вследствие вирусного размножения и распространяется в пределах злокачественной ткани.

Около полувека назад в литературе впервые были опубликованы данные о спонтанной регрессии злокачественных гематологических заболеваний, ассоциированных с естественной коревой инфекцией [2–5]. В течение последнего десятилетия наблюдался ренессанс интереса к виротерапии, что частично объясняется выявленными механизмами противоопухолевой избирательности вирусов. В настоящий момент многие вирусы рассматриваются в качестве потенциальных онколитических терапевтических векторов, для некоторых были инициированы клинические исследования, включая аденовирусы, пикорновирусы, реовирусы, полиовирусы, а также вирус простого герпеса, вирус коровьей оспы, вирус везикулярного стоматита, вирус болезни Ньюкасла, вирус кори, вирус эпидемического паротита и др..

Идеальный кандидат в онколитические вирусы должен удовлетворять нескольким основным критериям, таким, как: специфичность, безопасность и эффективность. Специфичность вируса подразумевает избирательное заражение и распространение в злокачественных тканях с их прямым лизисом при минимальном токсическом воздействии на окружающие нормальные клетки. При этом, вирус должен быть безопасным для организма хозяина, не распространяться в основной популяции здоровых клеток и не передаваться от человека к человеку. Также безопасность вируса включает его доказанную генетическую стабильность, т.е. отсутствие рекомбинации генома или генерации мутаций, приводящих к увеличению патогенности вируса. Под эффективностью понимают способность вируса проникнуть в клетки злокачественной паренхимы, реплицироваться с высоким индексом пролиферации и максимально разрушить их, несмотря на наличие противовирусного иммунного ответа. И, в заключение, он должен быть доступным для генетических модификаций с целью повышения терапевтического индекса, мониторинга вирусного распространения и контроля его тропизма.

Сем. *Paramyxoviridae* представлено оболочечными несегментированными РНК-содержащими вирусами с отрицательной полярностью генома, включающего от 6 до

10 последовательно соединенных генов. Сем. *Paramyxoviridae* включает подсем.: *Paramyxovirinae* и *Pneumovirinae*. Вирус кори относится к подсемейству *Paramyxovirinae*.

Вирус кори попадает в клетки слиянием с мембраной на клеточной поверхности при нейтральном pH. Два гликопротеина опосредуют этот процесс: гемагглютинин Н и белок слияния F. Белок Н связывается с рецепторами, в то время как белок F опосредует слияние вирусной и клеточной мембран. **Белок Н** вируса кори взаимодействует как минимум с 3 различными рецепторами. Дикий штамм вируса первично использует сигнальную лимфоцит-активирующую молекулу (SLAM, CD150), экспрессирующуюся на поверхности незрелых тимоцитов, активированных Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток и регулирующую продукцию интерлейкинов IL-4 и IL-13 CD4+ Т-клетками, а также продукцию IL-12, фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) и оксида азота (NO) макрофагами. Лимфотропизм и иммуносупрессивная природа вируса кори находятся в соответствии с распределением рецепторов SLAM [6–7].

В процессе адаптации к клеточным культурам в результате нескольких точечных мутаций в Н-гене вакцинный штамм вируса кори приобрел участок прикрепления для второго клеточного рецептора, повсеместно распространенного мембранного кофакторного белка (MCP, CD46) [8]. Рецепторы CD46 экспрессируются на всех человеческих клетках за исключением эритроцитов. Скорость связывания белка-гемагглютинина аттенуированного вируса кори с CD46 значительно выше, чем с рецепторами SLAM [8]. CD46 – член мембран-ассоциированного семейства белков регуляторов активности комплемента, он защищает клетки от собственного разрушения комплементом, действуя в качестве кофактора в Factor I-опосредованной протеолитической инактивации продуктов комплемента – C3b и C4b [9]. Поэтому злокачественные клетки экспрессируют больше рецепторов CD46 на своей поверхности по сравнению с аналогичными здоровыми клетками, что, вероятно, является одним из механизмов защиты от комплемент-опосредованного лизиса [10]. С помощью панели рекомбинантных клеток яичников китайских хомячков, экспрессирующих различный уровень рецепторов CD46, было установлено, что, хотя вирусное проникновение увеличивается соответственно увеличению плотности рецепторов на поверхности, клеточное слияние зависело от порогового значения числа рецепторов CD46, при котором оно было минимально, но становилось более обширным при «достаточном» уровне рецепторов CD46 [10]. Вследствие более высокой плотности CD46 на поверхности злокачественных клеток, они более чувствительны к цитопатическому действию, вызываемому аттенуированным вирусом кори, и, соответственно, способны вовлекать большее количество смежных клеток в образование синцития с их последующим лизисом. При этом, было показано, что здоровые человеческие клетки, экспрессирующие меньший уровень рецепторов CD46, минимально поражались

аттенуированным вирусом кори, не приводя к образованию синцития [10]. Таким образом, большее количество рецепторов CD46 на поверхности злокачественных клеток, относительно здоровых, существенно повышает их межклеточное слияние, ускоряя вирусное распространение в пределах злокачественной ткани и её гибель [11].

