

УДК 578.5

ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ЭНТЕРОВИРУСЫ

© 2012 г. П. М. Чумаков^{1,2,3}, В. В. Морозова^{1,4}, И. В. Бабкин^{1,4}, И. К. Байков^{1,4},
С. В. Нетесов^{1,5}, Н. В. Тикунова^{1,4*}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland OH 44195 USA

⁴Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

⁵Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”, Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

Поступила в редакцию и принята к печати 17.02.2012 г.

Расширение знаний в области молекулярной биологии вирусов и их взаимодействия с клеткой позволяет использовать вирусы в качестве инструмента для борьбы с онкологическими заболеваниями, поскольку клетки злокачественных опухолей, как правило, приобретают повышенную чувствительность к вирусам. Вместе с тем, для применения вирусного онколиза в терапии злокачественных заболеваний необходимо обеспечить максимально возможную безопасность онколитических вирусов для больного и его окружения. Энтеровирусы человека рассматриваются в качестве одного из наиболее удобных исходных объектов для создания онколитических вирусов, так как многие представители энтеровирусов либо полностью непатогенны для человека, либо вызывают малоопасные заболевания. Развитие методов генетической инженерии позволяет создавать высокоаттенуированные энтеровирусы, обладающие повышенной безопасностью и селективностью. В данном обзоре основные представители рода энтеровирусов – вирусы ЕСНО, Коксаки и вакцинные штаммы полиовирусов – рассмотрены в качестве перспективных исходных объектов для создания эффективных онколитических вариантов. Описаны уже созданные и апробированные онколитические варианты энтеровирусов, рассмотрены перспективы их применения в онкотерапии и проблемы, связанные с совершенствованием и практическим использованием.

Ключевые слова: онколитические энтеровирусы, вирусная онкотерапия, вирусы Коксаки, вирусы ЕСНО, полиовирусы.

ONCOLYTIC ENTEROVIRUSES, by P. M. Chumakov^{1,2,3}, V. V. Morozova^{1,4}, I. V. Babkin^{1,4}, I. K. Baykov^{1,4}, S. V. Netesov^{1,5}, N. V. Tikunova^{1,4} (¹Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia; *e-mail: Tikunova@niboch.nsc.ru; ²Engelgardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ³Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland OH 44195 USA; ⁴Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; ⁵State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia). Increasing information concerning molecular biology of viruses and virus-cell interactions makes it possible to use viruses as a tool in effort to treat cancer diseases. As a rule, tumor cells are highly sensitive to viruses that may be used in cancer therapy. Therewith, applications of viral oncolysis in treatment of cancer diseases assume maximum possible safety of used viruses for patient and environment. Human enteroviruses are one of the most convenient sources to generate oncolytic viruses. Many of enteroviruses are non-pathogenic for humans or cause mild disease. Progress in genetic engineering permits to develop attenuated enterovirus variants with high safety and selectivity. This review focuses on the main members of *Enterovirus* genus, such as Coxsackieviruses, and vaccine strains as promising source for development of oncolytic agents, applicable for cancer therapy. It reviews data concerning recently developed and tested oncolytic variants of enteroviruses and discusses perspectives of their application in cancer therapy and problems, concerning their improvement and practical use.

Keywords: oncolytic enteroviruses, viral cancer therapy, Coxsackieviruses, Echoviruses, Polioviruses.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на очевидный прогресс в понимании механизмов злокачественной трансформации, те-

рапия опухолей по-прежнему остается исключительно сложной задачей. До начала прошлого века противоопухолевая терапия сводилась к хирургическому удалению опухоли. После открытия рентгеновских лучей и радиоактивности большие на-

* Эл. почта: Tikunova@niboch.nsc.ru

жды возлагались на лучевую терапию, однако, кардинального прорыва не произошло [1]. С конца 1940-х годов стали развиваться методы химиотерапии, которые в ряде случаев позволили существенно увеличить продолжительность жизни больных, особенно в случае лейкозов [2, 3], но основным недостатком радио- и химиотерапии по-прежнему остается относительно низкая их специфичность. В последние годы активно разрабатываются более специфичные химиотерапевтические препараты и антитела, нацеленные на определенные типы раковых клеток [46]. В качестве альтернативного подхода изучается также возможность применения онколитических вирусов.

Возможность использования вирусов в терапии онкологических заболеваний связана с избирательностью цитолитического действия, которое оказывают на раковые клетки непатогенные или слабопатогенные для человека вирусы. Еще в начале 1900-х гг. появились сообщения о неожиданном улучшении состояния ряда онкологических больных после вакцинации или перенесенной вирусной инфекции. Так, наблюдали выраженную ремиссию у больной лейкозом после гриппоподобного заболевания [7], а также уменьшение размеров опухоли у больной раком шейки матки после введения антирабической вакцины [8]. Вскоре после открытия вирусов начались поиски оптимальных моделей для их культивирования. В ходе поиска было обнаружено, что клетки опухолей зачастую обладают повышенной чувствительностью ко многим вирусам. В 1920-х гг. в работах Левадити и Николау [9–11] был установлен онкотропизм многих инфекционных вирусов. Вирусы оказались способными избирательно размножаться в опухолях животных, причем в ряде случаев онкотропизм сопровождался онколитическим действием [11]. Эти наблюдения указывали на принципиальную возможность использования вирусного онколиза в терапии рака.

Исследования онколитической активности вирусов получили дальнейшее развитие в 1950–1970-х гг. [12]. Так, экспериментально обнаружили, что у перенесших корь больных лимфомой Беркитта и болезнью Ходжкина наблюдается временное улучшение состояния [13, 14]. Онколитической активностью обладают вирусы гриппа [15], энтеровирусы [12, 16] и некоторые другие вирусы [17, 18]. Описаны успешные попытки применения аденовирусов в терапии рака шейки матки [19–21] и энтеровирусов — при опухолях пищеварительного тракта [22].

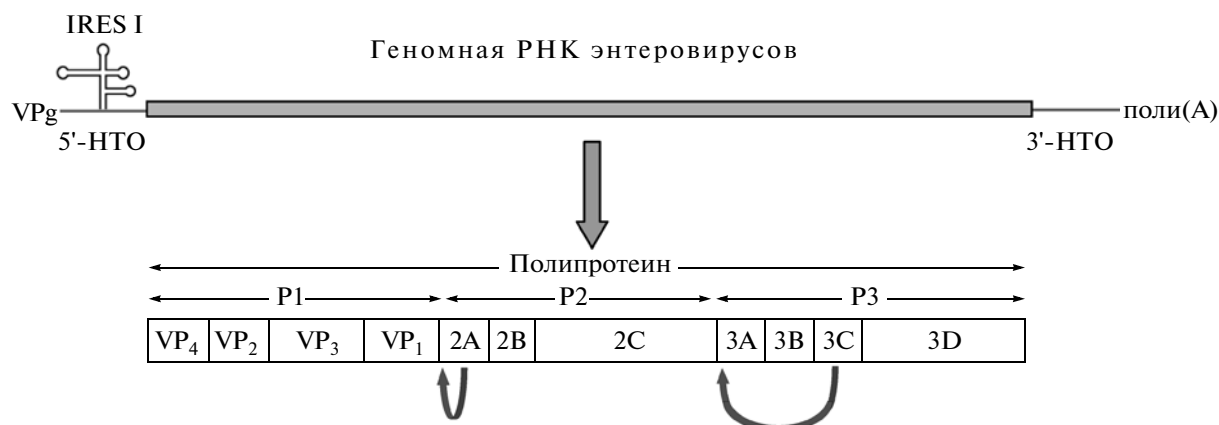
Несмотря на обнадеживающие результаты, применение вирусных препаратов в онкологии осложняется несколькими обстоятельствами. Во-первых, отмечались случаи неконтролируемого развития вирусной инфекции, что значительно

ухудшало состояние больного. Во-вторых, в большинстве случаев развитие вирусной инфекции приводило к закономерному появлению вирус-специфического иммунного ответа, что существенно ослабляло онколитический эффект. В-третьих, отсутствие понимания механизмов, лежащих в основе противоопухолевых свойств вирусов, осложняло внедрение таких подходов в клиническую практику. Не были разработаны также этические критерии испытаний противоопухолевой активности вирусов, а проводимые в ряде случаев без должного регламента клинические испытания серьезно дискредитировали саму идею использования явления вирусного онколиза в терапии рака. Все это на несколько десятилетий приостановило изучение возможностей и эффективности использования вирусов в качестве противоопухолевых средств [23].

