



Разработка препарата для онколитической иммунотерапии на основе вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) против рака молочной железы

Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Максютов А.З., Колосова И.В., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. В настоящее время активно развиваются новые направления в лечении рака, одним из которых является онколитическая иммунотерапия. Этот подход заключается в использовании вирусов в качестве онкоселективных цитолитических агентов, способных стимулировать опухолеспецифический и неспецифический иммунный ответ организма.

Цель работы – получение рекомбинантного вируса осповакцины, содержащего в геноме гены, кодирующие иммуностимулирующие молекулы, и изучение его онколитических и иммуностимулирующих свойств в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы. Рекомбинантный вирус осповакцины получен с использованием метода временной доминантной селекции. Цитолитическую эффективность вируса оценивали колориметрическим методом (МТТ-тест). Иммуногенность полиэпитопной конструкции в составе вирусного генома оценивали *ex vivo* стимуляцией клеток цельной крови иммунизированных мышей линии BALB/c в ответ на антигены с последующим определением уровня цитокинов методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Получен рекомбинантный вирус осповакцины L-IVP_опсоВ, содержащий ген, кодирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор в области гена J2R, который кодирует тимидинкиназу. Кроме того, данный вирус содержит искусственно синтезированную генетическую конструкцию, кодирующую иммуноген, состоящий из эпитопов антигенов, гиперэкспрессируемых в злокачественных клетках при раке молочной железы, встроенную в область гена С11L (кодирует вирусный фактор роста). Показано, что проведённые модификации вирусного генома не оказывают влияния на ростовые характеристики вируса при культивировании на культурах клеток CV-1 и 4647, а также определена цитолитическая эффективность вируса в отношении раковых культур клеток различного генеза. В эксперименте *in vivo* выявлено, что полиэпитопная конструкция в составе генома L-IVP_опсоВ способна инициировать изменение профиля цитокинов.

Обсуждение. Полученные данные охарактеризовали L-IVP_опсоВ как перспективный цитолитический и иммуностимулирующий агент и показали необходимость дальнейшего изучения его свойств в качестве средства онколитической иммунотерапии.

Заключение. Проведены основные эксперименты по оценке биологических свойств полученного L-IVP_опсоВ, которые необходимы для характеристики онколитического вируса.

Ключевые слова: онколитический вирус; вирус осповакцины; опухоль-ассоциированный антиген; цитотоксический Т-лимфоцит.

Для цитирования: Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Максютов А.З., Колосова И.В., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В. Разработка препарата для онколитической иммунотерапии на основе вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) против рака молочной железы. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 49-56.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-49-56>

Для корреспонденции: Бауэр Татьяна Валерьевна, аспирант, младший научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область. E-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10101).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов в написании статьи: Бауэр Т.В. – 20%; Трегубчак Т.В. – 20%; Максютов А.З. – 10%; Колосова И.В. – 10%; Максютов Р.А. – 20%; Гаврилова Е.В. – 20%.

Поступила 27.06.19

Принята в печать 28.11.19

Development of the drug oncolytic immunotherapy based on vaccinia viruses (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) against breast cancer

Bauer T.V., Tregubchak T.V., Maksyutov A.Z., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia

Introduction. Currently, new directions in cancer therapy are actively developing, one of which is oncolytic immunotherapy. This approach would be to use of viruses as cancer specific cytolytic agents capable of stimulating both the tumor-specific and non-specific immune response.

The objective paper was obtain a recombinant vaccinia virus containing genes encoding immunostimulating molecules and study oncolytic and immunostimulating properties of recombinant virus.

Material and methods. MTT test, ELISA, methods of transient dominant selection.

Results. The recombinant vaccinia virus (L-IVP_опсоВ) were obtained with deletion of the gene encoding thymidine kinase and had an integrated gene encoding GM-CSF. Also the virus have deletion of the gene encoding

viral growth factor and integrated genes encoding synthetic tumor-specific polyepitopic immunogens. It was shown that the modifications made to the viral genome did not affect the growth characteristics of the virus when cultured on CV-1 and 4647 cell cultures, and the cytopathogenic efficacy of the virus was determined in relation to cancer cultures of cells of various genesis. In *in vivo* experiment, it was revealed that the polyepitopic construct in the genome L-IVP_oncoB is able to initiate a change in the profile of cytokines.

Discussion. The obtained data characterized L-IVP_oncoB as a promising cytopathogenic and immunostimulating agent and showed the need for further study of its properties as means of oncolytic immunotherapy.

Conclusion. The basic experiments on the evaluation of the biological properties of the obtained L-IVP_oncoB, which are necessary for the characterization of the oncolytic virus, have been carried out.

Keywords: oncolytic virus; vaccinia virus; tumor-associated antigen; cytotoxic T-lymphocyte; breast cancer.

