

ОБЗОРНЫЕ  
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.27;577.29

ГЕН-ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ РАКА. ПОДХОДЫ И ПРОБЛЕМЫ

© 2022 г. И. В. Алексеенко<sup>1, 2, \*</sup>, В. В. Плешкан<sup>1, 2</sup>, А. И. Кузьмич<sup>1, 2</sup>,  
С. А. Кондратьева<sup>2</sup>, Е. Д. Свердлов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра  
“Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: irina.alekseenko@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.2021 г.

После доработки 10.10.2021 г.

Принята к публикации 14.10.2021 г.

Опухолевая гетерогенность и постоянная селекция в опухоли устойчивых к терапии раковых клеток требуют комбинаторных подходов к лечению рака, воздействующих на разные жизненно важные процессы в опухоли. Иммунотерапия совершила революционный переворот в подходах к лечению рака. Сегодня многие комбинаторные методы сгруппированы вокруг этого вида лечения. Большинство противоопухолевых иммунотерапевтических агентов вводятся внутривенно, что вызывает серьезные, зачастую опасные для жизни, побочные эффекты из-за накопления этих агентов в тканях, не являющихся мишенями. Побочные эффекты могут быть снижены при использовании локальной терапии, ограниченной опухолью, но при этом вызывающей системный противоопухолевый иммунный ответ. Локальность воздействия может быть достигнута посредством внутриопухолевого введения терапевтических генов. Эти гены могут кодировать множество терапевтических продуктов, начиная с ингибиторов контрольных точек и иммуномодуляторов и заканчивая ферментами, которые обеспечивают внутриопухолевое превращение пролекарств в химиотерапевтические агенты (ген-направленная энзиматическая пролекарственная терапия, ГНЭПТ). В данном обзоре мы рассмотрим подходы, использующие внутриопухолевое введение терапевтических генов, кодирующих молекулы иммунных контрольных точек, цитокинов, сигналов опасности, ферментов ГНЭПТ, а также их сочетания для ген-иммунной терапии рака.

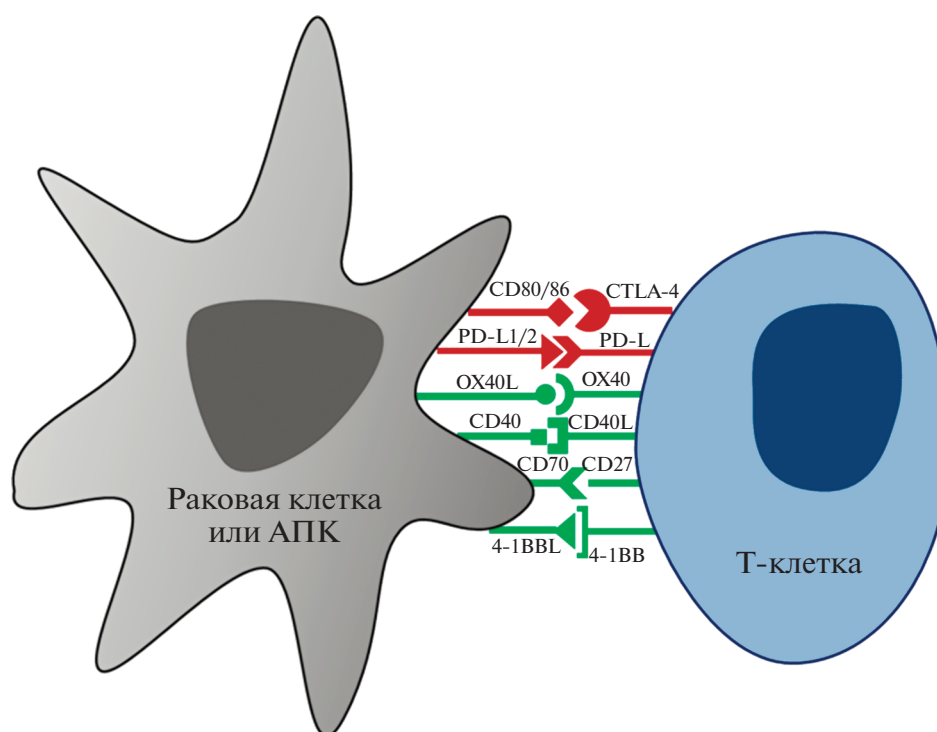
*Ключевые слова:* иммунотерапия, генная терапия, рак, иммунные контрольные точки, цитокины, сигналы опасности, ГНЭПТ.

DOI: 10.31857/S0016675822040026

УСПЕХИ И НЕУДАЧИ ИММУНОТЕРАПИИ  
ОПУХОЛЕЙ, ГЕН-ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ  
КАК СПОСОБ ПРЕОДОЛЕНИЯ  
ОГРАНИЧЕНИЙ

Опухоли привлекают к своей эволюции широкий репертуар нормальных клеток, формирующей микроокружение опухоли (МО), что играет важнейшую роль как в эволюции самой первичной опухоли, так и в ее метастазировании. МО солидных опухолей состоит из двух основных компонентов, клеточного и неклеточного, пропорция и состав которых варьируют в зависимости от места возникновения опухоли и стадии ее развития [1]. МО во многом ответственно за создание барьера, который защищает опухоль от внешнего воздействия, в том числе и от клеток иммунной системы. Способность опухолей к созданию иммуносупрессивного микроокружения зависит от ряда механизмов, приводящих, в конечном счете, к ингибированию

иммунных эффекторных клеток, в частности цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. Исследование роли взаимодействий раковых клеток с МО в подавлении противоопухолевого иммунного ответа привело к современной революционной иммунотерапии с использованием иммунных контрольных точек (ИКТ) [2]. Наивные Т-клетки активируются после распознавания рецептором Т-клеток антигена, представленного антиген-презентирующими клетками (АПК), с участием костимулирующих молекул. Активирующие сигналы модулируются сложной сетью “тормозных” рецепторов – так называемых иммунных контрольных точек (ИКТ) (рис. 1) [3]. ИКТ необходимы для поддержания аутолетерантности и контроля продолжительности и амплитуды физиологических иммунных реакций в периферических тканях [4]. Активация ИКТ происходит когда рецепторы на поверхности Т-клеток распознают и связываются с лигандами на поверх-



**Рис. 1.** Ингибиторные и костимулирующие взаимодействия иммунных клеток. Красным обозначены ингибирующие взаимодействия, зеленым – костимулирующие. АПК – антиген-презентирующая клетка.

ности антиген-представляющих или опухолевых клеток [5]. При таком лиганд-рецепторном взаимодействии Т-клетки получают сигнал остановки иммунной реакции.

Раковые клетки используют этот механизм для того, чтобы избежать иммунного надзора. Эти взаимодействия можно блокировать антителами к лиганду или рецептору. Классическим примером являются взаимодействия между лигандами семейства В7 и рецепторами семейства CD28, которые играют важную роль в регуляции ответа Т-клеток, формируя как костимулирующие, так и коингибирующие сигналы. В настоящее время известно десять членов семейства В7, наиболее используемыми из которых являются В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1), лиганд запрограммированной смерти 2 (PD-L2) и пять представителей рецепторов семейства CD28: CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 и аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA) [6]. CD28 – единственный рецептор, который конститутивно экспрессируется на наивных Т-клетках и обеспечивает костимуляторные сигналы, необходимые для активации и выживания Т-клеток. Взаимодействие CD28 и его лигандов CD80 и CD86 участвует в активации Т-клеток, стимуляции пролиферации клеток и продукции цитокинов, а также в стимулировании выживания Т-клеток. Рецептор CTLA-4 имеет сродство к лигандам CD80/CD86 в 20–100 раз более высокое, чем CD28. CTLA-4 немедленно ак-

тивируется после связывания Т-клеточного рецептора (TCR) с антигеном и конкурирует с CD28 за лиганды раковых клеток CD80/86, тем самым блокируя костимуляторный сигнал CD28 и подавляя пролиферацию и активацию Т-клеток. Блокада CTLA-4 освобождает Т-лимфоциты и позволяет иммунной системе уничтожать раковые клетки. Ипилимумаб, моноклональное антитело к цитотоксическому Т-лимфоцит-связанному антигену 4 (CTLA-4), стал первым терапевтическим ингибитором ИКТ, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA).

Помимо CTLA-4 наиболее широко известны и используются в качестве мишеней в терапевтической практике такие ингибирующие ИКТ как рецептор PD1 (белок запрограммированной гибели клеток, programmed death-1) и его лиганды PD-L1/PD-L2 [7]. Успех ингибиторов ИКТ CTLA-4 и PD-1/PD-L1 стимулировал поиск других ИКТ [8, 9]. Поскольку CTLA-4 и PD-1 регулируют различные ингибирующие пути и имеют неперекрывающиеся механизмы действия, предполагают, что одновременная блокада CTLA-4 и PD-1 может быть более эффективной, чем блокировка только одной ИКТ. Действительно, в ходе клинических испытаний комбинаций анти-CTLA-4 и анти-PD-1 было показано, что комбинированная терапия ассоциирована с более высокой частотой позитивного ответа, но при этом также и с более

частыми и более выраженными нежелательными эффектами [10, 11]. Иммуноterapia с использованием ИКТ значительно увеличили продолжительность жизни многих пациентов со злокачественными новообразованиями, однако большинство пациентов с распространенными формами рака слабо отвечают или не отвечают вовсе на терапию. Кроме того, вследствие ингибирования иммунных контрольных точек развиваются многочисленные, иногда фатальные побочные эффекты, в основном аутоиммунные воспалительные реакции [12, 13]. Показана кардиотоксичность ингибиторов ИКТ, включающая такие эффекты как миокардит, перикардит, атеросклероз, аритмию и васкулит [14].

Данные эффекты являются результатом избыточного иммунного ответа против органов и тканей пациентов. Все противоопухолевые препараты на основе антител к иммунным контрольным точкам предназначены для внутривенного введения, и поэтому существует проблема достижения терапевтических внутриопухолевых концентраций в отсутствие системной токсичности. Данные проблемы особенно актуальны для солидных опухолей [15]. Системная токсичность, возникающая при внутривенном введении препаратов ИКТ, зачастую не позволяет использовать оптимальные дозы лекарственных средств [16].

