

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ VV-GMCSF-Lact

© 2023 г. Е. В. Кулигина^{a,b,*}, В. А. Рихтер^{a,**}, В. В. Власов^{a,***}

^aИнститут химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

^bООО “Онкостар”, Сколково, Московская область, Россия

*E-mail: kuligina@niboch.nsc.ru

**E-mail: richter@niboch.nsc.ru

***E-mail: vlassov@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023 г.

После доработки 27.07.2023 г.

Принята к публикации 09.08.2023 г.

Виротерапия, или терапия с помощью онколитических вирусов, — один из наиболее активно развивающихся подходов к лечению широкого спектра солидных опухолей. Статья посвящена разработке и изучению свойств первого отечественного лекарственного препарата на основе рекомбинантного вируса осповакцины. Рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact получен генно-инженерным путём из российского штамма Л-ИВП вируса осповакцины. На культурах клеток и опухолевых моделях выявлены цитотоксическая активность и противоопухолевая эффективность вируса в отношении опухолевых клеток человека различного тканевого происхождения. Препарат успешно прошёл доклинические исследования как лекарство против рака молочной железы человека, в том числе трижды негативного фенотипа. Доказаны его безопасность, хорошая переносимость и фармакологическая эффективность. В настоящее время препарат находится в клинических исследованиях I фазы: изучение безопасности, переносимости и фармакокинетики у пациенток с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы. VV-GMCSF-Lact — первый российский противоопухолевый онколитический вирус, получивший разрешение Минздрава России на проведение клинических испытаний.

Ключевые слова: виротерапия, вирус осповакцины, рак молочной железы, глиома, доклинические и клинические исследования.

DOI: 10.31857/S0869587323090098, EDN: UGRBDM

Онколитические вирусы рассматриваются в качестве перспективных агентов для эффективной терапии опухолей, в том числе резистентных к традиционной химиотерапии [1–4]. Приемле-

мые профили безопасности и хорошая переносимость различных вирусов (аденовирус, вирус осповакцины, реовирус, парвовирус, вирус болезни Ньюкасла, вирус простого герпеса и др.) у



КУЛИГИНА Елена Владимировна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН. РИХТЕР Владимир Александрович — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биотехнологии ИХБФМ СО РАН. ВЛАСОВ Валентин Викторович — академик РАН, научный руководитель ИХБФМ СО РАН.

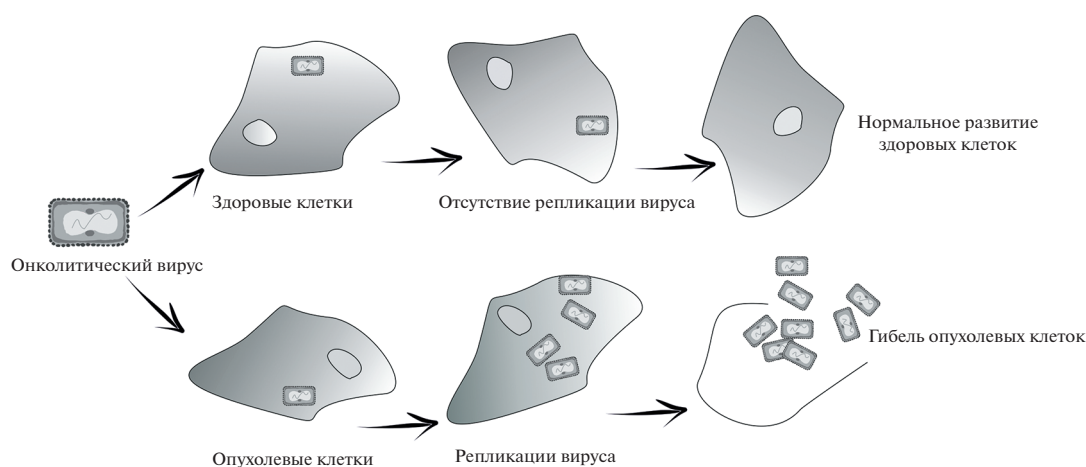


Рис. 1. Схема противоопухолевого действия онколитического вируса

пациентов обнадёживают при использовании их в качестве терапевтических препаратов (рис. 1).

В 2015 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило первый онколитический вирус Imlygic (talimogene laherparepex, также известный как T-VEC) для лечения пациентов с рецидивирующей меланомой [5]. Практически сразу препарат был разрешён в Европе. Ранее, в 2005 г., в Китае одобрили препарат Онкорин (Oncorine, H101), созданный на основе генетически модифицированного аденовируса, для лечения рака носоглотки в комбинации с химиотерапией [6]. Препарат Rigvir — немодифицированный энтеровирус штамма ECHO-7, был зарегистрирован в Латвии в 2004 г., а затем в Грузии и Армении, и вплоть до 2019 г. использовался для лечения меланомы [7]. Однако в 2019 г. Инспекция здравоохранения Латвии остановила распространение препарата из-за несоответствия его качества заявленным параметрам. Тем не менее компания Rigvir до сих пор работает над возобновлением латвийской регистрации.

