

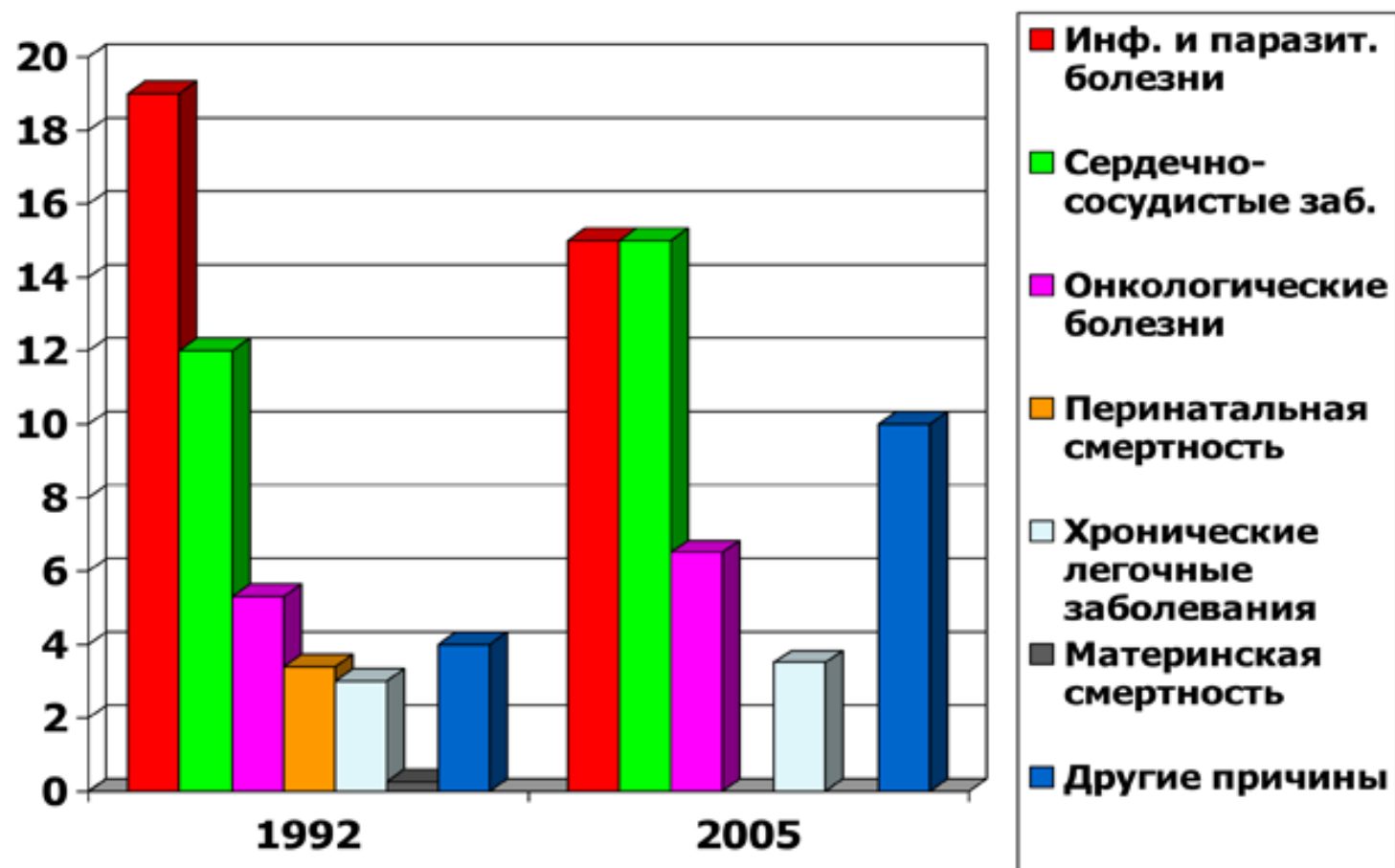
Онколитические вирусы: история и общее состояние дел в мире

Нетёсов С. В., Кочнева Г.В., Локтев В.Б., Святченко В.А., Сергеев А.Н.,
Терновой В.А., Тикунова Н.В., Шишкина Л.Н., Чумаков П.М.