For citation: Bauer T.V., Tregubchak T.V., Maksyutov A.Z., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Development of the drug oncolytic immunotherapy based on vaccinia viruses (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) against breast cancer. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian Journal)*. 2020; 65(1): 49-56. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-49-56>

For correspondence: Tatyana V. Bauer, PhD student, Junior Research Scientist of the department of genomic research of the State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru

Information about authors:

Bauer T.V., <https://orcid.org/0000-0002-4954-9905>

Tregubchak T.V., <https://orcid.org/0000-0001-9608-2044>

Maksyutov A.Z., <https://orcid.org/0000-0002-4027-8299>

Maksyutov R.A., <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>

Kolosova I.V., <https://orcid.org/0000-0003-2317-4153>

Gavrilova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7118-5749>

Acknowledgments. The study was carried out for the grant of the Russian Science Foundation (project No. 16-15-10101).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Contribution: Bauer T.V. – 20%; Tregubchak T.V. – 20%; Maksyutov A.Z. – 10%; Kolosova I.V. – 10%; Maksyutov R.A. – 20%; Gavrilova E.V. – 20%.

Received 27 June 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Рак молочной железы является одним из наиболее распространённых видов злокачественных новообразований у женщин во всём мире. На него приходится около 14% летальных исходов, обусловленных онкологическими заболеваниями [1]. Однако за последние несколько десятилетий наблюдается значительное снижение показателей смертности больных раком молочной железы благодаря совершенствованию диагностических средств и разработке новых методов терапии [2]. Накопленные данные о молекулярных механизмах канцерогенеза позволяют применять различные подходы к терапии, учитывающие подтип рака молочной железы, профиль экспрессии генов и мутационный статус неопластических клеток опухолей молочной железы. Данные подходы включают гормональную терапию для больных люминальным раком молочной железы подтипов А и В [3], применение ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER2) для лечения больных раком молочной железы, для которого характерна гиперэкспрессия HER2 [4], использование поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) для таргетного воздействия на клетки опухоли, несущие мутации по BRCA1 (breast cancer gene 1) [5]. Однако применение указанных препаратов часто сопровождается развитием лекарственной устойчивости у пациентов. Её механизм в первую очередь обусловлен наличием популяции неопластических клеток, представляющих собой раковые стволовые клетки, способные адаптироваться к изменяющимся условиям микроокружения опухоли и сохранять способность к пролиферации [6]. Раковые

стволовые клетки при раке молочной железы подвергаются дифференцировке в эндотелиальные клетки, обеспечивая активную васкуляризацию опухолевой ткани [7], что способствует процессам метастазирования и повышает риск рецидива заболевания [8], поэтому возникает острая потребность в разработке новых препаратов и методов лечения.

При поиске новых терапевтических агентов онколитические вирусы рассматриваются в качестве перспективных основ для создания противоопухолевых средств, о чём свидетельствуют появление и применение в клинической практике препаратов на основе вирусов различных семейств. Так, в 2005 г. в Китае был одобрен первый онколитический препарат на основе аденовируса 5-го типа «Oncorine» для лечения злокачественных опухолей головы и шеи [9]. С 2007 г. в Латвии для терапии меланомы разрешён к использованию в клинической практике препарат «Rigivir» на основе энтеровируса группы ЕСНО 7-го типа, прошедшего адаптацию путём пассирования на перевиваемых культурах клеток, полученных из биопсийного материала опухолей при диагностированной меланоме [10]. Кроме того, для терапии меланомы применяется препарат на основе вируса простого герпеса 1-го типа *Talitogene laherparepvec*, одобренный в США с 2015 г. [11].

Однако, как и у большинства лекарственных средств, у препаратов на основе вирусов существуют недостатки, ограничивающие их применение. Основная проблема заключается в природных иммуномодулирующих свойствах вирусов, что обуславливает необходимость создания панели препаратов виро-терапии для успешного длительного лечения злока-

чественных новообразований и возможности при необходимости проводить замену препарата, чтобы избежать снижения эффективности лечения. Кроме того, иммуностимулирующие свойства вирусов обеспечивают их противоопухолевый эффект, наряду с прямым цитодеструктивным действием на опухолевые клетки. Таким образом, препараты для терапии рака, полученные на основе вирусов, целесообразно относить к средствам онколитической иммунотерапии, что обусловлено их цитолитическими, онкоселективными и иммуностимулирующими свойствами.

В данной работе реализуется комплексный подход, включающий использование онколитического вируса и иммунотерапии рака, направленный на снятие иммунологической толерантности и индукцию противоопухолевого иммунитета, результативность которого зависит от подходящего антигена-мишени и эффективного представления данного антигена иммунной системе организма. Сочетание иммуно- и виротерапии может стать перспективным направлением в разработке препаратов для лечения онкологических заболеваний.