Кроме того, в 2011 г. двумя группами ученых независимо друг от друга был установлен третий рецептор для вируса кори – родственник рецептору полиовируса 4 (PVRL4), также известный как Нектин-4 [12–13]. Он используется как диким, так и вакцинными штаммами вируса кори в качестве входных ворот [12–13]. Этот рецептор преимущественно экспрессируется во время эмбриогенеза и в значительно меньшей степени в нормальных взрослых тканях, за исключением эпителия респираторного тракта и, в меньшей мере, в миндалинах и легочных пневмоцитах [14]. С другой стороны, высокий уровень Нектина-4 найден в некоторых карциномах, злокачественных опухолях яичников и молочной железы, а также легких и толстой кишки [15]. Действительно, Нектин-4 изначально был идентифицирован как опухолевый биомаркер [1]. Таким образом, естественный тропизм вакцинных штаммов вируса кори к избыточно экспрессирующимся рецепторам на поверхности злокачественных клеток может обуславливать специфичность этих штаммов.

После заражения **белок F** вируса кори, экспрессирующийся на цитоплазматической мембране зараженной клетки, может опосредовать слияние с соседними клетками, образуя синцитий (гигантское многоядерное клеточное образование), приводящий к гибели ткани *in vivo* [16]. Для вируса кори требуется коэкспрессия белков F и H для формирования синцития [16]. Один из недостатков при использовании онколитических вирусных векторов – это их ограниченная доставка в целевые клетки. Образование синцития может преодолеть эту преграду путём захвата в синцитий и разрушения тех злокачественных клеток, в которые сам вирус не в состоянии проникнуть, таким образом, существенно повышая онколитический эффект вируса. Так, было показано, что трансфекция гликопротеинов H и F вируса кори в глиобластомную клеточную линию U87 приводит к образованию синцития, включающего до 50–100 смежных нетрансфицированных клеток [17].

Кроме того, репликация вируса кори происходит исключительно в цитоплазме зараженной клетки, следовательно, ядерная ДНК не принимает в этом участия, что дает ему преимущество в безопасности по отношению к онколитическим ДНК-вирусам, т.к. он не может встраиваться в геном, приводя к делециям генов, хромосомным абберациям и/или активации онкогенов.

Длительная история применения вакцин, содержащих аттенуированные штаммы вируса кори, уже не оставляет сомнений в их **безопасности** для организма человека. Вакцинные штаммы вируса генетически стабильны, даже после длительной репликации в человеческих

клетках [18], что позволяет применять штаммы, разработанные ещё в середине 1960-х гг.. Более того, не было доложено о реверсии вакцинных штаммов к дикому типу и рекомбинации между ними у людей, зараженных как диким, так и вакцинным штаммами. Кореяная вакцина непатогенна, малотоксична и неконтагиозна [18]. Кроме того, было показано, что рекомбинантный вирус кори, содержащий длинные фрагменты чужеродных кодирующих последовательностей, относительно стабилен как *in vitro*, так и *in vivo* [1]. Участки, кодирующие чужеродные белки, могут быть введены между генами белков вируса со своими собственными старт- и стоп-кодонами в кДНК, полученной путём переписывания геномной РНК. Таким образом, чужеродные белки могут транскрибироваться параллельно с вирусными в процессе вирусной репликации в клетке хозяина с учетом феномена транскрипционной полярности парамиксовирусов.

Специфичность вируса кори, основанная на дефекте в системе врождённого иммунитета. Основной критерий для онколитических вирусов – их способность избирательно заражать и убивать злокачественные клетки, при этом, минимально затрагивая здоровые клетки. Вирус кори отвечает этому критерию. Как уже обсуждалось выше, специфичность вируса кори связана, в первую очередь, с его тропизмом к рецепторам, избыточно экспрессирующимся на поверхности злокачественных клеток. Однако, это не единственный его механизм. По-видимому, распространение вируса кори также опосредованно дефектами в системе врождённого иммунного ответа на вирус в злокачественной клетке, а именно, – способностью индуцировать сильный иммунный ответ в нормальных, но не опухолевых клетках [11].

Как известно, здоровым клеткам присущ внутриклеточный врождённый механизм защиты от вирусной инфекции, включающий воздействие на вирус путём ингибирования его репликации. В то же время, он индуцирует торможение клеточного роста или сигналы апоптоза и активирует адаптивную ветвь иммунного ответа с основной целью разрушения вирус-продуцирующие клетки, лимитируя тем самым вирусное распространение [19]. Вирусные нуклеиновые кислоты и белки распознаются мембранными и цитоплазматическими «паттерн»-распознающими рецепторами врождённой иммунной системы, такими как Toll-подобные рецепторы (TLRs), RIG-I-подобные рецепторы (RLRs) и NOD-подобные рецепторы (NLRs) [19]. Вирусное распознавание «паттерн»-распознающими рецепторами через каскад специфических биохимических реакций приводит, во-первых, к увеличению продукции, в первую очередь, дендритными клетками (ДК) интерферонов (ИФН) первого типа (ИФН- α и ИФН- β), которые, в свою очередь, индуцируют противовирусный ответ в зараженных и незараженных клетках и активируют клетки врождённого иммунитета – НК-клетки; а во-вторых, увеличению экспрессии ко-стимулирующих молекул (CD40, CD80 и CD86), которые активируют Т-клетки и