Уменьшить токсичность, свойственную иммунотерапии с использованием ИКТ, можно посредством локализации ее внутри опухоли за счет контролируемой экспрессии терапевтических генов либо с помощью внутриопухолевого введения генотерапевтических конструкций. Одним из перспективных путей дальнейшего развития противоопухолевой иммунотерапии является ген-иммунная терапия, которая предполагает доставку в опухоль генов, кодирующих активаторы “противоопухолевого иммунного цикла”. Ген-иммунная терапия может быть направлена на каждый этап “противоопухолевого иммунного цикла” (см. ниже), что может приводить к развитию системного противоопухолевого эффекта (абскопальный эффект, *abscopal effect*). Далее в этом обзоре мы постараемся детально рассмотреть поэтапный механизм формирования противоопухолевого иммунного ответа, известные попытки стимуляции различных его этапов методами генной терапии, а также использование комбинаторных подходов для активации противоопухолевого иммунного ответа.

### ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУННЫЙ ЦИКЛ

Для формирования эффективного противоопухолевого иммунного ответа необходимо запустить серию поэтапных событий, которые Ченом и Меллманом (Chen and Mellman) были объединены в концепцию “противоопухолевого иммунного цикла” [17]. На первом этапе цикла в результате ги-

бели раковых клеток происходит высвобождение опухоль-ассоциированных антигенов. На втором этапе антиген-презентирующие клетки, например дендритные клетки, захватывают высвободившиеся антигены, процессируют и экспонируют их в комплексе с молекулами МНСII (главного комплекса гистосовместимости второго типа) наивным Т-лимфоцитам, в результате чего происходит активация и созревание антиген-специфичных Т-клеток (этап 3). Затем активированные эффекторные Т-клетки мигрируют к опухоли (этап 4) и инфильтрируют ее (этап 5). Далее на шестом этапе в опухоли происходит специфическое распознавание и связывание Т-клеточными рецепторами опухолевого антигена, связанного с МНСI на поверхности раковых клеток. Результатом такого распознавания является уничтожение целевой раковой клетки (этап 7). Далее гибель раковых клеток приводит к высвобождению новой порции опухолевых антигенов, цикл повторяется, расширяя свои границы.

У онкологических больных противоопухолевый иммунный цикл происходит неэффективно, раковым клеткам удается реализовать механизмы защиты от иммунной системы. Помимо эксплуатации ИКТ, упомянутых выше, раковые клетки могут снижать уровень презентации антигенов на своей поверхности, избегая узнавания цитотоксическими клетками, и секретировать противовоспалительные цитокины, угнетающие активацию Т-лимфоцитов. Также продукция факторов роста и противовоспалительных цитокинов клетками МО приводит к рекрутированию иммуносупрессорных популяций миелоидных и лимфоидных клеток, в частности регуляторных Т-клеток (Tregs), макрофагов II типа, миелоидных супрессорных клеток (*myeloid-derived suppressor cells, MDSCs*), подавляющих иммунный ответ [18].

Цель иммунотерапии рака – инициирование или стимулирование самоподдерживающегося противоопухолевого иммунного цикла с минимальными побочными явлениями, что можно реализовать с помощью локальной ген-иммунной терапии. Локальность воздействия может достигаться, как уже упоминалось выше, посредством внутриопухолевого введения генотерапевтических препаратов и за счет опухолеспецифической экспрессии терапевтических генов.

Важно отметить, что внутриопухолевая доставка также дает преимущество немедленного доступа агента к лимфатическим узлам, дренирующим опухоль, которые считаются ключевым центром для инициации и поддержания противоопухолевого иммунного ответа [19]. Нами будут рассмотрены подходы, использующие внутриопухолевое введение конструкций, кодирующих молекулы ИКТ и цитокинов, ген-направленную энзиматическую пролекарственную терапию (ГНЭПТ) в контексте иммунотерапии, а также возможность сочетания

этих методов для достижения лучшего терапевтического эффекта.

### ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ИНГИБИТОРЫ ИКТ И КОСТИМУЛЯТОРЫ Т-КЛЕТОК

Снять некоторые ограничения взаимодействия раковых клеток с эффекторными клетками иммунной системы (шестой этап иммунного цикла) позволяет использование препаратов, нацеленных на ингибирующие и стимулирующие взаимодействия иммунных и опухолевых клеток. Использование ингибиторов ИКТ и костимуляторных молекул в настоящее время активно развивается (разнообразие перспективных молекул описано, например, в обзоре [6]). Однако такой подход сопряжен с высокой токсичностью иммунотерапевтических препаратов, вводимых системно, что обсуждалось выше. Использование генетически кодируемых молекул ИКТ, синтезируемых локально, способно нивелировать их токсическое действие. Недавно такой подход был применен для локального подавления PD-L1 с помощью белка, названного “PD-L1 trap (ловушка для PD-L1)” [20]. Авторы создали плазмиду, кодирующую внеклеточный домен белка PD-L1, слитый с тримеризующим доменом. Системное введение наночастиц с такой плазмидой мышам с привитой опухолью CT26 приводило к торможению роста опухоли. Был выявлен синергизм действия при комбинировании PD-L1 trap с оксалиплатином, широко применяемым цитостатическим препаратом.

Хотя блокада PD-1/L1 является эффективным терапевтическим подходом для многих пациентов с солидными и гематологическими злокачественными новообразованиями, ее недостаточно для индукции регрессии опухоли у большинства пациентов. Оптимальные Т-клеточные ответы требуют костимуляции Т-клеточного рецептора, что может быть обеспечено посредством активации членов семейства рецепторов фактора некроза опухоли, таких как OX40. Активация OX40 его лигандом OX40L в присутствии распознаваемого Т-клеточным рецептором антигена способствует размножению CD4+ и CD8+ Т-клеток, усиливает первичные цитотоксические реакции Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов памяти, а также подавляет регуляторную функцию Т-клеток. На мышинных моделях было показано, что внутриопухолевая монотерапия с помощью мРНК OX40L индуцировала иммунные ответы в опухолях, до этого только частично отвечавших на системное лечение ингибиторами PD-1/PD-L1 [21]. На данный момент инициированы клинические испытания (КИ) препаратов, включающих мРНК OX40L (см. табл. 1). Так, мРНК-2416 (Moderna, Inc.), которая кодирует OX40L человека, используется как терапевтический агент в составе липидных наночастиц.

Проведено первое КИ (NCT03323398, табл. 1) мРНК-2416. В ходе КИ мРНК-2416 вводили внутриопухолево пациентам с рецидивирующими или не отвечающими на лечение солидными злокачественными опухолями или лимфомами. Результаты свидетельствуют об активации иммунного ответа после лечения: наблюдались повышение показателей цитолитической активности и стимуляция экспрессии воспалительных генов Т-клеток [22].

Другое клиническое исследование предполагает внутриопухолевое введение мРНК – TriMix, кодирующей костимулирующую молекулу CD70, лиганд CD40 и конститутивно-активный Toll-подобный рецептор 4 (TLR 4). В настоящее время в данное КИ идет набор пациентов с ранней стадией рака молочной железы (NCT03788083, табл. 1).

Рецептор костимулирующей ИКТ 4-1BB относится к семейству рецепторов факторов некроза опухоли, его экспрессия обнаруживается на поверхности активированных эффекторных и регуляторных Т-лимфоцитов, а также на дендритных клетках и естественных киллерах. Взаимодействии 4-1BB с его лигандом 4-1BBL усиливает пролиферацию эффекторных Т-клеток, секрецию ими IL-2, увеличивает их выживаемость и цитолитическую активность [23].

Онколитические вирусы, кодирующие гены лигандов OX40L или 4-1BBL, на мышинных моделях продемонстрировали выраженный противоопухолевый эффект [24–26]. Показано, что онколитический аденовирус LOAd703 (delolimogene muradepoervec), несущий гены тримеризованного CD40L и 4-1BBL, обеспечивает избирательный лизис опухолевых клеток, индукцию противоопухолевых цитотоксических Т-клеточных реакций, уменьшение инфильтрации клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSC) и индукцию регрессии опухоли в доклинических исследованиях [27]. В исследовании [28] LOAd703 инициировал устойчивый противоопухолевый иммунный ответ в отношении экспериментальной модели карциномы поджелудочной железы. В настоящее время эффективность LOAd703 оценивается в КИ на пациентах с раком поджелудочной железы (NCT02705196).

Еще одним примером такого подхода служит препарат RP3, который представляет собой генетически модифицированный вирус простого герпеса типа 1 (HSV-1), несущий сразу три гена, кодирующих антитела против CTLA-4 и лиганды CD40 и h4-1BBL. В настоящее время проводятся КИ препарата RP3 (фаза I/II) на пациентах с солидными опухолями (NCT04735978, NCT04336241, NCT04050436, NCT04349436, NCT03767348, см. табл. 1). Таким образом, ген-иммунная терапия, использующая доставку в опухоль генов-ингибиторов ИКТ и генов-костимуляторов Т-клеток, активно развивается.

**Таблица 1.** Примеры клинических исследований генотерапевтических препаратов, кодирующих гены-активаторы иммунной системы, предназначенных для внутриопухолевого введения

Название	Способ доставки	Кодирует	Тип опухоли	КИ
<b>Препараты с невирусной системой доставки</b>				
mRNA-2416	LNP*	OX40L	Рецидивирующие/не отвечающие на лечение солидные опухоли поздней стадии или лимфомы, карцинома яичника	NCT03323398
mRNA-2752	LNP	Триплет OX40L + IL-23 + IL-36γ	Рецидивирующие/не отвечающие на лечение солидные опухоли поздней стадии или лимфомы РМЖ, плоскоклеточный рак головы и шеи, неходжкинская лимфома, уротелиальный рак	NCT03739931
MEDI1191 (mRNA-2905)	LNP	IL-12	Протоковая карцинома <i>in situ</i> высокой степени дифференцировки	NCT02872025
IT-pIL12-EP	Электропорация	IL-12	Солидные опухоли	NCT03946800
Tavokinone telseplasmid (tavo)	Электропорация	IL-12	РМЖ	NCT02531425 NCT00323206
hIL-2	DOTMA/Cholesterol	IL-2	Карцинома Меркеля, меланома, метастатический и рецидивирующий рак головы и шеи	NCT01440816 NCT01502293 NCT03823131
SAR441000	–	IL-12sc + IL-15sushi + IFNα + GM-CSF	Рак головы и шеи	NCT00006033
TriMix mRNA solution	–	CD70, CD40 L, TLR 4	Метастатические опухоли	NCT03871348
CYL-02	Линейный PEI	SST2 + DCK::UMK	РМЖ	NCT03788083
IFx-Hu2.0	Линейный PEI	Emm55	Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы	NCT 01274455 NCT02806687
			Меланома кожи III-IV стадии, карцинома Меркеля, плоскоклеточная карцинома кожи, базальноклеточная эпителиома	NCT03655756 NCT04925713 NCT04853602 NCT04160065
<b>Препараты с вирусной системой доставки</b>				
ProstAtak (aglatimagene besadenovex, CAN-2409)	Аденовирус	HSVtk	Рак простаты	NCT01436968
T-VEC (talimogene laherparepvec)	ВПГ-1**	GM-CSF	Меланома	Зарегистрирован

