

УДК 615.281+577.2:616-006+578.1

Л. В. Шестопалова¹, Д. А. Максимова¹, А. А. Красильникова¹, К. В. Корчагина¹,
Н. Ю. Силко², А. М. Шестопалов²

¹ Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия

E-mail: lv@fen.nsu.ru

ВИРУСЫ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АГЕНТ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ*

Онкологические заболевания в настоящее время остаются одной из основных причин смертности людей. Неопластические процессы могут возникнуть в любом органе и практически вне зависимости от возраста, пола, расы, питания, окружающей среды и т. д. Рак возникает либо из-за снижения гибели клеток, либо из-за увеличения количества новообразующихся клеток [1]. Другими словами, любой сбой клеточного цикла или запрограммированной смерти клеток приводит к неконтролируемому клеточному росту [2]. Появление техник, позволяющих осуществлять лучшую визуализацию и диагностику онкологических заболеваний, с одной стороны, и достижение более глубокого понимания молекулярно-биологических процессов, вызывающих возникновение рака, – с другой, явилось предпосылкой для создания новых терапевтических подходов к лечению онкологических больных, увеличивающих процент их общей выживаемости. В то же время терапевтические схемы, основанные преимущественно на комплексном применении радио- и химиотерапии, для больных с метастазами остаются малоэффективными. К тому же они не

лишены такого серьезного недостатка, как побочные эффекты вследствие низкой селективности этих подходов по отношению к нормальным и опухолевым клеткам.

Непосредственной целью применения противоопухолевых агентов является направленная стимуляция гибели раковых клеток, потому значительный интерес вызывает возможность использования для достижения этой цели онколитических вирусов [3], способных оказывать адресное цитолитическое воздействие на опухолевые клетки, не вызывая при этом гибели нормальных клеток организма.

Начало использования вирусов для лечения рака можно отнести еще к середине XX в. [4]. К настоящему времени выявлен целый ряд вирусов, обладающих онколитическим эффектом. На различных животных и человеческих моделях изучали их противораковый потенциал, специфичность, эффективность и безопасность для здоровых тканей [5]. К таким агентам относят аденовирусы [6], вирусы простого герпеса [7], кори [8], реовирусы [9], парвовирусы [10], вирус везикулярного стоматита [11], эпидемического паротита [12] и др. Эти вирусы

* Работа выполнена при финансовой поддержке грантов АБЦП (№ 2.1.1 / 9888) и Министерства образования и науки (договор № 11.G34.31.0034).

использованы для лечения пациентов с раком до или после различных генетических манипуляций [5]. Получен целый ряд перспективных препаратов на основе различных онколитических вирусов, разработка которых, как правило, связана со сложными манипуляциями на генетическом уровне.

Для создания большинства имеющихся в настоящее время противораковых препаратов на вирусной основе применены вирусы млекопитающих, которые являются условно патогенными для человека. Опасность широкого использования этих препаратов заключается в том, что вирусы, на основе которых они созданы, могут существенно увеличить свою патогенность в ходе эволюции или за счет спонтанного мутагенеза. Кроме того, у РНК-вирусов человека в ходе эволюции возникла способность адаптироваться к иммунной системе человека и развивать механизмы иммунной маскировки.

В качестве кандидата для онколитической виротерапии, обладающего высоким онколитическим потенциалом для лечения людей с онкологическими заболеваниями, внимание привлек вирус болезни Ньюкасла (ВБН). Это парамиксовирус, считающийся одним из самых опасных для птиц [13], который, однако, способен вызывать смерть раковых клеток, оставаясь апаатогенным для нормальных клеток млекопитающих [14]. К важному преимуществу данного вируса можно отнести также и то, что этот вирус адаптирован только к иммунной системе птиц. На данный момент онколитический эффект ВБН протестирован на различных типах опухолей человека [15].

Молекулярно-биологические характеристики ВБН

Данный вирус относится к роду *Avulavirus* семейству *Paramyxoviridae*. Это семейство включает известные вирусы, такие как вирус паротитной инфекции, парагрипп человека, вирус Сендай, обезьяний вирус-5 и сравнительно недавно обнаруженные вирусы Нипа и Хендра. Геном ВБН представлен одноцепочечной отрицательно смысловой РНК и составляет примерно 15 кб. Геномная РНК содержит шесть генов, кодирующих, по меньшей мере, 8 белков. Нуклеопротеид (NP), фосфопротеин (P) и большой полимеразный белок (L) формируют нуклеокапсид. Гемагглютинин-нейраминидазный комплекс

(HN) и белок слияния (F) заякорены в липидном бислое мембраны наружной оболочки, в то время как внутренний слой оболочки вириона формирует матричный белок (M). Два дополнительных неструктурных белка V и W образуются в процессе редактирования РНК, в ходе транскрипции гена P [3]. Показано, что белок V играет важную роль в предотвращении интерфероновому ответу и апоптоза в клетках курицы, но в клетках человека этого не происходит. Белок W, вероятно, также играет роль в репликации и патогенезе ВБН [16].

HN имеет шесть участков гликозилирования, которые отвечают не только за складчатость, стабильность, созревание белка и антигенность, но и определяют вирулентность вируса. Таким образом, HN наряду с F обуславливает цитопатогенность вируса [17]. Белки M, F и HN связаны с вирусной оболочкой. F- и HN-белки являются посредниками проникновения и высвобождения вируса, белок M принимает участие в морфогенезе и почковании ВБН [18]. Белок NP формирует и заключает в нуклеокапсид геномную РНК, которая служит в качестве шаблона для вирусной транскрипции и репликации. Белок P имеет важное значение для синтеза вирусной РНК. Он образует отдельные комплексы с NP- и L-белками и нуклеокапсидом [19]. Транскрипция вирусной геномной РНК осуществляется при помощи вирусной полимеразы (PL комплекса); каталитическая активность полимеразы и функции белка L и P отвечает за связывание комплекса P-L с нуклеокапсидом. После образования достаточного количества вирусных белков NP начинает связываться с лидерной последовательностью – процесс, в котором белок P выступает в качестве шоперона (сопровождающего) для доставки NP к образующейся РНК [20]. Как полагают, NP-P-комплекс регулирует переход от транскрипции к репликации [21], и некоторые результаты исследований в этой области также свидетельствуют о важной роли белка M в данном процессе. Так как белок M ассоциируется с нуклеокапсидом [22], он может повлиять на транскрипцию и / или репликацию [23]. Комплекс PL отвечает за репликацию генома, т. е. за синтез полнотражной плюс-цепи антигеномной РНК – матрицы для синтеза минус-цепи геномной РНК, которая в конечном счете упаковывается в потомственные вирионы. Белок L вы-