Среди огромного разнообразия онколитических вирусов особого внимания заслуживает вирус осповакцины. Организация генома, способность к лизису инфицированных клеток и тропность к широкому спектру опухолей делают его идеальным объектом для конструирования рекомбинантов с повышенной противоопухолевой активностью. В настоящее время несколько препаратов, разработанных на основе этого вируса, находятся на стадиях доклинической разработки и клинических исследований. Наиболее продвинутой среди них — препарат Реха-Вес компании Jennerex Biotherapeutics (США), созданный на основе штамма JX-594 вируса осповакцины, который сконструирован из родительского штамма Wyeth путём удаления из генома вируса гена ви-

русной тимидинкиназы и встраивания двух трансенов — гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ) человека и гена β -галактозидазы *Escherichia coli* [8]. Первые фазы клинических испытаний показали многообещающие результаты: безопасность, хорошую переносимость и высокую терапевтическую эффективность, обусловленные не только прямым онколитическим действием вируса на опухолевые клетки, но и усилением ГМКСФ-зависимого противоопухолевого иммунитета [9–12].

Однако рандомизированные клинические испытания (II и III фазы) Реха-Вес в отношении гепатоцеллюлярной карциномы поздних стадий не показали значительного увеличения выживаемости пациентов по сравнению с контрольной группой [13]. Возможными причинами неудач могли стать как недостаточная литическая активность исходного штамма Wyeth, на основе которого создан Реха-Вес, так и поздняя стадия развития опухолевого процесса.

Ещё один рекомбинантный штамм вируса осповакцины — vvDD (JX-929 или vvDD-CDSR), прошедший первую фазу клинических исследований, сконструирован на базе штамма WR (Western Reserve), наиболее вирулентного среди штаммов вируса осповакцины. Из генома вируса были удалены гены вирусной тимидинкиназы (tk) и ростового фактора (VGF), в результате чего он потерял способность размножаться в нормальных клетках. В область гена тимидинкиназы встроены гены бактериальной цитозиндезаминазы и рецептора соматостатина. Эффективность онколитического действия вируса в отношении опухолевых клеток при этом значительно увеличилась и превзошла таковую для Реха-Вес [13–15].

Это лишь два примера разработки противоопухолевых препаратов на основе вируса осповакцины, которые наиболее близки к полученно-

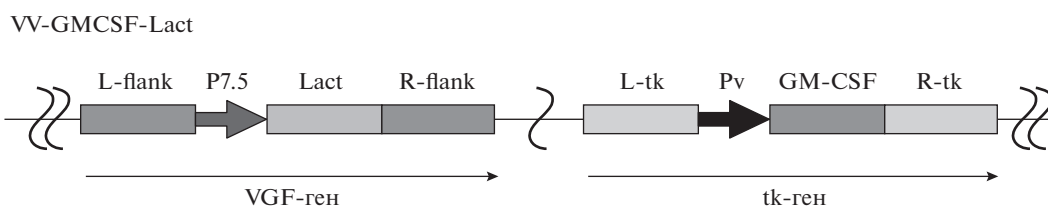


Рис. 2. Схема структуры генно-модифицированного онколитического вируса VV-GMCSF-Lact

L-flank (слева) и R-flank (справа) — фрагменты генома вируса осповакцины, фланкирующие ген вирусного ростового фактора (VGF); Lact — ген лактапина; P7.5, Pv — промоторы вируса осповакцины; L-tk (слева) и R-tk (справа) — последовательности генома VACV, штамм Л-ИВП, фланкирующие ген вирусной тимидинкиназы (tk); GM-CSF — ген ГМКСФ человека

му нами рекомбинантному штамму. Всего же на сайте ClinicalTrials.gov зарегистрировано более 120 клинических испытаний различных рекомбинантов вируса осповакцины в качестве лекарственных препаратов для терапии широкого спектра опухолей. При этом лишь одно клиническое исследование лекарств этого класса проводится в России — по протоколу Oncolact2020 “Открытое мультикогортное исследование I фазы безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, раствор для инъекций, замороженный, у пациенток с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы в последовательных когортах с эскалацией дозы при однократном и многократном введении” (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT05376527).

Рассмотрим подробнее разработку, доклинические и клинические испытания отечественного инновационного противоопухолевого лекарственного препарата, сконструированного на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины.

Получение генно-модифицированного онколитического вируса VV-GMCSF-Lact. VV-GMCSF-Lact создан коллективом авторов лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и лаборатории вирусных гепатитов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора на основе отечественного штамма вируса осповакцины Л-ИВП (Lister-Institute of Vaccine Preparations, Moscow, Russia, GenBank accession number: Bank It1780508 LIVP KP233807), который до 1980 г. использовался для вакцинации против оспы. Этот штамм, как и все штаммы вируса осповакцины, реплицируется в цитоплазме, не контактирует с генетическим материалом инфицированной клетки, не имеет онкогенного потенциала и способен индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Ранее было показано, что генетически немодифицированный Л-ИВП обладает естественной ци-

тотоксической активностью по отношению к человеческим и мышинным раковым клеткам [16].

Разработанный нами онколитический вирус, как и vvDD, содержит делеции фрагментов генов вирусной тимидинкиназы (tk) и ростового фактора (virus growth factor, VGF), в районы которых встроены гены ГМКСФ человека и онкотоксического белка лактапина соответственно (рис. 2). В результате проведенных генно-инженерных манипуляций VV-GMCSF-Lact ослаблен (аттенуирован) более чем в 100 раз по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП. Лактапин — фрагмент каппа-казеина человеческого молока. Этот пептид индуцирует апоптоз (программируемая гибель клеток) опухолевых клеток человека и животных и не влияет на жизнеспособность нормальных клеток [17–21]. ГМКСФ в свою очередь индуцирует развитие противоопухолевого иммунного ответа [22].