Следующий этап в исследованиях онколитических вирусов стал возможным благодаря достижениям молекулярной биологии и вирусологии, а также в связи с совершенствованием методов генетической инженерии. Появилась возможность создания рекомбинантных вирусов, способных с повышенной селективностью инфицировать клетки опухолей или стимулирующих синтез противоопухолевых продуктов в зараженных клетках [24, 25]. Современные подходы к повышению избирательности действия вирусов в отношении опухолевых клеток направлены на решение двух основных задач. Первая, “трансдукционное нацеливание”, предполагает модифицировать поверхностные белки вириона таким образом, чтобы обеспечить преимущественное связывание вируса с рецепторами, расположенными главным образом на поверхности опухолевых клеток [26]. Вторая, “нетрансдукционное нацеливание”, направлена на повышение избирательности репликации вируса на опухолевых клетках [24, 27]. Каждый из этих подходов позволяет повысить онкотропизм вируса, однако, наибольший эффект может быть достигнут при их комбинации [28]. Для разработки онколитических вариантов опробованы вирусы нескольких семейств, из которых, безусловно, наибольший интерес представляют вирусы, прототипы которых не связаны с серьезными заболеваниями человека.

ЭНТЕРОВИРУСЫ: СВОЙСТВА И КЛАССИФИКАЦИЯ

Энтеровирусы относятся к роду *Enterovirus* и входят в семейство Пикорнавирусов (*Picornaviridae*). Энтеровирусы реплицируются в основном в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), что обусловлено их устойчивостью к кислой среде желудка. Они также устойчивы к действию многих детергентов, дезинфицирующих средств и длительно сохраняют жизнеспособность при комнатной



Организация энтеровирусного генома и кодируемых им белков. IRES I – участок внутренней посадки рибосом первого типа; 5'-НТО и 3'-НТО – 5'- и 3'-нетранслируемые районы. Стрелки снизу показывают расщепление энтеровирусного полипротеина двумя вирусными протеазами (2A и 3C) на три фрагмента: P1, P2 и P3.

температуре. Энтеровирусы распространены повсеместно, насчитывая, по меньшей мере, 10 видов, каждый из которых подразделяют на отдельные гено- и серотипы. Среди энтеровирусов встречаются как патогенные для человека, так и такие, связь которых с заболеваниями не установлена [29]. Возбудитель полиомиелита (полиовирус) также относится к роду энтеровирусов.

Энтеровирусы представляют собой безоболочечные вирусы, вирионы которых имеют форму икосаэдра диаметром 28–30 нм. Их капсид состоит из четырех структурных белков, VP1–VP4 [30], из которых VP1–VP3 формируют внешнюю поверхность, а VP4 расположен внутри капсида. Геном энтеровирусов представлен одноцепочечной (+)РНК размером 7.2–8.5 т.н., которая обладает инфекционностью при ее введении в клетки. Геномная РНК содержит единственную открытую рамку трансляции (ОРТ), 5'- и 3'-некодирующие участки и поли(А)-последовательность на 3'-конце (рисунок). 5'-конец генома ковалентно связан с белком VPg [31, 32]. 5'-нетранслируемая область (НТО) сильно структурирована, она содержит участки, необходимые для репликации генома, а также сайт внутренней посадки рибосом (IRES), используемый для кеп-независимой трансляции вирусной РНК [33, 34]. 3'-НТО генома энтеровируса важна для инициации синтеза (–)РНК [35]. Вирусная РНК без поли(А)-последовательности утрачивает инфекционность [36]. Геномная РНК энтеровирусов способна к рекомбинации с относительно высокой частотой [37]; чем выше гомология между РНК различных энтеровирусов, тем с большей вероятностью может происходить их взаимная рекомбинация [30].

Репликация энтеровирусной РНК, как и сборка вирионов, происходит в цитоплазме инфицированной клетки. Геномная вирусная РНК, попавшая в цитоплазму, транслируется с образованием единого белка-предшественника [38]. В дальнейшем белок-

предшественник разрезается вирусными протеазами сначала на три фрагмента, а потом на зрелые вирусные белки (рисунок). Кроме структурных белков вириона, белок-предшественник содержит вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу и ряд других неструктурных белков, участвующих в репликации генома. Эти белки обеспечивают синтез промежуточной (–)РНК, что далее приводит к синтезу новых геномных (+)РНК. По мере синтеза и накопления капсидных белков происходит формирование вирионов.

Для заражения клетки энтеровирусы используют в качестве рецепторов и корецепторов различные поверхностные клеточные белки. Многие энтеровирусы связываются с фактором CD55/DAF, одним из компонентов каскада комплемента. Однако большинству энтеровирусов для эффективного заражения клетки недостаточно одного взаимодействия с CD55. Например, некоторым ЕСНО-вирусам в качестве корецептора нужен β₂-микроглобулин [39], а большинство представителей Коксаки группы А взаимодействуют одновременно с CD55 и молекулой интегрина ICAM-1 [40, 41]. Вирусы Коксаки группы В в основном используют так называемый рецептор вирусов Коксаки и аденовирусов (CAR), белок с молекулярной массой 46 кДа, который относится к суперсемейству иммуноглобулинов [42–44], а посредником при проникновении полиовирусов в клетку служит гликопротеин CD155 [45].

Энтеровирусы попадают в организм через слизистую оболочку верхних дыхательных путей или ЖКТ, после чего они размножаются преимущественно в лимфоидных образованиях носоглотки (аденоиды и миндалины) и тонкого кишечника (Пейеровы бляшки). Обычно инфекция протекает достаточно легко и бессимптомно, реже с признаками легкого недомогания – лихорадкой, головной болью, тошнотой, болями в брюшной области,

рвотой [29]. Энтеровирусы, при их распространении за пределы ЖКТ, могут вызывать заболевания различной степени тяжести [30]. Тяжелейшей энтеровирусной инфекцией является полиомиелит. Чаще всего полиовирусы реплицируются в ЖКТ почти бессимптомно, но иногда вирус проникает в центральную нервную систему (ЦНС), где поражает моторные нейроны передних рогов спинного мозга. У перенесших полиомиелит часто сохраняются стойкие парезы и параличи разных групп мышц, что порой приводит к пожизненной инвалидности. Вирусы Коксаки групп А и В, вирусы ЕСНО и другие энтеровирусы как правило не столь опасны, хотя иногда могут вызывать такие тяжелые заболевания, как асептический серозный менингит, менингоэнцефалит, острый миокардит и геморрагический синдром новорожденных [46, 47]. Кроме того, эти вирусы могут вызывать ОРВИ, диарею, геморрагический конъюнктивит и Борнхольмскую болезнь (эпидемическую плевродию). Некоторые вирусы Коксаки группы А (серотипы 46, 9, 10 и 16), группы В (серотипы 2 и 5), а также энтеровирус 7 часто определяются как возбудители энтеровирусного стоматита, который иногда протекает в виде энтеровирусной экзантемы полости рта и конечностей [30]. Вирусы ЕСНО-11 и ЕСНО-19 могут вызывать воспаление оболочки глаза, энтеровирусный увеит, нередко приводящий к слепоте [48, 49]. Эти вирусы могут также вызвать геморрагический синдром новорожденных [50, 51]. Несмотря на внушительный список заболеваний, более чем в 90% случаев заражения полиовирусами, и по меньшей мере в 50% случаев заражения другими энтеровирусами, инфекции протекают стерто или бессимптомно, что позволяет считать ряд представителей энтеровирусов апатогенными вирусами-сапрофитами [52–54].

ОНКОТРОПНЫЕ И ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНТЕРОВИРУСОВ

Сообщения об онколитических свойствах различных энтеровирусов начали появляться с 1950-х годов [55, 56]. Комплексные исследования онколитической активности энтеровирусов проводились как на животных моделях солидных опухолей, так и в экспериментах на добровольцах. Особенно подробно описаны результаты изучения вирусов ЕСНО серотипов 1, 7 и 12 [53, 57–59], полиовируса типа 1 [60–63] и вируса Коксаки А21 [64–66].

Существенные различия в патогенности отдельных представителей энтеровирусов обусловили два основных подхода к исследованию их онколитической активности. Онколитический потенциал апатогенных и крайне низкопатогенных вариантов можно изучать без введения каких-либо модификаций. В то же время, патогенные вирусы необходимо предварительно аттенуировать, в том числе

путем создания методами генетической инженерии рекомбинантных вариантов с повышенной селективностью в отношении опухолевых клеток при снижении способности размножаться в здоровых клетках.

Одними из первых для изучения противоопухолевой активности энтеровирусов стали использовать вирусы ЕСНО. Этот акроним от Enteric Cytopathic Human Orphan означает, что энтеровирусы ЕСНО оказывают цитопатическое действие в культуре клеток и являются “сиротами”, т.е. не связаны с какими-либо заболеваниями человека. Впоследствии связь некоторых представителей энтеровирусов с заболеваниями все же была установлена, однако это название прочно утвердилось. Ряд непатогенных вирусов ЕСНО, а также некоторые штаммы вирусов Коксаки выделили от совершенно здоровых детей в ходе массовой вакцинации против полиомиелита в конце 1950-х гг., в ходе изучения причин отсутствия иммунитета против вакцинного полиовируса у некоторых детей. Выяснилось, что одновременное протекание бессимптомной энтеровирусной инфекции препятствует заселению кишечника вакцинным полиовирусом вследствие эффекта интерференции.

