

УДК 577.2:616-006; 61:578.7

## ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ВИРУСЫ В ТЕРАПИИ ГЛИОМ

© 2012 г. Н. В. Губанова<sup>1,5\*</sup>, А. С. Гайтан<sup>6</sup>, И. А. Разумов<sup>1,2,5</sup>, В. А. Мордвинов<sup>5</sup>,  
А. Л. Кривошапки<sup>5,6</sup>, С. В. Нетесов<sup>1,2</sup>, П. М. Чумаков<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”, Кольцово,  
Новосибирская обл., 630559 Россия

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup>Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH 41195 USA

<sup>5</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>6</sup>Научно-исследовательский институт патологии кровообращения  
им. академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск 630055 Россия

Поступила в редакцию 28.05.2012 г.

Принята к печати 14.06.2012 г.

Несмотря на достижения современной медицины, излечение больных с опухолями глиального происхождения остается трудно достижимой задачей. Инвазивный характер и расположение в жизненно важных областях головного мозга делают этот тип новообразований сложным для хирургического вмешательства, а адъювантная терапия не приносит ожидаемых результатов. Частые рецидивы и злокачественность глиом обусловлены наличием стволовых клеток, обладающих повышенной инвазивностью и устойчивостью к радио- и химиотерапии. Совершенствование технологий конструирования рекомбинантных вирусов позволило создать штаммы, проявляющие онколитическую активность в отношении глиальных опухолей. Большинство этих штаммов прошли первую стадию клинических испытаний и показали безопасность их использования. Несмотря на очевидную перспективность данного подхода, существующие штаммы недостаточно эффективны, что указывает на необходимость их совершенствования. В представленном обзоре рассмотрены наиболее успешные варианты онколитических вирусов, дошедших до клинических испытаний, а также обсуждаются перспективы новых подходов в виротерапии глиом.

**Ключевые слова:** глиомы, онколитические вирусы, противоопухолевая терапия, молекулярная онкология.

ONCOLYTIC VIRUSES IN THE THERAPY OF GLIOMAS, by N. V. Gubanova<sup>1,5\*</sup>, A. S. Gaytan<sup>6</sup>, I. A. Razumov<sup>1,2,5</sup>, V. A. Mordvinov<sup>5</sup>, A. L. Krivoshapkin<sup>5,6</sup>, S. V. Netesov<sup>1,2</sup>, P. M. Chumakov<sup>1,3,4</sup> (<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia; \*e-mail: nat@bionet.nsc.ru; <sup>2</sup>Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia; <sup>3</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; <sup>4</sup>Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH 41195, USA; <sup>5</sup>Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; <sup>6</sup>Meshalkin Institute of Circulation Pathology, Novosibirsk, 630055 Russia). Despite the advances of modern medicine, malignant glioblastoma cure remains an elusive goal. Both the invasive nature and location in vital areas of the brain make this type of tumors difficult for surgical treatment, while the current adjuvant therapy is not as successful as expected. Frequent recurrence and invasiveness of malignant gliomas is due to resistance of glioma stem cells to conventional radiation and chemotherapy. Technological advances in constructing recombinant viruses have allowed creating strains with high oncolytic activity toward glial tumors. Many of these strains have passed Phase I of clinical trials and demonstrated high safety. Despite the obvious potential of the approach, efficiency of the existing strains is still far from being sufficient for effectively curing the disease and require further improvement. The review summarizes results obtained with the most successful variants of oncolytic viruses that come down to the clinical trials and discusses the prospects for new approaches in virotherapy of malignant gliomas.

**Keywords:** gliomas, oncolytic viruses, cancer therapy, molecular oncology.

Принятые сокращения: МРТ – магнитно-резонансная томография; EGFR – рецептор фактора роста эпидермиса; СКГ – стволовые клетки глиобластомы; ВБН – вирус болезни Ньюкасла; БОЕ – бляшкообразующая единица; Ad – аденовирус (при названии серотипа); PKR – РНК-зависимая протеинкиназа R; ТЦП – титр цитопатичности; eIF2 $\alpha$  – фактор инициации трансляции 2 $\alpha$ ; RR – рибонуклеотид-редуктаза; ВКМ – внеклеточный матрикс.

\* Эл. почта: nat@bionet.nsc.ru

Злокачественные опухоли головного мозга составляют сравнительно небольшую часть всех онкологических заболеваний (1–1.5%), причем происходят они преимущественно из клеток глии (более 60%) [1]. Среди злокачественных глиом в 70% случаев диагностируются мультиформные глиобластомы, реже (15%) – анапластические астроцитомы; остальные 15% приходятся на менее агрессивные глиомы [2]. Злокачественные глиомы имеют исключительно неблагоприятный прогноз, а их лечение представляет особую сложность. Средний безрецидивный период у больных глиобластомой составляет 6 мес., а средняя продолжительность жизни не превышает 9–12 мес. Несмотря на очевидный прогресс в понимании механизмов возникновения и прогрессии злокачественных глиом, а также внедрение множества новых методов лечения, за последние 30 лет средняя продолжительность жизни больных увеличилась всего лишь на 2–3 мес. [3, 4]. В подавляющем большинстве случаев терапевтические воздействия по-прежнему остаются паллиативными. Инфильтративный характер роста и расположение в функционально значимых областях головного мозга делают эти опухоли крайне сложными для радикального хирургического удаления. Прогрессирование заболевания и неизбежный рецидив после проведенного лечения обусловлены, по-видимому, уцелевшими стволовыми клетками глиомы (СКГ), обладающими повышенной инвазивностью и устойчивостью к радио- и химиотерапевтическим воздействиям [5, 6].

В современной нейроонкологической практике принят комплексный мультидисциплинарный подход, включающий хирургическое удаление опухоли с последующим применением адъювантных методов лучевого и химиотерапевтического воздействия. Принцип хирургического метода состоит в максимальном удалении опухолевой ткани без создания нового неврологического дефицита. Для решения данной задачи применяются высокотехнологические нейронавигационные станции [7], все шире внедряются интраоперационные высокопольные МРТ-установки. Получил также мировое признание метод микрохирургического удаления злокачественных глиом с применением интраоперационной флуоресценции метаболитов 5-аминолевулиновой кислоты (5-ALA), избирательно накапливающихся в клетках злокачественных глиом [8]. Этот метод позволяет с большей точностью вычленять границы распространения глиомы и способствует ее оптимальному удалению [9].

Наряду с продолжающимися исследованиями, направленными на улучшение эффективности хирургического и химиолучевого лечения, продолжают поиски новых методов. Большие надежды возлагают на такие подходы, как таргетная терапия [10] – генная терапия, иммунотерапия,

избирательное радиологическое воздействие на злокачественные клетки, применение онколитических вирусов.

Значительный интерес вызывают подходы к терапии злокачественных глиом, в которых используются онколитические вирусы. Углубленное понимание механизмов репликации вирусов, их взаимодействия с клеточными системами, достижения в технологии конструирования рекомбинантных вирусов позволили сконструировать вирусные штаммы, обладающие терапевтическими свойствами. Большое число таких штаммов прошло первую стадию клинических испытаний и показало безопасность их использования в предлагаемых концентрациях, но, к сожалению, пока еще низкую эффективность при терапии злокачественных глиом. В представленном обзоре проанализированы свойства наиболее перспективных штаммов онколитических вирусов, дошедших до стадии клинических испытаний и рассмотрены возможности новых подходов в виротерапии злокачественных глиом головного мозга.