Структура VV-GMCSF-Lact была подтверждена как методом ПЦР, так и прямым секвенированием участков генов tk и VGF. Синтез продуктов обоих трансгенов (ГМКСФ и лактапина) в клетках млекопитающих, инфицированных вирусом, подтвержден методом анализа клеточных лизатов Вестерн-блот и методом иммуногистохимии [23].

Таким образом, удаление двух генов, обеспечивающих способность вируса реплицироваться в клетке, резко снижает его вирулентность в отношении здоровых клеток и увеличивает тропность к быстро делящимся опухолевым клеткам, пролиферативный потенциал которых вирус может использовать для собственного воспроизведения. Наличие трансгенов также усиливает противоопухолевый потенциал вирусной конструкции.

Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact *in vitro*. Цитотоксическую активность и онкоселективность VV-GMCSF-Lact оценивали по его действию на онкотрансформированные клетки различного происхождения, а также на нормальные немалигнизированные клетки (рис. 3). Установлено, что вирус тормозит развитие опухолевых клеток различного тканевого происхождения, практически не влияя на жизнеспособность

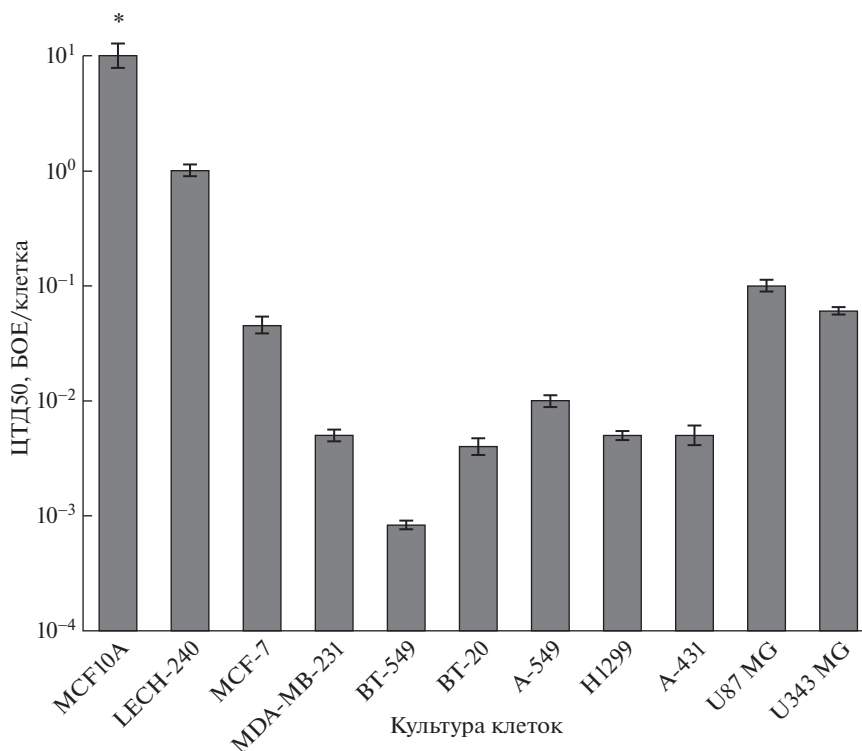


Рис. 3. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении онкотрансформированных и нормальных клеток человека различного тканевого происхождения

Культуры опухолевых клеток: MCF-7, MDA-MB-231, BT-549, BT-20 — рак молочной железы; A-549, H1299 — рак лёгкого; A-431 — эпидермоидная карцинома; U87 MG, U343 MG — глиобластома; культуры немалигнизированных (нормальных) клеток: MCF10A — эпителиоциты молочной железы; LECH-240 — диплоидные клетки лёгкого эмбриона человека; * — максимальная доза вируса 10 БОЕ/клетку не вызвала 50%-го токсического эффекта; БОЕ — бляшкообразующая единица; ЦТД₅₀ — цитотоксическая доза, концентрация вируса, вызывающая гибель 50% клеток (чем больше значение ЦТД₅₀, тем меньшей онколитической активностью обладает вирусный препарат в данной культуре клеток)

нормальных клеток [23]. При этом клетки различных опухолей проявляли разную чувствительность к действию вируса. Наиболее восприимчивыми к онколитическому действию VV-GMCSF-Lact оказались клетки опухолей молочной железы (MDA-MB-231, BT-549 и BT20).

Количественную оценку способности вируса адресно размножаться в опухолевых клетках человека проводили путём расчёта индекса онкоселективности: отношение ЦТД₅₀ в нормальных клетках к ЦТД₅₀ в опухолевых.