Живые энтеровирусные вакцины

Оказалось, что выделенные от здоровых детей штаммы непатогенных энтеровирусов ЕСНО и Коксаки способны не только препятствовать заселению кишечника вакцинными штаммами полиовируса, но и предотвращать развитие ряда вирусных заболеваний за счет феномена интерференции. На основе коллекции непатогенных штаммов энтеровирусов, выделенных из фекалий здоровых новорожденных и детей дошкольного возраста, под руководством М.К. Ворошиловой в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР в 1960–1970-е годы были созданы живые энтеровирусные вакцины (ЖЭВ) [67]. После тщательного изучения свойств штаммы ГС-ЕСНО-1 и Л572-ЕСНО-12 [68, 69] были признаны вакцинными и использованы для производства живых энтеровирусных вакцин ЖЭВ-4 и ЖЭВ-7 соответственно [52, 53, 70]. Первоначально планировалось использовать ЖЭВ для борьбы с энтеровирусными инфекциями путем вытеснения болезнетворных вирусов конкурирующими непатогенными симбионтами. В дальнейшем показали, что ЖЭВ способны ограничивать развитие инфекций, вызываемых не только патогенными энтеровирусами, но и вирусом гриппа, другими возбудителями ОРВИ, вирусом герпеса и пр. [52, 53, 67], по-видимому, из-за эффекта интерференции вследствие стимуляции образования интерферона реплицирующимися непатогенными вирусами. ЖЭВ также испытывали в качестве средства против некоторых хрониче-

ческих заболеваний (герпетические поражения, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, прогрессивные формы клещевого энцефалита) и злокачественных опухолей [52, 53].

В 1958–1968 гг. в ряде клиник на 1452 онкологических больных с поздними стадиями опухолевого процесса и неэффективностью традиционной терапии испытывали три штамма живой вакцины против полиомиелита и штаммы ЖЭВ и в ряде случаев отмечали положительный клинический эффект [53]. В частности, улучшение состояния, стабилизацию или уменьшение размеров опухоли наблюдали у 58% больных в группе из 248 человек, что позволяло осуществить в дальнейшем хирургическое вмешательство [53]. Наилучшие результаты отмечены при опухолях ЖКТ [71]. При этом установлено, что непатогенные энтеровирусы способны размножаться в клетках опухоли [72], служат мощными индукторами образования интерферона и активаторами Т-клеточного иммунитета, благотворно влияют на лейкопоэз, вызывают радиопротективный эффект и могут использоваться в комплексе с другими методами терапии опухолей [53, 73, 74].

Разработка онколитического энтеровирусного препарата Ригвир

С начала 1960-х гг. онколитическую активность ЕСНО-вирусов изучали также в Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латвийской ССР под руководством А. Я. Муцениеце [59]. Для повышения онколитической активности природные энтеровирусные штаммы многократно пассировали в культурах клеток опухолей человека. В 1968 г. были начаты клинические испытания пяти аттенуированных онколитических штаммов энтеровирусов группы ЕСНО. В испытаниях участвовали добровольцы – больные раком IV стадии, у которых традиционные методы терапии оказались неэффективными. Вирусные препараты вводили путем внутримышечных инъекций. При этом у некоторых больных отмечалась гибель части клеток опухоли с характерными для энтеровирусов цитопатическими признаками, но в целом эффективность терапевтического действия была низкой. По мнению авторов, это было связано со значительной массой опухоли и быстрым развитием противовирусного иммунитета. На этом основании предложена стратегия, включающая радикальное хирургическое вмешательство, с последующим применением виротерапии для уничтожения оставшихся опухолевых клеток и метастазов и стимуляции противоопухолевого иммунитета [75].

По результатам проведенных испытаний штамм энтеровируса ЕСНО-7, обладавший наиболее выраженными онколитическими свойствами, отобран для дальнейшего изучения и назва-

ли Rīgvīr [76, 77]. С 1988 года проводилась фаза III клинических испытаний, в которой сравнивали эффективность Rīgvīr с эффективностью оперативной, лучевой и химиотерапии. В 2004 году Rīgvīr был запатентован и официально зарегистрирован в качестве лекарственного средства в Латвии, став первым в мире энтеровирусным препаратом, который, пройдя полный цикл клинических исследований, применяется в онкотерапии. С 2008 года препарат Rīgvīr доступен в аптеках и медицинских учреждениях Латвии как строго рецептурное средство. Информацию о свойствах и применении данного препарата можно найти на сайте Латвийского центра виротерапии (www.viroterapija.lv).

Онколитические свойства вирусов ЕСНО

Развитие молекулярной и клеточной биологии позволило выйти на новый уровень исследования онколитических энтеровирусов. Энтеровирус ЕСНО-1 (штамм Faouk) на протяжении ряда лет используется в качестве модели онколитического вируса в университете австралийского города Ньюкасл, [57, 58, 78]. В частности, установлена способность ЕСНО-1 вызывать лизис всех восьми использованных линий клеток рака яичников. Отмечено существенное подавление метастазирования и роста опухолей, культивируемых *in vivo* в иммунодефицитных мышах [78]. Онколитические свойства вируса ЕСНО-1 подтверждены также на модели мышинных ксенотрансплантатов клеток рака предстательной железы человека [57]. С целью изучения онколитических свойств вируса динамику роста и лизиса ксенотрансплантатов метастазирующих линий клеток рака желудка определяли по биолюминесценции клеток, экспрессирующих люциферазу, [58]. Однократная внутриопухолевая инъекция вируса ЕСНО-1 приводила к существенному замедлению роста опухоли и уменьшению метастазирования. Преимущество вируса перед другими противоопухолевыми средствами состоит в его способности находиться в организме в течение длительного времени благодаря постоянному размножению в клетках опухоли, что делает излишним повторное введение [58].

Интенсивно изучается также механизм избирательности вируса ЕСНО-1 в отношении опухолевых клеток. Этот вирус проникает в клетки, связываясь с клеточным рецептором VLA-2 – интегрином $\alpha_2\beta_1$ [79]. Поверхностные белки вируса взаимодействуют с доменом I α_2 -субъединицы этого рецептора [80]. Интегрин $\alpha_2\beta_1$ интенсивно продуцируется в клетках рака яичников, желудка, предстательной железы и других органов, что отчасти обуславливает повышенный тропизм вирусов ЕСНО в отношении клеток злокачественных опухолей [57, 58, 81]. Этот интегрин участвует во

взаимодействии с белками внеклеточного матрикса — коллагеном типа I и ламинином. Усиленная экспрессия интегрин $\alpha_2\beta_1$ может способствовать распространению злокачественной опухоли, в частности, метастазированию в брюшную полость [82–85]. Предполагается, что взаимодействие опухолевых клеток, несущих интегрин $\alpha_2\beta_1$, с вирусом ЕСНО-1 может препятствовать их распространению по организму вследствие конкуренции вируса за связывание с белками внеклеточного матрикса [58]. Следует отметить, что механизмы собственно цитолитической активности вируса ЕСНО-1 пока изучены недостаточно. Установлено, что для эффективного размножения вируса необходим не только интегрин $\alpha_2\beta_1$ на поверхности клетки, что указывает на существование дополнительных механизмов, обеспечивающих восприимчивость клеток [58]. В отличие от ряда других вирусов, ЕСНО-1 связывается с $\alpha_2\beta_1$ -интегрином, находящимся в неактивном конформационном состоянии. Это приводит к кластеризации интегрин на поверхности клеток и активации сигнальных путей, способствующих проникновению вируса в клетку путем эндоцитоза, причем механизм взаимодействия вируса с $\alpha_2\beta_1$ -интегрином отличается от механизма взаимодействия между белками внеклеточного матрикса и интегрином, что приводит к активации других сигнальных путей эндоцитоза [86]. Детальные механизмы этого процесса еще предстоит выяснить.

Онколитические свойства вирусов Коксаки

Энтеровирусы Коксаки (*Coxsackievirus*) подразделяются на группы А и В. Первые данные об онколитической активности нескольких представителей группы В вирусов Коксаки были получены еще в середине XX века [12]. Однако более углубленное изучение онколитического потенциала вирусов Коксаки было проведено за последние годы на модели вирусов группы А, в основном Коксаки А21 (штамм Kuykendall) [64–66].