полняет посттранскрипционные модификации, такие как экзпирование, метилирование и полиаденилирование мРНК [24]. NP, P и L вместе составляют белки вирусного репликационного комплекса [18].

Молекулярно-генетические маркеры патогенности ВБН

Среди штаммов ВБН выделяют три патотипа: лентогенные (низко вирулентные), мезогенные (со средней вирулентностью) и велоогенные (высоковирулентные) типы. Разделение на патотипы проводят в соответствии со средней продолжительностью жизни инфицированного куриного эмбриона и степенью вирулентности в отношении однодневных цыплят [25]. Показано, что ВБН выборочно реплицируется в опухолевых клетках и вызывает их смерть, но остается апаатогенным для нормальных клеток млекопитающих. Благодаря этому свойству ВБН используется в качестве потенциального противоракового агента для лечения опухолей [26].

В зависимости от способности различных штаммов ВБН к онколизису их классифицируют как литические и нелитические. Литические штаммы вызывают разрушение клеток-мишеней, индуцируя изменения в цитоплазматической мембране, в том числе образование синцитиев. К таким штаммам относятся 73-T31, МТН-68/Н32, PV 701 [27] и т. д. Нелитические штаммы вызывают медленную регрессию опухоли, нарушая метаболизм в клетке. К ним относится достаточно известный и часто используемый в исследованиях штамм Ольстера [28]. Как литические, так и нелитические штаммы эффективно реплицируются в опухолевых клетках и активно исследуются в качестве противораковых агентов.

Расщепление F-белка необходимо для начала инфекции и является основным фактором, определяющим вирулентность. Сайт расщепления белка F вирулентных штаммов ВБН содержит несколько основных аминокислотных остатков, узнаваемых внутриклеточными фурин-подобными протеазами. Сайт расщепления белка F низко вирулентных штаммов не содержит этих аминокислот и узнается внеклеточными трипсино-подобными протеазами, найденными в ограниченном количестве тканей (преимущественно в тканях респираторного и желу-

дочно-кишечного трактов) [29], вследствие чего здесь происходит ограничение репликации штаммов ВБН с низкой вирулентностью.

Штаммы голубинового парамиксовируса типа 1 (ГПМВ 1) относятся к отдельной группе штаммов ВБН и связаны с инфекциями у голубей. Некоторые штаммы ГПМВ 1 имеют низкую вирулентность, т. е. обладают низким интрацеребральным индексом патогенности (ICPI) у кур, несмотря на наличие сайта расщепления белка F, обычно ассоциированным с вирулентными вирусами [30]. Ранее показано, что обмен F-генами между ГПМВ 1 с низкой вирулентностью и высокопатогенным вирусом не влияет на изменение вирулентности химерных вирусов по сравнению с изначальными формами [31]. Таким образом, низкая вирулентность некоторых штаммов ГПМВ 1 определяется, по-видимому, другими факторами. В частности, имеются данные, которые свидетельствуют о том, что за вирулентность ВБН отвечают белки V, HN и L [32–34]. Механизмы, лежащие в основе проявления ими качеств детерминант патогенности, изучены недостаточно.

Роль белков NP, P, M, L в вирулентности ВБН исследована J. C. Dortmans и соавт. [35]. Методами обратной генетики гены, кодирующие эти белки, рекомбинированы между штаммом ГПМВ 1 с низкой вирулентностью AV324 и высоко вирулентным штаммом ВБН Herts. На однодневных цыплятах *in vivo* определены патогенность и уровни репликации химерных вирусов, а также исследована кинетика репликации и размер образованных бляшек различных химерных вирусов в монослое культуры клеток. При анализе репликации *in vitro* использована котрансфекция плазмидами, кодирующими минигеном, который экспрессирует люциферазу в присутствии NP-, P- и L-белков. Полученные результаты показали, что вирулентность ВБН напрямую связана с активностью вирусного репликационного комплекса.

Очевидно, что все три белка, входящие в состав вирусного репликационного комплекса (NP, P, L), играют важную роль в определении статуса вирулентности ВБН. После проведения рекомбинации генов, вирулентность штамма Herts значительно снизилась, в то время как штамм AV324 стал гораздо более вирулентным. Каждый из этих

белков приносит свой вклад в статус вирулентности вируса, но при совместной рекомбинации они действуют синергически. Матричный (М) белок штамма AV324 иначе влиял на вирулентность в фоновом режиме штамма Herts, вероятно за счет взаимодействия с вирусным репликационным комплексом. Однако этот эффект не был взаимным, так как у белка М штамма Herts не хватало способности увеличивать вирулентность штамма AV324 [31].

Отличие в вирулентности между штаммами AV324 и Herts, вероятно, напрямую связано с эффективностью репликации вируса *in vivo*. После того, как гены, кодирующие весь NP-P-L репликационный комплекс, рекомбинированы, титр вируса Herts во всех органах однодневных цыплят был снижен, в то время как у авирулентного штамма AV324 титр вируса был увеличен в трех из четырех тестируемых органов.