Для оценки онкоселективности использовали две культуры клеток нормальных тканей человека (MCF10A — культура клеток нормального эпителия молочной железы человека и LECH-240 — диплоидная культура клеток лёгкого эмбриона человека) и культуры клеток рака молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231, BT-549, BT-20) и рака лёгкого (A-549, H1299). Рассчитанные индексы селективности в паре культур молочной железы (нормальная/опухолевая) варьируют от 100 до 12000, для клеток лёгкого — 63 и 190 соответственно. Различия в индексах связаны с тем, что клетки

лёгкого эмбриона человека обладают достаточно высокой пролиферативной активностью (возможность неограниченного деления), что в определённой степени роднит их с раковыми и усиливает способность VV-GMCSF-Lact реплицироваться в них [24].

Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact *in vivo*. Изучение противоопухолевой эффективности и антиметастатического потенциала VV-GMCSF-Lact *in vivo* проводили на иммунодефицитных мышах линий SCID и nude с подкожно трансплантированными опухолями молочной железы человека MDA-MB-231 и BT-549, эпидермоидной карциномы A431 и глиобластомы U87-MG. Вирусный препарат вводили экспериментальным животным как внутривенно, так и внутриопухолево, в дозе 10⁷ БОЕ на животное, курсом из трёх инъекций с интервалом в 7 дней. Индекс торможения роста опухолей во всех экспериментах составил не менее 82% [23, 25]. Титр вируса в гомогенате инфицированных опухолей составлял 10⁸ БОЕ/мл, что свидетельствует об интенсивной репродукции вируса в опухолевых клетках.

Внутриопухолевое введение вируса вызывает деструкцию опухолевой ткани по сравнению с опухолями мышей контрольной группы, получавших физраствор. Репродукция вируса и экспрессия лактапина служат главными факторами деструкции опухоли, однако на этот процесс может влиять и экспрессия ГМКСФ в составе рекомбинантных штаммов. Известно, что локальная гиперэкспрессия этого цитокина приводит к патологическим изменениям ткани [22], что может быть связано с активацией эффекторных клеток иммунной системы. Мы исследовали данное явление в инфицированных VV-GMCSF-Lact опухолях методом иммуногистохимии с использованием антител к CD11b. Белок CD11b (интегрин альфа-M/бета-2) экспрессируется в моноцитах, гранулоцитах, макрофагах и натуральных киллерах и играет ключевую роль в воспалительном процессе, поскольку опосредует адгезию и миграцию лейкоцитов. Введение VV-GMCSF-Lact приводит к накоплению CD11b-позитивных клеток в соединительной ткани, прилежащей к опухоли (что соответствует наблюдаемой лейкоцитарной инфильтрации), а также вокруг кровеносных сосудов [24].

При оценке антиметастатического потенциала VV-GMCSF-Lact установлено, что при внутриопухолевом введении вирус проникает в опухолевые клетки, размножается в них, выходит из опухоли в кровоток и затем находит отдалённые очаги (метастазы) и уничтожает их [26]. Исследование фармакокинетики показало, что по истечении 12 суток после внутриопухолевого введения вирус обнаруживается лишь в опухоли и не тестируется в органах и тканях.

Таким образом, разработанный нами на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вирусный препарат эффективно поражает опухолевые клетки, находит метастазы и тормозит их развитие. При этом вирус является самореплицирующимся лекарственным препаратом, который даже при однократном введении способен надолго сохраняться в опухоли и выполнять свою терапевтическую функцию. Полученные данные о противоопухолевой и антиметастатической эффективности препарата в отношении солидных опухолей (негемопоэтические опухоли, то есть развившиеся не из клеток кроветворной системы) позволили нам перейти к его доклиническим испытаниям.

Доклинические исследования VV-GMCSF-Lact. Клетки злокачественных новообразований молочной железы человека оказались одними из наиболее чувствительными к онколитическому действию вируса. Поэтому в доклинических испытаниях вирусный препарат на основе VV-GMCSF-Lact изучался как лекарственное средство для терапии рака молочной железы, в том числе три-

жды негативного фенотипа (представляет собой злокачественную опухоль, для которой характерно отсутствие прогестероновых и эстрогеновых рецепторов, а также рецепторов эпидермального фактора роста). В ходе фармацевтической разработки препарата показано, что наиболее приемлемая готовая лекарственная форма — замороженная вирусная суспензия с титром вируса не менее 1×10^7 БОЕ/мл, требующая при транспортировке и хранении соблюдения холодовой цепи (транспортировка при температуре не выше -20°C ; хранение при -40°C).

Диапазон терапевтических доз лекарственного средства устанавливался в экспериментах на лабораторных животных с трансплантированными опухолями и составил 10^7 – 10^8 БОЕ на животное. Исследования общей (острой и субхронической) токсичности препарата проводили на базе лаборатории биологических испытаний Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Пушино), которая имеет аккредитацию соответствия принципам надлежащей лабораторной практики (Statement of OECD GLP Compliance).

Определение нетоксичного дозового уровня показало, что тестируемый препарат при однократном внутривенном введении самкам животных в дозах, в 7.5 (мыши), 30 (крысы) и 150 раз (кролики) превышающих однократную терапевтическую дозу для человека, не обладает выраженным токсическим действием. Наблюдаемые клинические признаки и снижение прироста массы тела свидетельствуют о достижении доз, близких к максимально переносимым.