#### **ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Среди первичных опухолей центральной нервной системы у взрослых большинство составляют глиальные опухоли, которые различаются по уровню клеточной дифференцировки и злокачественности. Анапластическая астроцитома (III степень по классификации ВОЗ) и глиобластома (IV степень по классификации ВОЗ) образуют основную группу злокачественных глиом. Анапластическая астроцитома представляет собой инфильтрирующее новообразование, для которого характерны фокальные или дисперсные анаплазии и более высокий индекс пролиферации по сравнению с астроцитомами более низкой градации (пилочитарная и фибриллярная астроцитомы – степень злокачественности I и II по классификации ВОЗ соответственно). Гистологический диагноз этого заболевания основан на атипичности ядер и повышенной митотической активности клеток опухоли.

На гистологическом уровне глиобластомы представляют собой ткань с пролиферирующими кровеносными сосудами, содержащую области некроза [11]. Как правило, глиобластома возникает *de novo*, хотя примерно в 10% случаев ее появление обусловлено прогрессией глиальных опухолей головного мозга с более низкой градацией – фибриллярных астроцитом (II степень злокачественности) или анапластических астроцитом (III степень), в таких случаях глиобластомы считают вторичными. При МРТ-исследова-

нии глиобластома характеризуется высококонтрастной периферической зоной с нерегулярным контуром, которая окружает гетерогенную область с признаками некротических изменений. Перифокальный отек, как правило, значительно выражен.

Развитие опухоли обусловлено наследственными или соматическими мутациями в ряде генов, которые контролируют важные биологические процессы. Мутации или хромосомные аберрации могут приводить к активации онкогенов и/или инактивации генов опухолевых супрессоров. Некоторые генетические нарушения сопровождаются потерей гетерозиготности, при которой один аллель может содержать мутации, а другой утрачивается в результате делеции протяженных участков хромосомы. Наиболее часто при глиобластомах выявляют делеции в хромосоме 10 – в области q22-qter (83%) [12, 13] и всего короткого плеча (72%) [13], а также дополнительные (сверхчисленные) фрагменты хромосомы 7: короткое плечо (78%) и область q11.1–q22 (83%) [13]. Эти генетические нарушения приводят к амплификации области 7p21, содержащей ген рецептора фактора роста эпидермиса (EGFR). Аутокринная стимуляция этого рецептора приводит к активации Ras-пути и усилению пролиферации клеток. В области q23.3 хромосомы 10 расположен ген-супрессор *P TEN*, кодирующий фосфатазу, противодействующую активности киназы PI3K, которая стимулируется факторами роста и усиливает пролиферацию клеток. Утрата этого гена в глиобластомах способствует усилению пролиферативной активности [14]. Сигнальный путь EGFR/Ras/PI3K/AKT активирован в 88% глиобластом [15].

В 87% злокачественных глиом нарушен сигнальный путь опухолевого супрессора p53 [15], который обеспечивает стабильность генома и контролирует процесс индукции апоптоза. Инактивация p53 происходит по нескольким механизмам. Это могут быть точечные миссенс-мутации (наиболее часто приводящие к замене аминокислотных остатков в положениях 175, 248 и 273 [16]), делеции всего гена *p53*, сопровождающиеся потерей гетерозиготности области 17p13 (35% случаев), амплификации генов, кодирующих негативные регуляторы – MDM2 (14%) и MDM4 (7%), а также через мутации или делеции с потерей гетерозиготности области 9p21 гена *CDKN2A* (49%), кодирующего белок p14<sup>ARF</sup>, негативный регулятор белка Mdm2.

Третий по частоте генетических нарушений (77%) – сигнальный каскад, затрагивающий функцию опухолевого супрессора ретинобластомы pRb [16]. В гипофосфорилированном состоянии pRb связан с факторами транскрипции семейства E2F и поддерживает их в неактивном состоянии. В начале S-фазы циклин-зависимые

киназы CDK4/6 фосфорилируют pRb, в результате чего происходит диссоциация комплекса pRb/E2F. Это приводит к стимуляции транскрипционной активности E2F, запуску генов, участвующих в синтезе ДНК, с последующим делением клетки. В глиобластомах, как и во многих других злокачественных опухолях, часто мутированы гены данного сигнального пути: в 11% делетирован ген *pRb*, амплифицированы гены циклин-зависимых киназ, фосфорилирующих pRb (ген *CDK4* в 18%, ген *CCND2* в 2% и ген *CDK6* в 1%). Активность циклин-зависимых киназ, в свою очередь, регулируется белками p14<sup>ARF</sup> и p16<sup>INK</sup>. Белок p16<sup>INK</sup> препятствует образованию комплекса CDK4/6-циклин D, вызывая подавление его активности. Наряду с генами сигнального пути p53, с наибольшей частотой гомозиготные делеции и мутации при глиобластомах затрагивают гены *CDKN2A/CDKN2B* (область 9p21), делетированные в 55 и 53% случаев соответственно [16].

Высокая частота таких генетических нарушений указывает на их существенный вклад в формирование глиобластом и открывает возможность для разработки таргетных подходов к терапии. Данные об этих нарушениях позволяют конструировать терапевтические штаммы вирусов, проявляющие онколитический эффект в отношении опухолевых клеток с определенными генетическими нарушениями.

## РОЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ОПУХОЛЕЙ

Существенную роль в агрессивности опухолей могут играть СКГ [17], поскольку выявлена прямая корреляция между количеством СКГ и степенью злокачественности опухоли [18]. Опухолевые клетки, обладающие стволовыми свойствами, впервые обнаружили в лимфомах [19], а позднее в опухолях молочной железы [20], предстательной железы [21], прямой кишки [22], легкого [23]. Стволовые клетки в глиальных опухолях были обнаружены и описаны в 2002 г. Игнатовой и соавт. [24]. Представляя небольшую фракцию популяции опухолевых клеток, СКГ обладают способностью к асимметричному делению. В результате при каждом делении образуются две клетки – одна дочерняя стволовая и одна, утратившая мультипотентность, но способная давать потомство клеток с различными фенотипами [6], – нейральным и глиальным, которые экспрессируют тканевые маркеры ( $\beta$ -тубулин III и GFAP соответственно), а также клетки со смешанным фенотипом, экспрессирующие маркеры, характерные как для нейронов, так и для клеток нейроглии. Приобретение генетических повреждений, характерных для данной опухоли и вызывающих злокачественную трансформацию клеток, происходит уже на стадии СКГ, что впервые показали

на примере мутаций гена p53 [24]. Происхождение СКГ остается темой для дискуссии. Они могут представлять собой нейральные стволовые клетки, претерпевшие трансформацию, но не утратившие способности к самовоспроизведению. Но возможно также, что СКГ – это дедифференцированные астроциты, которые приобрели свойства мультипотентности в результате мутаций [25].

СКГ отличаются повышенной устойчивостью ко всем современным противоопухолевым средствам и методам радиотерапии [26], что, вероятно, обусловлено их способностью к эффективной репарации повреждений ДНК, связанных с применяемой терапией [27]. Для СКГ характерна повышенная экспрессия ряда генов ABCG2-транспортеров, способствующих выбросу лекарственных средств из клетки и обуславливающих устойчивость к химиотерапии [28–30]. Химио- и радиотерапия злокачественных глиом приводит к удалению, главным образом, опухолевых клеток, не обладающих стволовыми свойствами, что приносит облегчение больному, но не предотвращает повторное развитие опухоли за счет выживших СКГ.

Поверхностные маркеры СКГ, такие как CD133, CD117, CD71 и CD45, хорошо охарактеризованы, что позволяет выделять эти клетки из клинического материала [31]. Согласно сделанным оценкам, такие клетки составляют от 5 до 30% общей массы опухоли и имеют характерный генетический профиль, отражающий одновременно их злокачественный и стволовой фенотип.

В связи с высокой устойчивостью СКГ к существующим противоопухолевым воздействиям ведется активный поиск новых терапевтических препаратов, обладающих цитотоксической активностью в отношении СКГ [17, 32, 33]. Одним из перспективных направлений считается разработка препаратов на основе онколитических вирусов [34].