Низкопатогенные штаммы ВБН, как правило, не могут распространяться системно при интрацеребральной инъекции. Поскольку у этих вирусов отсутствует многоосновный фрагмент расщепления в F-белках, активация требует присутствия трипсиноподобных протеаз, которых, по-видимому, нет в нервной ткани. Кроме того, репликация этих вирусов часто ограничивается местом инъекции [34]. Титр штамма AV324 в тканях головного мозга постепенно снижался с течением времени, но вирус был все еще в состоянии распространяться в печени, легких и селезенке.

Таким образом, изоляты ГПМВ 1 с низкой вирулентностью могут быть вполне адаптированы к их хозяевам, будучи в состоянии системно распространяться в связи с их типичным велогенным фрагментом сайта расщепления F-белка, в то время как репликация самого вируса остается на относительно низком уровне.

Отличия в эффективности вирусных репликативных комплексов подтверждены анализами репликации *in vitro*. Оптимальная репликация наблюдалась, когда все три белка происходили от штамма Herts. Этот вывод соответствует результатам тестов ICPI. Однако ни одна из возможных комбинаций NP-, P-, L-белков AV324 и Herts не достигла уровня совместной репликации белков штамма Herts. Одним из возможных объяснений может явиться то, что отдельные белки репликации Herts по природе своей более

активны, но оптимальная активность зависит от наличия родственных партнеров взаимодействия. Аминокислотные последовательности белковых доменов, ответственных за взаимодействие NP- и P-белков [36], отличаются между Herts и AV324. Области, ответственные за взаимодействие P-L, предположительно также отличаются между этими двумя вирусами, так как показано существование отличий у некоторых других парамиксовирусов [19]. Поскольку эти комплексы имеют важное значение для транскрипции и репликации вирусного генома [18], сделано предположение, что отсутствует оптимум их работы в гетерологичных конструкциях.

Расхождение между результатами, полученными *in vivo* и *in vitro*, можно объяснить ролью белка М. Помимо того, что он считается центральным организатором вирусного морфогенеза [18], рядом исследований показано его участие в регуляции синтеза вирусной РНК [23; 37]. Совместно с NP М-белок связывается с нуклеокапсидом [38]. После внедрения вируса в клетки-мишени нуклеокапсид отделяется от белка М и выделяется в цитоплазму, где происходит транскрипция. Взаимодействие белка М с нуклеокапсидом может повлиять на транскрипцию и последующую репликацию. Кроме того, это взаимодействие может быть специфичным для определенного штамма и не взаимным.

Другое возможное объяснение состоит в том, что ассоциация белка М с факторами клетки-хозяина между двумя штаммами может различаться. Во время инфекционного цикла белок М ВБН и других парамиксовирусов циркулирует между цитоплазмой и ядром. На ранних этапах инфекции он локализуется преимущественно в цитоплазме [38]. Позже его присутствие отмечается в ядре. Считается, что ядерная локализация сигналов и предполагаемая последовательность позднего основного домена вируса необходимы для почкования. Высказано также предположение о подавлении белком М функциональной активности ядра клетки-хозяина [39].

Также рассмотрено участие в вирулентности ВБН белков NP, P, L [34]. В этих исследованиях химерные вирусы получены путем обмена генами между штаммом LaSota со сниженной вирулентностью и мезогенным штаммом Beaudette C, классифицирующиеся как члены Lineage 2 или гено-

тип II в группе птичьего парамиксовируса типа 1 [24]. Удивительно, что рекомбинантный Beaudette C вирус, содержащий ген L штамма LaSota, реплицировался на более высоком уровне и был более патогенным, чем исходный вирус. Однако никакого эффекта не выявлено для NP- и Р-белков. Эти результаты отличаются от более поздних исследований, которые показывают, что все три белка репликации связаны с вирулентностью. Объяснение этой разницы может заключаться в том, что LaSota и Beaudette C имеют одно филогенетическое происхождение и генотип, тогда как штаммы, используемые в исследовании, упомянутом ранее, разного происхождения и генотипа. Herts классифицируется как член линии 3b (или генотип IV), а AV324 принадлежит к линии 4b (или генотипу VI) [40]. Кроме того, Herts является куриным производным штамма, а AV324 имеет голубиное происхождение.

Молекулярный механизм отношений между уровнем репликации вируса и его патогенностью до конца не изучен. Вполне возможно, что более высокий уровень синтеза РНК приводит к более интенсивной репликации вируса и, тем самым, к более эффективному производству вирусных частиц. Это может подавлять иммунный ответ, вызывая усиление патогенеза.

Корреляция между вирулентностью и эффективностью репликации вируса отмечалась и раньше. Например, сообщалось, что снижение уровня синтеза РНК связано со снижением вирулентности ВБН [41]. Для некоторых других парамиксовирусов, таких как вирус кори [42], респираторно-синцитиальный вирус, вирус парагриппа [43], описано, что детерминанты ослабления вируса связаны с мутациями в Р- и L-генах.

Благодаря использованию сайта клонирования RasI установлено, что рекомбинация генов Р между штаммами ВБН имеет лишь ограниченное влияние на вирулентность. Тем не менее нельзя полностью исключить возможность отличий влияния обмена полноценным белком Р на вирусные функции и вирулентность.

Таким образом, для более детального выяснения возможного влияния белков на вирусную транскрипцию и репликацию требуются дополнительные исследования. В целом имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что вирулентность ВБН является комплексной особенностью и

определяется многочисленными генетическими факторами, а также зависит от штамма ВБН и типа клеток-мишеней [31].

Использование онколитического эффекта ВБН в клинике

ВБН имеет ряд уникальных свойств, которые делают его эффективным и перспективным противоопухолевым агентом. Он обладает отличной способностью связываться с клеточными рецепторами и проникать в цитоплазму клеток путем эндоцитоза [44]. Клетки опухоли, в отличие от нормальных клеток, имеют дефектную интерфероновую систему, что способствует избирательной репликации ВБН в цитоплазме клеток опухоли, независимо от клеточной пролиферативной активности. При этом процесс репликации вируса относительно безопасен для нормальных клеток организма, а он сам может выступать в качестве адьюванта [28].