Таблица 1. Окончание

Название	Способ доставки	Кодирует	Тип опухоли	КИ
Реха-Vec (rexastimogene devasigervес)	Вирус осповакцины	GM-CSF	Гепатоцеллюлярная карцинома, колоректальный рак, нейробластома, рабдомосаркома, лимфома и другие типы опухолей	NCST04849260 NCST03206073 NCST02562755 + еще 15 КИ
LOAd703 (delolimogene tiradenoptervес)	Аденовирус 5/35	TMZ-CD40L + 4-1BBL	Злокачественная меланома, протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, карцинома яичника, карцинома печени, колоректальный рак	NCST04123470 NCST02705196 NCST03225989 NCST03555149
RIVAL-01/ТАК-605 (ТBio-6517)	Вирус осповакцины	Flt3 ligand + anti-CTLA-4 + IL-12	РМЖ, колоректальный рак	NCST04301011
RP1	ВПГ-1	GALV-GP R- + GM-CSF	Меланома и прочие злокачественные новообразования кожи	NCST04050436 NCST04349436 NCST03767348
RP3	ВПГ-1	anti-CTLA-4 + CD40L + 4-1BBL	Распространенная солидная опухоль	NCST04735978
TNFerade	Аденовирус	TNF $\alpha$	Рак пищевода, местнораспространенный рак простаты	NCST00051480 NCST01048151
INGN 241 (Ad-mda7)	Аденовирус	MDA-7 (IL-24)	Злокачественная меланома, метастазы	NCST00116363
BT-001 (TG6030)	Вирус осповакцины	anti-CTLA4 + GM-CSF	Различные типы опухолей	NCST04725331
ADV-hIL12	Аденовирус	IL-12	РМЖ	NCST00849459
Ad-RTS-hIL-12	Аденовирус	IL-12	Диффузная глиома ствола головного мозга, опухоли головного мозга у детей, глиобластома	NCST03330197 NCST03636477 + еще 6 КИ
Ad5-yCD/mut-TKSR39rep-hIL12	Аденовирус	IL-12 + yCD/TK мутант	Метастатический рак поджелудочной железы, рак простаты	NCST03281382 NCST02555397
VG161	ВПГ-1	IL12/15 + PDL1B	Первичный рак печени, развитые злокачественные солидные опухоли	NCST04806464 NCST04758897
INXN-2001	Аденовирус	IL-12	Меланома	NCST01397708
ALVAC-hB7.1 ALVAC-hIL-12	Вирус оспы канареек	B7-1/CD80 IL-12	Неоперабельная меланома	NCST00003556
IL-12 gene therapy	Аденовирус	IL-12	РМЖ	NCST04095689
Mobilian (M-VM3)	Аденовирус	TLR5 – рецептор и агонист	Рак простаты	NCST02654938
H103	Аденовирус 2-го типа	HSP70	Распространенная солидная опухоль	[56]

\* LNP – липидные наночастицы (Lipid Nanoparticle). \*\* Вирус простого герпеса человека первого типа (herpes simplex type 1 (HSV-1) virus).

## ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ЦИТОКИНЫ

Другим хорошо проработанным направлением ген-иммунной терапии является использование генетически кодируемых цитокинов. Эти малые сигнальные белки участвуют в нескольких этапах противоопухолевого иммунного цикла, таких как презентация опухолевых антигенов (этап 2), праймирование и активация Т-клеток (этап 3), инфильтрация эффекторных Т-клеток в опухоль (этап 5) и гибель раковых клеток (этап 7). Цитокины являются активными иммуномодуляторами [29]. Активируемые цитокинами сигнальные пути координируют сигнал-зависимый иммунный отклик [30] и определяют эффективность противоопухолевого иммунитета [31]. Провоспалительные цитокины, такие как IL-2, IL-12 и фактор некроза опухоли (TNF), способны опосредовать приток лейкоцитов, включая В- и Т-клетки, К опухоли. Однако внутривенное введение рекомбинантных цитокинов часто связано с дозозависимой токсичностью и даже с угрожающими жизни последствиями [32]. Возможно по этой причине на сегодняшний день только использование рекомбинантного IL-2 было одобрено для терапии опухолей. При этом внутриопухолевое введение цитокинов при терапии может значительно снижать токсичность [29]. Это дает основания полагать, что внутриопухолевая ген-иммунная терапия на основе генов или мРНК, кодирующих цитокины, может быть хорошей альтернативой их системному введению.

Tavokinogene telseplasmid (tavo) – генотерапевтический препарат, кодирующий IL-12, был разработан компанией OncoSec (США) для лечения различных видов рака. Терапия основана на внутриопухолевом введении синтетической плазмидной ДНК, несущей ген IL-12, эффективность доставки ДНК увеличена с помощью электропорации. Испытания препарата показали безопасность и эффективность в отношении метастазирующих опухолей [33, 34]. В настоящее время в США, Австралии и Канаде ведутся КИ препарата на пациентах с раком молочной железы, Т-клеточной лимфомой кожи, раком головы и шеи со злокачественной меланомой и карциномой Меркеля (NCT02531425, NCT01440816, NCT01502293, NCT03823131, NCT02345330, NCT03823131 [35], табл. 1). Ведется разработка плазмидных препаратов, кодирующих другие цитокины. Так, внутриопухолевая доставка наночастиц из хитозана, содержащих гены цитокинов IL-15 и IL-21 в составе плазмидного вектора, продемонстрировала подавление роста опухоли и увеличение выживаемости у модельных организмов [36, 37].

В последние годы активно развивается разработка препаратов на основе мРНК, кодирующей различные цитокины. В исследовании I фазы КИ

препарата MEDI1191 (компания Модерна, США) на основе мРНК, кодирующей IL-12, с последующим применением моноклональных антител к PD-L1 (препарат дурвалумаб) показана безопасность и эффективность такой терапии у пациентов с солидными опухолями, нечувствительными к стандартной терапии. В КИ (NCT03871348) препарат SAR441000, содержащий мРНК, кодирующую цитокины IL-12sc, IFN- $\alpha$ 2b, GM-CSF и IL-15sushi [38], изучался в монотерапии и в комбинации с цемиплимабом (моноклональное антитело против PD-1). Было показано, что SAR441000 вызывает иммуномодулирующий эффект и в целом хорошо переносится пациентами.

Многие исследователи считают перспективными векторами для цитокиновой генной терапии онколитические вирусы, в частности аденовирусы, вирусы герпеса, парамиксовирусы, поксвирусы и рабдовирусы [39]. Обычно такие вирусы кодируют IL-2, IL-12, IL-15, IL-6, IL-21, IL-18, IL-24 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), которые действуют на различные элементы иммунной системы. Показано, что введение модельным животным онколитических вирусов, несущих гены цитокинов, такие как интерферон- $\beta$ , GM-CSF, IL-12, IL-24, IL-4, IL-18, подавляет опухолевый рост, метастазирование и индуцирует противоопухолевый иммунитет [40].

Препарат Imlygic® (Amgen Inc., США) стал первым генотерапевтическим противоопухолевым препаратом, одобренным FDA США и EMA (European Medicines Agency, Европейское агентство по лекарственным средствам). Препарат Imlygic® (T-VEC, talimogene laherparepvec) – генетически модифицированный репликационно-компетентный вирус простого герпеса 1-го типа, экспрессирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (hGM-CSF). Экспрессия GM-CSF в условиях вирусного лизиса опухолевых клеток способствует вовлечению и активации антиген-презентирующих клеток, таким образом усиливая противоопухолевый иммунный ответ организма. Препарат рекомендован для лечения больных с нерезектабельными из-за множественности, но доступными для внутриопухолевого введения очагами меланомы кожи и пораженными метастазами лимфатическими узлами. Talimogene laherparepvec продемонстрировал значительное повышение частоты устойчивого ответа, а также выживаемости без прогрессии опухоли в рандомизированном КИ III фазы пациентов с меланомой [41]. Примеры КИ других препаратов, кодирующих цитокины, с невирусной и вирусной системами доставки представлены в табл. 1.

Также в настоящее время разрабатываются генотерапевтические препараты, кодирующие одновременно иммунные контрольные точки и ци-

токсины, например, препарат mRNA-2752 компании Модерна, кодирующий одновременно OX40L, IL-23 и IL-36γ. В доклинических испытаниях [21] показано, что внутриопухолевая инъекция mRNA-2752 приводила к повышенному рекрутированию иммунных клеток в опухоли, индуцировала экспрессию различных цитокинов и хемокинов и активацию дендритных и Т-клеток. В 2018 г. было инициировано КИ (NCT03739931, табл. 1) с целью оценки безопасности внутриопухолевого введения mRNA-2752 у пациентов с рецидивирующими/рефрактерными злокачественными солидными опухолями и лимфомами. В ходе исследования будет оценена безопасность как монотерапии mRNA-2752, так и комбинированной терапии mRNA-2752 с дурвалумабом.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИГНАЛОВ ОПАСНОСТИ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Увеличить эффективность второго этапа иммунного цикла, захват и процессирование опухолевых антигенов АПК можно посредством использования “сигналов опасности”. В 1994 г. Мацингер предложил “теорию опасности”, согласно которой иммунная система отслеживает повреждения и активируется в ответ на “сигналы опасности” от поврежденных тканей, а не на чужеродные агенты [42]. “Сигналы опасности” – молекулы DAMPs (damage-associated molecular patterns, молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями), которые вырабатываются поврежденными клетками в ответ на воздействие патогенов, токсинов, механических повреждений и т.д. и индуцируют сильный иммунный ответ за счет активации созревания дендритных клеток. “Сигналами опасности” могут быть как молекулы, связанные с экзогенными патогенами – PAMPs (pathogen-associated molecular patterns, патоген-ассоциированные молекулярные структуры), такие как бактериальные липополисахариды, CpG-олигонуклеотиды или белок жгутика флагеллин, так и эндогенные продукты поврежденных и мертвых клеток. Эндогенными молекулами DAMPs могут быть белки, ДНК, РНК, продукты метаболизма, АТФ, мочевая кислота, сульфат гепарина и другие компоненты клетки в зависимости от условий [43]. Например, к белковым DAMPs относятся внеклеточные белки, такие как бигликан и тенасцин С, и внутриклеточные белки, такие как гистоны, S100 белки, белки теплового шока (HSP), негистоновый хромосомный белок HMGB1 (high-mobility group protein B1) и белки плазмы, такие как фибриноген, Gc-глобулин и сывороточный амилоид А (SAA) [44]. Их взаимодействие со специальными рецепторами, например TLR-рецепторами (toll-like receptor, толл-подобные рецепторы), вызывает ответную реакцию на “опас-

ность” внутри клеток и в их микроокружении [45]. Эти рецепторы известны как “рецепторы опознавания паттерна” или PRRs (Pattern recognition receptor) (см., например, [46, 47]). После взаимодействия между DAMP и PRR на клетках-мишенях запускаются внутриклеточные сигнальные каскады, активирующие экспрессию генов – медиаторов воспаления, которые координируют устранение патогенов и поврежденных или инфицированных клеток.