Изучение острой токсичности лекарственного средства на мышах ICR и крысах SD показало, что его однократное подкожное введение самцам и самкам в дозах, эквивалентных терапевтической, 5-кратной (при введении мышам) и 20-кратной терапевтической (крысам) для человека, является безопасным. Введение препарата внутривенно в дозе, в 5 раз (мышам), либо в 20 раз (крысам) превышающей терапевтическую, способно вызывать ответную реакцию со стороны органов иммунной системы, что, в частности, проявлялось в увеличении массы селезёнки.

Исследование субхронической токсичности, раздражающего действия и фармакологической безопасности лекарственного средства при многократном введении самцам и самкам крыс SD позволило прийти к выводу, что препарат в использованных дозах безопасен для животных. Однако наблюдалось развитие подострой¹ воспалительной реакции в области введения препара-

¹ По продолжительности протекания воспалительные реакции делятся на острые, подострые и хронические. Термин “подострый” означает, что симптомы длятся дольше, чем при острых расстройствах, но не становятся хроническими.

та, что свидетельствует о его местном раздражающем действии. Он также способствовал стимуляции иммунного ответа, что заметно проявилось в регионарных подмышечных лимфоузлах в виде гиперплазии лимфоцитов в паракортикальной области. Что касается субхронической токсичности лекарственного средства при многократном подкожном введении самцам и самкам кроликов NZW, то в использованных дозах оно также безопасно. Кроме того, не выявлено отрицательного воздействия на двигательную активность, состояние сердечно-сосудистой и дыхательной систем.

В рамках изучения специфической токсичности вирусного препарата оценивались его алергизирующее и иммунотоксическое действие, а также влияние на репродуктивную функцию животных. В реакциях общей анафилаксии, активной кожной анафилаксии и гиперчувствительности замедленного типа установлено, что лекарственное средство на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины обладает слабым алергизирующим действием. Слабовыраженный иммунотоксический эффект препарата в использованных дозах зафиксирован при исследовании макропатологии, массы и клеточности² иммунокомпетентных органов, определении фагоцитарной активности макрофагов и оценке Т-зависимого гуморального и клеточного иммунного ответа. Также введение препарата в терапевтической и 5-кратной терапевтической дозах для человека не оказало существенного влияния на репродуктивную функцию самцов и самок крыс.

Основным механизмом действия лекарственного средства в отношении EGFR-положительных клеток рака молочной железы выступает RIPK-1-независимый EGFR-зависимый некроз. При этом введение в геном вируса трансгена, кодирующего белок лактапин, индуцирующий апоптоз, усиливает апоптотическую гибель опухолевых клеток [27]. Кроме того, опухолевые клетки, инфицированные вирусом, активно захватываются перитонеальными макрофагами.

Установлено, что фармакокинетика вирусного препарата при однократном и многократном введении является нелинейной. Особенности распределения вируса в организме экспериментальных животных с трансплантированными опухолями обусловлены репликацией (самовоспроизведением) рекомбинантного вируса в клетках опухоли и работой вируснейтрализующих антител. При этом основное содержание вируса детектируется в опухоли и незначительное — в других органах.

В экспериментах *in vitro* на культурах опухолевых клеток человека различного гистогенеза под-

тверждена высокая цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении опухолевых клеток молочной железы, лёгких, глиом и эпидермоидной карциномы. Противоопухолевую эффективность препарата подтверждали на моделях опухолей молочной железы (MDA-MB-231 и BT-549) и глиобластомы человека (U87-MG), подкожно трансплантированных иммунодефицитным мышам SCID. Препарат вводили внутриопухолево в дозе 10^7 БОЕ на животное курсом из 3—4 инъекций с интервалом 7 дней. Индекс торможения роста опухолей составил не менее 85%. VV-GMCSF-Lact также эффективно тормозил рост уже развившейся опухоли молочной железы MDA-MB-231 (индекс 42%).

Доклинические исследования безопасности и фармакологической эффективности лекарственного препарата на основе рекомбинантного вируса VV-GMCSF-Lact как терапевтического средства для лечения рака молочной железы человека успешно завершились в 2019 г. Полученные результаты позволили перейти к I фазе клинических испытаний.

Клинические исследования. Первая фаза клинических испытаний лекарственного препарата (Разрешение Министерства здравоохранения РФ № 787 от 26 ноября 2021 г.) проводится согласно протоколу Oncolact2020 “Открытое мультикогортное исследование I фазы безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, раствор для инъекций, замороженный, у пациенток с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы в последовательных когортах с эскалацией дозы при однократном и многократном введении”. Исследование зарегистрировано на сайте ClinicalTrials.gov (идентификатор NCT05376527). Спонсор — ООО “ОНКОСТАР” (Новосибирск), организация и проведение исследования — КИО ООО “АР-СИ-ТИ-ГЛОБАЛ” (Санкт-Петербург), медицинский мониторинг — ООО “3М Веритас” (Пермь), управление данными — Sciencefiles (Екатеринбург), статистический анализ фармакокинетических параметров — KEYSTAT (Смоленск).

Клинические испытания проводятся на четырёх клинических площадках:

- Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России (Санкт-Петербург), главный исследователь — доктор медицинских наук П.В. Криворотко;

- Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (Москва), доктор медицинских наук Е.В. Артамонова;

² Определение количества клеток иммунокомпетентного органа (на 1 г массы органа) и сопоставление с аналогичными показателями интактных животных.