Вирус Коксаки А21 в качестве рецептора использует одновременно две молекулы — CD55/DAF и молекулу интегрин ICAM-1 [40, 41]. Эти рецепторы в умеренных количествах представлены на поверхности клеток нормального эпителия дыхательных путей [87]. При этом молекулы ICAM-1 и DAF зачастую в большом количестве присутствуют на поверхности клеток многих опухолевых линий, что определяет их повышенную чувствительность к вирусу Коксаки А21. Эти же молекулы способствуют проявлению злокачественных свойств опухолевых клеток, большое количество DAF на поверхности опухолевых клеток защищает их от цитотоксического действия комплемента [88], а ICAM-1, взаимодействуя с антигеном цир-

кулирующих лимфоцитов LFA-1, способствует метастазированию [89].

Онколитическая активность вируса Коксаки А21 показана на различных видах опухолей как *in vitro*, так и на животных моделях. По результатам проведенных тестов этот вирус оказался эффективным онколитиком для клеток злокачественной меланомы [60, 90, 91], множественной миеломы [64], рака молочной [66] и предстательной железы [57].

Чувствительность опухолевых клеток к вирусам Коксаки определяется не только соответствующими рецепторными молекулами, представленными на их поверхности, но и рядом других факторов, в том числе соотношением скорости репликации вируса и скорости роста опухоли. Математическое моделирование предсказывает, что вирусный онколиз менее эффективен в отношении быстрорастущих опухолей, когда прирост опухолевых клеток может превышать число погибших [92]. Справедливость такого предсказания подтверждена при сравнении эффективности онколиза двух морфологически близких линий меланом, отличающихся по скорости роста на мышах с иммунодефицитом. Линии SK-Mel-28 (медленнорастущая) и ME4405 (быстрорастущая) экспрессируют одинаковые уровни рецепторов ICAM-1 и DAF и обладают одинаковой способностью реплицировать вирус Коксаки А21. Динамика онколитической активности этого вируса оказалась выше на медленнорастущей линии клеток SK-Mel-28. Это, однако, не означает, что онколитическая терапия неперспективна для быстрорастущих опухолей, поскольку, несмотря на различную динамику уничтожения опухолевых клеток, однократное введение вируса Коксаки А21 внутрь опухоли или внутрибрюшинно приводило к значительному уменьшению размера опухоли как SK-Mel-28, так и ME4405 и даже к полному их исчезновению [65].

Онколитическую активность вируса Коксаки А21 изучали также на клетках множественной миеломы *in vitro* [64]. Результатом введения CV-A21 в образцы биопсий костного мозга больных множественной миеломой стало уничтожение 98.7% CD138+ плазматических клеток. Эти данные указывают на возможности виротерапии с использованием CV-A21 непосредственно перед процедурой трансплантации аутологичных стволовых клеток с целью избавления от злокачественных плазматических клеток *ex vivo*.

Получены данные о чувствительности к вирусу Коксаки А21 и клеток рака молочной железы [66]. Заражение вирусом с высокой множественностью приводило к быстрому цитопатическому действию в восьми из девяти использованных линий клеток рака молочной железы, причем в контрольной линии нормальных клеток молочной железы цитопатическое действие отсутствовало.

тического действия не отмечалось. Онколитическую эффективность вируса Коксаки A21 оценивали с использованием биолюминесцентных моделей ксенотрансплантатов рака молочной железы на мышах с иммунодефицитом (линии опухолевых клеток T47D и клеток MDA-MB-231). Уже к 42-му дню после однократного внутривенного введения вируса у мышей исчезали метастазы, а объем первичных опухолей не превышал одной трети от исходного, в то время как в контрольной группе объем опухолей достигал 300–5000% от исходного уровня. Отмечено, что у части мышей вирус находился в организме до конца эксперимента, поскольку его репликация поддерживалась за счет остаточных опухолевых клеток, служивших субстратом для репликации вируса. Тем не менее, подобное длительное присутствие вируса не вполне отражает реальную ситуацию, поскольку в экспериментах использовали мышей с иммунодефицитом, которые не обладают противовирусным иммунитетом. В реальности развитие иммунного ответа против вируса, либо иммунитет в результате ранее перенесенной бессимптомной инфекции могут несколько ослабить терапевтическое действие. Учитывая это, перспективным представляется проведение нескольких последовательных курсов вирусов Коксаки различных серотипов, тем более что ряд таких вирусов (серотипы A13, A15, A18 и A21) имеют сходную онколитическую эффективность [55].

В связи с тем, что чувствительность разных опухолей к вирусу может варьировать, эффективность терапии можно повысить за счет комбинированного применения онколитического вируса и химиотерапии. Такую возможность изучали на линиях клеток рака молочной железы (MDA-MB-231 и T47D), поджелудочной железы (PANC-1) и прямой кишки (DLD-1) [91]. Все эти линии клеток характеризуются высоким уровнем рецепторов ICAM-1, но экспрессия DAF в клетках PANC-1 и DLD-1 была низкой. Комбинация вируса Коксаки A21 и доксорубина оказывала синергический эффект во всех использованных клетках *in vitro* и приводила к значительному ускорению их гибели. Ксенотрансплантаты клеток MDA-MB-231, меченных люциферазой, также оказались чувствительными к комбинации вируса Коксаки A21 и доксорубина, причем терапевтический эффект обеспечивали дозы доксорубина, значительно меньшие, применяемых при монотерапии. Ввиду перспективности применения вируса Коксаки A21 в качестве онколита, в Австралии с 2009 года проводятся клинические испытания (фазы I и II) препарата на основе этого вируса (CAVATAK™, www.viralytics.com) на больных опухолями головы и шеи, злокачественной меланомой, раком молочной и поджелудочной железы.

Онколитические свойства аттенуированных штаммов полиовирусов

Полиовирусы являются возбудителями полиомиелита, при котором поражаются моторные нейроны спинного мозга. Патогенные штаммы вируса полиомиелита дикого типа подразделяются на три серотипа, поэтому для профилактики полиомиелита используется живая оральная вакцина, представляющая собой вакцинные аттенуированные штаммы полиовируса серотипов I, II и III, полученные в 1950-х годах А. Сэбиным [93]. Эти штаммы полностью лишены нейровирулентности, хотя сохраняют способность размножаться в кишечнике и вызывать стойкий пожизненный иммунитет. Вакцинные штаммы полиовируса – типичные непатогенные энтеровирусы, пригодные для испытания онколитических свойств. Онколитическая активность вакцинных штаммов показана в ряде ранних работ [52, 53, 72]. В последние годы в связи с развитием методов генетической инженерии полиовирусы стали активно применяться для создания рекомбинантных вариантов, в том числе с усиленными онколитическими свойствами [94, 95].

Единственный клеточный рецептор полиовирусов – гликопротеин CD155, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов [45]. Как и другие рецепторы энтеровирусов, этот белок в больших количествах экспонируется на поверхности опухолевых клеток различного происхождения, включая эпидермальные и остеогенные карциномы, рак молочной железы и толстого кишечника, нейробластома и другие [96–98]. Высокий уровень продукции CD155 часто отмечается в злокачественных опухолях нейроэктодермального происхождения – астроцитоме, олигодендроглиоме и мультиформной глиобластоме [96–98]. При этом в нетрансформированных клетках CD155 экспрессируется на исключительно низком уровне, что, по-видимому, определяет нечувствительность этих клеток к полиовирусам [96]. Установлено, что повышенная представленность CD155 на поверхности многих опухолевых клеток определяется активностью морфогенного фактора Sonic hedgehog (Shh) и факторами транскрипции Gli1 и Gli3 [99]. Сигнальный путь фактора Shh в норме активен только в эмбриогенезе, однако многие виды рака характеризуются его патологической активацией [100]; благодаря этому CD155 является маркером различных линий раковых клеток, а опухоли, экспрессирующие CD155, представляют собой потенциальные мишени для онколитического действия полиовирусов.

Поскольку применение больших терапевтических доз полиовирусов в онкотерапии несет потенциальную угрозу реверсии вакцинного вируса к дикому типу, особое внимание на начальных стадиях

исследований уделялось вопросам безопасности. Для этого генно-инженерными методами на основе полиовируса типа I (штамм Mahoney) были созданы векторы, так называемые антиопухолевые репликоны [101, 102]. В этих векторах ген, кодирующий капсидный белок VP1, заменен геном *gag* вируса иммунодефицита человека типа 1. Сборка полноценных вирусных частиц достигалась одновременным заражением клеток полиовирусом и вирусом-помощником — штаммом вируса осповакцины, несущим ген капсидного белка VP1. Полученный рекомбинантный полиовирусный репликон был способен инфицировать клетку и амплифицироваться в ней, но дальнейшего инфицирования вирусными частицами других клеток при этом не происходило [103, 104]. Такой репликон амплифицировался в различных первичных культурах тканей из опухолей ЦНС (злокачественная глиома, астроцитомы, глиосаркома, нейробластома, менингиома и анапластическая глиома) [102]. При заражении наблюдалось характерное цитопатическое действие — образование вакуолей, округление клеток, разрывы клеточной мембраны. Далее онколитическую активность полиовирусов проверили на линиях опухолевых клеток различного происхождения, включая клетки рака молочной железы (BT20), прямой кишки (DLD-1), шейки матки (A-431) и меланомы (SK-MEL-2, SK-MEL-21, SK- и MEL-28). Цитопатическое действие в той или иной мере отмечено на всех использованных опухолевых клетках за исключением клеток лимфомы Беркитта (штамм Raji), в которых ген *CD155* не транскрибируется [105]. Чувствительность к полиовирусным репликонам показана также *in vivo* с использованием ксенотрансплантатов клеток глиомы D54-MG на мышцах с иммунодефицитом. Виротерапия сопровождалась статистически значимым увеличением выживаемости мышей с трансплантированной опухолью [102].