К основным PRRs относятся: TLR-рецепторы, семейство RIG-I-подобных рецепторов (RLR), цитоплазматические РНК-хеликазы, стимуляторы генов интерферона (STING), Nod-подобные рецепторы (NLR), лектиновые рецепторы С-типа (CLR) и сенсорные белки цитозольной ДНК [48]. Агонисты PRRs могут способствовать врожденным и специфическим иммунным реакциям, стимулируя опухолевые и окружающие их иммунные клетки к секреции цитокинов и хемокинов, регулируя поляризацию иммунных клеток, а также могут перепрограммировать иммуносупрессивное микроокружение опухоли [49, 50]. Среди множества агонистов особый интерес для генной терапии представляют пептидные агонисты, экспрессия которых в опухоли может достигаться доставкой в опухоль кодирующих их генов. Внутриопухолевая генная иммунотерапия агонистами PRRs направлена на индуцирование или усиление локального воспаления, приводящего к активации АПК. Кроме того, такой подход может приводить к формированию в опухоли иммунного ответа, характерного для заражения внутриклеточными патогенами (вирусами или бактериями), в ходе которого происходит активация CD8+ Т-клеток и выработка IFNγ CD4+ Т-клетками [51].

Одним из хорошо изученных белковых “сигналов опасности” является белок бактериальных жгутиков, флагеллин – агонист TLR5-рецептора [52]. Показано, что его синтез способствует стимуляции противоопухолевого иммунного ответа: он стимулирует пролиферацию Т-клеток, усиливает эффекторный ответ, увеличивает инфильтрацию Т-клеток и уменьшает рекрутирование и активацию Treg-клеток и миелоидных супрессорных клеток [53]. В исследовании [54] было показано, что аденовирус, экспрессирующий слитые белки флагеллин и Grp170, самый большой шаперон эндоплазматического ретикула, индуцирует мощный противоопухолевый ответ против меланомы B16, карциномы предстательной железы и карциномы толстой кишки мышей. Также в качестве белковых сигналов опасности, кодируемых онколитическими вирусами, были использованы гены белков теплового шока HSP-70, HSP-90 и транскрипционный фактор HSF1. Такие вирусы могут индуцировать специфический иммунный ответ в меланоме, колоректальных и других раковых опухолях у иммунокомпетентных мышей



**Таблица 2.** Использование молекул “сигналов опасности” в составе противоопухолевых генных препаратов

Молекула	Ссылки
Модифицированные аденовирусы	
Аденовирус, экспрессирующий слитые белки флагеллин и Grp170	[54]
Аденовирусы, кодирующие HSP-70, HSP-90, HSF1	[55, 56, 94]
Mobilan: рекомбинантный аденовирус, несущий самоактивирующуюся кассету TLR5	[95]
Онколитический вирус, кодирующий декорин и GM-CSF	[96]
Онколитический вирус, кодирующий декорин и IL-12	[97]
Модифицированные Т-клетки	
Трансдуцированные ретровирусным вектором, содержащим ген флагеллина, Т-клетки	[53]
Невирусные векторы	
Плазмидная ДНК с геном ESAT6	[98]
Плазмидная ДНК с генами ESAT6 и IL-2	[99]

[55]. В доклинических испытаниях HSP70-сверхэкспрессирующего онколитического вируса было показано, что его внутриопухолевое введение может ингибировать первичные и метастатические опухоли за счет усиленной онколитической активности и HSP70-опосредованного иммунного ответа. В ходе КИ данного вируса у некоторых пациентов наблюдались регрессия отдаленных метастазов и увеличение количества иммунных CD4+ и CD8+ Т-клеток и NK-клеток [56]. Примеры использования других молекул “сигналов опасности” в составе противоопухолевых генных препаратов можно найти в табл. 2.

В зависимости от инициирующего стимула гибель раковых клеток может быть иммуногенной или неиммуногенной. В результате иммуногенной гибели клеток (ICD, immunogenic cell death) высвобождаются растворимые медиаторы воспаления, которые действуют на рецепторы дендритных клеток, а также доступные для захвата опухолевые антигены, что в конечном счете усиливает презентацию опухолевых антигенов Т-клеткам. ICD в отличие от неиммуногенной гибели представляет собой важный путь активации иммунной системы против рака [57, 58]. Первоначально только некроз и аутофагия считались воспалительными и иммуногенными. Однако недавние исследования в химио- и лучевой терапии показали, что апоптотическую гибель клеток также можно разделить на иммуногенную и неиммуногенную. Например, апоптотическая гибель клеток, вызванная некоторыми онколитическими вирусами, является иммуногенной [59, 60].

Использование “сигналов опасности” в составе генотерапевтических препаратов усиливает привлечение и активацию АПК. Однако для формирования более эффективного противоопухолевого ответа также необходимо высвобождение опухолевых антигенов в процессе гибели раковых клеток. Таким образом, можно предположить,

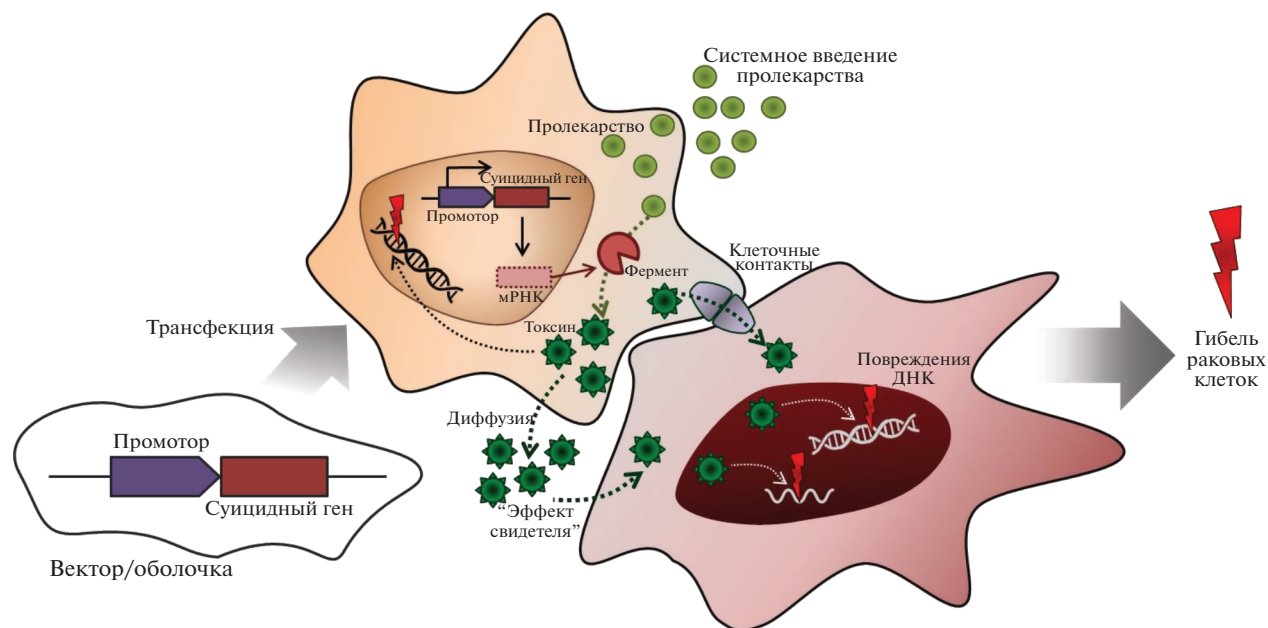
что для эффективной стимуляции первых стадий иммунного цикла необходимо сочетать “сигналы опасности” с цитотоксическими воздействиями, стимулирующими ICD. Среди генотерапевтических подходов такими свойствами обладает ГНЭПТ.

### ПРИНЦИПЫ ГНЭПТ

ГНЭПТ (ген-направленная энзиматическая пролекарственная терапия), ранее названная нами генной хирургией, – генная терапия с использованием генетических конструкций, в состав которых входят так называемые “гены-убийцы”, которые кодируют ферменты, способные превращать пролекарство в цитотоксин [61] (рис. 2). Экспрессия “генов-убийц” может контролироваться опухолеспецифичными промоторами, в этом случае фермент и связанная с ним ферментативная реакция преимущественно происходят в опухолевых клетках при минимальном воздействии на здоровые клетки. Таким образом, терапевтический индекс ГНЭПТ может быть намного выше, чем при обычной химиотерапии [62].

Цитотоксин может выходить из раковых клеток, в которых он был синтезирован, и проникать в соседние опухолевые клетки, не получившие “ген-убийцу”, приводя к их гибели тоже. Данное явление получило название “эффект свидетеля” (bystander effect), он может значительно увеличить эффективность ГНЭПТ [63].

ГНЭПТ направлена на уничтожение опухолевых клеток за счет использования присущих им свойств, например, повышенной скорости митотических делений. В этом отношении подход подобен химиотерапии. Однако, в отличие от последней, цитотоксин, убивающий раковые клетки путем ингибирования систем репликации, образуется внутри клеток, так что свойственная химиотерапии токсичность в данном случае резко снижается [64].