Новосибирский государственный университет,
ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии «Вектор»» Роспотребнадзора

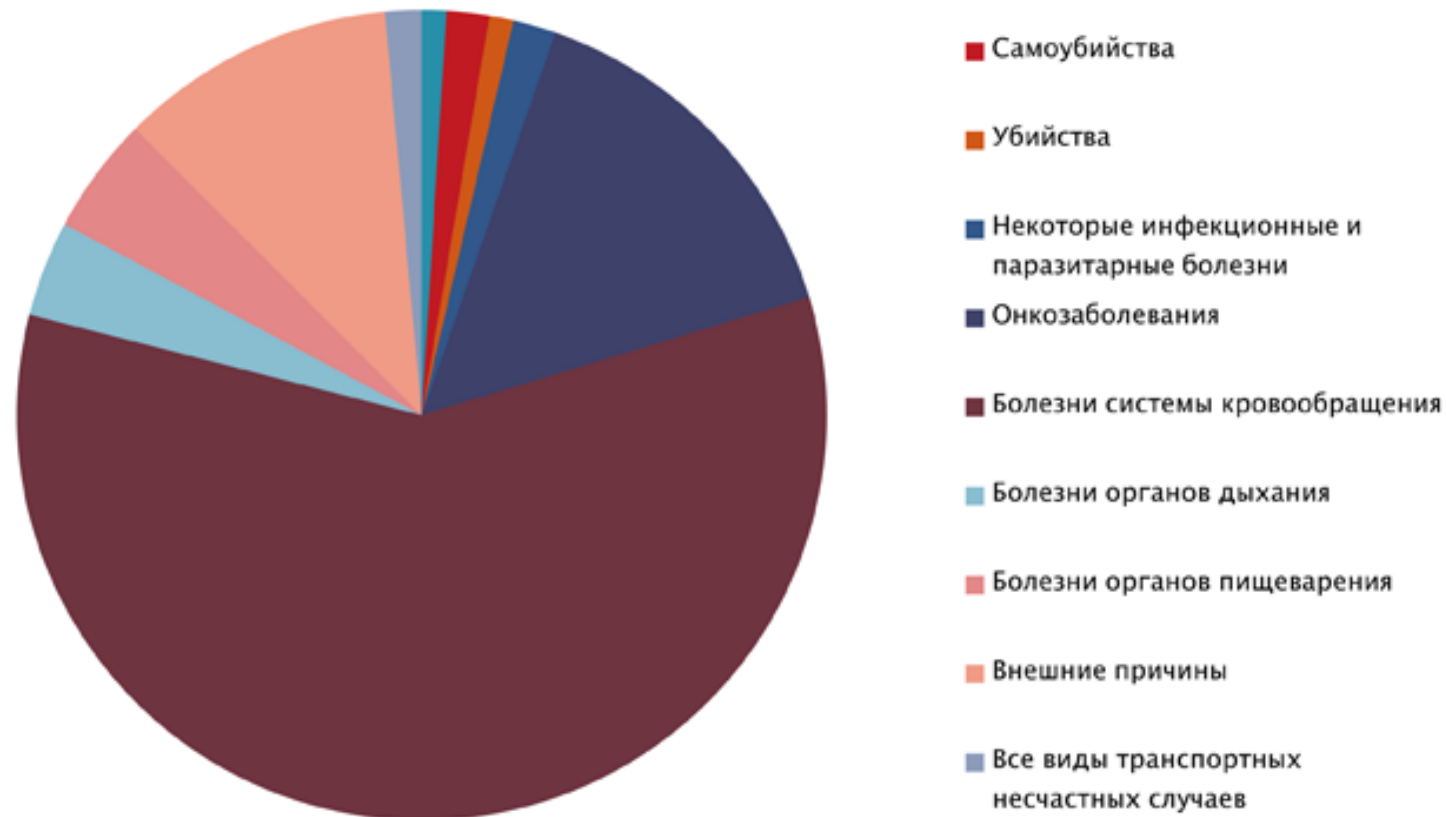
Новосибирск

Причины смертности в мире в 1992 и 2005 годах (млн.) по данным ВОЗ



Данные смертности в России в 2010 году, Госстат., сайт -
<http://www.gks.ru/dbscripts/Cbsd/DBInet.cgi?pl=2415004>