### ШТАММЫ ВИРУСОВ С ОНКОЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ И МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Первые сведения о чувствительности опухолей глиального происхождения к вирусам, опубликованные в 1961 г., были получены на модели вируса бешенства, размножающегося в индуцированных метилхолантроном глиобластомах мыши [35]. В дальнейшем описали культивирование вирусов герпеса (HSV), бешенства и кори в клетках глиомы и других клетках нейрального происхождения, хотя онколитический эффект и не наблюдали [36–39]. Вирусный онколиз глиом начали изучать в Японии в 1982 г. с использованием вируса паротита, представителя семейства парамиксови-

русов [40, 41]. Впоследствии более перспективными онколитиками признали другие вирусы этого семейства – вирус кори и вирус болезни Ньюкасла (ВБН).

#### *Вирус кори*

В 1984 г. описали спонтанную регрессию лимфом Ходжкина после вакцинации против кори [42–44]. Впоследствии на основе вируса кори был создан рекомбинантный онколитический штамм MV-CEA, который экспрессирует раково-эмбриональный антиген – секретируемый белок, по уровню которого в сыворотке больного можно оценивать активность вируса в организме [45]. Вирус хорошо реплицировался и вызывал апоптоз при заражении панели клеток глиобластом человека. При испытании *in vivo* на модели глиобластомы человека U87, культивируемой на бестимусных мышцах, вирус оказывал выраженное терапевтическое действие в отношении как подкожных, так и внутричерепных опухолей, причем динамику процесса удавалось отслеживать по уровню раково-эмбрионального антигена в плазме [45]. Вирус MV-CEA не обладал токсичностью при внутричерепном введении мышам [45] и макакам резус [46]. В октябре 2006 г. началась первая фаза клинических испытаний штамма MV-CEA на больных глиобластомой, завершить которую планирует в 2013 г. (<http://www.clinicaltrials.gov>).

#### *Вирус болезни Ньюкасла*

Вирус болезни Ньюкасла (ВБН) лидирует среди онколитических вирусов по числу клинических испытаний. Этот вирус, патогенный для большинства видов птиц, у человека вызывает лишь легкую форму лихорадки [47]. При этом ВБН хорошо реплицируется в культуре клеток человека, проявляя высокую избирательность в отношении опухолевых клеток. Хотя механизм онкотропности ВБН не совсем понятен, установлено, что для репликации вируса требуется активация сигнального пути онкогена *Ras*, его ветви, связанной с малой GTPазой Rac1 [48]. Активация *Ras* отмечена в 88% случаев глиобластом, что указывает на перспективность разработки препаратов на основе этого вируса. Еще в 1992 г. в опытах *in vitro* наблюдали цитопатическую активность ВБН на линиях клеток нейробластомы человека и крысы [49]. При введении ВБН бестимусным мышам с ксенотрансплантатами клеток нейробластомы человека (IMR-32) отмечена полная регрессия опухоли, что позволило предложить ВБН в качестве перспективного онколитического препарата [50]. В 1996 г. два аттенуированных штамма ВБН – NuJ (аттенуированный селекцией) и МТН-68/Н (природно-аттенуированный) – были допущены к клиническим испы-

таниям. При испытании штамма МТН-68/Н 14-летнему подростку с глиобластомой высокой степени злокачественности ежедневно внутривенно вводили вирус, что привело к выраженной регрессии опухоли и существенному неврологическому улучшению. Больной смог посещать школу, продолжая получать внутривенные инъекции препарата ВБН (3 раза в день по  $2.5 \times 10^8$  БОЕ) на протяжении более 3 лет при отсутствии дальнейшей прогрессии заболевания [51]. Еще у четырех человек с рецидивной формой глиобластомы использование штамма МТН-68/Н также привело к регрессии опухолей и увеличению продолжительности жизни [52]. Применение этого штамма в комбинации с вальпроевой кислотой привело к регрессии опухоли у ребенка с анапластической астроцитомой и массовому апоптозу опухолевых клеток, хотя неуклонный рост одного из очагов стал причиной летального исхода [53]. В клинических испытаниях штамма NuJ участвовало 14 больных мультиформной глиобластомой. В первой части испытания дозу вируса последовательно увеличивали с 0.1 до 55 млн. инфекционных единиц, во второй — больные получали еще три максимальные дозы. Отмечалось увеличение продолжительности жизни больных до 66 недель, у одного человека был достигнут полный ответ на терапию, который продолжался в течение 3 мес. Однако вслед за полной регрессией опухоли возник рецидив заболевания [54]. Полученные результаты указывают на минимальную токсичность препарата при его заметной эффективности.

### Реовирусы

Реовирусы, составляющие род в самостоятельном семействе вирусов, обычно не вызывают серьезных заболеваний у человека, хотя связаны с желудочно-кишечными и респираторными симптомами, которые протекают без существенных последствий. Геном вирусов этого семейства представлен двухцепочечными фрагментированными РНК. При их попадании в нормальные клетки происходит активация РНК-зависимой протеинкиназы R (PKR), что останавливает белковый синтез и репликацию вируса в клетке-хозяине. Во многих опухолевых клетках активация PKR подавлена в результате действия онкогена *Ras* [55, 56]. Высокая частота активации *Ras* в глиобlastомах [57] в сочетании с низкой патогенностью позволила применять реовирусы в терапевтических целях. Результаты предварительных работ указывали на явное цитопатическое действие реовирусов в отношении клеток глиомы U87 и U251N в культуре и на модели *in vivo* [58], а также на их низкую токсичность у приматов [59]. В ходе первой фазы клинических испытаний (Калгари, Канада) в 2008 г. 12 больным с рецидивами мультиформной глиобластомы внутрь опухоли вводили

препарат реовируса с повышением дозы от  $10^7$  до  $10^9$  ТЦП50. У 10 человек наблюдали прогрессию опухоли, у одного — стабилизацию заболевания. Средняя продолжительность жизни в этом испытании составляла 21 неделю, а у одного больного — 54 недели. Установлена безопасность применяемых доз и хорошая переносимость препарата [60]. На основе реовирусов создан онколитический препарат Reolysin (“Oncolytic Biotech”) [61]. Этот препарат прошел первую стадию клинических испытаний на солидных опухолях, которые показали его безопасность в дозах  $10^8$ – $10^{10}$  ТЦП50 и стабилизацию заболевания в 45% случаев [62]. В 2010 г. в США завершена первая стадия клинических испытаний этого препарата на больных мультиформной глиобластомой (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00528684>).

### Рекомбинантные штаммы герпесвирусов

Углубленное понимание механизмов взаимодействия вирусов и клетки, а также развитие технологии рекомбинантных ДНК позволили создавать варианты вирусов, способные реплицироваться преимущественно в опухолевых клетках, используя характерные для этих клеток генетические нарушения. Наибольшее число работ в этом направлении посвящено рекомбинантным штаммам герпесвирусов и аденовирусов.

При конструировании штамма онколитического герпесвируса HSV1716 использовали следующий подход. В норме в ответ на вирусную инфекцию в клетке происходит гомодимеризация, аутофосфорилирование и активация PKR. Активированная PKR блокирует репликацию вирусов, подавляя белковый синтез в результате фосфорилирования фактора инициации трансляции  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ). Преодолеть этот природный механизм противовирусной защиты герпесвирусам помогает ген *ICP34.5*, кодирующий белок  $\gamma 34.5$ , который заставляет клеточную протеинфосфатазу PP1 дефосфорилировать фактор eIF2 $\alpha$ , что восстанавливает синтез белка и репликацию вируса. В штамме HSV1716 ген *ICP34.5* делетирован, поэтому в нормальных клетках его репликация блокирована. В опухолевых клетках аутофосфорилирование PKR подавлено за счет активации онкогена *Ras*, что обеспечивает селективную репликацию рекомбинантного вируса [47, 63–65].