адаптивную ветвь иммунного ответа [19]. Эффекторный механизм действия ИФН- α и ИФН- β на вирусы состоит, во-первых, в блокировке трансляции фосфорилированием факторов инициации трансляции специальной белок-киназой PKR, предотвращая экспрессию вирусных белков, и, во-вторых, в деградации вирусной РНК за счет активации специальной РНКазы – RNase L, причем медиатором этой активации является 2'-5'-олигоденилатсинтетаза. Считается, что гены, кодирующие киназу и олигоденилатсинтетазу, находятся под транскрипционным контролем ИФН I типа. В результате образуются неактивные предшественники этих ферментов. Их окончательная активация происходит под воздействием дсРНК-вируса. Противовирусное действие ИФН I типа также может привести к запрограммированной гибели зараженной клетки через FADD/caspase-8 каскад или активацией экспрессии p53, Fas (APO-1, CD95), ФНО-апоптоз индуцирующий лиганд и про-апоптозное семейство белков Bcl-2 [11]. Как уже отмечалось, ИФН I типа вносят вклад и в активацию НК-клеток, которые осуществляют другой набор эффекторных функций против зараженных клеток. В частности, НК-клетки производят ИФН- γ , важнейший иммунорегуляторный цитокин. При выполнении некоторых условий, в частности, – отсутствия или сильно сниженной экспрессии молекул МНС I, НК-клетки способны убить зараженную вирусом клетку за счет системы перфорина и специальных протеаз – гранзимов.

Для злокачественных клеток характерны специфические мутации в генах, кодирующих продукты ИФН-каскада, что позволяет им сопротивляться ИФН-индуцируемому клеточному ингибированию роста и сигналам апоптоза [11]. Таким образом, злокачественные клетки получили преимущество по отношению к нормальным клеткам, но, в то же время, ослабили свой врожденный иммунный ответ, что делает злокачественную ткань относительно перmissive субстратом для вирусного роста, в то время как соседние нормальные клетки остаются защищенными от вирусного заражения благодаря своей врожденной иммунной системе. Патогенный вирус кори научился модулировать врожденный иммунный ответ клетки-хозяина и, следовательно, способен инфицировать нормальные клетки, что делает его небезопасными и неселективными в качестве терапевтического вектора. Модулирование врожденной иммунной системы достигается, в частности, наличием полицистронного гена фосфопротеина P, который кроме собственно фосфопротеина кодирует 2 дополнительных белка: V и C [20]. Вирусный белок V блокирует продукцию ИФН, конкурентно связываясь с продуктами сигнальных путей RIG-I-подобного рецептора и Toll-подобных рецепторов – TLR-7 и TLR-9 [21]. Белки P/V вируса кори и, в меньшей степени, белок C интерферируют с ИФН-индуцируемой передачей сигнала через JAK/STAT каскад [20] и, следовательно, снижают противовирусное действие ИФН. Кроме того, белок V вируса кори связывается с p73-p53-активирующим регулятором апоптоза (p73-PUMA), а белок C противодействует про-

апоптозной антивирусной активности PKR [11]. В отличие от дикого штамма аттенуированный вирус кори не может эффективно модулировать врождённый иммунный ответ нормальных клеток человека, так как он приобрел мутации в Р-гене в процессе аттенуации и, одновременно, утратил способность эффективно противодействовать продукции и эффектам ИФН [11]. Таким образом, врождённый иммунный ответ эффективно защищает клетки человека от аттенуированного вируса кори, не способного эффективно его модулировать в нормальных клетках, в отличие от злокачественных клеток.

Влияние вируса кори в качестве онколитического агента на адаптивный иммунный ответ. Последние исследования подтверждают концепцию, что вирус, заражающий злокачественные клетки, не только убивает их, но также активирует адаптивную ветвь иммунного ответа, направленного на зараженные злокачественные клетки, таким образом, опосредуя антиопухолевый иммунитет. Злокачественная клетка, зараженная вирусом, производит воспалительные цитокины, белки теплового шока, а также вирусные поверхностные белки и неопредетерминанты – опухоль-ассоциированные антигены (ОАА), что притягивает ДК, NK-клетки, моноциты и Т-клетки к месту заражения. ИФН- α активирует ДК и NK-клетки и индуцирует β -цепь рецептора IL-12 на Т-клетках, что в свою очередь, вместе с IL-12, вызывает Th1 тип ответа Т-клетками [11]. Вирусные антигены и ОАА представлены на поверхности ДК в комплексе с МНС класса I и II, активированными ИФН- α/β , к CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеткам, соответственно [22]. Таким образом, Т-клетки адаптивного иммунного ответа активируются против зараженных злокачественных клеток, но не нормальных зараженных клеток, а вирусные белки на поверхности злокачественных клеток играют роль адгезивных молекул при взаимодействиях лимфоцитов и костимуляции Т-клеток, активируя уже существующие Т-клетки памяти, специфичные для злокачественных клеток. Таким образом, можно предположить, что заражение вирусом не только убивает злокачественные клетки в процессе своей репликации или индукции врождённой ветви иммунного ответа, но также активирует адаптивную ветвь иммунитета против злокачественных новообразований.