Для реализации данного подхода на основе штамма Л-ИВП вируса осповакцины (ВОВ), принадлежащего к роду *Orthopoxvirus*, семейству *Poxviridae*, был создан рекомбинантный онколитический вирус L-IVP_оncoB, содержащий в геноме искусственный ген, кодирующий полиэпитопный иммуноген, состоящий из эпитопов антигенов, гиперэкспрессирующихся в опухолевых клетках при раке молочной железы. В результате использования искусственной полиэпитопной конструкции можно добиться высокого уровня иммунного ответа на доминантные и субдоминантные эпитопы опухолевых антигенов. Для лучшего представления опухолеспецифических эпитопов иммунной системе в состав ВОВ встроен ген, кодирующий иммуностимулирующий белок гранулоцитарно-макрофагальный колоннестимулирующий фактор (GM-CSF). Целевые встройки осуществлены в участки генов J2R и C11L, кодирующих тимидинкиназу (ТК) и вирусный ростовой фактор (VGF) соответственно. Данные модификации генома обеспечивают высокую эффективность размножения ВОВ в опухолевых клетках и приводят к практически полному подавлению репликации вируса в неделящихся здоровых клетках. В работе оценены цитолитическая эффективность L-IVP_оncoB в отношении раковых культур клеток различного генеза, в том числе рака молочной железы, и эффективность продукции цитокинов клетками цельной крови мышей, иммунизированных L-IVP_оncoB, в ответ на стимуляцию лизатом раковой культуры клеток MDA-MB-231.

Материал и методы

Материал. В работе использовали ВОВ – штамм Л-ИВП, полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; эукариотические культуры клеток 4647 и CV-1, полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотреб-

надзора; культуры клеток SW 620, A 431, OVCAR-3, C33A, MDA-MB-231, DU-145, SK-Mel-5, SK-Mel-28, полученные из коллекции Института цитологии и генетики СО РАН; мышей линии BALB/c из вивария ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Получение рекомбинантного вируса L-IVP_оncoB. Предсказание эпитопов для конструирования полиэпитопного иммуногена проводили на сервере IEDB с использованием метода ANN. Рекомбинантный вирус получали при помощи метода временной доминантной селекции [12].

МТТ-тест. Сравнительное изучение цитолитических свойств вариантов ВОВ проводили, используя МТТ-тест. 50% монослой клеток заражали изучаемыми вирусами с множественностью инфекции 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 и 10,0 БОЕ/кл. Через 72 ч добавляли 5 мг/мл МТТ (Sigma, США) и инкубировали 4 ч при 37 °С, после чего добавляли 200 мкл диметилсульфоксида и продолжали инкубацию при тех же условиях в течение 1 ч. Затем измеряли оптическую плотность спектрофотометрически при длине волны 540 нм на приборе Multiskan FC (Thermo Scientific, США) и определяли полулетальную дозу (ЦПД₅₀) для исследуемых вирусов.

Оценка ростовых свойств L-IVP_оncoB. Для изучения динамики роста L-IVP_оncoB 90% монослой клеток линий 4647 и CV-1, полученный на 6-луночных планшетах, инфицировали с множественностью заражения 1 БОЕ/кл. в трёх повторах и инкубировали 24, 48, 72 ч при 37 °С в условиях 5% CO₂. Далее трехкратно замораживали и оттаивали полученные вирусосодержащие препараты и определяли концентрацию вируса в них при помощи титрования методом бляшек на монослой клеток линии CV-1. Помимо клеток CV-1 использовали линию 4647, аттестованную для производства иммунобиологических препаратов.

Оценка активации цитотоксических Т-лимфоцитов. Эффективность индукции CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), специфичной для опухолевых антигенов в составе исследуемого рекомбинантного ВОВ, оценивали по изменению уровня продукции цитокинов в ответ на стимуляцию цельной крови животных антигенами. Для этого самок мышей линии BALB/c внутрибрюшинно инфицировали вирусом в дозе 10⁷ БОЕ/мышь в 100 мкл физиологического раствора (6 животных). Мышам контрольной группы (6 животных) внутрибрюшинно вводили 100 мкл физиологического раствора. По истечении 21 сут после инъекции исследуемого препарата брали кровь у животных из ретроорбитального синуса. После этого кровь разводили 1 : 4 раствором, содержащим питательную среду DMEM/F12, стрептомицин 100 мкг/мл, ампициллин 100 Ед/мл, гепарин 2,5 Ед/мл.

От каждой пробы отбирали аликвоты для дальнейшей стимуляции:

- 1) митогеном – смесью фитогемагглютинаина (0,05 мг/мл) и липополисахарида (0,1 мг/мл);
- 2) специфичными антигенами – лизатом перевиваемой культуры клеток MDA-MB-231.

Перечень эпитопов, входящих в состав полиэпитопной конструкции

The list of epitopes that make up the polyepitope construct

Опухоль-ассоциированные антигены Tumor-associated antigens	Аминокислотная последовательность специфического эпитопа Amino acid sequence of a specific epitope
HER2	YLEEITGYL, KIFGSLAFL, SIISAVVGI, QLFEDNYAL, QLMPYGCLL, RLLQETELV, YISAWPDSL, YMIMVKCWMI, SIISAVVGILLVVVLGVVFGI
Mammoglobin-A NY-BR-1	KLLMVLMLAAL, FLNQTDETL, TINPQVSKT, MQLIYDSSLCDL, KLLMVLMLAAL LLSHGAVIEV, SLSKILDTV, YLLHENCML, SLDQKLFQL, SLFESSAKI, AVYSEILSV, KVMEINREV
hMena	GLMEEMSALL, FASAMMHAEVL, GLAAAIAGA, LMEEMSALL
hTERT	RLFFYRKSIV, YLFFYRKSIV, YLQVNSLQTV, RLVDDFLLV, LLARCALFV, LLDTRTLEV, ILAKFLHWL
MUC-1	ALGSTAPPVHNV, ALWGQDVTSV, FLLLLLVTLTV, FLSFHISNL, FLLLLLVTLTVV, SLSYTNPAV, ALLVLCVLLVAL

Кроме того, отбирали аликвоту пробы, которая не подвергалась стимуляции (контрольные образцы).