Штамм герпесвируса G207 несет как делецию обеих копий гена *ICP34.5*, так и инактивирующую инсерцию репортерного гена *LacZ* в области гена *ICP6*, кодирующего рибонуклеотид-редуктазу (RR). Этот фермент необходим для репликации вируса, поскольку он обеспечивает синтез дезоксирибонуклеотидов, используемых для синтеза вирусных ДНК. Рибонуклеотид-редуктаза кодируется и клеточным геномом. Ее экспрессия

зависит от активности факторов транскрипции семейства E2F, контролируемых опухолевым супрессором pRb. В нормальных неделящихся клетках репликация вируса зависит от собственной RR, в то время как в опухолевых клетках клеточная RR компенсирует отсутствие вирусной RR в штамме G207, что дополнительно усиливает его онкоселективность. Экспрессия репортерного гена *LacZ* служит удобным гистологическим маркером, который позволяет следить за распространением вирусной инфекции в тканях организма [63, 65, 66].

Противоопухолевые свойства описанных рекомбинантных онколитических герпесвирусов испытаны как *in vitro*, так и на моделях *in vivo* [67–72]. Штамм HSV1716 прошел три клинических испытания первой фазы. В одном из них девяти больным глиобластомой препарат вируса вводили в опухоль ( $10^5$  ТЦП50). При этом не наблюдали токсичности и появления латентной герпесвирусной инфекции, отмечалось замедление или прекращение прогрессии опухоли и увеличение продолжительности жизни — у одного больного до 3 лет, у двух — до 4-го года после проведенного лечения [47, 73]. В другом исследовании вирус вводили в опухоль 12 больным с последующей резекцией опухоли через 4–9 дней. Гистологически в опухоли обнаружены признаки репликации вируса [74]. В третьем исследовании также участвовали 12 человек, и также не отмечено токсичности препарата; у трех больных увеличилась продолжительность жизни (15, 18 и 22 мес.) [75].

Штамм G207 прошел клинические испытания фазы 1 и 1b. В первых испытаниях участвовал 21 человек, а препарат вводили интратуморально в дозе, не превышающей  $3 \times 10^9$  БОЕ. Препарат не оказывал токсического эффекта. У восьми больных отмечен положительный ответ на терапию, у одного продолжительность жизни после терапии составила 5.5 лет [76]. В испытаниях фазы 1b участвовало шесть больных с рецидивами глиобластом, а доза вводимого препарата была снижена до  $1.15 \times 10^9$  БОЕ. Вирус вводили через катетер под контролем стереотаксиса непосредственно в опухоль. Через 2–5 дней опухоль удаляли и продолжали вводить вирус в образовавшуюся полость, химиотерапии больных не подвергали. У трех человек отмечалось улучшение самочувствия, все больные были живы через 1 мес. после лечения. Прогрессирование заболевания наступало в среднем через 3 мес., а средняя продолжительность жизни составила более 6 мес. При этом токсические явления, связанные с введением вируса, отсутствовали [77], хотя эффективность препарата нуждается в доработке.

### Рекомбинантные штаммы аденовирусов

Большая серия работ посвящена использованию онколитических вариантов на основе аденовирусов. Создание таких вариантов вирусов подробно описано в обзоре Святченко и соавт. [78]. Клинические испытания на глиобластомах прошел пока только один рекомбинантный штамм dl1520, также известный как ONYX-015 и способный избирательно реплицироваться в опухолевых клетках. Селективный онколитический эффект этого штамма достигается за счет делеции и мутации в гене, кодирующем белок E1B-55k. В природных вариантах аденовируса этот белок, совместно с продуктом вирусного гена *E4orf6*, подавляет активность опухолевого супрессора p53 и препятствует запуску апоптоза в зараженной клетке до окончания вирусного цикла. В случае дефектного E1B-55k репликация вируса будет успешной, только если p53 дефектен или отсутствует [79, 80]. Однако позднее предложили дополнительный механизм опухолевой селективности ONYX-015, независимый от статуса p53. Было показано, что в опухолевых клетках, в отличие от нормальных, происходит более активный транспорт вирусной РНК из ядра в цитоплазму, благодаря чему цикл литической репликации вирусов протекает более интенсивно [81]. В клетках многих видов рака описаны изменения белкового состава ядерных пор, принимающих непосредственное участие в ядерно-цитоплазматическом транспорте [82], однако влияние этих изменений на эффективность вирусной репликации остается недостаточно изученным.

В первой фазе клинических испытаний штамма ONYX-015 участвовали 24 больных глиобластомой, разделенных на группы по шесть человек, и каждая группа получала свою дозу препарата — от  $10^7$  до  $10^{10}$  БОЕ в виде инъекций в 10 участков ложа опухоли. Результаты проведенных клинических испытаний показали, что препарат не вызывал серьезных побочных явлений. У одного больного прекратился рост опухоли, еще у одного замедлилась скорость роста опухоли, трое (получивших  $10^9$  или  $10^{10}$  БОЕ вируса) оставались живыми в течение более 19 мес. [83].

Среди российских разработок необходимо отметить препарат Канцеролизин, созданный в ФГБУН ГНЦ ВБ “Вектор”. Этот штамм аденовируса, подобно ONYX-015, дефектен по гену, кодирующему белок E1B-55K. Доклинические исследования показали эффективность этого препарата на культурах клеток [84] и *in vivo* [85], а фаза I клинических испытаний показала его эпидемиологическую безопасность и хорошую переносимость [86]. В настоящее время планируется фаза II клинических испытаний на больных глиобластомой.

### Перспективы вирусной терапии глиом

Несмотря на многообещающие результаты доклинических лабораторных исследований, проведенных на моделях линий опухолевых клеток и лабораторных животных, и в целом приемлемую безопасность онколитических штаммов, онколитическая активность вирусов, показанная в клинических испытаниях, пока остается на уровне, недостаточном для внедрения этого подхода в клиническую практику. Для эффективного заражения всех опухолевых клеток в организме требуется создание условий, позволяющих вирусу максимально беспрепятственно проникнуть в опухоль, с высокой специфичностью заразить опухолевые клетки и вызвать их массовую гибель. Какие же факторы препятствуют этому процессу и замедляют внедрение в практику этого перспективного подхода? Этому вопросу посвящено множество обзорных статей, в которых подробно рассмотрены все аспекты проведенных и планируемых исследований. Суммируя результаты проведенного анализа, можно выделить основные моменты, решение которых позволит значительно повысить эффективность онколитической виротерапии.

В отличие от действия вируса на клетки в культуре, а также в опытах на лабораторных животных с иммунодефицитом, онколитический вирус прежде чем попасть в опухоль, расположенную в головном мозге больного, должен преодолеть ряд естественных барьеров. Так при внутривенном введении большая часть вируса практически моментально удаляется из кровотока ретикулоэндотелиальной системой печени и селезенки [87]. Для преодоления этого барьера необходимо использовать огромные дозы вируса, что повышает стоимость лечения и создает дополнительные проблемы в плане безопасности. В иммунокомпетентном организме имеются также адаптивные барьеры: в ответ на введение вируса быстро образуются нейтрализующие антитела, что сопровождается быстрым удалением вируса из кровотока, особенно при повторных введениях [88]. Действительно, кровь участников клинических испытаний, как правило, содержит антитела на вводимый вирус [60, 73–77, 83]. В опытах на иммунокомпетентных мышах установлено, что циркулирующие противовирусные антитела могут практически полностью связывать вводимый вирус [88]. Этот барьер можно частично преодолеть, вводя вирус непосредственно в опухоль. В качестве альтернативного подхода разрабатывается так называемый метод Троянского коня, предполагающий введение вируса в кровоток внутри предварительно зараженных восприимчивых клеток-носителей. Вирусы, находящиеся внутри клеток, не распознаются иммунной системой организма, что позволяет зараженной клетке проникнуть в опухоль, где она служит “фабри-

кой” для локального воспроизводства вируса, проникающего прямо в клетки опухоли [89]. В последнее время в доклинических экспериментах для доставки вирусов в опухоли мозга применяют зараженные нейральные стволовые клетки [90], которые оказываются более эффективными, чем суспензия вируса или зараженные мезенхимные стволовые клетки [91].