Таблица 1. Дизайн первого этапа первой фазы клинических исследований

Номер когорты пациенток	Количество пациенток	Объём препарата, мл	Доза препарата, БОЕ
1	3	0.5	1×10^7
2	3	1	2×10^7
3	3	2	4×10^7
4	3	3	6×10^7
5	3	4	8×10^7
6	3	5	10×10^7
Всего	18	—	—

• Онкологический научный центр (Санкт-Петербург), кандидат медицинских наук Т.Т. Агисhev;

• Городской клинический онкологический диспансер Минздрава России (Санкт-Петербург), доктор медицинских наук Р.В. Орлова.

Цель исследования — оценить безопасность, переносимость и фармакокинетические параметры лекарственного препарата на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины у пациенток с рецидивирующим/рефрактерным метастатическим раком молочной железы в последовательных когортах с эскалацией дозы при однократном и многократном введении. Основные задачи:

- определение максимально переносимой дозы препарата;
- установление частоты, характера, интенсивности и длительности нежелательных реакций, связанных с применением препарата при его введении в возрастающих дозах;
- выявление дозолимитирующей токсичности (ДЛТ), степени её выраженности, длительности и обратимости;
- определение профиля фармакокинетики вируса и антител к нему;
- оценка объективного ответа на проводимое лечение;
- оценка динамики изменения размеров опухоли.

Первый этап I фазы, однократное введение. Лекарственный препарат (раствор для инъекций, 2×10^7 БОЕ/мл) применялся интратуморально (внутриопухолево) однократно в дизайне³ “3 + 3” в следующих дозах (табл. 1). На каждый уровень дозы (то есть в одну когорту) может быть включено от 3 до 6 пациенток. Исследуемая доза препарата сначала вводилась одной пациентке. В слу-

чае хорошей переносимости, при отсутствии токсичности III степени и выше через сутки такая же доза вводилась второй пациентке и далее, ещё через сутки, третьей. Наблюдение велось в течение трёх дней, затем следующая когорта из трёх человек получала увеличенную дозу препарата по той же схеме. Далее пациентки проходили все процедуры и визиты согласно протоколу.

Эскалация до следующего уровня происходила, если во время дозирования первых трёх пациенток не отмечалась ДЛТ. Если дозолимитирующая токсичность фиксировалась у одной из трёх женщин, производился набор ещё трёх пациенток на данном уровне дозы. Если дополнительных явлений ДЛТ не отмечалось, исследование переходило на следующий уровень, при появлении дополнительных случаев токсичности эскалация доз останавливалась. Исследования также прекращали, если частота случаев ДЛТ в когорте из трёх пациентов составляла два или три. Эскалация дозы для одной и той же пациентки не производилась, то есть для следующего уровня дозы набиралась новая когорта. Максимально переносимой считается доза, более низкая по отношению к той, при которой была определена дозолимитирующая токсичность.

После введения каждой дозы оценивалась частота развития ДЛТ, признаками которой считается наступление как минимум одного из следующих событий:

- негематологическая токсичность III степени и выше (за исключением алопеции);
- развитие фебрильной нейтропении: нейтрофилы $<0.5 \times 10^9/\text{л}$ и повышение температуры тела $>38.3^\circ\text{C}$ не более двух дней после введения препарата или клинически значимая системная инфекция (местная инфекция в месте введения препарата или в месте взятия биопсии не будет считаться клинически значимой);
- тромбоцитопения III степени и выше и/или геморрагические осложнения;

³ В данном контексте дизайн — последовательность действий исследования.

- повторное повышение активности аланин-аминотрансферазы (АЛТ) и/или аспартатамино-трансферазы (АСТ) больше чем в 4 раза от верхней границы нормы.

К настоящему моменту исследования первого этапа успешно завершены. Этап охватывал 26 пациенток, 19 из которых получили лекарственный препарат. Согласно полученным результатам, препарат хорошо переносится и безопасен в используемых дозах. Основным нежелательным явлением стала гипертермия, развивавшаяся в течение 1–2 суток после введения препарата, что было ожидаемо ввиду его вирусной природы.

Результаты первого этапа I фазы клинических исследований показали, что противоопухолевый лекарственный препарат на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lac вируса осповакцины безопасен при однократном интратуморальном применении у женщин с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы и может быть рекомендован для оценки его противоопухолевой эффективности при многократном введении (второй этап I фазы клинических исследований).

Второй этап I фазы, многократное введение. Второй этап I фазы исследования стартовал во второй половине мая 2023 г. Лекарственный препарат применяется интратуморально (внутриопухолево) раз в неделю в течение 4 недель в 3 дозах, определённых по результатам первого этапа: 10×10^7 БОЕ — максимальная переносимая доза (в нашем случае максимальная из исследованных доз) и две более низкие дозы — 6×10^7 и 8×10^7 БОЕ. Исследование также проводится в дизайне “3 + 3”, то есть эскалация до следующего дозового уровня происходит, если во время дозирования первых трёх пациенток (доза 6×10^7 БОЕ, 4 инъекции с интервалом в 1 неделю) не отмечается дозозаменяющей токсичности. После последнего введения препарата последней пациентке в когорте проводится наблюдение за пациентками в течение 14 дней, затем следующей когорте из трёх человек вводят следующую дозу препарата по той же схеме.