Так, для клеток мезотелиомы, зараженных аттенуированным вирусом кори штамма Schwarz, была показана способность индуцировать созревание ДК моноцитарного происхождения (Мо-ДК) *in vitro*, в то время как облученные УФ злокачественные клетки не обладали ею [23]. Подобное созревание, как известно, индуцируется молекулами DAMPs, запущенными злокачественными клетками, зараженными вирусом кори, так как сам вирус кори не способен индуцировать созревание Мо-ДК [24]. Gauvrit с соавт. показали, что в отличие от облученных злокачественных клеток зараженные злокачественные клетки выделяют белки теплового шока – HSP70 и gp96 [23], которые частично могут быть ответственны за созревание Мо-ДК. Было также установлено, что Мо-ДК, подверженные действию зараженных вирусом

кори злокачественных клеток (но не облученных), перекрестно запускают CD8+ Т-лимфоцитарный ответ, специфичный для мезотелина – ОАА, выделяемого клетками мезотелиомы, сопровождающимся цитотоксическим действием для нее [23]. Сходный результат был доложен группой Donnelly для штамма Edmonston. Donnelly с соавторами показали, что зараженные клетки мезотелиомы выделяют DAMPs, такие как HMGB1, или воспалительные цитокины: ИФН I типа (ИФН- α и ИФН- β), IL-6 и IL-8, участвующие в созревании Мо-ДК [25]. Всё вышесказанное указывает, что коревая инфекция злокачественных клеток, вызывая непосредственно иммунологическую гибель клеток, способна стимулировать миелоидные ДК, в частности, – их способность перекрестно запускать противоопухолевый Т-клеточный ответ.

В последнее время в антинеопластической иммунотерапии иммуностимулирующие молекулы, способные активировать миелоидные и/или плазматоидные ДК, вызывают повышенный интерес. В своем недавнем исследовании Fonteneau с соавторами показали, что аттенуированный вирус кори в качестве онколитического агента активирует не только миелоидные, но и плазматоидные ДК (пДК) [26]. Эта разновидность ДК также известна как ИФН-продуцирующие клетки, продуцирующие большие количества ИФН I типа – ИФН- α , ИФН- β , ИФН- ω , при встрече с вирусами, в том числе – вирусом гриппа, вирусом простого герпеса и ВИЧ-1, узнавая вирусные нуклеиновые кислоты через TLR, в частности TLR-7 и TLR-9. Они также принимают участие в активации NK- и Т-клеточного ответов [23]. С помощью рекомбинантного штамма Schwarz вируса кори, экспрессирующего GFP, было показано *in vitro*, что непосредственно вирус кори не заражает пДК, в то же время он заражал и лизировал различные злокачественные клеточные линии – меланомы, мезотелиомы и лёгочной аденокарциномы [26]. В то же время, пДК, встретившись с зараженными злокачественными клетками, экспрессировали маркер созревания CD83 и выделяли большое количество ИФН- α . Последнее может быть полностью заблокировано с помощью TLR-7-специфического ингибитора IRS661, указывая на то, что пДК активация, вероятно, запускается TLR-7, узнающим одноцепочечную РНК вируса кори. ИФН- α , как и другие ИФН I типа, как известно, оказывают положительный эффект на противоопухолевый иммунный ответ. пДК поглощают фрагменты зараженных корью злокачественных клеток и представляют опухолевые антигены, активируя продукцию ИФН- γ специфичными CD8+ Т-клетками [23]. Таким образом, аттенуированный вирус кори представляет собой многообещающий онколитический агент с положительным влиянием на антиопухолевый иммунный ответ.

Эффективность коревой онколитической виротерапии и подходы для её повышения. Установленные механизмы избирательности и подтвержденные показатели безопасности позволили перейти к доклиническим исследованиям вируса кори в качестве

онколитического агента и сконцентрировать большее внимание на повышении его эффективности. Так, было показано, что аттенуированные штаммы вируса кори обладали противоопухолевой активностью в отношении многих первичных человеческих опухолевых тканей, традиционно используемых опухолевых клеточных линий *in vitro* и на некоторых модельных животных *in vivo* в доклинических исследованиях. Примеры включали: рак яичников, болезнь Рустицкого-Калера, мультиформную глиобластому, гранулобластому, рак простаты, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, мезотелиому, фибросаркому, рабдомиосаркому, почечно-клеточную карциному, В-клеточные неходжкиновские лимфомы, Т-клеточные лейкомии, эритролейкемии, кожные Т-клеточные лимфомы; при инфицировании с различной множественностью, варьировавшей от 10^3 до 10^8 ТЦД₅₀, с различными способами введения – внутриопухолевым, внутривенным, внутрибрюшным или внутриплевральным, однократно или многократно [1]. Во всех перечисленных моделях наблюдался характерный цитопатический эффект, включающий образование многоядерных клеточных агрегатов и синцития с последующей гибелью зараженных злокачественных клеток.