Далее инкубировали пробы при 37 °С в течение 20 ч и осаждали клеточные компоненты крови при 0,2g в течение 10 мин. Затем отбирали супернатант и хранили его при -20 °С.

Концентрацию цитокинов в *ex vivo* обработанных пробах цельной крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Quantikine Mouse IL-6 ELISA» и «Quantikine Mouse IL-10 ELISA», согласно протоколу фирмы-производителя.

Результаты

Рекомбинантный BOB L-IVP_{oncoB}. На первом этапе работы выбирали антигены для включения в полиэпитопную конструкцию, предназначенную для дальнейшей инсерции в состав рекомбинантного BOB. Для выбора антигенов анализировали публикации в реферируемых журналах [13] и в базах данных клинических испытаний ClinicalTrials.gov.

Помимо антигенов, характерных для определённых видов рака, выделяют «метастатические» антигены. Поскольку против крупной первичной опухоли иммунный ответ неэффективен, её всегда иссекают хирургическим путём, существует необходимость бороться с метастазами. К таким «метастатическим» антигенам относятся MUC-1, HER2 [14].

Важным критерием выбора антигенов для включения эпитопов в состав вакцинных конструкций является выполнение следующих условий:

- вакцина, созданная на основе такого антигена, находится на I–III стадиях клинических испытаний;
- проведены испытания вакцины на основе данного антигена на животных;
- для недавно открытых антигенов необходимо подтверждение их высокой иммуногенности в литературе [15].

Для конструирования полиэпитопного иммуногена выбрали наиболее часто встречающиеся при раке молочной железы антигенные детерминанты (см. таблицу).

Для улучшения протеосомальной деградации полиэпитопных конструкций и дополнительной стиму-

ляции цитотоксического ответа на все включённые в состав конструкции антигенные детерминанты на N-конец полиэпитопа добавлен убиквитин с заменённой C-концевой аминокислотой Gly76-Val [16, 17]. Для усиления ответа ЦТЛ в состав полиэпитопных конструкций добавлены универсальные Т-хелперные эпитопы p2 из Tetanus toxin, PADRE. Универсальные Т-хелперные эпитопы располагаются на C-конце конструкций.

В качестве спейсера на C-конце ЦТЛ-эпитопов использовали дипептид AD [18]. Универсальные Т-хелперные эпитопы p2 из Tetanus toxin и PADRE отделены трипептидом ARY. Использование спейсерных последовательностей между всеми эпитопами приводит к более точному и надёжному представлению каждого целевого эпитопа, что в свою очередь повышает общую эффективность вакцинных полиэпитопных конструкций.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полиэпитопный иммуноген, была синтезирована ЗАО «Евроген» (Россия).

Для получения целевого рекомбинантного BOB использовали ранее сконструированный BOB_{TK(-)}_{GM-CSF(+)}_{A34R}_(K151E)_{D110N} (неопубликованные данные). Данный вирус получен на основе BOB L-IVP 5 cl и содержит две аминокислотные замены в составе мембранного гликопротеина A34R. Введение таких замен в белок A34 в составе BOB усиливает формирование внеклеточных оболочечных вирионов, обладающих низкой иммуногенностью и обеспечивающих эффективный транспорт вируса в тканях инфицируемого организма, что может повысить онколитический потенциал BOB относительно первичных опухолей и метастазов, а также частично решает вопрос относительно снижения эффективности терапии онколитическим вирусом вследствие иммунной реакции организма при длительном или повторном применении препарата.

На основе BOB_{TK(-)}_{GM-CSF(+)}_{A34R}_(K151E)_{D110N} в ходе серии пассажей под селективным давлением был получен рекомбинантный BOB_{TK(-)}_{GM-CSF(+)}_{VGF(-)}_{BC(+)}_{A34R}_(K151E)_{D110N} (L-IVP_{oncoB}). Данный штамм депонирован в коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзо-