Онколитическое действие ВБН впервые описано W. A. Cassel, R. E. Garret в 1965 г. [45]. С тех пор исследования уникальных свойств вируса активно ведутся во многих направлениях, в том числе в части его клинического использования для борьбы с неопластическими процессами. В частности, в клинических испытаниях получена оценка эффективности ряда штаммов ВБН, используемых для лечения онкологических больных. При этом обязательно учитывались способы введения вируса.

Онколитические свойства ВБН изучаются как на мышинной модели, так и в клинических исследованиях на человеке [46]. Обнадёживающие результаты – регрессия опухоли и повышение клеточного иммунного ответа – получены при использовании вирусных онколизатов, представляющих собой суспензию, содержащую фрагменты плазматической мембраны от вирус-инфицированных опухолевых клеток [47]. Вирусные онколизаты протестированы на пациентах с меланомой, раком почки и другими злокачественными опухолями.

Еще один способ разработки клеточной вакцины основан на использовании интактных опухолевых клеток, инфицированных нелимитирующим штаммом ВБН. Смысл этого подхода в том, что данная клеточная вакци-

на способна стимулировать иммунную систему лучше, чем онколизаты.

В обоих случаях продемонстрирована частичная или полная регрессия новообразований при минимальных побочных эффектах и увеличения процента выживаемости пациентов.

Среди способов введения вирусного препарата можно выделить подкожный, внутрикожный или внутривенный пути. При всех способах доставки выявлена хорошая переносимость препаратов. R. M. Lorence и соавт. [15] опубликовал данные об испытаниях внутривенного введения аттенуированных штаммов ВБН PV701 пациентам с солидными опухолями каждые 28 дней, увеличивая концентрацию вируса от $5,9$ до $24,0 \times 10^9$ PFU/м². Исследователи установили, что максимально переносимая доза (МПД) после однократной инфузии находится в пределах 12×10^9 PFU/м², последующие инфузии увеличили МПД до 120×10^9 PFU/м². Таким образом, в отличие от большинства противораковых препаратов первая доза PV701 уменьшила токсичность последующей дозы. В итоге авторы наблюдали полную регрессию солидных опухолей [15]. Также установлено, что PV701 реплицируется специфично в опухолевых клетках и имеет широкий спектр антиопухолевой активности, что продемонстрировано цитоллизом опухолей эпителиального происхождения (в том числе рака молочной железы, легких, предстательной железы и толстой кишки), а также нейроэктодермального (меланомы, глиобластомы и нейробластомы) и мезенхимального (саркомы) происхождения.

A. Vigil et al. [14] опубликовали важные данные, полученные при использовании рекомбинантного ВБН, полученного методом обратной генетики, которые свидетельствуют о повышении его онколитической способности. На мышинных опухолевых моделях исследователи испытали рекомбинантные штаммы ВБН, экспрессирующие высокий уровень F-белка, мышинный колониальный гранулоцит-макрофагальный стимулирующий фактор (GM-CSF), интерферон γ (ИФН- γ), интерлейкин-2 (ИЛ-2) или фактор некроза опухоли α (ФНО α). Подкожные инъекции рекомбинантного ВБН индуцировали полную регрессию опухоли по сравнению с контрольной группой.

Механизмы ВБН-индуцированного онколиза

После инфицирования опухолевой клетки ВБН быстро реплицируется и заражает соседние клетки опухоли при помощи выхода потомства вирионов из зараженной клетки. Потомство вирионов обнаруживается уже через 3 ч после прививки, а развитие бляшек происходит в течение 2 дней после инокуляции. Существует несколько механизмов противоопухолевого действия вируса в организме человека. Во-первых, литические штаммы вируса могут непосредственно убивать опухолевые клетки. Такие штаммы признаны эффективными в профилактике опухолей от дальнейшего их распространения. Во-вторых, после заражения вирусные белки нелитических штаммов интегрируются в клеточные мембраны опухолевых клеток. Это может повысить уровень иммунного ответа. Наконец, сам вирус может стимулировать клетку-хозяина для получения эффекторных цитокинов, таких как интерфероны или факторы некроза опухоли, которые активизируют натуральных киллеров, макрофагов и сенсibilизированные Т-клетки. Так как ВБН активизирует секрецию ИФН и ФНО иммунными клетками, последний механизм считается наиболее перспективным [26].

Хорошо известно, что апоптоз является физиологическим процессом, который устраняет вредные и сильно поврежденные клетки, поддерживает тканевой гомеостаз у многоклеточных организмов. Этот процесс визуализируется изменением в клеточной морфологии и биохимических особенностей, в том числе фрагментации ДНК, вакуолизации цитоплазмы, почкования плазматической мембраны. Процесс апоптоза осуществляется, главным образом, при участии семейства цистеин-протеаз, называемых каспазами. Будучи генетически контролируемым процессом, апоптоз является восприимчивым к нарушениям в результате мутаций. Следовательно, любое изменение в регуляции апоптоза может привести к неконтролируемому делению клеток. Это критическое соотношение между апоптозом и неконтролируемым делением клеток означает, что любое воздействие, направленное на запуск апоптоза в раковых клетках, будет иметь потенциальный терапевтический эффект.