Большое значение для эффективности онколитического действия вирусов может иметь активация противоопухолевого иммунитета. Злокачественные глиомы высокоиммуногенны за счет экспрессии специфических антигенов, которые способствуют миграции макрофагов и других иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, а также вызывают активацию микроглии [47, 92, 93]. Возникающий при этом воспалительный процесс весьма сложен и включает много компонентов, способствующих иммуносупрессии и даже стимуляции роста опухоли [47, 94]. Онколитическая виротерапия призвана усиливать цитотоксический иммунный ответ против опухоли [77, 95, 96], что отчасти подтверждается результатами недавних клинических испытаний [77]. Для усиления иммунного ответа против опухоли на основе герпесвируса HSV-1 с делецией гена *ICP34.5* сконструированы “вооруженные” штаммы, содержащие гены провоспалительных цитокинов – интерлейкинов-4 [97] или -12 [98, 99]. Эти штаммы показали повышенную противоопухолевую активность на модели сингенных опухолей головного мозга у мышей, и в настоящее время идет подготовка к клиническим испытаниям этого штамма [47]. Однако вопрос о допустимости подобных подходов требует дальнейшей проработки, поскольку усиление воспаления может создать дополнительную угрозу отека мозга.

Результаты испытаний онколитических вирусов в комбинации с радио- и химиотерапией на животных моделях указывают на синергизм их действия [66, 100–103], что отчасти может объясняться иммуносупрессией, препятствующей нейтрализации вируса. Очевидно, что для достижения максимального онколитического эффекта необходимо добиваться максимальной репликации вирусов при сохранении и даже усилении противоопухолевого иммунитета. Попытка совместить в одном вирусе эти требования привела к созданию онколитических герпесвирусов следующего поколения, созданных на основе G207, в которых для усиления иммунного ответа дополнительно удален ген *ICP47* (белок ICP47, продукт этого гена, участвует в подавлении презентации антигенов главного комплекса гистосовместимости), и обеспечивается ранняя экспрессия гена *US11*, блокирующая действие интерферонов, что вызывает усиление репликации вирусов и лизис опухолевых клеток [104–106].

Описанные выше исследования показывают сложность взаимодействия системы опухоль—вирус—иммунная система. Это, безусловно, заставит в будущем ограничить использование в качестве моделей животных с иммунодефицитом [47]. Переход на иммунокомпетентных животных — трансгенных или с сингенными опухолями головного мозга [107, 108] — позволит полноценнее моделировать процессы, наблюдаемые в клинике.

Серьезную задачу представляет также повышение вирулентности онколитических вирусов в отношении клеток опухоли при одновременном сохранении их безопасности и безвредности для нормальных клеток. Для повышения специфичности доставки в состав вирусов вводят белки, обуславливающие их повышенный тропизм к поверхностным белкам и протеогликанам опухолевой клетки. Природные штаммы онколитических вирусов, такие как реовирус, вирус кори и ВВН, содержат на своей поверхности гемагглютинины, которые способствуют повышению нейротропизма этих вирусов, а белок F обуславливает слияние инфицированной клетки с соседними, что способствует распространению вирусов по опухоли. Данный подход был использован при конструировании штамма  $\Delta 24$ -RGD аденовирусов, который содержит фибриллы с введенным мотивом Arg-Gly-Asp, благодаря которому повышается тропизм к интегринам  $\alpha v \beta 3$  и  $\alpha v \beta 5$  [109]. Однако простое повышение тропизма может усилить токсичность штаммов в отношении здоровых клеток организма, поэтому в таких конструкциях можно использовать модифицированные промоторы, обеспечивающие избирательность экспрессии вирусных продуктов в опухолевых клетках [110].

Преодоление физических барьеров, которые представлены внеклеточным матриксом опухоли, также является одним из способов, который мог бы улучшить онколитическую активность штаммов. Внеклеточный матрикс (ВКМ) содержит протеогликаны (гепарансульфат и хондроитин), гиалуроновую кислоту, коллаген (наиболее представленный компонент ВКМ), эластин, фибронектин и ламинин. Компоненты ВКМ связываются с такими факторами роста, как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста фибробластов (FGF), и способствуют ангиогенезу и росту опухоли [111]. ВКМ также может абсорбировать вирусные частицы, препятствуя инфицированию опухолевых клеток [112]. Для преодоления этого барьера предлагалось ткани предварительно обрабатывать протеолитическими ферментами, такими как коллагеназа и гиалуронидаза [113], однако эту процедуру можно проводить только во время хирургического вмешательства. Введение в состав вируса гена, кодирующего фермент релаксин, модифицирующий ВКМ, позволило улуч-

шить распространение вируса по опухоли и увеличить продолжительность жизни мышей в использованной модели [114].

СКГ являются, пожалуй, наиболее перспективной мишенью для виротерапии глиом [34], поскольку их высокая устойчивость к терапевтическим воздействиям обуславливает неизбежные рецидивы заболевания. Поэтому в последнее время многие онколитические штаммы проходят тестирование на панели СКГ. Штаммы аденовирусов Ad5, Ad11p, Ad16p, CV23 [115] и уже упомянутый  $\Delta 24$ -RGD [80, 116] показали высокую эффективность против стволовых клеток глиомы на модели *in vitro*. Обнадеживающие результаты получены и при исследовании штамма на основе герпесвируса G47Delta (делеции *ICP6*, *ICP34.5* и *ICP47*) [117] и особенно Delta68H-6, специально сконструированного для преимущественного размножения в стволовых клетках опухоли [118]. Введение этих штаммов мышам с иммунодефицитом с ксенотрансплантатами СКГ человека не только приводило к редукции опухоли, но и подавляло способность к самовоспроизведению стволовых клеток.

Разработка химиотерапевтических препаратов включает идентификацию мишени действия, поиск и оптимизацию действующего соединения, доклиническое тестирование фармакологических и токсикологических свойств и последующие клинические испытания, в редких случаях заканчивающиеся внедрением в практику. Этот процесс занимает годы, и на весь цикл затрачивается не менее полумиллиарда долларов. Не удивительно, что после прохождения всех стадий фармацевтические компании не заинтересованы в усовершенствовании уже утвержденного препарата. Разработка онколитических вирусов может проходить по совершенно иной схеме, при которой результаты клинических испытаний могут служить основанием для разработки усовершенствованного варианта вируса, повторно вступающего в цикл испытаний [119]. Такой порядок особенно подходит для вирусов, нацеленных на злокачественные глиомы, поскольку их лабораторные испытания на клеточных и животных моделях оказываются малоинформативными. Вирусы человека вообще мало пригодны для испытания эффективности на животных, в то время как непатогенные для человека вирусы мышей, напротив, могут представлять проблему при доклинических испытаниях на мышинных моделях [3]. В то же время, глубокое понимание молекулярных механизмов взаимодействия вируса с клеткой и организмом внушает оптимизм по поводу возможности целенаправленного совершенствования новых вариантов онколитических вирусов, что позволит более эффективно и избирательно уничтожать клетки злокачественных глиом и преодолеть кажущейся ту-



пик в вопросе избавления от этих страшных заболеваний.