**Рис. 2.** Механизм действия ген-направленной энзиматической пролекарственной терапии (ГНЭПТ). Пунктирные стрелки обозначают возможные пути воздействия на раковую клетку, зависящие от конкретного токсина и типа клеток.

Кроме того, как уже упоминалось выше, гибель клеток от ГНЭПТ является иммуногенной [65]. Таким образом, препараты на основе ГНЭПТ способны не только уничтожить раковые клетки (этап 1 иммунного цикла), но и активировать противоопухолевый иммунный ответ (этап 2 иммунного цикла).

#### *Системы ГНЭПТ на основе тимидинкиназы вируса простого герпеса*

Наиболее изученной в настоящее время считается система ГНЭПТ “тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSVtk)/ганцикловир (Гц)”, достигшая поздних стадий клинических испытаний.

Тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSVtk) – фермент, катализирующий реакцию фосфорилирования нуклеозидов с образованием нуклеозидмонофосфатов. Ганцикловир (Гц) – синтетический аналог 2'-дезоксигуанозина, противовирусный препарат, в настоящее время используется в терапии цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции.

HSVtk обладает способностью фосфорилировать ганцикловир до ганцикловирмонофосфата, который клеточные киназы впоследствии фосфорилируют до ганцикловирдифосфата и ганцикловиртрифосфата. Цитотоксическое действие комбинации HSVtk/Гц реализуется за счет: 1) конкурентного ингибирования встраивания дезоксирибонуклеотрифосфата в ДНК опухолевой клетки под действием ДНК-полимеразы; 2) включения ганцикловиртрифосфата в ДНК опухолевой клетки,

приводящего к прекращению удлинения цепи ДНК во время клеточного деления. Вновь образующийся ганцикловиртрифосфат может выходить из опухолевых клеток, в которых он образовался, и проникать в соседние опухолевые клетки, приводя к их гибели (“эффект свидетеля”) [66, 67]. “Эффект свидетеля” проявляется за счет пассивной диффузии ганцикловира-монофосфата в соседние клетки через межклеточные щелевые контакты (gap-junctions). Недостаточная щелевая межклеточная коммуникация между делящимися раковыми клетками может ограничивать транспорт фосфорилированных производных ганцикловира в соседние клетки, ослабляя “эффект свидетеля” [68]. Опосредованная комбинацией HSVtk/ганцикловир гибель клеток может быть вызвана различными механизмами: апоптозом и некрозом, а также иммуногенной гибелью клеток с высвобождением опухолеспецифических антигенов и молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs), что приводит к инфильтрации опухоли различными антигенпрезентирующими клетками, включая дендритные и Т-клетки.

К настоящему времени инициировано более 200 клинических исследований ГНЭПТ-систем, и только некоторые из них достигли III фазы КИ. Препарат Cerepro (sitimagene ceradenovec) компании Ark Therapeutics представляет собой аденовирусный вектор, несущий ген *HSVtk*. Препарат предназначен для внутриопухолевого введения пациентам с глиомой высокой степени злокачественности, получил статус орфанного препарата

в 2002 г. В I и II фазах клинических исследований применение Сегерго было ассоциировано со значительным увеличением выживаемости. Предварительные результаты клинического исследования фазы III продемонстрировали значительный положительный эффект Сегерго в отношении времени до повторного вмешательства или смерти по сравнению со стандартным лечением (отношение рисков: 1.43; 95% ДИ: 1.06–1.93;  $p < 0.05$ ) [69]. Однако сотрудники Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА), изучив представленные Ark Therapeutics документы, не нашли достаточных доказательств клинической пользы препарата Сегерго и он не был зарегистрирован для клинического применения [70].

В настоящее время клинические исследования системы HSVtk/Гц в основном включают исследование комбинации этого подхода с другими методами противоопухолевой терапии для достижения лучших клинических результатов [71, 72]. Значительное внимание в области оптимизации систем ГНЭПТ и повышения их эффективности уделяется комбинации систем фермент–пролекарство с подходами, направленными на повышение иммуногенности опухолевых клеток. Использование вирусных векторов может приводить к дополнительной стимуляции иммунного ответа.

Так, испытания препарата ProstAtak (Aglatimogene besadenovec, CAN-2409, <https://www.candeltx.com/platforms/>), который представляет собой аденовирус, несущий ген *HSVtk*, и применяется в сочетании с перорально вводимым пролекарством валацикловиром, показали, что комбинация локального цитолитического действия с провоспалительным эффектом, обусловленным вирусным вектором, приводит к индукции опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов, которые вызывают активацию адаптивного иммунного ответа. В настоящее время проводится III фаза клинических исследований CAN-2409 на пациентах с впервые диагностированным локализованным раком простаты, у которых промежуточный или высокий риск прогрессирования (NCT01436968, табл. 1). Ожидается, что окончательные данные по эффективности CAN-2409 будут получены в 2024 г.

Одним из основных способов усиления противоопухолевой активности системы HSVtk/Гц является ее комбинация с различными модуляторами иммунной системы. Так, комбинация в одном рекомбинантном аденовирусе генов, кодирующих модифицированную тимидинкиназу вируса простого герпеса, HSV-sr39tk и IL-3, позволила повысить эффективность терапии благодаря более эффективной индукции иммунного ответа [73]. Также неоднократно было показано, что эффективность системы HSVtk/Гц резко возрастает, если в клетки опухоли совместно вводить гены HSVtk и GM-CSF [74–76]. Например, в работе

[77] изучалась противоопухолевая активность двух аденовирусных векторов, один из которых (AV-TK) содержал ген HSVtk, а второй (AV-GM/IL2)—гены цитокинов GM-CSF и IL-2 (интерлейкин-2). На мышцах с привитой высокометастазирующей опухолью 4T1 было показано, что только при одновременном введении аденовирусных векторов AV-TK и AV-GM/IL2 в опухоли наблюдается существенное подавление метастазирования и сильный опухолеспецифический цитотоксический ответ Т-лимфоцитов. В некоторых других исследованиях также было показано возникновение более сильного противоопухолевого иммунного ответа при использовании GM-CSF в сочетании с HSVtk/Гц [78–80].

В случае использования вирусных векторов иммунная система естественным образом активирует врожденный и адаптивный иммунные ответы на сами вирусные частицы, что препятствует длительному лечению [81]. Системы невирусной доставки обычно считаются неиммуногенными или низкоиммуногенными (см., например, [82]). Однако они менее эффективно проникают в опухолевые клетки и вследствие этого меньшая доля клеток разрушается, вызывая иммунный ответ. Поэтому для увеличения эффективности ГНЭПТ-систем на основе систем невирусной доставки необходимо дополнительно использовать гены, которые могут активировать иммунный ответ и увеличить эффективность противоопухолевой терапии. Такая стратегия может усилить системный эффект ГНЭПТ за счет обеспечения абскопального эффекта, тем самым обуславливая повышение общей эффективности применяемого противоопухолевого воздействия. Ее преимущества были продемонстрированы экспериментально. В нашей работе [64] мы использовали плазмиду, несущую экспрессионную кассету с генами HSVtk и GM-CSF под контролем CMV промотора, которая была инкапсулирована в поликатионную оболочку ПЭГ-ПЭИ. На опухолевых моделях было показано, что такая комбинация усиливает ингибирование роста опухоли, увеличивает продолжительность жизни животных и подавляет метастазирование по сравнению с конструкциями, несущими одиночный ген HSVtk или GM-CSF.

#### *Системы ГНЭПТ на основе цитозиндезаминазы*

Другой перспективной парой фермент/пролекарство для осуществления суицидной генной терапии является бактериальная или дрожжевая цитозиндезаминаза (CD) и пролекарство 5-фторцитозин (5-ФЦ), используемое в качестве противоракового препарата. Цитозиндезаминаза в норме катализирует реакцию гидролитического дезаминирования цитозина с образованием урацила, а в организмах дрожжей и бактерий принимает участие в утилизации пиримидина. Благодаря

реакции дезаминирования пролекарство 5-фторцитозин (5-ФЦ) в опухолевых клетках превращается в 5-фторурацил (5-ФУ), обладающий сильным противоопухолевым действием [83, 84]. Цитотоксический эффект 5-ФУ достигается следующими путями: 1) производное 5-ФУ, монофосфат (5-ФдУМФ), за счет необратимого ингибирования фермента тимидилатсинтазы останавливает синтез ДНК; 2) другие производные 5-ФУ, трифосфаты (5-ФУТФ и 5-ФдУТФ), могут встраиваться в нуклеотидную последовательность при репликации и останавливать синтез ДНК; 3) 5-ФУТФ предотвращает процессинг РНК и индуцирует апоптоз [85]. Помимо прямого воздействия благодаря “эффекту свидетеля” 5-ФУ из клеток, в которых он был синтезирован, проникает в соседние клетки и поражает их [86]. В отличие от системы ГНЭПТ на основе HSVtk/ганцикловира, система CD/5-ФЦ действует не только на делящиеся, но и на покоящиеся клетки. 5-ФУ свободно диффундирует между клетками, что обуславливает более сильный “эффект свидетеля”. Так, в *in vivo* модели показано, что даже 2% клеток, экспрессирующих CD, может быть достаточно для значительной регрессии опухоли при использовании нетоксичных доз 5-ФЦ [86].

Так же как и в системах, использующих HSVtk, существует несколько примеров того, как эффективность данной суицидной системы возрастает при использовании в сочетании с генами, кодирующими те или иные активаторы иммунного ответа. Так, комбинация аденовирусов, кодирующих CD и IL-12, в присутствии 5-фторцитозина позволила достичь существенно лучшей эффективности лечения экспериментальных опухолей мыши по сравнению с каждой из монотерапий. Комбинированная терапия также увеличивала активность НК-клеток селезенки и продукцию IFN-гамма спленоцитами [87]. Другим примером может служить аденовирусный вектор, несущий гены цитозиндезаминазы (CD) и гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF) под контролем CMV промотора (Ad-CD-GMCSF) [88]. У мышей, получивших лечение Ad-CD-GMCSF в сочетании с 5-ФЦ, значительно замедлялся рост опухоли и увеличивалась продолжительность жизни по сравнению с мышами, получившими конструкцию, содержащую только ген CD (Ad-CD), и мышами, не получившими лечения. Кроме того, отмечалось накопление опухолеспецифичных Т-клеток.