фект. Способность ВБН индуцировать апоптоз протестирована на различных линиях опухолевых клеток, включая линию клеток Vero (трансформированные фибробласты почки африканской зеленой марьшши) [44] и линию клеток карциномы молочной железы человека [47]. Тем не менее механизмы запуска апоптоза под влиянием ВБН до сих пор неясны и противоречивы. Из данных литературы известно, что ВБН вызывает экспрессию различных цитокинов, которые могут вызывать смерть клетки-хозяина путем онколизиса. Штамм 73-Т ВБН, как сообщается, вызывает экспрессию ИФН- α и ФНО α в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), а штамм Ulster оказывает регуляцию экспрессии рецепторов TRAIL на клеточной поверхности инфицированных клеток. Это свидетельствует о том, что вирус может активировать апоптоз через внешний сигнальный путь клеточной смерти. А. Hrabak и соавт. [48] выявили, что штамм МТН-68/Н вызывает цитотоксический противоопухолевый эффект посредством индукции синтеза оксида азота в перитонеальных макрофагах крысы. Это позволило предположить, что ВБН индуцирует апоптоз путем запуска внутренних сигнальных путей клеточной смерти. Кроме того, есть данные, свидетельствующие о том, что ВБН индуцирует экспрессию Nf κ B (транскрипционный фактор, основной участник в сигнальном пути выживания опухолевых клеток, он противодействует ФНО) и после активации этого фактора регулирует экспрессию генов МНС-1 (главного комплекса гистосовместимости). Это основано на том факте, что ни сам вирус, ни ИФН- α не могут вызывать экспрессию генов МНС в клетках эмбриональной карциномы, дефектных по Nf κ B и иным регуляторным факторам. Следовательно, можно предположить, что ВБН может вызвать процесс онколизиса через Nf κ B сигнальный путь [48].

Многие исследования направлены на выяснение механизмов вирус-индуцированного апоптоза в раковых клетках. Установлено, что ВБН вызывает каспазозависимые внешние и внутренние пути апоптоза в опухолевых клетках. На начальных стадиях инфекции процесс апоптоза преимущественно идет по внешнему пути, затем происходит активация внутренних сигнальных путей апоптоза [49]. Кроме того, обнаружено, что ВБН индуцирует апоптоз путем регуляции

экспрессии проапоптотического p53, Вах и обратной регуляции экспрессии антиапоптотического гена BCL-2 в целевых клетках. Отмечено также, что для индуцирования апоптоза необходимы репликация вируса и синтез вирусных белков *de novo* [44].

Большинство опухолей человека имеют дефект по гену p53. Лечение в таких случаях направлено на использование методов, с помощью которых можно убить опухолевые клетки независимым от p53 путем. Показано, что штамм МТН-68/Н вызывает стресс эндоплазматического ретикулума опосредованно p53-независимым апоптозом в линии клеток PC12 феохромоцитомы крысы и клетках HeLa. Из этого следует, что ВБН может вызывать апоптоз также через p53-независимые сигнальные пути [50]. Эти исследования показывают, что ВБН может быть использован для лечения пациентов с широким спектром опухолей. Тем не менее p53-независимые механизмы онколизиса для других штаммов вируса до сих пор не установлены.

ВБН имеет шесть структурных и два неструктурных белка. Роль этих белков в апоптозе до сих пор не ясна. Индукция апоптоза некоторыми вирусными продуктами определена у следующих вирусов: апотин вируса анемии куриц, E1A аденовируса, NS3 белок вируса диареи крупного рогатого скота, Vrg вируса иммунодефицита человека и т. д. J. Zeng и соавт. [51] сообщили, что HN-комплекс способен к прямой регуляции экспрессии IFN- α и TRAIL в клетках-мишенях. В то же время Z. Q. Mi и соавт. [52], основываясь на исследованиях *in vivo*, выявили, что супрессия меланомы мыши была на более высоком уровне при использовании комбинированного НДВ с HN по сравнению с НДВ или HN по одному. На основании этого ими сделан вывод о том, что HN-белок локализован на поверхности опухолевых клеток и способствует специфическому выбору опухолевых клеток вирусом. Исследованиями Y. C. Sun и соавт. [53] продемонстрирована ответственность за индукцию апоптоза в человеческой клеточной линии гепатомы SMMC7721 белка HN. Однако другими исследователями отмечено возрастание онколитического потенциала рекомбинантного куриного вакцинного штамма Hitchner b1, экспрессирующего более высокий уровень F-белка по сравнению с диким типом [14]. Возможно, существует

корреляция между патогенностью и онколитическими свойствами вируса.

Таким образом, белки HN и F являются посредниками в проявлении онколитического действия ВБН. Есть основания полагать, что HN- и F-белки везикулярных штаммов имеют более широкий онколитический потенциал, чем те же белки лентогенных штаммов.

Онколитические свойства рекомбинантных вирусов болезни Ньюкасла

В настоящее время активно используют методы обратной генетики и создание рекомбинантных ВБН с усиленными онколитическими свойствами. Рекомбинантные вирусы экспрессируют иммуномодулирующие молекулы, такие как ИЛ-2 (rNDV/IL2). Такие вирусы обладают значительным цитолитическим действием в отношении различных человеческих опухолевых клеточных линий, включая карциному молочной железы (клеточная линия MCF-7), аденокарциному толстой кишки человека (клеточная линия HT29) и линию клеток Jurkat (Т-лимфобластоидная линия клеток человека) [54]. Другой рекомбинантный штамм ВБН обладал способностью к экспрессии полноразмерного иммуноглобулина G (IgG) моноклональных антител [55]. Инфекция опухолевых клеток такими вирусами приводит к эффективной продукции и секреции функционального полноразмерного IgG антител к опухолевым клеткам и специфическому связыванию с антигенами опухолевой ткани. Такой подход позволит объединить преимущества онколитических РНК вирусов и моноклональных антител в одно мощное противораковое средство с новыми и улучшенными терапевтическими свойствами.

Противоопухолевые свойства штамма rNDV/IL2 протестированы на различных видах опухолей, включая меланому мышей [56]. Способность рекомбинантных ВБН к онколизису меланомы была еще больше усилена за счет включения гена NS1 гриппа в геном НДВ. Белок NS1 вируса гриппа выступает антагонистом интерферона и выполняет при этом антиапоптотическую функцию [57].

В настоящее время исследования онколитической способности рекомбинантных вирусов проводятся на экспериментальных

животных моделях. Степень безопасности и эффективность использования таких вирусов в клинике еще предстоит оценить.