Работа поддержана Программой Президента Российской Федерации (НШ-65387.2010.4, НШ-2996.2012.4), Договором №11.634.31.0034 и Аналитической ведомственной целевой программой 2.1.1/9888, Междисциплинарным интеграционным грантом СО РАН (проект № 52-В), Российским фондом фундаментальных исследований (11-04-00410) и Программой Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109.
- Wen P.Y., Kesari S. 2008. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* **359**, 492–507.
- Wollmann G., Ozduman K., van den Pol A.N. 2012. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. *Cancer J.* **18**, 69–81.
- Liu C., Sage J.C., Miller M.R., Verhaak R.G., Hippenmeyer S., Vogel H., Foreman O., Bronson R.T., Nishiyama A., Luo L., et al. 2011. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell.* **146**, 209–221.
- Huang Z., Cheng L., Guryanova O.A., Wu Q., Bao S. 2010. Cancer stem cells in glioblastoma—molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell.* **1**, 638–655.
- Altaner C. 2008. Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma.* **55**, 369–374.
- Ganslandt O., Behari S., Gralla J., Fahlbusch R., Nimsky C. 2002. Neuronavigation: concept, techniques and applications. *Neurol. India.* **50**, 244–255.
- Váldez P.A., Leblond F., Kim A., Harris B.T., Wilson B.C., Fan X., Tosteson T.D., Hartov A., Ji S., Erkmen K., et al. 2011. Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker. *J. Neurosurg.* **115**, 11–17.
- Babu R., Adamson C. 2012. Fluorescence-guided malignant glioma resections. *Curr. Drug Discov. Technol.* **20**, 20.
- Ohka F., Natsume A., Wakabayashi T. 2012. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol. Res. Int.* **878425**, 5.
- Brat D.J., van Meir E.G. 2004. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab. Invest.* **84**, 397–405.
- Kita D., Yonekawa Y., Weller M., Ohgaki H. 2007. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* **113**, 295–302.
- Vranova V., Necesalova E., Kuglik P., Cejpek P., Pesakova M., Budinska E., Relichova J., Veselska R. 2007. Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncol. Rep.* **17**, 457–464.
- Kanu O.O., Hughes B., Di C., Lin N., Fu J., Bigner D.D., Yan H., Adamson C. 2009. Glioblastoma multiforme oncogenomics and signaling pathways. *Clin. Med. Oncol.* **3**, 39–52.
- van Meir E.G., Hadjipanayis C.G., Norden A.D., Shu H.K., Wen P.Y., Olson J.J. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J. Clin.* **60**, 166–193.
- McLendon R., Friedman A., Bigner D., van Meir E.G., Brat D.J., Mastrogianakis G.M., Olson J.J., et al. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* **455**, 1061–1068.
- Aboody K.S., Najbauer J., Danks M.K. 2008. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther.* **15**, 739–752.
- Thon N., Damianoff K., Hegermann J., Grau S., Krebs B., Schnell O., Tonn J.C., Goldbrunner R. 2010. Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol. Cell Neurosci.* **43**, 51–59.
- Bonnet D., Dick J.E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737.
- Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **100**, 3983–3988.
- Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R., Li H., Bhatia B., Tang S., Reilly J.G., Chandra D., Zhou J., Claypool K., et al. 2006. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene.* **25**, 1696–1708.
- O’Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* **445**, 106–110.
- Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E., Lawrence S., Babar I., Vogel S., Crowley D., Bronson R.T., Jacks T. 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell.* **121**, 823–835.
- Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A. 2002. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia.* **39**, 193–206.
- Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* **432**, 396–401.
- Johannessen T.C., Bjerkvig R., Tysnes B.B. 2008. DNA repair and cancer stem-like cells—potential partners in glioma drug resistance? *Cancer Treat Rev.* **34**, 558–567.

27. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. **444**, 756–760.
28. Bleau A.M., Hambarzumyan D., Ozawa T., Fomchenko E.I., Huse J.T., Brennan C.W., Holland E.C. 2009. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*. **4**, 226–235.
29. Chu L., Huang Q., Zhai D.Z., Zhu Q., Huo H.M., Dong J., Qian Z.Y., Wang A.D., Lan Q., Gao Y.L. 2007. Expression and significance of ABCG2 in human malignant glioma. *Ai Zheng*. **26**, 1090–1094.
30. Jin Y., Bin Z.Q., Qiang H., Liang C., Hua C., Jun D., Dong W.A., Qing L. 2009. ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **135**, 1369–1376.
31. Kang M.K., Hur B.I., Ko M.H., Kim C.H., Cha S.H., Kang S.K. 2008. Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci.* **9**, 15.
32. Lamszus K., Gunther H.S. 2010. Glioma stem cells as a target for treatment. *Target Oncol.* **5**, 211–215.
33. Laks D.R., Visnyei K., Kornblum H.I. 2010. Brain tumor stem cells as therapeutic targets in models of glioma. *Yonsei Med. J.* **51**, 633–640.
34. Dey M., Ulasov I.V., Tyler M.A., Sonabend A.M., Lesniak M.S. 2011. Cancer stem cells: the final frontier for glioma virotherapy. *Stem Cell Rev.* **7**, 119–129.
35. Aksel I.S., Aykan T.B. 1961. Growth behavior of the rabies virus in a glioblastomatous tumor induced with methylcholanthrene in mice. *World Neurol.* **2**, 398–405.
36. Mannweiler K., Palacios O. 1969. Cultivation and reproduction of herpes simplex virus in nervous system cell cultures. *Acta Neuropathol.* **12**, 276–299.
37. Nakamura K., Homma M., Ishida N. 1975. Growth of measles virus in cultures of rat glioma cells. *Infect Immun.* **12**, 614–620.
38. Fleury H., Pasquier P.D. 1977. Replication of measles virus in a cell culture from a glioblastoma of human origin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **36**, 842–845.
39. Tsiang H., Koulakoff A., Bizzini B., Berwald-Netter Y. 1983. Neurotropism of rabies virus. An in vitro study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **42**, 439–452.
40. Yumitori K., Handa H., Yamashita J., Suda K., Otsuka S., Shimizu Y. 1982. Treatment of malignant glioma with mumps virus. *No Shinkei Geka.* **10**, 143–147.
41. Nandi S., Lesniak M.S. 2009. Adenoviral virotherapy for malignant brain tumors. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **9**, 737–747.
42. Greentree L.B. 1983. Hodgkin's disease: therapeutic role of measles vaccine. *Am J Med.* **75**, 928.
43. Schattner A. 1984. Therapeutic role of measles vaccine in Hodgkin's disease. *Lancet.* **1(8369)**, 171.
44. Zwitter M. 1984. Hodgkin's disease: therapeutic role of measles vaccine. *Am J Med.* **77**, A49.
45. Phuong L.K., Allen C., Peng K.W., Giannini C., Greiner S., TenEyck C.J., Mishra P.K., Macura S.I., Russell S.J., Galanis E.C. 2003. Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* **63**, 2462–2469.
46. Myers R., Harvey M., Kaufmann T.J., Greiner S.M., Krempsi J.W., Raffel C., Shelton S.E., Soeffker D., Zollman P., Federspiel M.J., et al. 2008. Toxicology study of repeat intracerebral administration of a measles virus derivative producing carcinoembryonic antigen in rhesus macaques in support of a phase I/II clinical trial for patients with recurrent gliomas. *Hum. Gene Ther.* **19**, 690–698.
47. Zemp F.J., Corredor J.C., Lun X., Muruve D.A., Forsyth P.A. 2010. Oncolytic viruses as experimental treatments for malignant gliomas: using a scourge to treat a devil. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 103–117.
48. Puhlmann J., Puehler F., Mumberg D., Boukamp P., Beier R. 2010. Rac1 is required for oncolytic NDV replication in human cancer cells and establishes a link between tumorigenesis and sensitivity to oncolytic virus. *Oncogene.* **29**, 2205–2216.
49. Reichard K.W., Lorence R.M., Cascino C.J., Peeples M.E., Walter R.J., Fernando M.B., Reyes H.M., Greager J.A. 1992. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *J. Surgical Res.* **52**, 448–453.
50. Lorence R.M., Katubig B.B., Reichard K.W., Reyes H.M., Phuangsab A., Sasseti M.D., Walter R.J., Peeples M.E. 1994. Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Res.* **54**, 6017–6021.
51. Csatory L.K., Bakacs T. 1999. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *JAMA.* **281**, 588–589.
52. Csatory L.K., Gosztonyi G., Szeberenyi J., Fabian Z., Liska V., Bodey B., Csatory C.M. 2004. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J. Neurooncol.* **67**, 83–93.
53. Wagner S., Csatory C.M., Gosztonyi G., Koch H.C., Hartmann C., Peters O., Hernaiz-Driever P., Theallier-Janko A., Zintl F., Langer A., et al. 2006. Combined treatment of pediatric high-grade glioma with the oncolytic viral strain MTH-68/H and oral valproic acid. *Apmis.* **114**, 731–743.
54. Freeman A.I., Zakay-Rones Z., Gomori J.M., Linetsky E., Rasooly L., Greenbaum E., Rozenman-Yair S., Panet A., Libson E., Irving C.S., et al. 2006. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol. Ther.* **13**, 221–228.
55. Norman K.L., Hirasawa K., Yang A.D., Shields M.A., Lee P.W. 2004. Reovirus oncolysis: the Ras/Ral-GEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 11099–11104.