Причины смертности в 2010 году



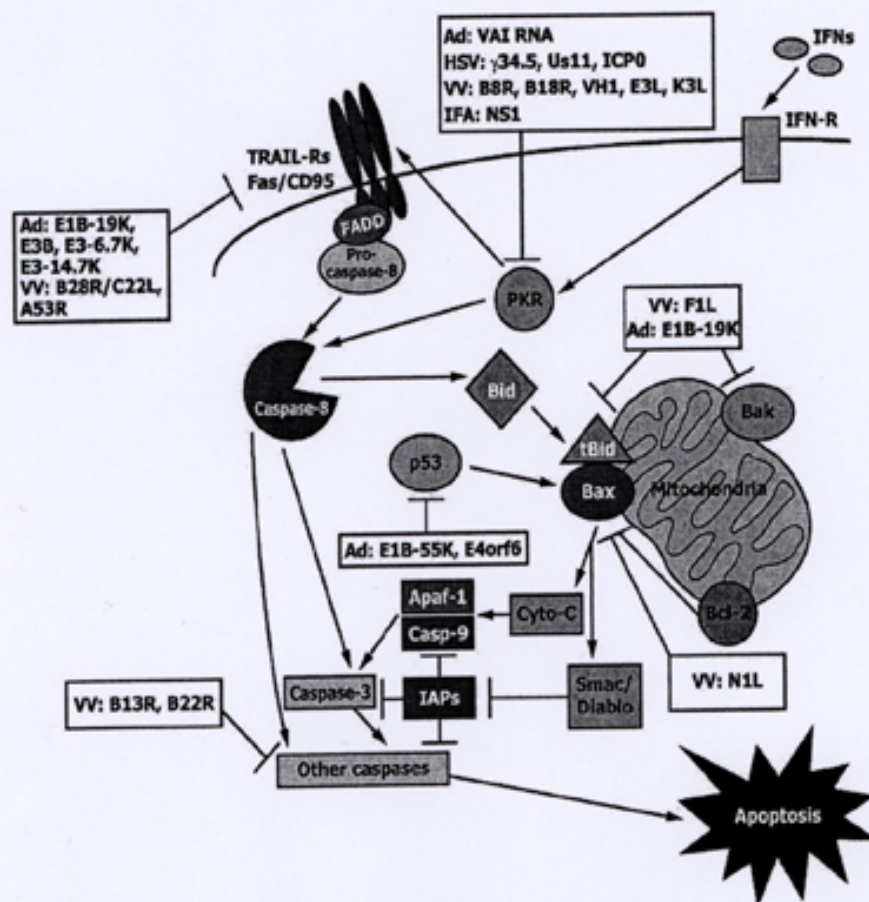
Некоторые данные ВОЗ о раковых заболеваниях

- ▶ В 2005 году в мире от рака умерло 7,6 млн. человек или 13% от всех умерших от болезней
- ▶ Пятая часть раковых заболеваний – от хронических инфекций: гепатиты В и С, вирусы папилломы человека, *Helicobacter pylori*, шистосомы, печеночные двуустки и ВИЧ.