Приведенные примеры указывают на ведущую роль иммунной системы для достижения системного противоопухолевого эффекта. Эти данные показывают, что для системы ГНЭПТ необходим подбор второго компонента, который сможет наиболее эффективно запустить каскад противоопухолевого иммунного цикла.

Наиболее известным генотерапевтическим препаратом на основе системы CD/5-ФЦ, достигшим III фазы клинических исследований, является препарат Тоса 511, разработанный компанией Tosagen, США и предназначенный для внутриопухолевого введения. Тоса 511 (vocimagene amiretrorepvec) – нелитический ретровирусный реплицирующийся вектор, несущий ген цитозиндезаминазы дрожжей, способный инфицировать только делящиеся клетки. Разработчиками использована “гуманизированная” форма гена цитозиндезаминазы *у*CD2 (с оптимизированным набором кодонов, характерных для гена человека), в которой дополнительно изменены три аминокислотных остатка для того, чтобы добиться стабильности работы цитозиндезаминазы при 37°C. Испытания на животных показали, что Тоса 511 стабильно реплицируется в ксенотрансплантатах опухолей человека и после введения 5-фторцитозина вызывает полную регрессию таких ксенотрансплантатов [89]. В КИ (NCT01470794, NCT01156584, NCT01985256) была доказана безопасность внутриопухолевого введения Тоса 511 пациентам с глиомами с последующим лечением Тоса FC (5-фторцитозин с пролонгированным периодом высвобождения) как в составе монотерапии, так и в комбинации с другими видами терапии. Тоса 511 показал многообещающие результаты на ранних стадиях клинических испытаний. У ряда пациентов с глиомами высокой степени злокачественности, получивших Тоса 511 + Тоса FC, наблюдалась многолетняя стойкая ремиссия [90]. В 2017 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) присвоило Тоса 511 статус “прорывной терапии” для лечения рецидивирующей глиомы высокой степени злокачественности [91].

Однако в многоцентровом исследовании III фазы, в ходе которого проводилась оценка эффективности лечения с помощью Тоса 511 + Тоса FC по сравнению со стандартной терапией у пациентов с рецидивирующей глиомой высокой степени злокачественности, подвергшейся резекции, не было выявлено статистически значимых различий между медианами общей выживаемости в группах. Медиана общей выживаемости составила 11.5 мес. при терапии препаратом Тоса 511 и 12.2 мес. при стандартной терапии соответственно (отношение рисков 1.06;  $p = 0.6154$ ). Кроме того, по всем вторичным конечным точкам также не было выявлено значимых различий между исследуемыми группами [92]. Провал Тоса 511 в КИ III фазы стал большим разочарованием для всех разработчиков генотерапевтических препаратов. Выдвигаются различные предположения, почему терапия Тоса 511 оказалась недостаточно эффективной, в частности неуспех связывают с низкой эффективностью начальной доставки вируса к месту опухоли, с на-

личиём физических и биологических барьеров для репликации вируса, отсутствием в составе препарата генов системы активации иммунного ответа и как следствие – с отсутствием развития адекватного противоопухолевого иммунного ответа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутриопухолевое введение иммунотерапевтических средств набирает обороты благодаря множеству преимуществ, включающих возможность достижения высоких локальных концентраций, значительное снижение системной токсичности и развитие абскопальных эффектов. Ген-иммунная внутриопухолевая терапия включает в себя ряд подходов, основанных на усилении противоракового иммунного ответа, и открывает принципиальную возможность сочетать в одной терапевтической конструкции несколько противораковых агентов и доставлять их непосредственно к опухоли, тем самым снижая побочные эффекты, наблюдаемые при системном введении. Локальная активация иммунных клеток в месте локализации опухоли способствует также развитию глобального иммунного ответа организма и позволяет воздействовать на отдаленные метастатические опухолевые очаги (абскопальный эффект). Такая стратегия “локальная доставка для глобального эффекта” была сформулирована и хорошо обоснована в обзоре с выразительным названием “Intratumoral Delivery of Immunotherapy – Act Locally, Think Globally” (“Внутриопухолевая иммунотерапия – действуйте локально, мыслите глобально”) [93]. Благодаря множеству преимуществ, таких как высокая локальная концентрация, индукция абскопального эффекта, сниженная нецелевая токсичность, это направление активно развивается в последнее время, что подтверждается растущим числом доклинических и клинических испытаний препаратов, относящихся к категории “ген-иммунная терапия рака”.

В состав генно-инженерных конструкций могут входить гены, кодирующие ферменты, превращающие пролекарства в лекарства, как это используется в ГНЭПТ, гены, кодирующие ингибиторы иммунных контрольных точек или костимуляторы Т-клеточной активации, или, наконец, гены, кодирующие неспецифические модуляторы иммунного ответа. Несмотря на множество свидетельств эффективности генотерапевтических препаратов, предназначенных для внутриопухолевого введения и кодирующих отдельные гены системы активации иммунного ответа, для широкого внедрения в клиническую практику необходимо добиваться более высокой эффективности такой терапии. На сегодняшний день общепринято мнение, что ключ к улучшению лечения заключается в комбинации подходов, которые позволяют восполнить недо-

статки каждого в отдельности. Мы полагаем, что комбинация ген-иммунных препаратов, действующих на различные этапы противоопухолевого иммунного цикла, может преодолеть существующие ограничения и значимо повысить эффективность такой терапии. Кроме того, существенного синергического эффекта можно ожидать от совместного использования ингибиторов иммунных контрольных точек на основе моноклональных антител и внутриопухолевой ген-иммунной терапии, способствующей формированию иммуноактивированного микроокружения опухоли.

Ген-иммунная терапия может хорошо сочетаться с традиционными методами лечения рака – химио- и радиотерапией. Оптимальный набор негенетических компонентов комбинированной терапии невозможно подобрать теоретически из-за непредсказуемости эффектов их взаимодействия. Тем не менее самые общие требования к этим агентам можно сформулировать *a priori*. В частности, побочные эффекты, возможно, могут быть уменьшены при местном, ограниченном пределах опухоли терапевтическом лечении, вызывающем также иммунологические ответы в удаленных от места введения опухолевых очагах, включая метастазы. С этой точки зрения наиболее очевидным и экспериментально и клинически наиболее изученным кандидатом на комбинированную терапию с ген-иммунными препаратами является местная лучевая терапия, которая вызывает иммуногенную смерть клеток и демонстрирует явный абскопальный эффект. Следует при этом иметь в виду значительные индивидуальные вариации пациентов, которые требуют улучшения диагностических методов, позволяющего персонализировать использование как ген-иммунной терапии, так и ее комбинаторных партнеров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 20-115-50440.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment // *Cancer Cell*. 2012. V. 21. № 3. P. 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
2. Smyth M.J., Ngiew S.F., Ribas A., Teng M.W. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016.

- V. 13. № 3. P. 143–158.  
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.209>
3. *Chen L., Flies D.B.* Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition // *Nat. Rev. Immunol.* 2013. V. 13. № 4. P. 227–242.  
<https://doi.org/10.1038/nri3405>
  4. *Forster M.D., Devlin M.J.* Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer // *Front. Oncol.* 2018. V. 8. P. 310.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00310>
  5. *Hude I., Sasse S., Engert A., Brockelmann P.J.* The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma // *Haematologica.* 2017. V. 102. № 1. P. 30–42.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2016.150656>
  6. *Marin-Acevedo J.A., Dholaria B., Soyano A.E. et al.* Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges // *J. Hematol. Oncol.* 2018. V. 11. № 1. P. 39.  
<https://doi.org/10.1186/s13045-018-0582-8>
  7. *Rotte A.* Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019. V. 38. № 1. P. 255.  
<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1259-z>
  8. *Sharma P., Allison J.P.* The future of immune checkpoint therapy // *Science.* 2015. V. 348. № 6230. P. 56–61.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>
  9. *Sharpe A.H.* Introduction to checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy // *Immunol. Rev.* 2017. V. 276. № 1. P. 5–8.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12531>
  10. *Postow M.* Toxicities associated with checkpoint inhibitor immunotherapy // UpToDate. This topic last updated: Aug 12, 2021. <https://www.uptodate.com/contents/toxicities-associated-with-checkpoint-inhibitor-immunotherapy>
  11. *Alexander W.* The checkpoint immunotherapy revolution: what started as a trickle has become a flood, despite some daunting adverse effects; new drugs, indications, and combinations continue to emerge // *P T.* 2016. V. 41. № 3. P. 185–191.
  12. *Postow M.A., Sidlow R., Hellmann M.D.* Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade // *N. Engl. J. Med.* 2018. V. 378. № 2. P. 158–168.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1703481>
  13. *Abdin S.M., Zaher D.M., Arafa E.A., Omar H.A.* Tackling cancer resistance by immunotherapy: updated clinical impact and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors // *Cancers (Basel).* 2018. V. 10. № 2. P. 32.  
<https://doi.org/10.3390/cancers10020032>
  14. *Stein-Merlob A.F., Rothberg M.V., Ribas A., Yang E.H.* Cardiotoxicities of novel cancer immunotherapies // *Heart.* 2021. heartjnl-2020-318083.  
<https://doi.org/10.1136/heartjnl-2020-318083>
  15. *Portsmouth D., Hlavaty J., Renner M.* Suicide genes for cancer therapy // *Mol. Aspects. Med.* 2007. V. 28. № 1. P. 4–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.12.001>
  16. *Ascierto P.A., Del Vecchio M., Mackiewicz A. et al.* Overall survival at 5 years of follow-up in a phase III trial comparing ipilimumab 10 mg/kg with 3 mg/kg in patients with advanced melanoma // *J. Immunother. Cancer.* 2020. V. 8. № 1. P.e000391.  
<https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000391>
  17. *Chen D.S., Mellman I.* Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle // *Immunity.* 2013. V. 39. № 1. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
  18. *Ziani L., Chouaib S., Thiery J.* Alteration of the antitumor immune response by cancer-associated fibroblasts // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 414.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00414>
  19. *Millington L., Zhang Y., Irvine D.J.* Delivering safer immunotherapies for cancer // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2017. V. 114. P. 79–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.011>
  20. *Song W., Shen L., Wang Y. et al.* Synergistic and low adverse effect cancer immunotherapy by immunogenic chemotherapy and locally expressed PD-L1 trap // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 2237.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04605-x>
  21. *Hewitt S.L., Bai A., Bailey D. et al.* Durable anticancer immunity from intratumoral administration of IL-23, IL-36gamma, and OX40L mRNAs // *Sci. Transl. Med.* 2019. V. 11. № 477. P. eaat9143.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat9143>
  22. *Jimeno A., Gupta S., Sullivan R. et al.* Abstract CT032: A phase 1/2, open-label, multicenter, dose escalation and efficacy study of mRNA-2416, a lipid nanoparticle encapsulated mRNA encoding human OX40L, for intratumoral injection alone or in combination with durvalumab for patients with advanced malignancies // *Cancer Res.* 2020. V. 76. № 14. Supplement. P. CT032.  
<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2020-CT032>
  23. *Bartkowiak T., Curran M.A.* 4-1BB Agonists: Multi-potent potentiators of tumor immunity // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 117.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00117>
  24. *Andarini S., Kikuchi T., Nukiwa M. et al.* Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of OX40 ligand to tumor cells enhances antitumor immunity of tumor-bearing hosts // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 9. P. 3281–3287.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3911>
  25. *Huang J.H., Zhang S.N., Choi K.J. et al.* Therapeutic and tumor-specific immunity induced by combination of dendritic cells and oncolytic adenovirus expressing IL-12 and 4-1BBL // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 2. P. 264–274.  
<https://doi.org/10.1038/mt.2009.205>
  26. *Shin C.A., Cho H.W., Shin A.R. et al.* Co-expression of CD40L with CD70 or OX40L increases B-cell viability and antitumor efficacy // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 29. P. 46173–46186.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10068>
  27. *Eriksson E., Milenova I., Wenthe J. et al.* Shaping the tumor stroma and sparking immune activation by CD40 and 4-1BB signaling induced by an armed oncolytic virus // *Clin. Cancer Res.* 2017. V. 23. № 19. P. 5846–5857.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0285>
  28. *Svensson E., Milenova I., Moreno R. et al.* Abstract 297: Immunotherapy with a CD40L/4-1BBL double-