56. Strong J.E., Tang D., Lee P.W. 1993. Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency. *Virology*. **197**, 405–411.
57. Hulleman E., Helin K. 2005. Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv. Cancer Res.* **94**, 1–27.
58. Yang W.Q., Senger D., Muzik H., Shi Z.Q., Johnson D., Brasher P.M., Rewcastle N.B., Hamilton M., Rutka J., Wolff J., et al. 2003. Reovirus prolongs survival and reduces the frequency of spinal and leptomeningeal metastases from medulloblastoma. *Cancer Res.* **63**, 3162–3172.
59. Yang W.Q., Lun X., Palmer C.A., Wilcox M.E., Muzik H., Shi Z.Q., Dyck R., Coffey M., Thompson B., Hamilton M., et al. 2004. Efficacy and safety evaluation of human reovirus type 3 in immunocompetent animals: racine and nonhuman primates. *Clin. Cancer Res.* **10**, 8561–8576.
60. Forsyth P., Roldan G., George D., Wallace C., Palmer C.A., Morris D., Cairncross G., Matthews M.V., Markert J., Gillespie Y., et al. 2008. A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Mol. Ther.* **16**, 627–632.
61. Stoeckel J., Hay J.G. 2006. Drug evaluation: Reolysin—wild-type reovirus as a cancer therapeutic. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **8**, 249–260.
62. Gollamudi R., Ghalib M.H., Desai K.K., Chaudhary I., Wong B., Einstein M., Coffey M., Gill G.M., Mettinger K., Mariadason J.M., et al. 2010. Intravenous administration of Reolysin, a live replication competent RNA virus is safe in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs.* **28**, 641–649.
63. Haseley A., Alvarez-Breckenridge C., Chaudhury A.R., Kaur B. 2009. Advances in oncolytic virus therapy for glioma. *Recent Pat CNS Drug Discov.* **4**, 1–13.
64. Nandi S., Lesniak M.S. 2009. Adenoviral virotherapy for malignant brain tumors. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **9**, 737–747.
65. Parker J.N., Bauer D.F., Cody J.J., Markert J.M. 2009. Oncolytic viral therapy of malignant glioma. *Neurotherapeutics.* **6**, 558–569.
66. Lun X., Alain T., Zemp F.J., Zhou H., Rahman M.M., Hamilton M.G., McFadden G., Bell J., Senger D.L., Forsyth P.A. 2010. Myxoma virus virotherapy for glioma in immunocompetent animal models: optimizing administration routes and synergy with rapamycin. *Cancer Res.* **70**, 598–608.
67. Hunter W.D., Martuza R.L., Feigenbaum F., Todo T., Mineta T., Yazaki T., Toda M., Newsome J.T., Platenberg R.C., Manz H.J., et al. 1999. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. *J. Virol.* **73**, 6319–6326.
68. Kennedy P.G., Gairns J., MacLean A.R. 2000. Replication of the herpes simplex virus type 1 RL1 mutant 1716 in primary neuronal cell cultures—possible relevance to use as a viral vector. *J. Neurol. Sci.* **179**, 108–114.
69. McKie E.A., Brown S.M., MacLean A.R., Graham D.I. 1998. Histopathological responses in the CNS following inoculation with a non-neurovirulent mutant (1716) of herpes simplex virus type 1 (HSV 1): relevance for gene and cancer therapy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **24**, 367–372.
70. Randazzo B.P., Kucharczuk J.C., Litzky L.A., Kaiser L.R., Brown S.M., MacLean A., Albelda S.M., Fraser N.W. 1996. Herpes simplex 1716—an ICP 34.5 mutant—is severely replication restricted in human skin xenografts *in vivo*. *Virology.* **223**, 392–395.
71. Sundaresan P., Hunter W.D., Martuza R.L., Rabkin S.D. 2000. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. *J. Virol.* **74**, 3832–3841.
72. Yazaki T., Manz H.J., Rabkin S.D., Martuza R.L. 1995. Treatment of human malignant meningiomas by G207, a replication-competent multmutated herpes simplex virus 1. *Cancer Res.* **55**, 4752–4756.
73. Rampling R., Cruickshank G., Papanastassiou V., Nicoll J., Hadley D., Brennan D., Petty R., MacLean A., Harland J., McKie E., et al. 2000. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* **7**, 859–866.
74. Papanastassiou V., Rampling R., Fraser M., Petty R., Hadley D., Nicoll J., Harland J., Mabbs R., Brown M. 2002. The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(–)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Ther.* **9**, 398–406.
75. Harrow S., Papanastassiou V., Harland J., Mabbs R., Petty R., Fraser M., Hadley D., Patterson J., Brown S.M., Rampling R. 2004. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther.* **11**, 1648–1658.
76. Markert J.M., Medlock M.D., Rabkin S.D., Gillespie G.Y., Todo T., Hunter W.D., Palmer C.A., Feigenbaum F., Tornatore C., Tufaro F., et al. 2000. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* **7**, 867–874.
77. Markert J.M., Liechty P.G., Wang W., Gaston S., Braz E., Karrasch M., Nabors L.B., Markiewicz M., Lakeman A.D., Palmer C.A., et al. 2009. Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre- and post-tumor resection for recurrent GBM. *Mol. Ther.* **17**, 199–207.
78. Святченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. 2012. Онколитические аденовирусы в терапии злокачественных новообразований: современное состояние и перспективы. *Молекуляр. биология.* **46**, 556–569.
79. Bischoff J.R., Kim D.H., Williams A., Heise C., Horn S., Muna M., Ng L., Nye J.A., Sampson-Johannes A., Fattaey A., et al. 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* **274**, 373–376.
80. Jiang H., Gomez-Manzano C., Aoki H., Alonso M.M., Kondo S., McCormick F., Xu J., Kondo Y., Bekele B.N.,