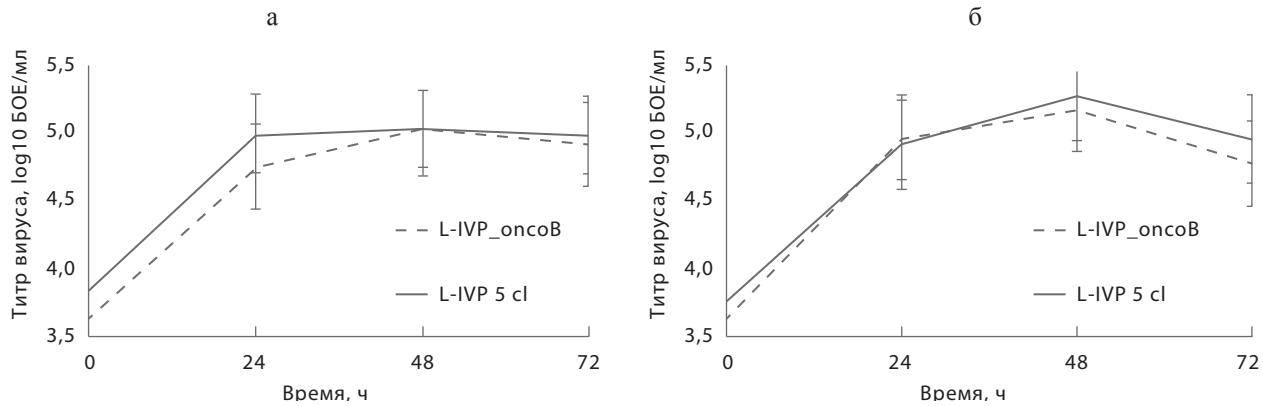


Рис. 1. Анализ динамики размножения L-IVP_oncoB по сравнению с исходным вариантом вируса (L-IVP 5 cl) на эукариотических культурах клеток 4647 (а) и CV-1 (б).

Fig. 1. Analysis of the propagation dynamics of L-IVP_oncoB comparing the original preserved viruses (L-IVP 5 cl) on eukaryotic cell cultures CV-1, 4647. On the abscissa axis – time of incubation of the monolayer of cells after infection with viruses; on the ordinate axis – virus titer, lg PFU/ml.

ра под номером V-796. Полная последовательность представлена в GenBank под номером MN341445.1.

Ростовые характеристики L-IVP_oncoB. L-IVP_oncoB получен путём модификаций генома исходного варианта вируса (L-IVP 5 cl) в районах, ответственных за ростовые свойства вируса, его история составляет 18 пассажей под селективным давлением и 10 пассажей без селективного давления. В связи с этим возникает потребность в изучении репликативных свойств полученного L-IVP_oncoB.

В проведённых экспериментах по изучению ростовых характеристик исследуемых ВОВ не выявлено достоверно значимых различий между ростовыми свойствами L-IVP_oncoB и исходным вариантом вируса (рис. 1), что свидетельствует об отсутствии

влияния модификации генома L-IVP_oncoB на вирусную репродукцию в эукариотических культурах клеток 4647 и CV-1.

Оценка цитолитической активности L-IVP_oncoB в раковых культурах клеток различного генеза. При помощи МТТ-теста изучена чувствительность раковых культур клеток различного генеза: SW 620 (колоректальный рак), А 431 (рак кожи), OVCAR-3 (рак яичников), С33А, MDA-MB-231 (рак молочной железы), DU-145 (рак простаты), SK-Mel-5 (меланома), SK-Mel-28 (меланома) – к L-IVP_oncoB (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о чувствительности линий клеток, используемых в эксперименте, к исследуемому вариантам ВОВ, что подтверждает широкий тропизм L-IVP_oncoB в отношении опухолевых клеток человека различного генеза. Данное свойство полученного вируса может оказать положительный эффект не только при терапии первичного опухолевого узла, но и при метастазирующих формах рака молочной железы.

Оценка активации ЦТЛ в ответ на опухоль-ассоциированные антигены (ОАА). На примере IL-6 и IL-10 показана активация продукции цитокинов клетками цельной крови мышей в ответ на стимуляцию лизатом клеток MDA-MB-231, в связи с чем можно сделать вывод об активации ЦТЛ (рис. 3).

Основным количественным параметром напряжённости специфического клеточного иммунитета является цитокиновый индекс (CI) – отношение антиген-стимулированной продукции к митоген-стимулированной. Другим параметром для количественной оценки реакции иммунной системы на целевой антиген является индекс влияния (II) – отношение антиген-стимулированной продукции цитокинов к спонтанной или индекс влияния антигена (МИ) – отношение митоген-стимулированной продукции цитокинов к спонтанной. Достоверной считается стимуляция, при которой II > 2, при этом важно, чтобы МИ > 2. Данные представлены как отношение средних арифметических разниц значений оптической плотности при 450 и 540 нм.

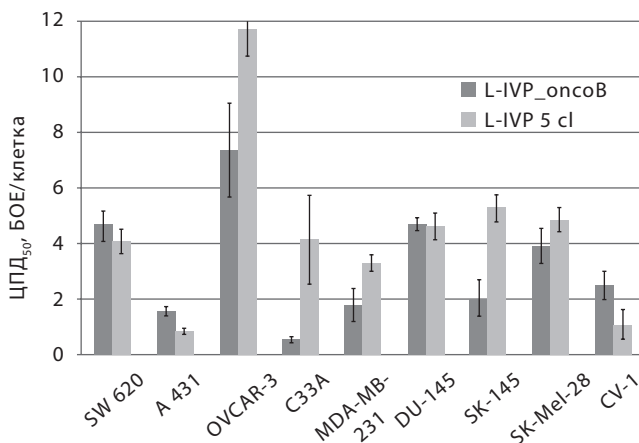


Рис. 2. Определение полулетальной дозы вариантов вируса осповакцины для раковых культур клеток различного генеза.

ЦПД₅₀ – доза вируса, при которой жизнеспособными остаются 50% клеток в лунке 96-луночного планшета через 72 ч после инфицирования.