- armed oncolytic adenovirus drives Th1 immunity and control tumor progression in a pancreas cancer model // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 15. Supplement. P. 297. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-297>
29. *De Lombaerde E., De Wever O., De Geest B.G.* Delivery routes matter: Safety and efficacy of intratumoral immunotherapy // *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer.* 2021. V. 1875. № 2. P. 188526. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188526>
  30. Cytokines in the balance // *Nat. Immunol.* 2019. V. 20. № 12. P. 1557. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0557-0>
  31. *Qiu Y., Su M., Liu L. et al.* Clinical application of cytokines in cancer immunotherapy // *Drug. Des. Devel. Ther.* 2021. V. 15. P. 2269–2287. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S308578>
  32. *Neri D., Sondel P.M.* Immunocytokines for cancer treatment: past, present and future // *Curr. Opin. Immunol.* 2016. V. 40. P. 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.03.006>
  33. *Daud A.I., DeConti R.C., Andrews S. et al.* Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. № 36. P. 5896–5903. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.6794>
  34. *Daud A., Algazi A.P., Ashworth M.T. et al.* Systemic antitumor effect and clinical response in a phase 2 trial of intratumoral electroporation of plasmid interleukin-12 in patients with advanced melanoma // *J. Clin. Oncol.* 2014. V. 32. № 15. Suppl. P. 9025. [https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.9025](https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.9025)
  35. *Algazi A., Bhatia S., Agarwala S. et al.* Intratumoral delivery of tavokinogene telseplasmid yields systemic immune responses in metastatic melanoma patients // *Ann. Oncol.* 2020. V. 31. № 4. P. 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.12.008>
  36. *Yan C., Jie L., Yongqi W. et al.* Delivery of human NKG2D-IL-15 fusion gene by chitosan nanoparticles to enhance antitumor immunity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 463. № 3. P. 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.065>
  37. *Tan L., Han S., Ding S. et al.* Chitosan nanoparticle-based delivery of fused NKG2D-IL-21 gene suppresses colon cancer growth in mice // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 3095–3107. <https://doi.org/10.2147/IJN.S128032>
  38. *Bechter O., Utikal J., Baurain J.-F. et al.* A first-in-human study of intratumoral SAR441000, an mRNA mixture encoding IL-12sc, interferon alpha2b, GM-CSF and IL-15sushi as monotherapy and in combination with cemiplimab in advanced solid tumors // *J. Immunother. Cancer.* 2020. V. 8. Suppl. 3. P. Abstract 391. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-SITC2020.0391>
  39. *Pol J.G., Workenhe S.T., Konda P. et al.* Cytokines in oncolytic virotherapy // *Cytokine Growth. Factor. Rev.* 2020. V. 56. P. 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.10.007>
  40. *Aurelian L.* Oncolytic viruses as immunotherapy: progress and remaining challenges // *Onco. Targets. Ther.* 2016. V. 9. P. 2627–2637. <https://doi.org/10.2147/OTT.S63049>
  41. *Andtbacka R.H., Kaufman H.L., Collichio F. et al.* Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma // *J. Clin. Oncol.* 2015. V. 33. № 25. P. 2780–2788. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3377>
  42. *Gallucci S., Matzinger P.* Danger signals: SOS to the immune system // *Curr. Opin. Immunol.* 2001. V. 13. № 1. P. 114–119. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00191-6)
  43. *Guo Z.S., Liu Z., Bartlett D.L.* Oncolytic immunotherapy: Dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity // *Front. Oncol.* 2014. V. 4. P. 74. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00074>
  44. *Roh J.S., Sohn D.H.* Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases // *Immune Netw.* 2018. V. 18. № 4. P. e27. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
  45. *Galluzzi L., Buque A., Kepp O. et al.* Immunogenic cell death in cancer and infectious disease // *Nat. Rev. Immunol.* 2017. V. 17. № 2. P. 97–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>
  46. *Heil M., Land W.G.* Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life // *Front. Plant. Sci.* 2014. V. 5. P. 578. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00578>
  47. *van der Burg S.H., Arens R., Ossendorp F. et al.* Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion // *Nat. Rev. Cancer.* 2016. V. 16. № 4. P. 219–233. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.16>
  48. *Okude H., Ori D., Kawai T.* Signaling through nucleic acid sensors and their roles in inflammatory diseases // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 625833. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.625833>
  49. *Aleynick M., Svensson-Arvelund J., Flowers C.R. et al.* Pathogen molecular pattern receptor agonists: treating cancer by mimicking infection // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. № 21. P. 6283–6294. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1800>
  50. *Bai L., Li W., Zheng W. et al.* Promising targets based on pattern recognition receptors for cancer immunotherapy // *Pharmacol. Res.* 2020. V. 159. P. 105017. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105017>
  51. *Jin B., Sun T., Yu X.H. et al.* The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation // *Clin. Dev. Immunol.* 2012. V. 2012. P. 836485. <https://doi.org/10.1155/2012/836485>
  52. *Vijayan A., Rumbo M., Carnoy C., Sirard J.C.* Compartmentalized antimicrobial defenses in response to flagellin // *Trends. Microbiol.* 2018. V. 26. № 5. P. 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.008>
  53. *Geng D., Kaczanowska S., Tsai A. et al.* TLR5 Ligand-secreting T cells reshape the tumor microenvironment and enhance antitumor activity // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 10. P. 1959–1971. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2467>
  54. *Yu X., Guo C., Yi H. et al.* A multifunctional chimeric chaperone serves as a novel immune modulator inducing therapeutic antitumor immunity // *Cancer Res.* 2013. V. 73. № 7. P. 2093–2103. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1740>