Заключение

Интерес исследователей к изучению онколитической способности ВБН основан на уверенности, что виротерапия с использованием репликативно-компетентных вирусов способна обеспечить новыми эффективными стратегиями лечения больных с раком, в том числе случаев, когда стандартная терапия бессильна. Несмотря на увеличение объемов во всем мире доклинических и клинических исследований онколитических вирусов, свидетельствовать о полной безопасности и эффективности виротерапии еще преждевременно. Пока отсутствует полнота знаний о правомерности использования того или иного штамма ВБН в лечении конкретного типа злокачественного образования. Недостаточно сведений об осложнениях, вызванных виротерапией и ее отдаленных эффектах. Остается открытым вопрос об адресности и методах доставки вирусного вектора, ограничены возможности доклинических испытаний. Из этого следуют затруднения в точном прогнозировании результативности и эффективности использования вирусных препаратов.

Таким образом, желание использовать высокий онколитический потенциал вирусов в лечении пациентов с онкологическими заболеваниями, с одной стороны, и недостаточность имеющейся информации о механизмах онколизиса – с другой, делают эту проблему наиболее актуальной.

Для успешной виротерапии скорость репликации вирусных частиц в инфицированных клетках опухоли должна опережать темпы роста неинфицированных клеток опухоли, а также минимально воздействовать на здоровые ткани. Клиническая эффективность любого метода лечения зависит как от его противоопухолевой активности, так и от терапевтического индекса между раковыми и нормальными клетками. Селективный характер ВБН делает его идеальным агентом для виротерапии. Методы обратной генетики позволяют усилить онколитическую способность ВБН путем получения рекомбинантных репликационно-компетентных вирионов, а также улучшить методы доставки вируса к клеткам-мишеням. Это,

несомненно, поможет сделать виротерапию одним из самых эффективных методов лечения лиц с раком в ближайшем будущем.

В России внедрение этого таргетного метода терапии остается единичным. При этом используются только зарубежные вакцинные штаммы ВБН. Вместе с тем в природных резервуарах Российской Федерации циркулирует большое количество диких, неадаптированных штаммов ВБН, обладающих различными по своей силе и механизмам онколитическими свойствами [58]. Естественная среда обитания и свободная циркуляция в природе способствуют мутациям вируса и изменениям его свойств, что может приводить к усилению онколитического потенциала некоторых отдельных штаммов.

Активный мониторинг ВБН, циркулирующих в мире, исследование природы их онколитических свойств позволят выявить новые перспективные для клинической онкологии штаммы и в дальнейшем использовать их для получения вовирусных препаратов.

Список литературы

1. *Reed J. C.* Dysregulation of Apoptosis in Cancer // *J. Clin. Oncol.* 1999. Vol. 17. P. 2941–2953.
2. *Lowe S. W., Lin A. W.* Apoptosis in Cancer // *Carcinogenesis.* 2000. Vol. 21. P. 485–495.
3. *Nelson N. J.* Scientific Interest in Newcastle Disease Virus is Reviving // *J. Natl. Cancer Inst.* 1999. Vol. 91. P. 1708–1710.
4. *Ackermann W. W., Kurtz H.* A New Host-Virus System // *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1952. Vol. 81. P. 421–423.
5. *Ring C. J. A.* Cytolytic Viruses as Potential Anti-cancer Agents // *J. Gen. Virol.* 2002. Vol. 83. P. 491–502.
6. *Bischoff J. R., Kirn D. H., Williams A., Heise C., Horn S., Muna M., Ng L., Nye J. A., Sampson-Johannes A., Fattaey A., McCormick F.* An Adenovirus Mutant that Replicates Selectively in p53-deficient Human Tumour Cells // *Science.* 1996. Vol. 274. P. 373–376.
7. *Liu B., Robinson M., Han Z., McGrath Y., Branston R., Reay P., McGrath Y., Thomas S. K., Thornton M., Bullock P., Love C. A., Coffin R. S.* Optimised Oncolytic Herpes Simplex Virus for Cancer Treatment // *Mol. Ther.* 2003. Vol. 7. P. 293.
8. *Taqi A. M., Abdurrahman M. B., Yakubu A. M., Flemming A. F.* Regression of Hodgkin's Disease after Measles // *Lancet.* 1981. Vol. 1. P. 1112.
9. *Coffey M. C., Strong J. E., Forsyth P. A., Lee P. W. K.* Reovirus Therapy of Tumours with Activated Rats Pathway // *Science.* 1998. Vol. 282. P. 1332–1334.
10. *Rommelaere J., Tattershall P.* Onco-suppression by Parvoviruses // *Handbook of parvoviruses* / Ed. by P. Tijssen. Boca Raton, FL. 1990. P. 41–57.
11. *Stojdl D. F., Lichty B., Knowles B., Marius R., Atkins H., Sonenberg N., Bell J. C.* Exploiting Tumour-specific Defects in the Interferon Pathway with a Previously Unknown Oncolytic Virus // *Nat. Med.* 2000. Vol. 6. P. 821–825.
12. *Asada T.* Treatment of Human Cancer with Mumps Virus // *Cancer.* 1974. Vol. 34. P. 1907–1928.
13. *Alexander D. J.* Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviridae Infection // *Diseases of Poultry* / Ed. by B. W. Calnek. Ames, Iowa, 1997. P. 541–569.
14. *Vigil A., Park Man-Seong, Martinez O., Chua M. A., Xiao S., Cros J. F., Martinez-Sobrido L., Woo S. L., Garcia-Sastre A.* Use of Reverse Genetics to Enhance the Oncolytic Properties of Newcastle Disease Virus // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67. P. 8285–8292.
15. *Lorence R. M., Pecora A. L., Major P. P., Hotte S. J., Laurie S. A., Roberts M. S., Groene W. S., Bamat M. K.* Overview of Phase I Studies of Intravenous Administration of PV701, an Oncolytic Virus // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2003. Vol. 5. P. 618–624.
16. *Park M. S., Garcia-Sastre A., Cos J. F., Basler C. F., Palese P.* Newcastle Disease Virus V Protein is a Determinant of Host Range Restriction // *J. Virol.* 2003. Vol. 77. P. 9522–9532.
17. *McGinnes L. W., Morrison T. G.* Inhibition of Receptor Binding Stabilizes Newcastle Disease Virus HN and F Protein-containing Complexes // *J. Virol.* 2006. Vol. 80. P. 2894–2903.
18. *Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B., Straus S. E.* Paramyxoviridae: the Viruses and Their Replication // *Fields Virology.* Philadelphia, 2007. P. 1449–1496.
19. *Horikami S. M., Curran J., Kolakofsky D., Moyer S. A.* Complexes of Sendai Virus NP-P and P-L Proteins are Required for Defec-

tive Interfering Particle Genome Replication *in vitro* // J. Virol. 1992. Vol. 66. P. 4901–4908.