Безопасность рекомбинантных полиовирусных репликонов испытывали на трансгенных мышцах, экспрессирующих рецептор полиовируса. Такие мыши обычно чрезвычайно чувствительны к заражению полиовирусом дикого типа. Введение этим мышам внутриспинально полиовирусных репликонов в дозе, в 10000 раз превышающей летальную дозу полиовируса дикого типа, не приводило к видимым патологическим проявлениям [102]. На основе этих данных считается целесообразным использовать полиовирусные репликоны в качестве виротерапии для разрушения микрометастазов внутри ЦНС после хирургического удаления первичной опухоли [102].

Онколитическая виротерапия представляет собой один из наиболее перспективных методов терапии опухолей ЦНС. Сейчас метастазирование опухолей в ЦНС означает наступление терминальной стадии заболевания, при которой средняя про-

должительность жизни обычно не превышает одного года. Неблагоприятный прогноз, в частности, связан с ограниченной возможностью использования лучевой терапии из-за угрозы радиационного некроза тканей головного мозга, а доставка лекарств в головной и спинной мозг затруднена наличием гематоэнцефалического барьера [100].

Вариантом онколитического полиовируса, перспективным в случае опухолей ЦНС, считается генетически модифицированный штамм PV-RIPO (варианты PV1-RIPO и PVS-RIPO) [96], производное вакцинного штамма полиовируса типа I Сэбина. Этот рекомбинантный вирус содержит IRES риновируса человека типа 2 (HRV2). PV-RIPO не способен размножаться в нормальных клетках нейрогенного происхождения и, в отличие от исходного вакцинного штамма, не вызывает менингит у трансгенных мышей, несущих *CD155* [106].

Изучение молекулярных основ взаимодействия нейронов с PV-RIPO показало, что IRES HRV2 взаимодействует с гетеродимером белка, связывающего двухцепочечные РНК (DRBP76), и ядерным фактором активированных Т-клеток (NF45). Гетеродимер DRBP76 специфичен для нейронов, он располагается преимущественно в цитоплазме, где участвует в процессах трансляции. Связывание этого гетеродимера предотвращает инициацию трансляции в нейронах за счет подавления IRES HRV2 [107, 108]. Установлено, что замена IRES в RV-RIPO не влияет на высокую онколитическую активность полиовируса. Повышенная активность IRES HRV2 в быстрорастущих злокачественных клетках свидетельствует о принципиальных отличиях в регуляции скорости трансляции в клетках опухолей, что делает их чувствительными к онколитическому действию PV-RIPO. Многие детали молекулярных механизмов онколитической активности вирусов изучены не до конца, поскольку в них участвует множество регуляторных белков, канонических и неканонических факторов трансляции, IRES-связывающих белков и пр. [59].

Онколитическую активность штамма PV-RIPO испытывали не только на первичных злокачественных опухолях нервной системы, но и на метастазах рака молочной железы в головной мозг как *in vitro*, так и на животных моделях. Используемые с этой целью модельные клетки рака молочной железы экспрессировали *CD155* на высоком уровне, что обеспечивало их высокую чувствительность к онколитическому действию полиовируса *in vitro*. Онколитическое действие PV-RIPO в отношении метастазов рака молочной железы в субарахноидальное пространство и в паренхиму головного мозга изучали на бестимусных крысах с иммунодефицитом. Показана высокая эффективность PV-RIPO при введении как внутриспинально, так и под мозговую

оболочку [100]. Оценили также возможность применения рекомбинантного штамма PV-RIPO в терапии злокачественного менингита, сопровождающего мультиформные глиобластомы. Эту работу выполняли на трансгенных мышах, экспрессирующих CD155, а также на бестимусных крысах. При введении вируса в спинной мозг признаков токсичности не отмечалось, при этом срок жизни мышей достоверно увеличивался, а у части крыс наблюдалась стойкая ремиссия, вплоть до полного исчезновения трансплантированной опухоли [109].

Поскольку при использовании аттенуированных вирусов существует риск реверсий и восстановления патогенности, стабильность рекомбинантного штамма PV-RIPO подтверждали серийными пассажами на ксенотрансплантатах клеток мультиформной глиобластомы НТВ-15 с последующей проверкой генетических и фенотипических характеристик данного штамма. Оказалось, что вирус сохраняет все признаки исходного штамма, а также свои онколитические свойства [60]. При этом через 10 дней после внутриопухолевого введения вирус обнаруживался в организме животного в крайне незначительных количествах и полностью отсутствовал через 28 дней. Таким образом, вирус не обладал способностью к длительной персистенции в организме после того как исчезли доступные жизнеспособные опухолевые клетки, на которых он мог размножаться [60].

В настоящее время химерный штамм PV-RIPO находится на завершающей стадии испытаний на животных моделях, и в ближайшее время планируется начать его клинические испытания [106].

Другой перспективной областью применения онколитических полиовирусов может стать терапия нейробластом — солидных опухолей, достаточно часто встречающихся у детей. Нейробластомы слабо поддаются терапии, поэтому прогноз заболевания обычно неблагоприятный.

Онколитическое действие аттенуированного полиовируса показано на клетках нейробластом как *in vitro*, так и на модели их ксенотрансплантатов *in vivo* на мышах с иммунодефицитом [62, 63]. Мышам с трансплантированными опухолевыми клетками SJ-N-JF вводили внутрь опухоли аттенуированный штамм полиовируса, что сопровождалось быстрым разрушением клеток опухоли и ее полным исчезновением. В опытах *in vitro* живой аттенуированный полиовирус вызвал гибель 27 из 29 использованных линий клеток нейробластомы [63].

С целью обеспечения максимальной безопасности виротерапии на основе полиовируса типа I (штамм Mahoney) был создан штамм A₁₃₃Gmono-crePV, обладавший онколитической активностью в отношении нейробластомы [95]. Этот рекомбинантный штамм содержит точечную мутацию в спейсерном районе 5'-НТО вирусного генома [95],

которая вызывает ослабление нейровирулентных свойств полиовируса более чем в 1000 раз, вероятно, за счет снижения уровня трансляции вирусной РНК [110]. Для предотвращения возможности реверсий такого штамма к вирусу дикого типа в спейсерный участок 5'-НТО встроили необходимый для вирусной репликации геномный элемент *cre*, расположенный исходно внутри гена вирусного белка 2C^{ATPase} [111, 112]. Аттенуированный таким образом вирус стабилен, обладает способностью эффективно реплицироваться в клетках нейробластомы и вызывать их разрушение.

Применению онколитической виротерапии может препятствовать преобладающий иммунитет к применяемому вирусу или быстрое развитие иммунного ответа при введении онколитического вируса. Первоначально аттенуированные и рекомбинантные полиовирусы испытывали на мышах с иммунодефицитом, что не позволяло оценить ограничения, накладываемые развитием противовирусного иммунитета [61, 62]. Поэтому для тестирования онколитической активности штамма A₁₃₃Gmono-crePV использовали иммунокомпетентных трансгенных мышей линии CD155 tgA/J, экспрессирующих CD155 человека. Мыши этой линии высоковосприимчивы к полиовирусу и могут использоваться в качестве модели заболевания полиомиелитом [95]. Для имитации преобладающего противовирусного иммунитета мышей иммунизировали рекомбинантным полиовирусом mono-crePV, после чего вводили им клетки линии Neuro-2a^{CD155}, что приводило к формированию нейробластомы. Далее проводили курс внутриопухолевых инъекций препарата рекомбинантного вируса A₁₃₃Gmono-crePV. У девяти из 11 мышей опухоль исчезла полностью при отсутствии признаков нейротоксичности введенного препарата. У двух мышей опухоль возникла вновь через несколько месяцев после проведенной виротерапии, причем рецидивы опухоли оказывались устойчивыми к повторной терапии вирусом A₁₃₃Gmono-crePV. Выяснилось, что в этих случаях клетки опухолей обладали низким уровнем экспрессии рецептора CD155. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости комбинированной терапии нейробластом, поскольку монотерапия онколитическим вирусом может оказаться недостаточной для полного излечения. Комбинирование онколитической виротерапии, химиотерапии и радиотерапии может сопровождаться меньшей общей токсичностью, что позволит избежать или уменьшить сердечно-легочные осложнения, дисфункцию почек и нарушения в эндокринной системе.