По состоянию на 10 августа 2023 г. закончено дозирование пациенток первой когорты второго этапа (доза 6×10^7 БОЕ, 4 инъекции с интервалом в 1 неделю). Явлений ДЛТ не зарегистрировано. По окончании периода наблюдения (14 дней) следующей когорте из трёх пациенток будет введена доза 8×10^7 БОЕ и т.д. Окончание второго этапа I фазы клинических исследований запланировано на первый квартал 2024 г.

Перспективы использования VV-GMCSF-Lac для терапии опухолей головного мозга. Известно, что злокачественные новообразования головного мозга и центральной нервной системы характеризуются одним из самых высоких показателей

смертности в структуре онкологических заболеваний в России и мире. Сегодня средняя выживаемость пациентов с диагнозом глиобластома составляет не более 15 месяцев. Имеющиеся в настоящий момент схемы терапии опухолей головного мозга не обеспечивают существенного улучшения качества и увеличения продолжительности жизни пациентов, поэтому, несомненно, важна разработка эффективных методов терапии.

При оценке цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении опухолевых клеток человека в рамках научно-исследовательских работ и доклинических испытаний установлено, что клетки глиобластомы весьма чувствительны к онколитическому действию вируса [23–27]. Показан значительный противоопухолевый потенциал VV-GMCSF-Lact в отношении трансплантированных экспериментальным животным глиом человека U87-MG и U343-MG [25] и глиомы C6 крысы.

Для изучения противоопухолевой эффективности вируса в отношении опухолей внутричерепной локализации целесообразно рассматривать внутривенный способ введения препарата как наименее инвазивный. При попадании в организм вирус провоцирует выработку вируснейтрализующих антител, которые взаимодействуют с вирусными частицами, что снижает противоопухолевый эффект препарата. Для защиты вируса от действия антител существует целый ряд подходов, один из которых — использование аптамеров, способных экранировать вирусы от иммунной системы [28].

В рамках работ по увеличению терапевтического потенциала VV-GMCSF-Lact в отношении опухолей головного мозга с помощью математического моделирования построены полноатомные модели пяти аптамеров, специфичных к онколитическому вирусу, которые отражают наиболее вероятную конформацию аптамеров в растворе. Выявлены потенциальные сайты связывания аптамеров с вирусом и определены нуклеотиды в структуре аптамеров, обуславливающие связывание с вирусной частицей, а также нуклеотиды, поддерживающие геометрию сайта связывания. Кроме того, созданы молекулярные конструкции бифункциональных аптамеров, обеспечивающих одновременно защиту вирусов от иммунной системы и адресную доставку к глиальным опухолям головного мозга. Применение разработанных аптамерных конструкций на опухолевых моделях глиом человека *in vitro* и *in vivo* позволит увеличить противоопухолевую эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении опухолей головного мозга.

Лекарственный препарат, разработанный на основе онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, — перспективное противоопухолевое средство для терапии солидных опухолей различного тканевого происхождения. В доклинических исследованиях на животных продемонстрированы безопасность, хорошая переносимость и фармакологическая эффективность препарата. Клинические испытания I фазы у пациенток с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы — первые клинические исследования препаратов этого класса в России, подтверждают безопасность применения лекарственного препарата в клинической практике.