20. Curran J., Marq J. B., Kolakofsky D. An N-terminal Domain of the Sendai Paramyxovirus P Protein Acts as a Chaperone for the NP Protein during the Nascent Chain Assembly Step of Genome Replication // J. Virol. 1995. Vol. 69. P. 849–855.

21. Vidal S., Kolakofsky D. Modified Model for the Switch from Sendai Virus Transcription to Replication // J. Virol. 1989. Vol. 63. P. 1951–1958.

22. Li D., Jans D. A., Bardin P. G., Meanger J., Mills J., Ghildyal R. Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids is Mediated by the M2-1 Protein // J. Virol. 2008. Vol. 82. P. 8863–8870.

23. Iwasaki M., Takeda M., Shirogane Y., Nakatsu Y., Nakamura T., Yanagi Y. The Matrix Protein of Measles Virus Regulates Viral RNA Synthesis and Assembly by Interacting with the Nucleocapsid Protein // J. Virol. 2009. Vol. 83. P. 10374–10383.

24. Sidhu M. S., Menonna J. P., Cook S. D., Dowling P. C., Udem S. A. Canine Distemper Virus L Gene: Sequence and Comparison with Related Viruses // Virology. 1993. Vol. 193. P. 50–65.

25. Saif Y. M., Barnes H. J., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Swayne D. E., Alexander D. J., Gough R. E. Newcastle Disease, other Avian Paramyxoviruses and Pneumovirus Infections // Diseases of poultry. Iowa, 2003. Vol. 1. P. 63–92.

26. Schirrmacher V., Griesbach A., Ahlert T. Anti-tumour Effects of Newcastle Disease Virus *in vivo*: Local Versus Systemic Effects // Int. J. Oncol. 2001. Vol. 18. P. 945–952.

27. Pecora A. L., Rizvi N., Cohen G. I., Meropol N. J., Sterman D., Marshall J. L., Goldberg S., Gross P., O'Neil J. D., Groene W. S., Roberts M.S., Rabin H., Bamat M. K., Lorence R. M. Phase I Trial of Intravenous Administration of PV701, an Oncolytic Virus, in Patient with Advanced Solid Cancers // J. Clin. Oncol. 2002. Vol. 20. P. 2251–2266.

28. Ockert D., Schirrmacher V., Beck N., Stoelben E., Ahlert T., Flechtenmacher J., Hagmuller E., Buchcik R., Nagel M., Saeger H. D. Newcastle Disease Virus-infected Intact Autologous Tumors Cell Vaccine for Adjuvant Active Specific Immunotherapy of Resected Colorectal Carcinoma // Clin. Cancer Res. 1996. Vol. 2. P. 21–28.

29. Ogasawara T., Gotoh B., Suzuki H., Asaka J., Shimokata K., Rott R., Nagai Y. Expression of Factor X and its Significance for the Determination of Paramyxovirus Tropism in the Chick Embryo // EMBO J. 1992. Vol. 11. P. 467–472.

30. Meulemans G., Berg T. P. van den, De-caesstecker M., Boschmans M. Evolution of Pigeon Newcastle Disease Virus Strains // Avian. Pathol. 2002. Vol. 31. P. 515–519.

31. Dortmans J. C., Koch G., Rottier P. J., Peeters B. P. Virulence of Pigeon Paramyxovirus Type 1 Does Not Always Correlate with the Cleavability of its Fusion Protein // J. Gen. Virol. 2009. Vol. 90. P. 2746–2750.

32. Leeuw O. S. de, Koch G., Hartog L., Ravenshorst N., Peeters B. P. Virulence of Newcastle Disease Virus is Determined by the Cleavage Site of the Fusion Protein and by Both the Stem Region and Globular Head of the Haemagglutinin-neuraminidase Protein // J. Gen. Virol. 2005. Vol. 86. P. 1759–1769.

33. Romer-Oberdorfer A., Veits J., Werner O., Mettenleiter T. C. Enhancement of Pathogenicity of Newcastle Disease Virus by Alteration of Specific Amino Acid Residues in the Surface Glycoproteins F and HN // Avian. Dis. 2006. Vol. 50. P. 259–263.

34. Rout S. N., Samal S. K. The Large Polymerase Protein Is Associated with the Virulence of Newcastle Disease Virus // J. Virol. 2008. Vol. 82. P. 7828–7836.

35. Dortmans J. C., Rottier P. J., Koch G., Peeters B. P. The Viral Replication Complex Is Associated with the Virulence of Newcastle Disease Virus // J. Virol. 2010. Vol. 84. P. 10113–10120.

36. Jahanshiri F., Eshaghi M., Yusoff K. Identification of Phosphoprotein : Phosphoprotein and Phosphoprotein : Nucleocapsid Protein Interaction Domains of the Newcastle Disease Virus // Arch. Virol. 2005. Vol. 150. P. 611–618.

37. Reuter T., Weissbrich B., Schneider-Schaulies S., Schneider-Schaulies J. RNA Interference with Measles Virus N, P, and L mRNAs Efficiently Prevents and with Matrix Protein mRNA Enhances Viral Transcription // J. Virol. 2006. Vol. 80. P. 5951–5957.