Fig. 2. Determination of a semi-lethal dose of VV variants for cancer cells of various genesis.

TCID₅₀ is the dose of virus lysing 50% of cells in a well of a 96-well plate 72 h after infection. On the abscissa axis – cell cultures; on the ordinate axis – values of TCID₅₀, PFU/cell.

Обсуждение

В ходе жизненного цикла клетки делятся, дифференцируются, мигрируют, подвергаются апоптозу. Соблюдение баланса между этими четырьмя основными клеточными процессами в результате регуляции множества внутриклеточных сигнальных путей обуславливает рост и морфогенез организма, а на более поздних этапах онтогенеза обеспечивает состояние гомеостаза. Когда в клетке происходит ряд мутаций, высвобождающих её от воздействия факторов, регулирующих клеточное деление, запускается активация протоонкогенов, а также снижается экспрессия генов – супрессоров опухолевого роста, что приводит к неуправляемой клеточной пролиферации [19]. В ряде случаев на данном этапе развития онкопатологии иммунная система организма способна бороться с неопластическими клетками и противодействовать развитию новообразований, приводя к спонтанной ремиссии опухоли. Однако вероятность спонтанной ремиссии довольно низкая [20], так как клетки опухоли обладают низкой иммуногенностью и активируют механизмы, позволяющие им избегать иммунного ответа, из чего можно заключить, что течение многих онкологических заболеваний связано с развитием опухоль-ассоциированной иммуносупрессии.

Иммунорезистентность опухоли связывают с различными механизмами, главными из которых являются:

- сдвиг цитокинового баланса в сторону иммуносупрессорных медиаторов;
- значительное преобладание CD4⁺CD25⁺ Т-регуляторных лимфоцитов, эффективно подавляющих иммунный ответ на развивающуюся опухоль;
- низкая иммуногенность ОАА.

Низкая иммуногенность ОАА объясняется тем, что они представляют собой нормальные белки организма, хотя и с возможными незначительными изменениями, сверхэкспрессируемые или экспрессируемые в нехарактерных для них тканях или временных промежутках [21].

Для комплексного преодоления механизмов, обеспечивающих иммунорезистентность опухоли и формирование полноценного противоопухолевого иммунитета, нами был получен рекомбинантный ВОВ L-IVP_оncоВ и изучены его свойства. Целесообразность использования онколитических вирусов в комбинированной терапии рака обусловлена их способностью, помимо прямого цитодеструктивного действия, влиять как на чувствительность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям и эндогенным противоопухолевым механизмам, так и на организм в целом, восстанавливая его естественные антиканцерогенные молекулярные механизмы.

ВОВ способен активировать иммунную систему организма как естественный природный антиген. С целью усилить способность ВОВ стимулировать специфический клеточный противоопухолевый иммунитет нами была создана полиэпитопная конструкция из эпитопов антигенов, гиперэкспрессирующихся опухолевыми клетками при раке молочной железы.

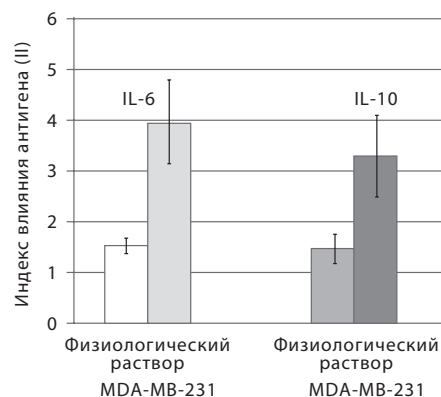


Рис. 3. Результат измерения уровня продукции цитокинов клетками цельной крови мышей, которым предварительно вводили 10^7 БОЕ L-IVP_оncоВ, в ответ на стимуляцию лизатом клеток MDA-MB-231. Различия между группами достоверны при $p < 0,05$.

Fig. 3. The result of measuring the level of cytokine production by whole blood cells of mice in response to the stimulation by cell lysate MDA-MB-231. Mice were injected in advance with 10^7 PFU L-IVP_оncоВ. Differences between groups are significant at $p < 0.05$.

On the abscissa axis – physiological solution; on the ordinate axis – the index of influence of the antigen (II).

Предположительно, полиэпитопная конструкция в составе вирусного генома будет с высокой эффективностью проникать в клетки организма и усиливать иммуногенные свойства вируса, необходимые для стимуляции естественного противоопухолевого иммунитета. Рациональность применения таких конструкций заключается в том, что использование полиэпитопных вакцин, основанных на целом ряде основных ОАА, может преодолеть гетерогенность экспрессии антигенов различными раковыми клетками внутри одной опухоли, запуская механизм контроля роста опухоли посредством презентации ОАА молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I) ЦТЛ [22].

Таким образом, нами осуществлены дизайн нуклеотидной последовательности, кодирующей полиэпитопный иммуноген, и его встройка в вирусный геном при помощи метода временной доминантной селекции [12]. Ростовые характеристики полученного рекомбинантного вируса L-IVP_оncоВ были изучены на культурах клеток. При создании онколитического препарата на основе вируса важно, чтобы полученный вариант вируса сохранил репродуктивные свойства на культуре клеток, использование которой планируется при производстве препарата на его основе. Нами было показано, что в ходе длительной пассажной истории ростовые характеристики рекомбинантного вируса не изменились относительно исходного варианта.