Одна из основных задач в клинической онколитической виротерапии является разработка подходящих, неинвазивных методов для мониторинга *in vivo* репликации, локализации, распространения и элиминации вируса, а также для определения профиля экспрессии генов и вирусной кинетики в динамике по времени. Подобные данные, полученные в режиме реального времени, могут быть ключевыми для определения оптимальной величины дозы и временных интервалов между повторными циклами лечения. Вирусы могут быть модифицированы с целью экспрессии клинически важных маркерных пептидов, которые, в идеале, должны иметь постоянный период полураспада в кровотоке, быть легко количественно измеряемыми доступными методами, не обладать иммуногенностью или биологической активностью [1].

Так, для вируса кори была разработана система обратной генетики для восстановления РНК и размножения генетически измененного вируса кори штамма Edmonston (MV-Edm) из клонированной кДНК [27], которая используется в настоящий момент для конструирования практически всех генетически полученных онколитических производных MV-Edm. Первым таким исследованным на человеке вирусом был MV-CEA, производный штамм MV-Edm, экспрессирующий растворимый внеклеточный N-терминальный домен человеческого эмбрионального опухолевого антигена (CEA) [1]. CEA – хорошо изученный, биологически инертный опухолевый маркер с минимальной иммуногенностью, применяющийся, в основном, для мониторинга ремиссии заболевания, поэтому количественная оценка CEA может быть представлена простыми и доступными методами [1]. Заражение и размножение вируса MV-

СЕА в злокачественных тканях приводит к экспрессии гена СЕА и секреции растворимого маркерного пептида во внеклеточное пространство. Таким образом, оценка пептида СЕА в сыворотках пациентов может предоставлять необходимую информацию об экспрессионном профиле и вирусной кинетике. Доклинические исследования на модельных мышах с ксенотрансплантатами рака яичников показали, что внутрибрюшинное введение вируса MV-СЕА приводило к полной регрессии 80 % опухолей и повышало среднюю выживаемость более, чем на 250 %, тогда как внутриопухолевое введение этого вируса мышам с пересаженной ортотопической мультиформной глиобластомой приводило к полной регрессии заболевания у 7 из 8 мышей [11]. Несмотря на то, что у некоторых животных в дальнейшем наблюдался вторичный рост опухоли, средняя выживаемость значительно повышалась [11]. В данный момент MV-СЕА проходит I фазу клинических исследований на пациентах с раком яичников или глиомой в Mayo Clinic, Рочестер. Однако следует отметить, несмотря на то, что определение СЕА в крови указывает на распространение вируса в зараженной ткани, оно не дает понять идет ли речь о заражении злокачественной или здоровой ткани. Поэтому для мониторинга заражения злокачественных клеток Iankov с соавторами предложили другое производное MV-Edm – MV-λ, штамм вируса, экспрессирующий легкую λ-цепь человеческого иммуноглобулина [28]. Заражение этим штаммом моноклональной линии клеток множественной миеломы, продуцирующей легкую κ-цепь иммуноглобулина, приводит к секреции уникального химерного иммуноглобулина, состоящего из одной λ- и одной κ-цепи, не найденного *in vivo*. С другой стороны, вирусное распространение в здоровых клетках приводит к секреции только свободных легких λ-цепей. Таким образом, детекция уникального химерного иммуноглобулина специфична для заражения злокачественных клеток [28].

Однако онколитические вирусы, секретирующие растворимые маркерные пептиды, не дают информации об анатомической локализации очага вирусного заражения. Поэтому был разработан производный штамм MV-Edm – MV-NIS, экспрессирующий ген человеческого тироидального симпорта иодида калия (hNIS) [1]. hNIS – мембранный ионный канал, в норме экспрессирующийся в щитовидной, молочных и слюнных железах, желудке, кишечнике и опосредующий поступление иодидов внутрь клетки, в том числе и радиоизотопов. Зараженные вирусом MV-NIS клетки экспрессируют белок hNIS на своей мембране, опосредующий накопление радиоизотопов внутри нее, которое может быть прослежено с помощью неинвазивных доступных методов. Подобный неинвазивный мониторинг вируса MV-NIS дает информацию в режиме реального времени о вирусной анатомической локализации, распространении, размножении и генной экспрессии в динамике. Кроме того, hNIS может повысить онколитическую эффективность вируса кори, накапливая в злокачественных клетках терапевтические концентрации радиоизотопов, таких как ^{131}I , излучающего β и γ-частицы [1].

Бета-частицы индуцируют прямое радиационное повреждение соседних незараженных клеток, включая лизис злокачественных клеток, резистентных к виротерапии. Подобная комбинация опосредованного радиоизотопами разрушения злокачественных тканей и рекомбинантных онколитических вирусов, получила название – радиовиротерапия [1]. Существенное повышение противоопухолевой активности вируса MV-NIS в комбинации с радиотерапией было продемонстрировано для клеточной линии множественной миеломы MM1, резистентной к вирусному онколизису [11]. Однако важно отметить, что к основным недостаткам использования репортерного гена hNIS в виротерапии относится отсутствие необходимых механизмов для органификации йода в нетироидных клетках, что приводит к выведению йода из NIS-экспрессирующих клеток, и, как следствие, снижению эффективности лечения [11]. Это особенно важно, если структура злокачественной опухоли лимитирует вирусное распространение в её пределах, что приводит к снижению эффективности лечения.