38. Harrison M. S., Sakaguchi T., Schmitt A. P. Paramyxovirus Assembly and Budding: Building Particles that Transmit Infections // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2010. Vol. 42. P. 1416–1429.

39. Ghildyal R., Ho A., Jans D. A. Central Role of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein in Infection // *FEMS Microbiol. Rev.* 2006. Vol. 30. P. 692–705.
40. Aldous E.W., Mynn J. K., Banks J., Alexander D. J. A Molecular Epidemiological Study of Avian Paramyxovirus Type 1 (Newcastle disease virus) Isolates by Phylogenetic Analysis of a Partial Nucleotide Sequence of the Fusion Protein Gene // *Avian. Pathol.* 2003. Vol. 32. P. 239–256.
41. Madansky C. H., Bratt M. A. Noncytopathic Mutants of Newcastle Disease Virus are Defective in Virus-specific RNA Synthesis // *J. Virol.* 1981. Vol. 37. P. 317–327.
42. Bankamp B., Kearney S. P., Liu X., Bellini W. J., Rota P. A. Activity of Polymerase Proteins of Vaccine and Wild-type Measles Virus Strains in a Minigenome Replication Assay // *J. Virol.* 2002. Vol. 76. P. 7073–7081.
43. Murphy B. R., Collins P. L. Live-attenuated Virus Vaccines for Respiratory Syncytial and Parainfluenza Viruses: Applications of Reverse Genetics // *J. Clin. Invest.* 2002. Vol. 110. P. 21–27.
44. Cantin C., Holguera J., Ferreira L., Villar E., Munoz-Barroso I. Newcastle Disease Virus May Enter Cells by Caveolae-mediated Endocytosis // *J. Gen. Virol.* 2007. Vol. 88. P. 559–569.
45. Cassel W. A., Garret R. E. Newcastle Disease Virus as an antineoplastic Agent // *Cancer.* 1965. Vol. 18. P. 863–868.
46. Fauziah O., Omar A. R., Patimah I., Aini I. Microscopic Evaluation of Newcastle Disease Virus (NDV): a Killer in Chicken but a Possible Live Saver in Humans // *J. Elect. Microscop. Thailand.* 2002. Vol. 16. P. 272–274.
47. Washburn W., Weigand M. A., Grosse-Wilde A., Janke M., Stahl H., Riser E., Sprick M. R., Schirrmacher V., Walczak H. TNF-related Apoptosis-inducing Ligand Mediates Tumoricidal Activity of Human Monocytes Stimulated by Newcastle Disease Virus // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170. P. 1814–1821.
48. Hrabak A., Csuka I., Bajor T., Csatory L. K. The Cytotoxic Effect of MTH-68/H: A Live Attenuated Newcastle Disease Virus Is Mediated by the induction of Nitric Oxide Synthesis in Rat Peritoneal Macrophages *in vitro* // *Cancer Lett.* 2006. Vol. 231. P. 279–289.
49. Elankumaran S., Rockermann D., Samal S. K. Newcastle Disease Virus Exerts Oncolysis by Both Intrinsic and Extrinsic Caspase-dependent Pathways of Cell Death // *J. Virol.* 2006. Vol. 80. P. 7522–7534.
50. Fabian Z., Csatory C. M., Szeberenyi J., Csatory L.K. p53 Independent Endoplasmic Stress-mediated Cytotoxicity of a Newcastle Disease Virus Strain in Tumors Cell Lines // *J. Virol.* 2007. Vol. 81. P. 2817–2830.
51. Zeng J., Fournier P., Schirrmacher V. Induction of Interferonalpha and Tumour Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Human Blood Mononuclear Cells by Haemagglutinin Neuraminidase but not F Protein of Newcastle Disease Virus // *Virology.* 2002. Vol. 297. P. 19–30.
52. Mi Z. Q., Jin N. Y., Sun Y. C., Li X., Lian H., Li J., Guan G. F. Anti-Tumour Research on Mouse Melanoma with Combined Application of Newcastle Disease Virus and Its HN Gene // *Ai. Zheng.* 2004. Vol. 23. P. 910–913.
53. Sun Y. C., Jin N. Y., Mi Z. Q., Li X., Lian H., Li P. Induction of Apoptosis in Human Hepatoma Cell Line SMMC7721 by Newcastle Disease Virus HN Gene // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2005. Vol. 27. P. 279–282.
54. Zhao H., Janke M., Fournier P., Schirrmacher V. Recombinant Newcastle Disease Virus Expressing Human Interleukin-2 Serves as a Potential Candidate for Tumour Therapy // *Virus Res.* 2008. Vol. 136. P. 75–80.
55. Puhler F., Willuda J., Puhmann J., Mumberg D., Romer Oberdorfer A., Beier R. Generation of a Recombinant Oncolytic Newcastle Disease Virus and Expression of a Full IgG Antibody from Two Transgenes // *Gene Ther.* 2008. Vol. 15. P. 371–383.
56. Zamarin D., Vigil A., Garcia-Sastre A., Fong Y. Genetically Engineered Newcastle Disease Virus for Malignant Melanoma Therapy // *Gene Ther.* 2009. Vol. 16. P. 796–804.
57. Zamarin D., Martinez-Sobbrido L., Kelly K., Mansour M., Sheng G., Vigil A., Garcia-Sastre A., Palese P., Fong Y. Enhancement of Oncolytic Properties of Recombinant Newcastle Disease Virus Through Antagonism of Cellular Innate Immune Responses // *Mol. Ther.* 2009. Vol. 17. P. 697–706.
58. Силко Н. Ю., Шестопалов А. М., Шестопалова Л. В. Случаи выделения вируса болезни Ньюкасла на территории России // *Вестн. Новосиб. гос. ун-та. Серия: Биология, клиническая медицина.* 2010. Т. 8, вып. 1. С. 57–61.