Одним из главных природных свойств любого вируса является специфический клеточный тропизм, определяющий, какие ткани организма преимущественно будут инфицированы, и, следовательно, какое заболевание будет вызвано. Так, вирус бешенства

повреждает нейроны, вирус гепатита В – гепатоциты, ВИЧ повреждает Т-хелперы, а вирус гриппа – клетки эпителия дыхательных путей. Многие вирусы характеризуются преимущественным, хотя и не исключительным, тропизмом к опухолевым клеткам. В частности, это может объясняться нарушением в системе апоптоза раковых клеток и опухоль-ассоциированной иммуносупрессией, в то время как в здоровых тканях организма запускается процесс апоптоза и формируется специфический противовирусный иммунитет, являющиеся ключевыми механизмами для ограничения вирусной инфекции.

ВОВ характеризуется широким охватом восприимчивых к нему млекопитающих и способностью поражать обширный спектр тканей организма человека. ВОВ способен инфицировать неопластические клетки, образующиеся в разных органах и тканях, несмотря на протекающие в них молекулярные процессы канцерогенеза, что подтвердили результаты проведенного МТТ-теста, определившего высокую цитолитическую активность L-IVP_onsoB в отношении раковых клеток различного генеза.

Кроме того, ключевая роль в виротерапии злокачественных новообразований отведена формированию противоопухолевого иммунитета. Оценить иммунологические эффекты, опосредованные полиэпитопным иммуногеном, встроенным в вирусный геном, в экспериментах *in vitro* невозможно, а в системах *in vivo* на животных можно получить только косвенные данные о способности стимулировать Т-клеточный ответ, поскольку искусственно синтезированный иммуноген состоит из эпитопов ОАА, экспрессируемых злокачественными клетками опухолей человека. Поэтому способность полиэпитопа в составе L-IVP_onsoB активировать ЦТЛ проверяли опосредованно – путём оценки уровня секреции цитокинов в цельной крови мышей в ответ на стимуляцию митогенами или лизатом клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231. Полученные данные свидетельствуют о влиянии полиэпитопного иммуногена на сдвиг цитокинового профиля, что свидетельствует об активации клеток иммунной системы.

Сдвиг цитокинового баланса в микроокружении опухоли имеет большое значение в терапии злокачественных новообразований. Цитокины могут как активировать, так и угнетать рост опухоли [23] в зависимости от её микроокружения [24]. Так, роль IL-10 в патогенезе и развитии опухоли крайне противоречива. В литературе представлены результаты исследований, в которых подтверждено действие IL-10 как иммуносупрессивного цитокина, способного снизить противоопухолевый иммунный ответ в микроокружении опухоли, а также обнаружена способность опухолевых клеток продуцировать IL-10 для ухода из-под иммунного надзора [25]. Наряду с этим получены данные, подтверждающие, что IL-10 оказывает противоопухолевое действие. В мышинной модели опухоли с повышенной экспрессией mIL-10 показано отторжение опухоли, которое усиливалось с повышением секреции mIL-10 [26].

На эффекты, оказываемые тем или иным цитокином, может влиять пул других цитокинов, формирующих цитокиновый профиль крови или микроокружения опухоли. IL-10 при введении в комбинации с IL-4 и/или IL-2 стимулирует пролиферацию зрелых мышиных CD8⁺ Т-клеток *in vitro* [27]. IL-10 можно использовать в качестве эффективного адъюванта для вакцины на основе поксвируса. При совместном введении вируса и IL-10 показана повышенная активация ЦТЛ у мышей [28].

Таким образом, полученные нами данные, характеризующие рекомбинантный вирус L-IVP_onsoB, свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения свойств вируса и перспективности его использования в качестве средства онколитической иммунотерапии.

Заключение

С развитием молекулярной биологии появились новые направления в терапии рака, одно из которых – онколитическая иммунотерапия, сочетающая действие препаратов на основе вирусов и белков, стимулирующих противоопухолевый иммунитет. Метод онколитической иммунотерапии имеет ряд преимуществ, но нуждается в дальнейших исследованиях.

На данный момент проведены основные эксперименты по оценке биологических свойств полученного L-IVP_onsoB, которые необходимы для характеристики онколитического вируса. Предположительно литические способности вируса, эффективная доставка терапевтических молекул посредством ВОВ и активация ЦТЛ эффективной презентацией полиэпитопов ОАА молекулами МНС I должны показать синергическое действие в борьбе со злокачественными опухолевыми тканями при раке молочной железы. Свойства L-IVP_onsoB в дальнейшем будут изучены *in vivo* на мышинных онкологических моделях – ксеногraftах.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Youlden D.R., Cramb S.M., Dunn N.A., Muller J.M., Pyke C.M., Baade P.D. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 2012; 36(3): 237-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.02.007>
2. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* 2017; 67(1): 7-30. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
3. Rouzier R., Perou C.M., Symmang W.F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(16): 5678-85. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2421>
4. Nixon N.A., Hannouf M.B., Verma S. A review of the value of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in breast cancer. *Euro. J. Cancer.* 2018; 89: 72-81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.037>
5. Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A., Tutt A., Wu P., Mergui-Roelvink M., et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(2): 123-34. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900212>
6. Butti R., Gunasekaran V.P., Kumar T.V.S., Banerjee P., Kundu G.C. Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2019; 107: 38-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018>
7. Delgado-Bellido D., Serrano-Saenz S., Fernández-Cortés M., Oli-