Для обеспечения эффективности лечения онколитические вирусы должны быть способными: миновать противовирусный защитный ответ, проникнуть из сосудов в злокачественную паренхиму и распространиться внутри нее. В процессе системной и внутрибрюшинной доставки, большинство вирусных частиц образуют комплексы и нейтрализуются компонентами врождённого или гуморального иммунного ответа, включающего систему комплемента, специфические противовирусные антитела, преиммунные IgM и фагоцитарные иммунные макрофаги [29]. В частности, как уже отмечалось выше, большинство потенциальных пациентов на лечение с использованием вируса кори имеют соответствующие антитела, что может снизить эффективность лечения, особенно при внутривенном способе введения, а также при метастазах или раке крови, требующих системной доставки. Вирусы, которые все-таки достигают опухоли, должны проникнуть из опухолевых кровеносных сосудов в злокачественную паренхиму. Внутриопухолевое распространение вируса зависит от плотности рецепторов на поверхности злокачественных клеток и анатомической структуры опухоли. Вне зависимости от способа введения вируса, его распространение в пределах злокачественной ткани часто неэффективно в сравнении с быстрым заражением и распространением в клеточном монослое [1]. Поэтому было разработано несколько подходов для преодоления первичного и вторичного иммунного ответа и, соответственно, повышения эффективности виротерапии. Наиболее простой из них – использование повышенных множественностей заражения, что не всегда возможно из-за сложности наработки больших количеств вирусов. Другие подходы включали: (1) комбинацию лечения с иммуносупрессорами; (2) специальные носители для доставки вируса; (3) вставка в аттенуированный штамм генов соответствующего дикого вируса для ингибирования внутриклеточных путей врождённого иммунитета; а также получение рекомбинантных вирусов

с измененным рецепторным тропизмом или повышенной фузиогенностью для более эффективного проникновения и распространения вируса.

Иммуносупрессия при виротерапии направлена, прежде всего, на повышение вирусного распространения и персистенции путём подавления иммунного ответа против онколитического вируса и зараженных клеток. Циклофосфамид – один из таких иммуносупрессорных агентов. Он убивает клетки, приводя к внутри- и межнитевым поперечным сшивкам ДНК, затрудняя её репликацию и инактивируется клеточными альдегид-дегидрогеназами. Таким образом, клетки, экспрессирующие меньший уровень альдегид-дегидрогеназы, такие как созревающие гематопозитические клетки-предшественники и все популяции лимфоцитов, высокочувствительны к цитотоксическому эффекту циклофосфамида. Циклофосфамид замедляет продукцию противокоревых антител и увеличивает время полного выведения вируса из крови, повышая эффективность лечения, что дало толчок для I фазы клинических исследований онколитической коревой виротерапии в комбинации с циклофосфамидом у пациентов с тяжело поддающейся лечению множественной миеломой [11].

Для защиты от противовирусного иммунитета и для увеличения эффективности доставки вируса к злокачественной опухоли были изучены различные типы клеток в качестве потенциальных вирусных носителей, включая непосредственно злокачественные клетки, стволовые клетки, незрелые и зрелые ДК, активированные Т-лимфоциты, моноклеарные клетки периферической крови, первичные CD14+ клетки [30]. Идеальный кандидат в вирусные носители должен удовлетворять некоторым требованиям, таким как: быть перmissiveм по отношению к вирусной инфекции, безопасным для организма и доступным в необходимом количестве; обладать способностью эффективно доставлять и высвобождать онколитический вирус в клетки-мишени, при этом, в процессе доставки находиться в «молчащей» фазе для минимальной детекции нейтрализующими антителами. Кроме того, носители могут выступать в качестве своеобразных вирусных «фабрик», поддерживающих вирусное размножение внутри, приводя к высокому вирусному выходу в злокачественной ткани. В частности, при естественной коревой инфекции клеточно-ассоциированная виремия является частью жизненного цикла вируса кори, тем самым защищая вирус от специфических антител. Кроме того, ещё одним преимуществом онколитического вируса кори для заключения его в носители является его природная фузиогенность, позволяющая эффективно доставлять вирус через гетерослияние зараженных носителей со злокачественными клетками.