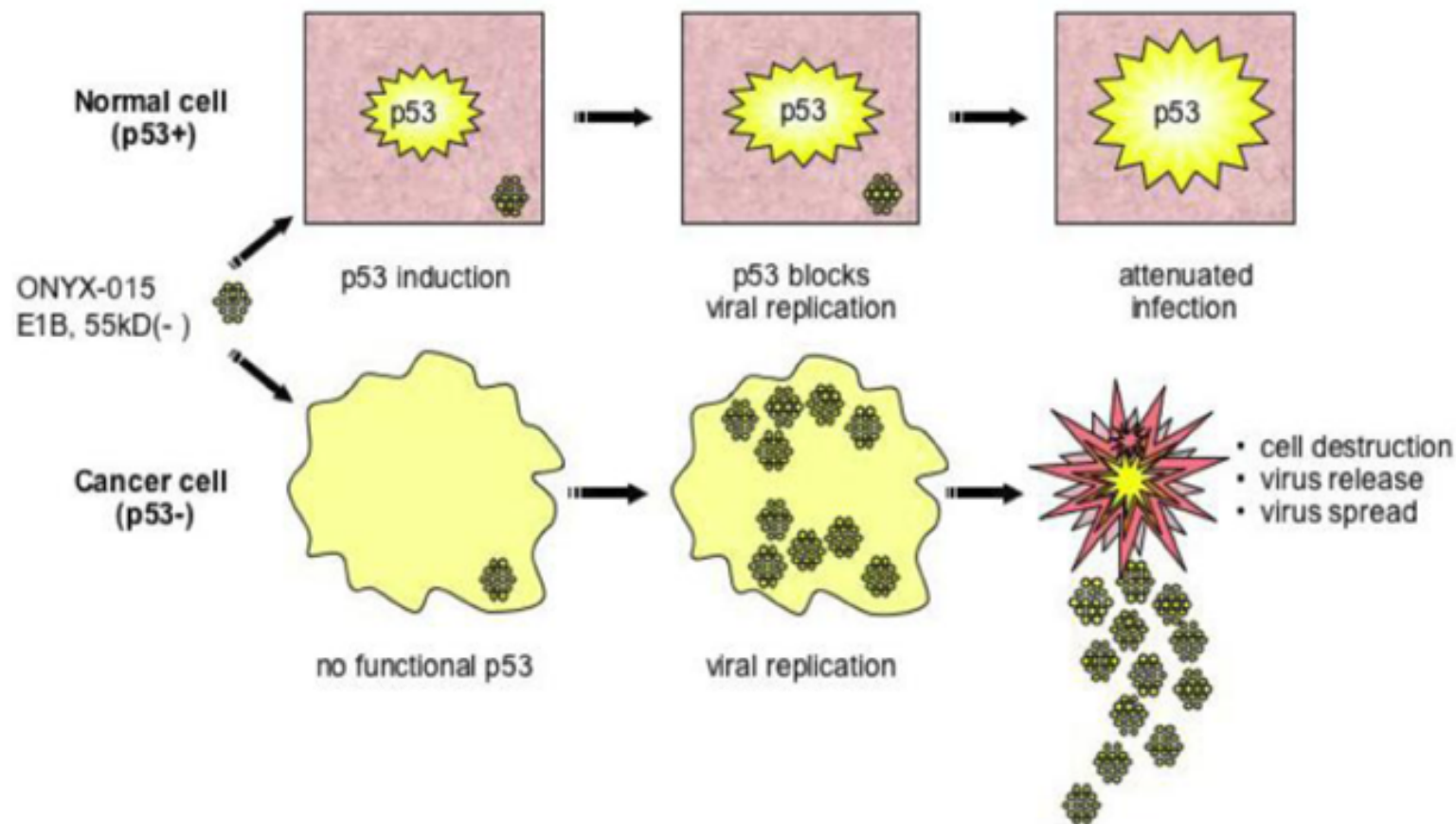
Исторические стратегии применения вирусов и бактерий для онколитических целей

- Противораковая терапия вирус-индуцированной лихорадкой (начало 20-го века)
- Противораковая терапия микроб-индуцированной лихорадкой с температурой: сыпной тиф, сальмонелла, стафилококк
- Противораковая терапия энтеровирусами и парамиксовирусами (ВБН) – 50–70-е годы 20 века
- Противоопухолевая вакцинация (вирус папилломы, вирус гепатита В) – предотвращение рака, но не лечение
- Новая волна интереса к онколитическим вирусам – середина 90-х годов 20 века, на основе выявленных механизмов противораковой избирательности вирусов

Метаболическая схема клеточного апоптоза с указанием действия как клеточных, так и вирусных белков, кодируемых онколитическими вирусами Ad, HSV и VV, а также интерферонового механизма. Показано схематически.



ONYX-015 селективно реплицируется и убивает p53 дефектные опухолевые клетки



Вирусы – онколитики и их мишени

Вирус	Дефекты в вирусных генах	Клеточная мишень	Опухоли
Ad: ONYX-015	E1B-55kD	Дефектный p53-путь	Мозг, горло, печень, яичник и т.д.
Ad: dl922-947 и D24	E1A CR1& CR2-домены	p53-путь	Мозг, грудь, матка, прямая кишка, горло
HSV: G207	ICP34.5	Протеин-фосфатаза 1a и IF-дефект	Мозг, грудь, горло, прямая кишка, яичник, простата
NDV	нет	Активирует Ras- путь	Фибросаркома и нейробластома
Реовирус	Мутация в S1 и дикий	Активирует Ras- путь	Мозг, грудь, прямая кишка, яичники
VSV	Дикий и мутации в М-гене	Дефектный IF-путь	Прямая кишка, легкие, кожа

Онколитические вирусы

Вирус	Вид онкопатологии	Стадия исследований
Рекомбинантный аденовирус	Рак мочевого пузыря	Завершена 1 фаза
Генно-инженерная осповакцина	Метастазирующая меланома	Фазы 1 и 2 клинических испытаний
Рекомбинантный реовирус	RAS-mediated tumors	Фазы 1 и 2 клинических испытаний
Коксаки вирус	Меланома	Доклинические испытания