- ver F.J. Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Mol. Cancer*. 2017; 16(1): 65. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0631-x>
8. Economopoulou P., Kaklamani V.G., Siziopikou K. The role of Cancer stem cells in breast Cancer initiation and progression: potential Cancer stem cell-directed therapies. *Oncologist*. 2012; 17(11): 1394-401. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0163>
 9. Garber K. China approves world's first oncolytic. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98(5): 298-300. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djj111>
 10. Jaunalksne I., Brokane L., Petroška D., Rasa A., Alberts P. ECHO-7 oncolytic virus Rigvir® in an adjuvant setting for stage I uveal melanoma; A retrospective case report. *Am. J. Ophthalmol. Case Rep.* 2020; 17: 100615. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ajoc.2020.100615>
 11. Adam J., Robertson J., Donegan E., Voicechovskaja I. NICE guidance for talimogene laherparepvec for unresectable metastatic melanoma. *Lancet Oncol.* 2016; 17(11): 1485-6. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30489-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30489-2)
 12. Falkner F.G., Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 1990; 64(6): 3108-11.
 13. Cheever M.A., Allison J.P., Ferris A.S., Finn O.J., Hastings B.M., Hecht T.T., et al. The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(17): 5323-37. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0737>
 14. Schlom J. Therapeutic Cancer Vaccines: Current Status and Moving Forward. *J. Natl. Cancer Inst.* 2012; 104(8): 599-613. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djs033>
 15. Milani A., Sangiolo D., Aglietta M., Valabrega G. Recent advances in the development of breast cancer vaccines. *Breast Cancer (Dove Med. Press)*. 2014; 6: 159-68. DOI: <https://doi.org/10.2147/BCTT.S38428>
 16. Thomson S.A., Khanna R., Gardner J., Burrows S.R., Coupar B., Moss D.J., et al. Minimal epitopes expressed in a recombinant poly-epitope protein are processed and presented to CD8⁺ cytotoxic T cells: implications for vaccine design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92(13): 5845-9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5845>
 17. Eslami N.S., Shokrgozar M.A., Mousavi A., Azadmanesh K., Nomanian A., Apostolopoulos V., et al. Simultaneous immunisation with a Wilms' tumour 1 epitope and its ubiquitin fusions results in enhanced cell mediated immunity and tumour rejection in C57BL/6 mice. *Mol. Immunol.* 2012; 51(3-4): 325-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.03.033>
 18. Seyed N., Taheri T., Vauchy C., Dosset M., Godet Y., Eslamifard A., et al. Immunogenicity Evaluation of a Rationally Designed Polytope Construct Encoding HLA-A*0201 Restricted Epitopes Derived from Leishmania major Related Proteins in HLA-A2/DR1 Transgenic Mice: Steps toward Polytope Vaccine. *PLoS One*. 2014; 9(10): e108848. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108848>
 19. Nemecek A.A., Wallace S.S., Sweasy J.B. Variant base excision repair proteins: Contributors to genomic instability. *Semin. Cancer Biol.* 2010; 20(5): 320-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.10.010>
 20. Horii R., Akiyama F., Kasumi F., Koike M., Sakamoto G. Spontaneous healing of breast cancer. *Breast Cancer*. 2005; 12(2): 140-4. DOI: <https://doi.org/10.2325/jbcs.12.140>
 21. Allegrezza M.J., Conejo-Garcia J.R. Targeted Therapy and Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer*. 2017; 3(1): 19-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.009>
 22. Peres L.P., da Luz F.A., Pultz B.A., Brígido P.C., de Araújo R.A., Goulart L.R. Peptide vaccines in breast cancer: The immunological basis for clinical response. *Biotechnol. Adv.* 2015; 33(8): 1868-77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.013>
 23. Borsig L., Wolf M.J., Roblek M., Lorentzen A., Heikenwalder M. Inflammatory chemokines and metastasis — tracing the accessory. *Oncogene*. 2013; 33(25): 3217-24. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.272>
 24. Salazar-Onfray F., López M.N., Mendoza-Naranjo A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18(1-2): 171-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.01.015>
 25. Chen Q., Daniel V., Maher D.W., Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int. J. Cancer.* 1994; 56(5): 755-60. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910560524>
 26. Giovarelli M., Musiani P., Modesti A., Dellabona P., Casorati G., Allione A., et al. Local release of IL-10 by transfected mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances antitumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. *J. Immunol.* 1995; 155(6): 3112-23.
 27. Chen W., Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J. Immunol.* 1991; 147(2): 528-34.
 28. Kaufman H.L., Rao J.B., Irvine K.R., Bronte V., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model. *J. Immunother.* 1999; 22(6): 489-96. DOI: <https://doi.org/10.1097/00002371-199911000-00003>