Другой подход направлен на подавление врождённого иммунитета к вирусной инфекции. В частности для вируса кори он заключается в замене генов аттенуированного штамма соответствующими генами дикого штамма, способных ингибировать внутриклеточные сигнальные пути врождённого иммунитета. Как известно, вакцинные штаммы вируса кори

индуцируют существенно больший уровень секреции ИФН I типа по сравнению с диким штаммом, что связано, в основном, с приобретенными мутациями в гене P. Naralambieva с соавт. получили производный штамм MV-Edm, в котором, P-ген вакцинного штамма был замещен на P ген дикого штамма MVIC-B [31]. Заражение *in vitro* злокачественных клеточных линий и первичных тканей химерным вирусом индуцировало более низкий уровень ИФН I типа по сравнению с неизменным вирусом, повышая онколитическую эффективность [31]. Следует, однако, отметить, что в то время как дикий вирус кори способен полностью выключить индукцию ИФН I типа, химерный вирус значительно подавлял, но не прекращал полностью продукцию ИФН. Это наблюдение позволяет предположить, что другие белки вируса кори тоже принимают участие в ускользании дикого вируса от механизмов врождённого иммунного ответа и могут быть также замещены.

Важно отметить, что были сконструированы рекомбинантные вирусы не только для подавления антивирусного, но и для повышения противоопухолевого иммунитета. Так, рекомбинантные вирусы кори, экспрессирующие мышинный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ) или ИФН β , существенно увеличивали онколизис по сравнению с исходным вирусом [1]. Данный эффект был частично опосредован индукцией неспецифического воспалительного ответа в пределах злокачественной ткани.

Как уже обсуждалось выше, рецепторный тропизм вируса кори, частично объясняет его избирательность к злокачественным клеткам. Несмотря на то, что даже при очень высоких дозах аттенуированных штаммов вируса не отмечалось его токсичности, изменение рецепторного тропизма, направленного, в первую очередь, на повышение специфичности против раковых клеток, может ещё больше повысить его безопасность, в частности, при потенциально низкой или варьирующей рецепторной экспрессии, встречающейся не только у гистологически идентичных типов рака, но и в пределах одной и той же злокачественной ткани [32]. Тот факт, что вирусное связывание с рецепторами и слияние опосредуются различными белками, H и F соответственно, значительно упрощает эту задачу, в частности, изменять вирусную направленность к рецепторам без потери его фузиогенности. Путём сравнения диких и аттенуированных штаммов относительно недавно были установлены аминокислотные основания, необходимые для взаимодействия белка H с CD46 и SLAM [33]. Так, единственная замена аминокислоты тирозина на аланин в позиции 481 (Y481A) и аргинина на аланин в позиции 533 (R533A) в штамме вируса кори MV-Edm делала его нечувствительным к рецепторам CD46 и SLAM, соответственно [33]. Кроме того, Leonard с соавторами показали, что замена тирозина на аланин в позиции 543 (Y543A) белка H дикого штамма вируса делала его нечувствительным к рецептору Nectin-4 [34]. Таким образом, были успешно разработаны производные штаммы вируса кори с измененным тропизмом путём

введения опухоль-специфичных полипептидных лигандов в С-конец белка гемагглютинаина, таких как рецепторы: эпидермального фактора роста, инсулиноподобного фактора роста-1, одноцепочечных антител против CD38 (миелома-ассоциированный антиген), против СЕА, против CD20 (лимфома-ассоциированный антиген), а также одноцепочечный Т-клеточный рецептор, рецептор IL-13 [1, 32] и др..

Другой подход включает изменения в структуре белка F. Как известно, функциональным белок F становится после протеолитического расщепления его предшественника F₀ на две субъединицы – большую (F1) и малую (F2). Протеолитическое расщепление F₀ обычно опосредованно повсеместно распространенной клеточной протеазой – фурином. Springfield с соавторами разработали стратегию, согласно которой избирательность расщепления достигается вставкой в белок F последовательностей, чувствительных к специфичным для злокачественных клеток протеазам [35].

Еще один новый подход для изменения селективности включает вставку в геном вируса кори последовательностей элементов, направленных к микроРНК (miRNA) [36]. Эндогенные клеточные микроРНК, как известно, присутствуют в нормальных клетках, но практически или полностью отсутствуют в злокачественных. Таким образом, они могут ограничивать репликацию вируса в нормальных, но не злокачественных клетках.

В заключении следует отметить, что вирус кори представляет собой многообещающий онколитический агент для лечения злокачественных новообразований, способный избирательно заражать, распространяться и эффективно разрушать злокачественные ткани, что было подтверждено в доклинических исследованиях на широком спектре злокачественных опухолей *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, он безопасен, стабилен и доступен для генетических модификаций, в частности, для мониторинга процесса лечения, а все вышеперечисленные подходы, направленные на подавление уже существующего противокоревоего и повышение антинеопластического иммунитета, делают его одним из наиболее практичных онколитических векторов.

Литература.

1. Msaouel P., Opyrchal M., Domingo Musibay E., Galanis E. Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013; 13 (4) : 483–502.
2. Bluming A.Z., Ziegler J.L. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet.* 1971; 2 (7715) : 105–106.
3. Gross S. Measles and leukaemia. *Lancet.* 1971; 1 (7695) : 397–398.
4. Pasquinucci G. Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet.* 1971; 1 (7690) : 136.
5. Zygiert Z. Hodgkin's disease: remissions after measles. *Lancet.* 1971; 1 (7699) : 593.