Кроме того, препараты на основе онколитических вирусов, в том числе VV-GMCSF-Lact, обладают ещё одним неоспоримым преимуществом: при лечении опухолей они могут использоваться в комбинации с любыми другими терапевтическими подходами (химио- и лучевой терапией, а также иммунотерапевтическими препаратами), что значительно расширяет горизонты их применения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Научно-исследовательские работы проведены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.” (соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0057 от 27.06.2014 г.). Доклинические исследования препарата проведены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу” (Государственный контракт № 14.N08.11.0189 от 27.11.2017 г.). Исследование “Аптамеры как инструменты повышения противоопухолевой эффективности онколитического вируса VV-GMCSF-Lact для терапии злокачественных опухолей головного мозга” выполняется за счёт гранта Российского научного фонда № 22-64-00041 (<https://rscf.ru/project/22-64-00041/>).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lauer U.M., Beil J.* Oncolytic viruses: challenges and considerations in an evolving clinical landscape // *Future Oncol.* 2022. V. 18. P. 2627–2766.
2. *Li K., Zhao Y., Hu X. et al.* Advances in the clinical development of oncolytic viruses // *Am. J. Transl. Res.* 2022. V. 14 (6). P. 4192–4206.
3. *Yun C.O., Hong J., Yoon A.R.* Current clinical landscape of oncolytic viruses as novel cancer immunotherapeutic and recent preclinical advancements // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. 953410.
4. *Lin D., Shen Y., Liang T.* Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions // *Signal Transduct. Target Ther.* 2023. V. 8 (1). 156.
5. *Pol J., Kroemer G., Galluzzi L.* First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy // *OncoImmunology.* 2015. V. 5. e1115641.
6. *Liang M.* Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2018. V. 18 (2). P. 171–176.
7. *Hietanen E., Koivu M.K.A., Susi P.* Cytolytic Properties and Genome Analysis of Rigvir® Oncolytic Virotherapy Virus and Other Echovirus 7 Isolates // *Viruses.* 2022. V. 14 (3). 525.
8. *Mastrangelo M.J., Maguire H.C., Lattime E.C.* Intraleisional vaccinia/GM-CSF recombinant virus in the treatment of metastatic melanoma // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000. V. 465. P. 391–400.
9. *Liu T.C., Hwang T., Park B.H. et al.* The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates antitumoral, anti-vascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. P. 1637–1642.
10. *Heo J., Reid T., Ruo L. et al.* Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer // *Nat. Med.* 2013. V. 19. P. 329–336.
11. *Parato K.A., Breitbach C.J., Le Boeuf F. et al.* The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. P. 749–758.
12. *Hou W., Chen H., Rojas J. et al.* Oncolytic vaccinia virus demonstrates antiangiogenic effects mediated by targeting of VEGF // *Int. J. Cancer.* 2014. V. 135. P. 1238–1246.
13. *Chan W.M., McFadden G.* Oncolytic Poxviruses // *Annu. Rev. Virol.* 2014. V. 1. P. 119–141.
14. *Zeh H.J., Downs-Canner S., McCart J.A. et al.* First-in-man study of western reserve strain oncolytic vaccinia virus: safety, systemic spread, and antitumor activity // 2015. *Mol. Ther.* V. 23. P. 202–214.
15. *Downs-Canner S., Guo Z.S., Ravindranathan R. et al.* Phase 1 Study of Intravenous Oncolytic Poxvirus (vvDD) in Patients with Advanced Solid Cancers // *Mol. Ther.* 2016. V. 24 (8). P. 1492–1501.
16. *Zonov E., Kochneva G., Yunusova A. et al.* Features of the antitumor effect of vaccinia virus Lister Strain // *Viruses.* 2016. V. 8 (1). 20.
17. *Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V. et al.* Recombinant analogs of a novel milk pro-apoptotic peptide, lactaptin, and their effect on cultured human cells // *Protein J.* 2010. V. 29. P. 174–180.
18. *Koval O.A., Fomin A.S., Kaledin V.I. et al.* A novel pro-apoptotic effector lactaptin inhibits tumor growth in mice models // *Biochimie.* 2012. V. 94. P. 2467–2474.
19. *Fomin A.S., Koval' O.A., Semenov D.V. et al.* The analysis of biochemical markers of MCF-7 cells apoptosis induced by recombinant analog of lactaptin // *Bioorg. Khim.* 2012. V. 38. P. 92–98.
20. *Koval O.A., Sakaeva G.R., Fomin A.S. et al.* Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumor

- samples to new potential anticancer peptide lactaptin // *J. Cancer Res. Ther.* 2015. V. 11. P. 345–351.
21. Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S. *et al.* Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts // *PLoS One*. 2014. V. 9. e93921.
 22. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy // *Front. Immunol.* 2022. V. 13.
 23. Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A. *et al.* Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy // *Oncotarget*. 2016. V. 7. P. 74171–74188.
 24. Кочнева Г.В., Ткачёва А.В., Сиволобова Г.Ф. и др. Противоопухолевый потенциал рекомбинантного штамма вируса осповакцины, продуцирующего секретируемый химерный белок, состоящий из гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и онкотоксического белка лактаптина // *Биофармацевтический журнал*. 2017. № 1. С. 11–21.
 25. Vasileva N., Ageenko A., Dmitrieva M. *et al.* Double recombinant vaccinia virus: a candidate drug against human glioblastoma // *Life*. 2021. V. 11. P. 1084.
 26. Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф. и др. Модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 на мышцах линии nude для исследования онколитической активности вируса осповакцины // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. № 4. С. 480–486.
 27. Koval O., Kochneva G., Tkachenko A. *et al.* Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells // *BioMed Research International*. 2017. V. 2017. 3620510.
 28. Dymova M.A., Kichkailo A.S., Kuligina E.V., Richter V.A. Aptamers enhance oncolytic viruses' antitumor efficacy // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. 151.

ANTITUMOR DRUG BASED ON THE GENE-MODIFIED VACCINIA VIRUS VV-GMCSF-Lact

E. V. Kuligina^{1,2,#}, V. A. Richter^{1,##}, and V. V. Vlassov^{1,###}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

²*LLC "Oncostar", Skolkovo, Moscow region, Russia*

[#]*E-mail: kuligina@niboch.nsc.ru*

^{##}*E-mail: richter@niboch.nsc.ru*

^{###}*E-mail: vlassov@mail.ru*

Virotherapy, or therapy with oncolytic viruses, is one of the most rapidly developing approaches to the treatment of a wide range of solid tumors. The article is devoted to the development and study of the properties of the first domestic drug based on recombinant vaccinia virus. The recombinant virus VV-GMCSF-Lact was engineered from Lister strain (L-IVP) vaccinia virus. The cytotoxic activity and antitumor efficacy of the virus against human tumor cells of various tissue origins were shown on cell cultures and tumor models. The drug has successfully passed preclinical studies as a drug against human breast cancer, including a triple negative phenotype. The drug was proven to be safe, well tolerated and pharmacologically effective. It is currently in Phase I clinical trials to study safety, tolerability and pharmacokinetics in patients with relapsed and/or refractory metastatic breast cancer. VV-GMCSF-Lact is the first Russian antitumor oncolytic virus which received the permission from the Russian Ministry of Health to conduct clinical trials.

Keywords: virotherapy, vaccinia virus, breast cancer, glioma, preclinical and clinical studies.