Онколитические вирусы–2

Вирус	Вид онкопатологии	Стадия исследований
Рекомб. вирус простого герпеса	Рак груди, меланома, и др.	Завершена 1 фаза
Рекомб. вирус простого герпеса	Глиома, меланома, и др.	Начало 3 фазы в Европе
Рекомб. вирус простого герпеса	Глиобластома	Завершена фаза 2
Рекомб. вирус простого герпеса	Метастазы колоректального рака	Завершена 1 фаза

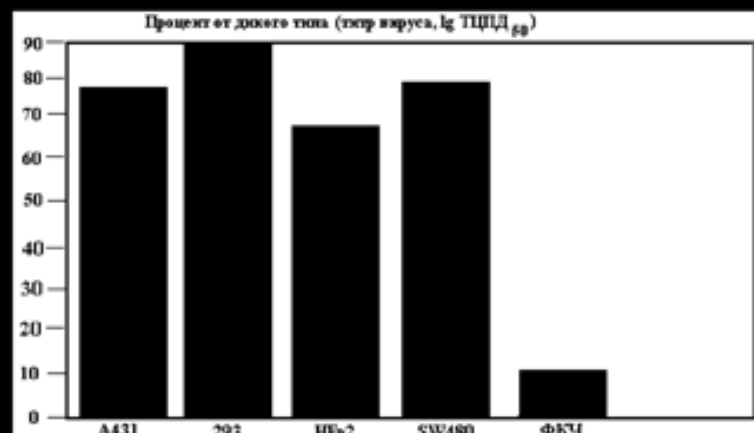
**Сравнительные результаты терапии больных
меланомой препаратом энтеровируса RIGVIR (Латвия)
или другими иммуномодуляторами в зависимости от
стадии заболевания**

Стадия	Выживаемость 5 лет	
	Rigvir+	Не получали Rigvir
IIA	92,6 (25/27)	66,7 (2/3)
IIB	88,9 (8/9)	28,6 (2/7)
IIC/III	76,5 (13/17)	14,3 (1/7)
IV	60,0 (21/35)	9,5 (2/21)

Разработка ГНЦ ВБ «Вектор» – Онколитический аденовирус

- ▶ Наиболее распространенными для злокачественных новообразований человека являются соматические мутации в гене p53 (ген супрессии опухолей).
- ▶ Они обнаружены в ДНК более 50% всех раковых опухолей человека различной локализации, включая опухоли головы и шеи (60%), легких (60%), ободочной кишки (50%) и яичек (60%).
- ▶ Одним из новых перспективных способов лечения онкологических заболеваний является вирусотерапия. Этот метод основан на применении вирусов, избирательно инфицирующих раковые клетки.
- ▶ Созданный в ГНЦ ВБ «Вектор» штамм Adel2 несет делецию гена E1B55K, в результате чего он может избирательно размножаться на p53-дефектных опухолевых клетках, вызывая их разрушение.

Цитоцидное воздействие мутантного вируса Adel2 на p53-дефектные опухолевые клетки и на нормальные фибробласты кожи человека. Все клетки были инфицированы стандартными десятикратными разведениями Adel2 или дикого типа аденовируса. Выраженность цитоцидного эффекта оценивали через 72ч.



Состояние разработки

- ▶ Способность Adel2 к селективной репликации в p53-дефектных опухолевых клетках позволяет надеяться на перспективность его использования для терапии p53-дефектных злокачественных новообразований человека.
- ▶ Получен патент РФ № 2194755, Бюллетень Изобретений № 35 от 20.12.2002. Рекомбинантная плазмидная ДНК rAd5-f, несущая фрагмент генома аденовируса 5 типа с делецией в гене E1B-55K, и штамм мутантного аденовируса Adel2, обладающий селективной противоопухолевой активностью. Качко А.В., Терновой В.А., Киселев Н.Н., Нетесов С.В. и др.
- ▶ Штамм Adel2 аденовируса был использован для создания противоракового препарата «Канцеролизин».
- ▶ Для производственного культивирования штамма Adel2 проведена полная паспортизация и аттестация рабочего и посевного банков культуры клеток 293, трансформированной генами E1A и E1B аденовируса с целью суппрессии функции гена p53.