- Colman H., et al. 2007. Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1410–1414.
81. O'Shea C.C., Johnson L., Bagus B., Choi S., Nicholas C., Shen A., Boyle L., Pandey K., Soria C., Kunich J., et al. 2004. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell*. **6**, 611–623.
82. Xu S., Powers M.A. 2009. Nuclear pore proteins and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 620–630.
83. Chiocca E.A., Abbed K.M., Tatter S., Louis D.N., Hochberg F.H., Barker F., Kracher J., Grossman S.A., Fisher J.D., Carson K., et al. 2004. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol. Ther.* **10**, 958–966.
84. Качко А.В., Святченко В.А., Терновой В.А., Киселев Н.Н., Сорокин А.В., Киселев С.Л., Георгиев Г.П., Нетесов С.В. 2003. Варианты аденовируса типа 5 с делециями в ранних генах: способность к селективной репликации в р53-дефектных опухолевых клетках человека. *Молекуляр. биология.* **37**, 868–875.
85. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А., Ким И.И., Фатюхина О.Е., Шишкина Л.Н., Плясунов И.В., Святченко В.А., Малкова Е.М., Сергеев А.Н., и др. 2006. Изучение реактогенности, безопасности с специфической активности противоракового лечебного препарата “Канцеролизин” на животных. *Биотехнология.* **2**, 66–72.
86. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А., Ким И.И., Фатюхина О.Е., Шишкина Л.Н., Богрянцева М.П., Плясунов И.В., Святченко В.А., Киселев Н.Н., и др. 2006. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата “Канцеролизин”. *Вопросы вирусологии.* **6**, 39–42.
87. Breitbach C.J., Burke J., Jonker D., Stephenson J., Haas A.R., Chow L.Q.M., Nieva J., Hwang T.-H., Moon A., Patt R., et al. 2011. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature.* **477**, 99–102.
88. Power A.T., Bell J.C. 2007. Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Mol. Ther.* **15**, 660–665.
89. 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.
90. Ahmed A.U., Ulasov I.V., Mercer R.W., Lesniak M.S. 2012. Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors. *Methods Mol. Biol.* **797**, 97–109.
91. Ahmed A.U., Tyler M.A., Thaci B., Alexiades N.G., Han Y., Ulasov I.V., Lesniak M.S. 2011. A comparative study of neural and mesenchymal stem cell-based carriers for oncolytic adenovirus in a model of malignant glioma. *Mol. Pharm.* **8**, 1559–1572.
92. Okada H., Kohanbash G., Zhu X., Kastenhuber E.R., Hoji A., Ueda R., Fujita M. 2009. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit. Rev. Immunol.* **29**, 1–42.
93. Kaur G., Han S.J., Yang I., Crane C. 2010. Microglia and central nervous system immunity. *Neurosurg Clin. N. Am.* **21**, 43–51.
94. Markovic D.S., Glass R., Synowitz M., Rooijen N., Kettenmann H. 2005. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 754–762.
95. Paul S., Ricour C., Sommereyns C., Sorgeloos F., Michiels T. 2007. Type I interferon response in the central nervous system. *Biochimie.* **89**, 770–778.
96. Savarin C., Bergmann C.C. 2008. Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 472–479.
97. Andreansky S., He B., van Cott J., McGhee J., Markert J.M., Gillespie G.Y., Roizman B., Whitley R.J. 1998. Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. *Gene Ther.* **5**, 121–130.
98. Hellums E.K., Markert J.M., Parker J.N., He B., Perbal B., Roizman B., Whitley R.J., Langford C.P., Bharara S., Gillespie G.Y. 2005. Increased efficacy of an interleukin-12-secreting herpes simplex virus in a syngeneic intracranial murine glioma model. *Neuro Oncol.* **7**, 213–224.
99. Parker J.N., Gillespie G.Y., Love C.E., Randall S., Whitley R.J., Markert J.M. 2000. Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 2208–2213.
100. Friedman A., Tian J.P., Fulci G., Chiocca E.A., Wang J. 2006. Glioma virotherapy: effects of innate immune suppression and increased viral replication capacity. *Cancer Res.* **66**, 2314–2319.
101. Fulci G., Breyman L., Gianni D., Kurozumi K., Rhee S.S., Yu J., Kaur B., Louis D.N., Weissleder R., Caligiuri M.A., et al. 2006. Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 12873–12878.
102. Kanai R., Rabkin S.D., Yip S., Sgubin D., Zaupa C.M., Hirose Y., Louis D.N., Wakimoto H., Martuza R.L. 2012. Oncolytic virus-mediated manipulation of DNA damage responses: synergy with chemotherapy in killing glioblastoma stem cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 42–55.
103. Ikeda K., Ichikawa T., Wakimoto H., Silver J.S., Deisboeck T.S., Finkelstein D., Harsh G.R.t., Louis D.N., Bartus R.T., Hochberg F.H., et al. 1999. Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nat. Med.* **5**, 881–887.
104. Fukuhara H., Ino Y., Kuroda T., Martuza R.L., Todo T. 2005. Triple gene-deleted oncolytic herpes simplex virus vector double-armed with interleukin 18 and soluble

- B7-1 constructed by bacterial artificial chromosome-mediated system. *Cancer Res.* **65**, 10663–10668.
105. Todo T. 2008. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. *Front Biosci.* **13**, 2060–2064.
106. Todo T., Martuza R.L., Rabkin S.D., Johnson P.A. 2001. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 6396–6401.
107. Fomchenko E.I., Holland E.C. 2006. Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5288–5297.
108. Hambardzumyan D., Parada L.F., Holland E.C., Charest A. 2011. Genetic modeling of gliomas in mice: new tools to tackle old problems. *Glia.* **59**, 1155–1168.
109. Fueyo J., Alemany R., Gomez-Manzano C., Fuller G.N., Khan A., Conrad C.A., Liu T.J., Jiang H., Lemoine M.G., Suzuki K., et al. 2003. Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 652–660.
110. Alonso M.M., Cascallo M., Gomez-Manzano C., Jiang H., Bekele B.N., Perez-Gimenez A., Lang F.F., Piao Y., Alemany R., Fueyo J. 2007. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antiglioma effect *in vivo*. *Cancer Res.* **67**, 8255–8263.
111. Davis G.E., Senger D.R. 2005. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res.* **97**, 1093–1107.
112. Vaha-Koskela M.J., Heikkila J.E., Hinkkanen A.E. 2007. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett.* **254**, 178–216.
113. Minchinton A.I., Tannock I.F. 2006. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 583–592.
114. Ganesh S., Gonzalez Edick M., Idamakanti N., Abramova M., Vanroey M., Robinson M., Yun C.O., Jooss K. 2007. Relaxin-expressing, fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice. *Cancer Res.* **67**, 4399–4407.
115. Skog J., Edlund K., Bergenheim A.T., Wadell G. 2007. Adenoviruses 16 and CV23 efficiently transduce human low-passage brain tumor and cancer stem cells. *Mol. Ther.* **15**, 2140–2145.
116. Alonso M.M., Jiang H., Gomez-Manzano C., Fueyo J. 2012. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. *Methods Mol. Biol.* **797**, 111–125.
117. Wakimoto H., Kesari S., Farrell C.J., Curry W.T., Jr., Zaupa C., Aghi M., Kuroda T., Stemmer-Rachamimov A., Shah K., Liu T.C., et al. 2009. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. *Cancer Res.* **69**, 3472–3481.
118. Kanai R., Zaupa C., Sgubin D., Antoszczyk S.J., Martuza R.L., Wakimoto H., Rabkin S.D. 2012. Effect of gamma34.5 deletions on oncolytic herpes simplex virus activity in brain tumors. *J. Virol.* **86**, 4420–4431.
119. Liu T.C., Hwang T.H., Bell J.C., Kirn D.H. 2008. Translation of targeted oncolytic virotherapeutics from the lab into the clinic, and back again: a high-value iterative loop. *Mol. Ther.* **16**, 1006–1008.