Следует особо отметить, что мыши, полностью излеченные от нейробластомы с помощью онколитического вируса A₁₃₃Gmono-crePV, приобрели устойчивость к повторным попыткам индукции

опухоли введением клеток Neuro-2a^{CD155}. По-видимому, антигенпредставляющие клетки захватывают опухолевые антигены лизированных вирусом клеток, что приводит к специфической презентации пептидов и активации цитотоксических Т-клеток. Эти события ускоряют дальнейшее разрушение опухоли и индуцируют появление противоопухолевого иммунитета. Подобное действие наблюдали ранее и при использовании других онколитических вирусов [113–115]. Недавно были получены данные о приобретении иммунной устойчивости к нейробластоме в результате терапии онколитическим вирусом A₁₃₃G_{mono-cre}PV. Оказалось, что пересадка спленоцитов или CD8⁺ Т-клеток от мыши, вылеченной с помощью полиовирусной терапии, приводит к прекращению роста опухоли и у реципиентной мыши [63]. Эти результаты указывают на возможную перспективность сочетания виротерапии онколитическим вирусом A₁₃₃G_{mono-cre}PV с иммунотерапией полиовирусными онколизатами при нейробластоме.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЭНТЕРОВИРУСОВ В КАЧЕСТВЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Учитывая разнообразие клеточных рецепторов, используемых энтеровирусами для проникновения в клетку, онколитические препараты на основе этих вирусов могут быть эффективными против широкого спектра опухолей. Последовательное применение нескольких онколитических штаммов, представляющих различные типы энтеровирусов, может усилить терапевтическое воздействие [53]. Следует отметить высокую эффективность и перспективность уже имеющихся разработок [60, 95].

В то же время существуют и проблемы, связанные с особенностями биологии энтеровирусов. Во-первых, необходимо учитывать, что многие энтеровирусы потенциально патогенны для человека, и их применение может вызывать различного рода осложнения. Поэтому онколитические препараты возможны на основе либо исходно непатогенных штаммов энтеровирусов, либо их рекомбинантных аттенуированных вариантов. Однако применение исходно непатогенных штаммов энтеровирусов в качестве онколитических не гарантирует полностью их безопасность, поскольку энтеровирусы обладают высокой изменчивостью. Следует учитывать также склонность этих вирусов к рекомбинации, что может приводить к реверсии вируса к дикому типу, либо к появлению нового патогенного варианта, поэтому необходимо тщательно тестировать стабильность всех создаваемых онколитических препаратов на основе энтеровирусов. Наконец, способность вирусов к

уничтожению опухолей далеко не безгранична. Целесообразно проведение виротерапии в комбинации с другими методами. Особенно эффективно хирургическое удаление большей части опухолевых клеток с целью уменьшения вероятности образования вариантов, устойчивых к действию вируса. В этом случае виротерапия может быть показана для уничтожения клеток, оставшихся после удаления основной массы опухоли, и метастазов, недоступных для хирургического вмешательства.

Несмотря на указанные ограничения, дальнейшая разработка онколитических препаратов на основе энтеровирусов может оказаться весьма перспективным дополнением к уже существующим методам терапии опухолей. Разумное комбинирование хирургических, химических, радиационных и биологических методов противоопухолевой терапии, несомненно, позволит значительно снизить число случаев, не поддающихся полному излечению.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы по поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (НШ-2996.2012.4), Госконтракта (№ 02.740.11.0767) “Выявление вирусных возбудителей заболеваний, актуальных для здравоохранения Западной Сибири (гепатиты, гастроэнтериты, серозный менингит), изучение их генетического разнообразия в целях разработки и совершенствования диагностикумов”, Договора НГУ с Министерством образования и науки (№ 11.G34.31.0034) “Новые подходы к разработке лекарств: поиск, отбор и конструирование непатогенных для человека штаммов вирусов, перспективных для использования в качестве онколитических препаратов”, программы Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” и Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-00410).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bernier J., Hall E.J., Giaccia A. 2004. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat. Rev. Cancer*. **4**, 737–747.
2. Farber S., Diamond L.K. 1948. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N. Engl. J. Med.* **238**, 787–793.
3. Pui C.H., Robison L.L., Look A.T. 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. **371**, 1030–1043.
4. Bianchini C., Ciorba A., Pelucchi S., Piva R., Pastore A. 2011. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumori*. **97**, 137–141.
5. Litzow M.R. 2011. Pharmacotherapeutic advances in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia in adults. *Drugs*. **71**, 415–442.

6. Samant R.S., Shevde L.A. 2011. Recent advances in anti-angiogenic therapy of cancer. *Oncotarget*. **2**, 122–134.
7. Dock G. 1904. The influence of complicating diseases upon leukemia. *Am. J. Med. Sci.* **127**, 563–592.
8. De Pace N.G. 1912. Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia*. **9**, 82–86.
9. Levaditi C., Nicolau S. 1922. Sur la culture de virus vaccinal dans les neoplasmes epitheliaux. *CR Soc. Biol.* **85**, 928.
10. Levaditi C., Nicolau S. 1922. Affinite du virus herpetique pour les neoplasmes epitheliaux. *CR Soc. Biol.* **87**, 498–500.
11. Levaditi C., Nicolau S. 1923. Vaccine et neoplasmes. *Ann. Inst. Pasteur.* **37**, 443–447.
12. Suskind R.G., Huebner R.J., Rowe W.P., Love R. 1957. Viral agents oncolytic for human tumors in heterologous host; oncolytic effect of Coxsackie B viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 309–318.
13. Bluming A.Z., Ziegler J.L. 1971. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet*. **2**, 105–106.
14. Sinkovics J., Horvath J. 1993. New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirolology*. **36**, 193–214.
15. Lindenmann J., Klein P.A. 1967. Viral oncolysis: increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *J. Exp. Med.* **126**, 93–108.
16. Kunin C.M. 1964. Cellular susceptibility to Enteroviruses. *Bacteriol. Rev.* **28**, 382–390.
17. Asada T. 1974. Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer*. **34**, 1907–1928.
18. Southam C.M. 1960. Present status of oncolytic virus studies. *Trans NY Acad. Sci.* **22**, 657–673.
19. Moore A.E. 1952. Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumors. *Ann. NY Acad. Sci.* **54**, 945–952.
20. Moore A.E. 1954. Effects of viruses on tumors. *Annu. Rev. Microbiol.* **8**, 393–410.
21. Newman W., Southam C.M. 1954. Virus treatment in advanced cancer; a pathological study of fifty-seven cases. *Cancer*. **7**, 106–118.
22. Ворошилова М.К., Чумаков М.П., Королева Г.А., Грачев В.П., Лаврова И.К., Алпатов Г.А., Уманский К.Г., Ваганова Н.Т., Розенбаум Г.И., Чарцева В.Ф., Рабинович Е.А., Синяк Л.И., Лукина В.А., Чичельницкий Д.И. 1969. Дальнейшие наблюдения по безопасности и онколитической активности некоторых энтеровирусных вакцин, примененных в массивных дозировках при онкологических заболеваниях человека. В: *Вирусный онколиз и искусственная гетерогенизация опухолей*. Рига: с. 69.
23. Kuruppu D., Tanabe K.K. 2005. Viral oncolysis by herpes simplex virus and other viruses. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 524–531.
24. Everts B., van der Poel H.G. 2005. Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther.* **12**, 141–161.
25. Power A.T., Bell J.C. 2008. Taming the Trojan horse: optimizing dynamic carrier cell/oncolytic virus systems for cancer biotherapy. *Gene Ther.* **15**, 772–779.
26. Verheije M.H., Rottier J.M. 2012. Retargeting of viruses to generate oncolytic agents. *Adv. Virol.*, article ID 798526, 15 pages.
27. Mohr I. 2005. To replicate or not to replicate: achieving selective oncolytic virus replication in cancer cells through translational control. *Oncogene*. **24**, 7697–7709.
28. Dobbstein M. 2004. Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **273**, 291–334.
29. Ворошилова М.К. 1979. *Энтеровирусные инфекции человека*. М.: Медицина.
30. Pallansch M., Roos R. 2007. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. in: *Fields Virology*. Eds Knipe D.M., Howley P.M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 840–893.
31. Flanagan J.B., Petterson R.F., Ambros V., Hewlett N.J., Baltimore D. 1977. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**, 961–965.
32. Lee Y.F., Nomoto A., Detjen B.M., Wimmer E. 1977. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**, 59–63.
33. Duke G.M., Osorio J.E., Palmenberg A.C. 1990. Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 5' noncoding poly(C) tract. *Nature*. **343**, 474–476.
34. Hahn H., Palmenberg A.C. 1995. Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts. *J. Virol.* **69**, 2697–2699.
35. Todd S., Towner J.S., Brown D.M., Semler B.L. 1997. Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J. Virol.* **71**, 8868–8874.
36. Spector D.H., Baltimore D. 1974. Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **71**, 2983–2987.
37. Jarvis T.C., Kirkegaard K. 1992. Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.* **11**, 3135–3145.
38. Summers D.F., Maizel J.V., Jr. 1968. Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **59**, 966–971.
39. Ward T., Powell R.M., Pipkin P.A., Evans D.J., Minor P.D., Almond J.W. 1998. Role for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J. Virol.* **72**, 5360–5365.
40. Shafren D.R. 1998. Viral cell entry induced by cross-linked decay-accelerating factor. *J. Virol.* **72**, 9407–9412.
41. Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A., Burns G.F., Barry R.D. 1997. Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.* **71**, 4736–4743.

42. Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L., Finberg R.W. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. **275**, 1320–1323.
43. Carson S.D., Chapman N.N., Tracy S.M. 1997. Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 325–328.
44. Tomko R.P., Xu R., Philipson L. 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 3352–3356.
45. Mendelsohn C.L., Wimmer E., Racaniello V.R. 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*. **56**, 855–865.
46. Jenista J.A., Powell K.R., Menegus M.A. 1984. Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J. Pediatr.* **104**, 685–690.
47. Muir P., Kämmerer U., Korn K., Mulders M.N., Pöyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G.M., van Loon A.M. 1998. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union concerted action on virus meningitis and encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 202–227.
48. Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Lukashov A.N., Denisova E.V., Katargina L.A. 2004. enterovirus uveitis. *Rev. Med. Virol.* **14**, 241–254.
49. Lukashov A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Ilonen J., Karganova G.G., Reznik V.I., Hinkkanen A.E. 2003. Molecular epidemiology of enteroviruses causing uveitis and multisystem hemorrhagic disease of infants. *Virology*. **307**, 45–53.
50. el-Sageyer M.M., Szendrői A., Hütter E., Uj M., Szücs G., Mezey I., Tóth I., Kátai A., Kapiller Z., Páll G., Petrás G., Szalay E., Mihály I., Gourova S., Berencsi G. 1998. Characterisation of an echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary. *Acta Virologica*. **42**, 157–166.
51. Rabkin C.S., Telzak E.E., Ho M.S., Goldstein J., Bolton Y., Pallansch M., Anderson L., Kilchevsky E., Solomon S., Martone W.J. 1988. Outbreak of echovirus 11 infection in hospitalized neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 186–190.
52. Voroshilova M.K. 1989. Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease. *Prog. Med. Virol.* **36**, 191–202.
53. Ворошилова М.К. 1988. Вирусологические и иммунологические аспекты применения ЖЭВ при онкологических заболеваниях. В кн.: *Полезные для организма непатогенные штаммы энтеровирусов: профилактическое и лечебное их применение*. М.: Медицина, 24–29.
54. Ворошилова М.К. 1977. Эволюция энтеровирусных инфекций. *Вестник АМН СССР*. 42–50.
55. Au G.G., Beagley L.G., Haley E.S., Barry R.D., Shafren D.R. 2011. Oncolysis of malignant human melanoma tumors by Coxsackieviruses A13, A15 and A18. *Viol. J.* **8**, 22.
56. Taylor M.W., Cordell B., Souhrada M., Prather S. 1971. Viruses as an aid to cancer therapy: regression of solid and ascites tumors in rodents after treatment with bovine enterovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **68**, 836–840.
57. Berry L.J., Au G.G., Barry R.D., Shafren D.R. 2008. Potent oncolytic activity of human enteroviruses against human prostate cancer. *Prostate*. **68**, 577–587.
58. Haley E.S., Au G.G., Carlton B.R., Barry R.D., Shafren D.R. 2009. Regional administration of oncolytic Echovirus 1 as a novel therapy for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *J. Mol. Med.* **87**, 385–399.
59. Муцениеце А.Я. 1978. Изучение чувствительности меланом человека к энтеровирусам, адаптированным к этим опухолям. В кн.: *Вирусы в терапии опухолей*. Рига: Зинатне, 175–189.
60. Dobrikova E.Y., Broadt T., Pooley-Nelson J., Yang X., Soman G., Giardina S., Harris R., Gromeier M. 2008. Recombinant oncolytic poliovirus eliminates glioma *in vivo* without genetic adaptation to a pathogenic phenotype. *Mol. Ther.* **16**, 1865–1872.
61. Gromeier M., Lachmann S., Rosenfeld M.R., Guttin P.H., Wimmer E. 2000. Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6803–6808.
62. Toyoda H., Ido M., Hayashi T., Gabazza E.C., Suzuki K., Kisenge R.R., Kang J., Hori H., Komada Y. 2004. Experimental treatment of human neuroblastoma using live-attenuated poliovirus. *Int. J. Oncol.* **24**, 49–58.
63. Toyoda H., Wimmer E., Cello J. 2011. Oncolytic poliovirus therapy and immunization with poliovirus-infected cell lysate induces potent antitumor immunity against neuroblastoma *in vivo*. *Int. J. Oncol.* **38**, 81–87.
64. Au G.G., Lincz L.F., Enno A., Shafren D.R. 2007. Oncolytic Coxsackievirus A21 as a novel therapy for multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **137**, 133–141.
65. Au G.G., Lindberg A.M., Barry R.D., Shafren D.R. 2005. Oncolysis of vascular malignant human melanoma tumors by Coxsackievirus A21. *Int. J. Oncol.* **26**, 1471–1476.
66. Skelding K.A., Barry R.D., Shafren D.R. 2009. Systemic targeting of metastatic human breast tumor xenografts by Coxsackievirus A21. *Breast Cancer Res. Treat.* **113**, 21–30.
67. Чумаков М.П., Ворошилова М.К., Андупова А.С., Бойко В.М., Блинова М.И., Приймаги Л.С., Родин В.И., Сейбиль В.Б., Сияк К.М., Смородинцев А.А., Степанчук В.А., Терехов С.Н., Трофимова Л.И., Чумаков П.М. 1992. Живые энтеровирусные вакцины для экстренной профилактики массовых респираторных заболеваний во время осенне-зимних эпидемий гриппа и острых респираторных заболеваний. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и инфекционных заболеваний*. 37–40.
68. Ворошилова М.К., Тольская Е.А., Королева Г.А., Чумаков К.М., Чумаков П.М. 1970. Изучение биологических и морфологических свойств вирусов ЕСНО-I и ЕСНО-12. *Энтеровирусные инфекции. Труды ИПВЭ АМН СССР*. М.: 269–274.
69. Королева Г.А., Ворошилова М.К., Грачев В.П. 1969. Биологические свойства энтеровирусных