6. *Navaratnarajah C.K., Leonard V.H.J., Cattaneo R.* Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment and cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009; 329 : 59–76.
7. *Yanagi Y., Takeda M., Ohno S., Hashiguchi T.* Measles virus receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009; 329 : 13–30.
8. *Tahara M., Takeda M., Shirogane Y., Hashiguchi T., Ohno S., Yanagi Y.* Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells by using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. *J. Virol.* 2008; 82 : 4630–4637.
9. *Oglesby T.J., Allen C.J., Liszewski M.K., White D.J., Atkinson J.P.* Membrane cofactor protein (CD46) protects cells from complement-mediated attack by an intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 1992; 175 : 1547–1551.
10. *Anderson B.D., Nakamura T., Russell S.J., Peng K.W.* High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2004; 64 : 4919–4926.
11. *Lech P.J., Russell S.J.* Use of attenuated paramyxoviruses for cancer therapy. *Expert Rev. Vaccines.* 2010; 9 (11) : 1275–1302.
12. *Muhlebach M.D., Mateo M., Sinn P.L., Prüfer S., Uhlig K.M., et al.* Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 2011; 480 (7378) : 530–533.
13. *Noyce R.S., Bondre D.G., Ha M.N., Lin L.T., Sisson G., et al.* Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* 2011; 7 (8) : e1002240.
14. *Noyce R.S., Richardson C.D.* Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. *Trends Microbiol.* 2012; 20 (9) : 429–439.
15. *Touchefeu Y., Schick U., Harrington K.J.* Measles virus: a future therapeutic agent in oncology? *Med. Sci. (Paris).* 2012; 28 (4) : 388–394. [In French].
16. *Horvath C.M., Paterson R.G., Shaughnessy M.A., Wood R., Lamb R.A.* Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *J. Virol.* 1992; 66 : 4564–4569.
17. *Galanis E., Bateman A., Johnson K., Diaz R.M., James C.D., et al.* Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. *Hum. Gene Ther.* 2001; 12 (7) : 811–821.
18. *Griffin D.E., Pan C.H.* Measles: old vaccines, new vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009; 330 : 191–212.
19. *Takeuchi O., Akira S.* Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* 2009; 227 : 75–86.
20. *Fontana J.M., Bankamp B., Rota P.A.* Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunol. Rev.* 2008; 225 : 46–67.
21. *Nakatsu Y., Takeda M., Ohno S., Shirogane Y., Iwasaki M., Yanagi Y.* Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J. Virol.* 2008; 82 : 8296–8306.
22. *Prestwich R.J., Harrington K.J., Pandha H.S., Vile R.G., Melcher A.A., Errington F.* Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy. *Expert Rev. Anti Cancer Ther.* 2008; 8 : 1581–1588.

23. *Gauvrit A., Brandler S., Sapede-Peroz C., Boisgerault N., Tangy F., Gregoire M.* Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* 2008; 68 : 4882–4892.
24. *Fonteneau J.F., Guillerme J.B., Tangy F., Grégoire M.* Attenuated measles virus used as an oncolytic virus activates myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology.* 2013; 2 (5) : e24212.
25. *Donnelly O.G., Errington-Mais F., Steele L., Hadac E., Jennings V., et al.* Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther.* 2013; 20 : 7–15.
26. *Guillerme J.B., Boisgerault N., Roulois D., Ménager J., Combredet C., et al.* Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19 : 1147–1158.
27. *Radecke F., Spielhofer P., Schneider H., Kaelin K., Huber M., et al.* Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.* 1995; 14 (23) : 5773–5784.
28. *Iankov I.D., Hillestad M.L., Dietz A.B., Russell S.J., Galanis E.* Converting tumor-specific markers into reporters of oncolytic virus infection. *Mol. Ther.* 2009; 17 (8) : 1395–1403.
29. *Fisher K.* Striking out at disseminated metastases: the systemic delivery of oncolytic viruses. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2006; 8 : 301–313.
30. *Russell S.J., Peng K.W.* The utility of cells as vehicles for oncolytic virus therapies. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008; 10 : 380–386.
31. *Haralambieva I., Iankov I., Hasegawa K., Harvey M., Russell S.J., Peng K.W.* Engineering oncolytic measles virus to circumvent the intracellular innate immune response. *Mol. Ther.* 2007; 15 (3) : 588–597.
32. *Msaouel P., Iankov I.D., Dispenzieri A., Galanis E.* Attenuated oncolytic measles virus strains as cancer therapeutics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13 (9) : 1732–1741.
33. *Vongpunsawad S., Oezgun N., Braun W., Cattaneo R.* Selectively receptor-blind measles viruses: identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *J. Virol.* 2004; 78 (1) : 302–313.
34. *Leonard V.H., Sinn P.L., Hodge G., Miest T., Devaux P., et al.* Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J. Clin. Invest.* 2008; 118 (7) : 2448–2458.
35. *Springfeld C., von Messling V., Frenzke M., Ungerechts G., Buchholz C.J., Cattaneo R.* Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases. *Cancer Res.* 2006; 66 (15) : 7694–7700.
36. *Leber M.F., Bossow S., Leonard V.H., Zaoui K., Grossardt C., et al.* MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism. *Mol. Ther.* 2011; 19 (6) : 1097–1106.