Состояние разработки –2

- ▶ Успешно проведены доклинические испытания Канцеролизина.
- ▶ Отобраны 5 кандидатов-добровольцев с диагнозом «диссеминированная меланома» для проведения клинических испытаний Канцеролизина.
- Разработаны в соответствии с требованиями Минздрава РФ необходимые НТД на препарат для проведения 1-й фазы клинических испытаний.
- На основе культуры клеток 293 были приготовлены производственный штамм Adel2 и 3 серии препарата для 1-й фазы клинических испытаний, переданные на аттестацию в ГИСК им. Л.А. Тарасевича.
- ▶ Разработанные нами проекты НТД на препарат, включая проект программы его клинических испытаний на ограниченной группе людей, переданы для предварительной экспертизы в ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ 1-Й ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

- ▶ Завершена 1-я фаза клинических испытаний препарата «Канцеролизин» при его интратуморальном введении 8-ми пациентам с диагнозами рак в области головы и шеи или меланома кожи IV степени.
- ▶ Показано, что при отсутствии аденовируса в крови титры антител к нему в сыворотке крови пациентов, получивших два или три цикла введения максимальной дозы «Канцеролизина», умеренно повышаются относительно исходного уровня.
- ▶ У 2-х пациентов из 8 были найдены мутации в значимых областях гена p53 из клеток биопсийного материала. У 4-х пациентов были обнаружены мутации гена p53 в крови, причем у 1-го – в значимом участке экзона 5.
- ▶ При проведении 1-й фазы клинических испытаний «Канцеролизина» была продемонстрирована хорошая переносимость препарата у всех пациентов и стабилизация процесса, по крайней мере, у одного пациента. Показано, что «Канцеролизин» не обладает токсичностью и реактогенностью при применении его в минимальной и максимальной дозах.
- ▶ По результатам 1-й фазы клинических испытаний «Канцеролизина» препарат был оценен как перспективный для дальнейшей разработки и проведения 2-й фазы клинических испытаний.

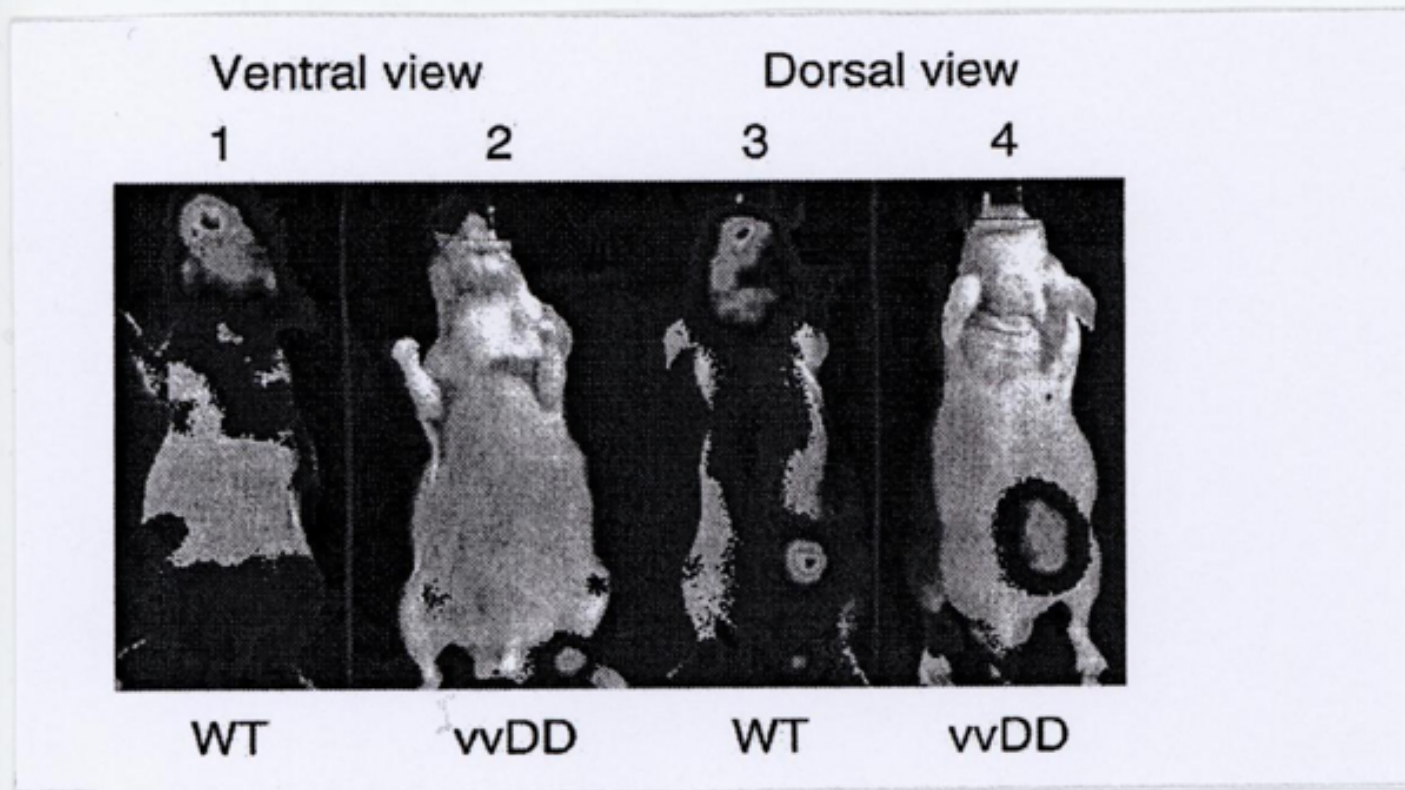
Перспективы препарата «Канцеролизин»