- вакцинных штаммов ЖЭВ-4, ЖЭВ-7, ЖЭВ11 и ЖЭВ-13. *Материалы 16 научной сессии института полиомиелита и вирусных энцефалитов* М.: 185.
70. Чумаков М.П., Ворошилова М.К., Бойко В.М. 1973. К итогам широких контролируемых испытаний эпидемиологической эффективности живых энтеровирусных вакцин для экстренной профилактики гриппа и вирусных ОРЗ. *Труды ИПВЭ АМН СССР*. М.: 19–28.
 71. Ворошилова М.К., Ваганова Н.Т. 1969. Опыт лечения больных опухолями желудочно-кишечного тракта живыми энтеровирусными вакцинами. в *Вирусный онколиз и искусственная гетерогенизация опухолей*. Рига: Зинатне, 2326
 72. Tsyarkin L.B., Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Lavrova I.K., Koroleva G.A. 1976. The morphology of tumors of the human gastrointestinal tract in short-term organ culture and the reaction of these tumors to infection with poliovirus. *Cancer*. **38**, 1796–1806.
 73. Ворошилова М.К., Горюнова А.Г., Горбачкова Е.А., Чумаков П.М., Оганян Г.Р., Кодкинд Г.Х. 1977. Изучение клеточного иммунитета у онкологических больных в процессе бессимптомной энтеровирусной инфекции. В кн.: *Виротерапия и искусственная гетерогенизация опухолей*. Рига: Зинатне, 17–19.
 74. Ворошилова М.К., Магазаник С.С., Чумаков П.М. 1980. Полезные вирусы человека. в *Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний*. Ташкент: Медицина, 227–229.
 75. Муцениеце А.Я. 1972. *Онкотропизм вирусов и проблема виротерапии злокачественных опухолей*. Рига: Зинатне.
 76. Муцениеце А.Я., Бумбиерис Я.В. 1982. Трансплантационные антигены и их изменения при канцерогенезе и вирусной инфекции. В кн.: *Гетерогенизация опухолей*. Рига: Зинатне, 217–234.
 77. Приедите И.Ю., Гарклава Р.Р., Муцениеце А.Я. 1971. Лечение больных раком желудка после палиативных операций. *Материалы III конференции онкологов ЭССР, ЛитССР и ЛатвССР*. Рига: 77.
 78. Shafren D.R., Sylvester D., Johansson E.S., Campbell I.G., Barry R.D. 2005. Oncolysis of human ovarian cancers by echovirus type 1. *Int. J. Cancer*. **115**, 320–328.
 79. Bergelson J.M., Shepley M.P., Chan B.M., Hemler M.E., Finberg R.W. 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science*. **255**, 1718–1720.
 80. King S.L., Cunningham J.A., Finberg R.W., Bergelson J.M. 1995. Echovirus 1 interaction with the isolated VLA-2 I domain. *J. Virol*. **69**, 3237–3239.
 81. Moser T.L., Pizzo S.V., Bafetti L.M., Fishman D.A., Stack M.S. 1996. Evidence for preferential adhesion of ovarian epithelial carcinoma cells to type I collagen mediated by the alpha2beta1 integrin. *Int. J. Cancer*. **67**, 695–701.
 82. Bartolazzi A., Kaczmarek J., Nicolo G., Risso A.M., Tarone G., Rossino P., Defilippi P., Castellani P. 1993. Localization of the alpha 3 beta 1 integrin in some common epithelial tumors of the ovary and in normal equivalents. *Anticancer Res*. **13**, 1–11.
 83. Buczek-Thomas J.A., Chen N., Hasan T. 1998. Integrin-mediated adhesion and signalling in ovarian cancer cells. *Cell Signal*. **10**, 55–63.
 84. Cannistra S.A., Ottensmeier C., Niloff J., Orta B., DiCarlo J. 1995. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*. **58**, 216–225.
 85. Koike N., Todoroki T., Komano H., Shimokama T., Ban S., Ohno T., Fukao K., Watanabe T. 1997. Invasive potentials of gastric carcinoma cell lines: role of alpha 2 and alpha 6 integrins in invasion. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. **123**, 310–316.
 86. Jokinen J., White D.J., Salmela M., Huhtala M., Kapy-la J., Sipila K., Puranen J.S., Nissinen L., Kankaan-paa P., Marjomaki V., Hyypia T., Johnson M.S., Heino J. 2010. Molecular mechanism of alpha2beta1 integrin interaction with human echovirus 1. *EMBO J*. **29**, 196–208.
 87. Bianco A., Whiteman S.C., Sethi S.K., Allen J.T., Knight R.A., Spiteri M.A. 2000. Expression of inter-cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in nasal epithelial cells of atopic subjects: a mechanism for increased rhinovirus infection? *Clin. Exp. Immunol*. **121**, 339–345.
 88. Lublin D.M., Atkinson J.P. 1989. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu. Rev. Immunol*. **7**, 35–58.
 89. Rosette C., Roth R.B., Oeth P., Braun A., Kammerer S., Ekblom J., Denissenko M.F. 2005. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. **26**, 943–950.
 90. Shafren D.R., Au G.G., Nguyen T., Newcombe N.G., Haley E.S., Beagley L., Johansson E.S., Hersey P., Barry R.D. 2004. Systemic therapy of malignant human melanoma tumors by a common cold-producing enterovirus, coxsackievirus a21. *Clin. Cancer Res*. **10**, 53–60.
 91. Skelding K.A., Barry R.D., Shafren D.R. 2010. Enhanced oncolysis mediated by Coxsackievirus A21 in combination with doxorubicin hydrochloride. *Invest. New Drugs*. **21**, 21.
 92. Wodarz D. 2001. Viruses as antitumor weapons: defining conditions for tumor remission. *Cancer Res*. **61**, 3501–3507.
 93. Mueller S., Wimmer E., Cello J. 2005. Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res*. **111**, 175–193.
 94. Dobrikova E., Florez P., Bradrick S., Gromeier M. 2003. Activity of a type 1 picornavirus internal ribosomal entry site is determined by sequences within the 3' nontranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 15125–15130.
 95. Toyoda H., Yin J., Mueller S., Wimmer E., Cello J. 2007. Oncolytic treatment and cure of neuroblastoma by a novel attenuated poliovirus in a novel poliovirus-susceptible animal model. *Cancer Res*. **67**, 2857–2864.
 96. Gromeier M., Solecki D., Patel D.D., Wimmer E. 2000. Expression of the human poliovirus receptor/CD155 gene during development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of poliomyelitis. *Virology*. **273**, 248–257.
 97. Solecki D., Bernhardt G., Lipp M., Wimmer E. 2000. Identification of a nuclear respiratory factor-1 binding

- site within the core promoter of the human polio virus receptor/CD155 gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 12453–12462.
98. Solecki D., Wimmer E., Lipp M., Bernhardt G. 1999. Identification and characterization of the *cis*-acting elements of the human *CD155* gene core promoter. *J. Biol. Chem.* **274**, 1791–1800.
99. Solecki D.J., Gromeier M., Mueller S., Bernhardt G., Wimmer E. 2002. Expression of the human poliovirus receptor/CD155 gene is activated by sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* **277**, 25697–25702.
100. Ochiai H., Moore S.A., Archer G.E., Okamura T., Chewning T.A., Marks J.R., Sampson J.H., Gromeier M. 2004. Treatment of intracerebral neoplasia and neoplastic meningitis with regional delivery of oncolytic recombinant poliovirus. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4831–4838.
101. Ansardi D.C., Porter D.C., Anderson M.J., Morrow C.D. 1996. Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* **46**, 1–68.
102. Ansardi D.C., Porter D.C., Jackson C.A., Gillespie G.Y., Morrow C.D. 2001. RNA replicons derived from poliovirus are directly oncolytic for human tumor cells of diverse origins. *Cancer Res.* **61**, 8470–8479.
103. Porter D.C., Ansardi D.C., Morrow C.D. 1995. Encapsidation of poliovirus replicons encoding the complete human immunodeficiency virus type 1 gag gene by using a complementation system which provides the P1 capsid protein in trans. *J. Virol.* **69**, 1548–1555.
104. Porter D.C., Melsen L.R., Compans R.W., Morrow C.D. 1996. Release of virus-like particles from cells infected with poliovirus replicons which express human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J. Virol.* **70**, 2643–2649.
105. Solecki D., Schwarz S., Wimmer E., Lipp M., Bernhardt G. 1997. The promoters for human and monkey poliovirus receptors. Requirements for basic and cell type-specific activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 5579–5586.
106. Goetz C., Gromeier M. 2010. Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 197–203.
107. Merrill M.K., Dobrikova E.Y., Gromeier M. 2006. Cell-type-specific repression of internal ribosome entry site activity by double-stranded RNA-binding protein 76. *J. Virol.* **80**, 3147–3156.
108. Merrill M.K., Gromeier M. 2006. The double-stranded RNA binding protein 76: NF45 heterodimer inhibits translation initiation at the rhinovirus type 2 internal ribosome entry site. *J. Virol.* **80**, 6936–6942.
109. Ochiai H., Campbell S.A., Archer G.E., Chewning T.A., Dragunsky E., Ivanov A., Gromeier M., Sampson J.H. 2006. Targeted therapy for glioblastoma multiforme neoplastic meningitis with intrathecal delivery of an oncolytic recombinant poliovirus. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1349–1354.
110. De Jesus N., Franco D., Paul A., Wimmer E., Cello J. 2005. Mutation of a single conserved nucleotide between the cloverleaf and internal ribosome entry site attenuates poliovirus neurovirulence. *J. Virol.* **79**, 14235–14243.
111. Paul A.V. 2002. Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In: *Molecular biology of picornaviruses*. Eds Semler B.L., Wimmer E. Washington, DC: ASM Press, 227–246.
112. Yin J., Paul A.V., Wimmer E., Rieder E. 2003. Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J. Virol.* **77**, 5152–5166.
113. Coffey M.C., Strong J.E., Forsyth P.A., Lee P.W. 1998. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science.* **282**, 1332–1334.
114. Nakamura H., Kasuya H., Mullen J.T., Yoon S.S., Pawlik T.M., Chandrasekhar S., Donahue J.M., Chiocca E.A., Chung R.Y., Tanabe K.K. 2002. Regulation of herpes simplex virus gamma(1)34.5 expression and oncolysis of diffuse liver metastases by Myb34.5. *J. Clin. Invest.* **109**, 871–882.
115. Nemunaitis J., Ganly I., Khuri F., Arseneau J., Kuhn J., McCarty T., Landers S., Maples P., Romel L., Randlev B., Reid T., Kaye S., Kim D. 2000. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res.* **60**, 6359–6366.