55. *Huang X.F., Ren W., Rollins L. et al.* A broadly applicable, personalized heat shock protein-mediated oncolytic tumor vaccine // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 21. P. 7321–7329.
56. *Li J.L., Liu H.L., Zhang X.R. et al.* A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients // *Gene Ther.* 2009. V. 16. № 3. P. 376–382.  
<https://doi.org/10.1038/gt.2008.179>
57. *Golden E.B., Pellicciotta I., Demaria S. et al.* The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways // *Front. Oncol.* 2012. V. 2. P. 88.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00088>
58. *Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L.* Immunogenic cell death in cancer therapy // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. V. 31. P. 51–72.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>
59. *Woller N., Gurlevik E., Ureche C.I. et al.* Oncolytic viruses as anticancer vaccines // *Front. Oncol.* 2014. V. 4. P. 188.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00188>
60. *Uusi-Kerttula H., Hulin-Curtis S., Davies J., Parker A.L.* Oncolytic adenovirus: Strategies and insights for vector design and immuno-oncolytic applications // *Viruses.* 2015. V. 7. № 11. P. 6009–6042.  
<https://doi.org/10.3390/v7112923>
61. *Sverdlov E.D.* Genetic surgery – a right strategy to attack cancer // *Curr. Gene Ther.* 2011. V. 11. № 6. P. 501–531.  
<https://doi.org/10.2174/156652311798192842>
62. *Hamstra D.A., Lee K.C., Tychewicz J.M. et al.* The use of 19F spectroscopy and diffusion-weighted MRI to evaluate differences in gene-dependent enzyme prodrug therapies // *Mol. Ther.* 2004. V. 10. № 5. P. 916–928.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.022>
63. *Azatian A., Yu H., Dai W. et al.* Effectiveness of HSV-tk suicide gene therapy driven by the Grp78 stress-inducible promoter in esophagogastric junction and gastric adenocarcinomas // *J. Gastrointest. Surg.* 2009. V. 13. № 6. P. 1044–1051.  
<https://doi.org/10.1007/s11605-009-0839-1>
64. *Alekseenko I.V., Snezhkov E.V., Chernov I.P. et al.* Therapeutic properties of a vector carrying the HSV thymidine kinase and GM-CSF genes and delivered as a complex with a cationic copolymer // *J. Transl. Med.* 2015. V. 13. P. 78.  
<https://doi.org/10.1186/s12967-015-0433-0>
65. *Hojeij R., Domingos-Pereira S., Nkosi M. et al.* Immunogenic human papillomavirus pseudovirus-mediated suicide-gene therapy for bladder cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 7. P. 1125.  
<https://doi.org/10.3390/ijms17071125>
66. *Greco R., Oliveira G., Stanghellini M.T. et al.* Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene // *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 95.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00095>
67. *Yi Q.Y., Bai Z.S., Cai B. et al.* HSVTK/GCV can induce cytotoxicity of retinoblastoma cells through autophagy inhibition by activating MAPK/ERK // *Oncol. Rep.* 2018. V. 40. № 2. P. 682–692.  
<https://doi.org/10.3892/or.2018.6454>
68. *Ram Z., Culver K.W., Oshiro E.M. et al.* Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells // *Nat. Med.* 1997. V. 3. № 12. P. 1354–1361.  
<https://doi.org/10.1038/nm1297-1354>
69. *Immonen A., Vapalahti M., Tyynela K. et al.* AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study // *Mol. Ther.* 2004. V. 10. № 5. P. 967–972.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.002>
70. EMA. Ark Therapeutics Ltd withdraws its marketing authorisation application for Cerepro (sitimagene ceradenovec) // Press Release 11/03/2010. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ark-therapeutics-ltd-withdraws-its-marketing-authorisation-application-cerepro-sitimagene>
71. *Shen C.H., Lin M.C., Fang C.Y. et al.* Suppression of bone metastatic castration-resistant prostate cancer cell growth by a suicide gene delivered by JC polyomavirus-like particles // *Gene Ther.* 2021. Online ahead of print.  
<https://doi.org/10.1038/s41434-021-00280-8>
72. *Emamian M., Abbaspour A., Shahani T. et al.* Non-viral suicide gene therapy: Cytosine deaminase gene directed by VEGF promoter and 5-fluorocytosine as a gene directed enzyme/prodrug system in breast cancer model // *Drug. Res. (Stuttg).* 2021. V. 71. № 7. P. 395–406.  
<https://doi.org/10.1055/a-1488-6054>
73. *Yu C.F., Hong J.H., Chiang C.S.* The roles of macrophages and nitric oxide in interleukin-3-enhanced HSV-Sr39tk-mediated prodrug therapy // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. P. e56508.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056508>
74. *Majumdar A.S., Zolotarev A., Samuel S. et al.* Efficacy of herpes simplex virus thymidine kinase in combination with cytokine gene therapy in an experimental metastatic breast cancer model // *Cancer Gene Ther.* 2000. V. 7. № 7. P. 1086–1099.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700215>
75. *Lechanteur C., Delvenne P., Princen F. et al.* Combined suicide and cytokine gene therapy for peritoneal carcinomatosis // *Gut.* 2000. V. 47. № 3. P. 343–348.  
<https://doi.org/10.1136/gut.47.3.343>
76. *Finocchiaro L.M., Fiszman G.L., Karara A.L., Glikin G.C.* Suicide gene and cytokines combined nonviral gene therapy for spontaneous canine melanoma // *Cancer Gene Ther.* 2008. V. 15. № 3. P. 165–172.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701096>
77. *Brockstedt D.G., Diagana M., Zhang Y. et al.* Development of anti-tumor immunity against a non-immunogenic mammary carcinoma through in vivo somatic GM-CSF, IL-2, and HSVtk combination gene therapy // *Mol. Ther.* 2002. V. 6. № 5. P. 627–636.
78. *Castleden S.A., Chong H., Garcia-Ribas I. et al.* A family of bicistronic vectors to enhance both local and systemic antitumor effects of HSVtk or cytokine expression in a murine melanoma model // *Hum. Gene Ther.* 1997. V. 8. № 17. P. 2087–2102.  
<https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.17-2087>



79. Lee K.H., Piao H., Son B.R. et al. Herpes simplex virus thymidine kinase and granulocyte macrophage colony-stimulating factor combination gene therapy in a murine CT26 cell colon cancer model // *Cancer Gene Ther.* 2004. V. 11. № 8. P. 570–576. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700736>
80. Braun B., Lange M., Oeckler R., Mueller M.M. Expression of G-CSF and GM-CSF in human meningiomas correlates with increased tumor proliferation and vascularization // *J. Neurooncol.* 2004. V. 68. № 2. P. 131–140. <https://doi.org/10.1023/b:neon.0000027751.87894.f0>
81. Lemos de Matos A., Franco L.S., McFadden G. Oncolytic viruses and the immune system: the dynamic duo // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020. V. 17. P. 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.001>
82. Ke L., Cai P., Wu Y.-L. Polymeric nonviral gene delivery systems for cancer immunotherapy // *Advanced Therapeutics.* 2020. V. 3. № 6. P. 1900213. <https://doi.org/10.1002/adtp.201900213>
83. Lu M., Freytag S.O., Stricker H. et al. Adaptive seamless design for an efficacy trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy and radiation in newly-diagnosed prostate cancer (ReCAP Trial) // *Contemp. Clin. Trials.* 2011. V. 32. № 3. P. 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2011.01.013>
84. Ostertag D., Amundson K.K., Lopez Espinoza F. et al. Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector // *Neuro. Oncol.* 2012. V. 14. № 2. P. 145–159. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor199>
85. Twitty C.G., Diago O.R., Hogan D.J. et al. Retroviral replicating vectors deliver cytosine deaminase leading to targeted 5-fluorouracil-mediated cytotoxicity in multiple human cancer types // *Hum. Gene Ther. Methods.* 2016. V. 27. № 1. P. 17–31. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.106>
86. Huber B.E., Austin E.A., Richards C.A. et al. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: Significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 17. P. 8302–8306. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8302>
87. Hwang K.S., Cho W.K., Yoo J. et al. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene transfer combined with cytosine deaminase followed by 5-fluorocytosine treatment exerts potent antitumor activity in Renca tumor-bearing mice // *BMC Cancer.* 2005. V. 5. P. 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-51>
88. Akbulut H., Coleri A., Sahin G. et al. A bicistronic adenoviral vector carrying cytosine deaminase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the therapeutic efficacy of cancer gene therapy // *Hum. Gene Ther.* 2019. V. 30. № 8. P. 999–1007. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.245>
89. Perez O.D., Logg C.R., Hiraoka K. et al. Design and selection of Toca 511 for clinical use: modified retroviral replicating vector with improved stability and gene expression // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. № 9. P. 1689–1698. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.83>
90. Cloughesy T.F., Landolfi J., Vogelbaum M.A. et al. Durable complete responses in some recurrent high-grade glioma patients treated with Toca 511 + Toca FC // *Neuro. Oncol.* 2018. V. 20. № 10. P. 1383–1392. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy075>
91. National Brain Tumor Society. National Brain Tumor Society Statement on Tocagen Designation // Press Release 23/02/2017. [https://blog.brainumor.org/press\\_releases/national-brain-tumor-society-statement-on-tocagen-designation/](https://blog.brainumor.org/press_releases/national-brain-tumor-society-statement-on-tocagen-designation/)
92. Collins S.A., Shah A.H., Ostertag D. et al. Clinical development of retroviral replicating vector Toca 511 for gene therapy of cancer // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2021. V. 10. P. 1–16. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1902982>
93. Aznar M.A., Tinari N., Rullan A.J. et al. Intratumoral delivery of immunotherapy-act locally, think globally // *J. Immunol.* 2017. V. 198. № 1. P. 31–39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601145>
94. Wang W., Ji W., Hu H. et al. Survivin promoter-regulated oncolytic adenovirus with Hsp70 gene exerts effective antitumor efficacy in gastric cancer immunotherapy // *Oncotarget.* 2014. V. 5. № 1. P. 150–160. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1430>
95. Mett V., Komarova E.A., Greene K. et al. Mobilan: A recombinant adenovirus carrying Toll-like receptor 5 self-activating cassette for cancer immunotherapy // *Oncogene.* 2018. V. 37. № 4. P. 439–449. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.346>
96. Liu Z., Yang Y., Zhang X. et al. An oncolytic adenovirus encoding decorin and granulocyte macrophage colony stimulating factor inhibits tumor growth in a colorectal tumor model by targeting pro-tumorigenic signals and via immune activation // *Hum. Gene Ther.* 2017. V. 28. № 8. P. 667–680. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.033>
97. Oh E., Choi I.K., Hong J., Yun C.O. Oncolytic adenovirus coexpressing interleukin-12 and decorin overcomes Treg-mediated immunosuppression inducing potent antitumor effects in a weakly immunogenic tumor model // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 3. P. 4730–4746. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13972>
98. Ushigusa T., Koyama Y., Ito T. et al. Innate immunity mediated by dendritic cells/macrophages plays a central role in the early period in tumor treatment using gene of *Mycobacterium tuberculosis* antigen // *J. Vet. Med. Sci.* 2018. V. 80. № 2. P. 190–196. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0466>
99. Koyama Y., Yoshihara C., Ito T. Novel antitumor strategy utilizing a plasmid expressing a *Mycobacterium tuberculosis* antigen as a “Danger Signal” to block immune escape of tumor cells // *Pharmaceutics.* 2015. V. 7. № 3. P. 165–174. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7030165>

## Gene-Immune Cancer Therapy. Perspectives and Problems

I. V. Alekseenko<sup>a, b, \*</sup>, V. V. Pleshkan<sup>a, b</sup>, A. I. Kuzmich<sup>a, b</sup>, S. A. Kondratieva<sup>b</sup>, and E. D. Sverdlov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*

<sup>b</sup>*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

*\*e-mail: irina.alekseenko@mail.ru*

Successful therapy of complex and heterogeneous malignant tumors requires the use of combinatorial approaches that combine the use of several methods that affect various processes vital for the development of tumors. The emergence of novel strategy for check-point immunotherapy (ICT) offers fundamentally new opportunities for cancer therapy, and many combinatorial methods are grouped around this type of treatment: from combinations of impact on various check-points to their combinations with traditional methods such as chemotherapy or radiation therapy. Despite important clinical benefits, checkpoint inhibition is associated with numerous side effects, probably caused by generalized immune activation. Combinations with other agents possessing their own toxicity can only increase the overall toxicity. Side effects can be reduced when using local therapy that is limited to the tumor, but elicits immunological responses in tumor foci distant from the site of treatment, including metastases. Tumor-confined therapeutic impact can be achieved with gene therapy, either by intratumoral delivery of the desired genes, or by their specific expression in the tumor. These genes can encode a variety of therapeutic products, from checkpoint inhibitors and immunomodulators to enzymes that mediate intratumoral conversion of prodrugs into chemotherapeutic agents (suicide gene therapy, Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy, GDEPT). Intratumoral injection of these genes can have a strong effect not only against injected tumors, but also against distant metastases, due to the abscopal effect. We will consider approaches using intratumoral administration of constructs encoding ICT, cytokines, danger signals, GDEPT enzymes, as well as and their combinations for gene-immune cancer therapy.

**Keywords:** immunotherapy, gene therapy, cancer, immune checkpoints, cytokines, danger signals, GDEPT.