- После того как стало известно, что разработанный биотехнологической компанией Onyx Pharmaceuticals препарат ONYX-015 для лечения рака головы и шеи показал высокую эффективность на второй стадии клинических испытаний, акции компании в августе 2000 года выросли на 36%. Однако, испытания были приостановлены, поскольку партнер компании оказался ненадежным.
- В Китае в 2004 году начаты клинические испытания препарата-аналога Онух-015 в сравнении с ним, которые успешно завершены. Китайский штамм уже несколько лет широко применяется в клиниках Китая
- Сейчас в России проводится 2-я фаза клинических испытаний препарата Канцеролизин. Их успех позволит отказаться от использования подобного импортного препарата.
- Потенциальными потребителями продукции являются лечебные учреждения, прежде всего, для лечения пациентов со злокачественными опухолями, имеющими дефекты гена p53 .

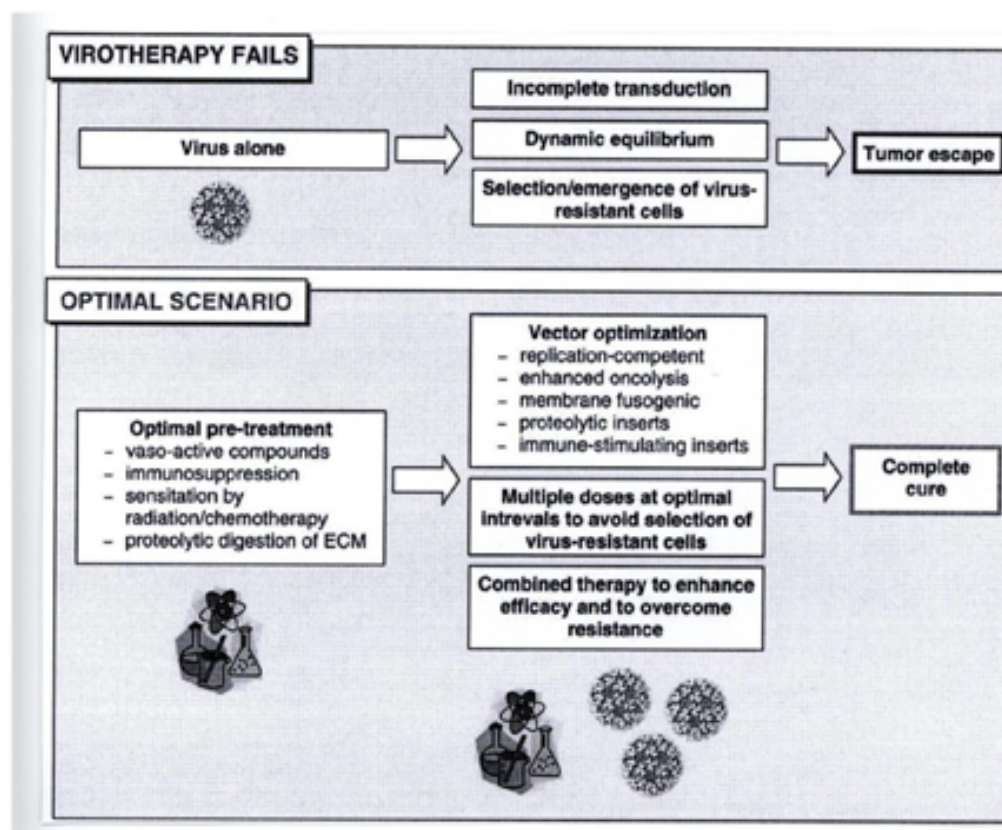
Необходимые характеристики онколитического вируса

- ❖ возможность генетической модификации и продукции в больших количествах
- ❖ селективная тропность только к неопластическим клеткам
- ❖ минимальная токсичность для нормальных тканей
- ❖ способность к репликации внутри опухолевых тканей с высоким индексом пролиферации и их системное уничтожение
- ❖ 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
- ❖ надежный механизм для инактивации или уничтожения раковых клеток
- ❖ отсутствие потенциального распространения в основной популяции здоровых клеток
- ❖ продолжительная эффективность несмотря на наличие иммунного ответа к реплицирующимся вирусам

Так выглядит опухоль-зависимая амплификация онколитического и дикого штаммов ОВ в несущих опухоль безтимусных мышах после системной доставки вирусов. Опухоль – подкожная, на спине. 1 и 3 мышам введен штамм WR-дикий, 2 и 4 – онколитический штамм, метка – люцифераза в обоих штаммах.



Оптимальные схемы применения онколитических вирусов



Предосторожности

- Соблюдение генно-инженерных правил
- Строгое следование биоэтическим правилам
- Дополнительные меры предосторожности при клинических испытаниях: проверка на индивидуальные дефекты иммунитета, на гиперчувствительность и т.д.

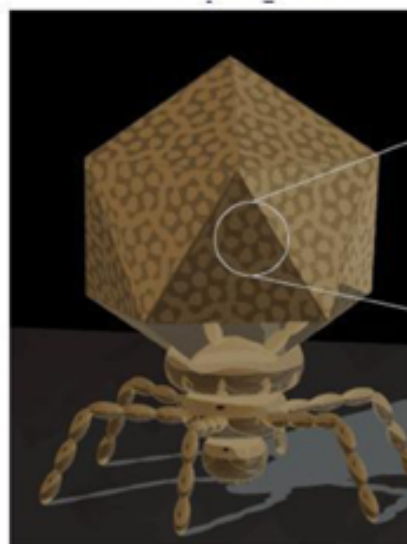
Преодолимые трудности

- ▶ Сейчас уже несколько групп в мире развивают данное направление. Основным возражением пока что является адаптивный иммунный ответ на вводимый вирус: сможет ли вирус убить опухоль раньше чем иммунная система поборет вирусы? Есть два способа с этим бороться : подавить иммунный ответ иммуносупрессорами или использовать последовательно разные онколитические вирусы.
- ▶ Также до сих пор стоят вопросы безопасности при применении вирусов. Все помнят пенсильванского юношу Jesse Gelsinger, который умер при попытке генной терапии с помощью аденовируса в 1999 году. Но недавно разработанные онколитические вирусы, включая Опух15, даже избыточно безопасны, и при их введении далеко не достигаются непереносимые дозы, а, кроме того, схема введения предусматривает сейчас тест на переносимость.
- ▶ Успех китайских ученых резко изменил ситуацию в этой области, и в последние 5 лет наблюдается бурный рост разработок в этой области

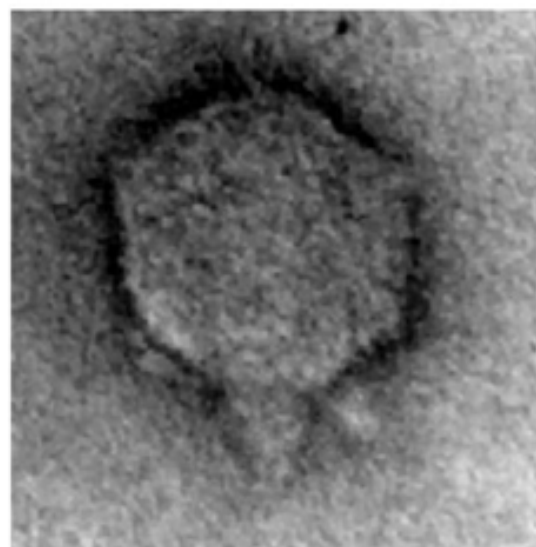
Перспективы онколитических вирусов

- ▶ **Энтеровирусы – различные виды опухолей ЖКТ и почек**
- ▶ **Аденовирусы – солидные подкожные опухоли и меланома, возможность использования разных серотипов в случае иммунитета к одному из них**
- ▶ **Парвовирусы – опухоли мозга**
- ▶ **Герпес-вирусы и поксвирусы – рак молочной железы, рак головы и шеи, меланома**
- ▶ **Реовирусы – рак предстательной железы и др.**

Спасибо за внимание !



Novagen, Inc



Spires & Brown, unpublished