

Доклиническая оценка безопасности противоопухолевых препаратов на основе живых непатогенных энтеровирусов

К.В. Сивак¹, К.И. Стосман^{1,✉}, Е.Ю. Калинина¹, М.М. Любишин¹, Я.Р. Оршанская¹,
Т.Н. Саватеева-Любимова¹, С.Б. Казакова¹, Д.М. Федосеева², А.С. Назаров², Е.И. Радион²,
С.М. Юдин², А.А. Кескинов², В.В. Макаров², В.С. Юдин², А.О. Желтухин³, П.О. Воробьев³,
Д.В. Кочетков³, Г.В. Ильинская³, А.В. Липатова³, П.М. Чумаков³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Профессора Попова, д. 15/17, Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства,
ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, Москва, 119121, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук,
ул. Вавилова, д. 32, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Стосман Кира Иосифовна kira.stosman@influenza.spb.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Создание новых препаратов на основе непатогенных штаммов энтеровирусов, обладающих онкотропными и онколитическими свойствами, является одним из современных и безопасных подходов к комплексному лечению онкологических заболеваний и профилактике постоперационного метастазирования. Необходимый этап доклинических исследований — изучение фармакологической безопасности лекарственных препаратов.

ЦЕЛЬ. Изучение общетоксического (при однократном и многократном введении), местнораздражающего действия, фармакологической безопасности и пирогенности как этапа регистрационных доклинических исследований безопасности препаратов на основе непатогенных штаммов энтеровирусов ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ8, ЖЭВ14 и Russo.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Препараты представляли собой высокоочищенные энтеровирусы групп А, В, С, выращенные в культуре клеток Vero, титр вируса: 2×10^7 – 5×10^8 ЦПД₅₀/мл (ЦПД₅₀ — цитопатогенная доза вируса, лизирующая 50% клеток); растворитель — изотонический раствор натрия хлорида. Исследование безопасности препаратов проводили на 220 мышах BALB/c и 440 крысах линии Wistar обоего пола, 18 кроликах самцах породы «Советская шиншилла». Препараты вводили внутривенно в дозах 1×10^5 и 1×10^6 ЦПД₅₀/особь однократно или в течение 90 суток 1 раз в неделю при исследовании токсичности при многократном введении в вышеуказанных дозах. Клинико-лабораторные, патоморфологические исследования проводили на 45 и 91 сутки эксперимента. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета статистических программ GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Установлено, что после однократного введения мышам и крысам каждого из пяти препаратов на основе энтеровирусов не наблюдалось летальности, отмечалась позитивная динамика набора массы тела, не было выявлено макроскопических и микроскопических патологических изменений мозга, селезенки, печени, почек, легких, места введения. При многократном введении в изученных дозах пре-

параты не вызвали функциональных изменений со стороны органов и систем. Все изучаемые показатели находились в пределах физиологической нормы для самцов и самок крыс. При гистологическом исследовании не отмечалось каких-либо патологических изменений, специфического цитолитического и/или цитопатического вирусного действия. Местнораздражающее действие отсутствовало. Все исследуемые препараты не обладали пирогенным эффектом.

ВЫВОДЫ. Результаты проведенных доклинических исследований продемонстрировали безопасность противоопухолевых препаратов ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ8, ЖЭВ 14 и Russo на основе живых непатогенных энтеровирусов.

Ключевые слова: противоопухолевые препараты; энтеровирусы; онколитические вирусы; онколитические штаммы; фармакологическая безопасность; токсичность; крысы; мыши; кролики; доклиническое исследование

Для цитирования: Сивак К.В., Стосман К.И., Калинина Е.Ю., Любишин М.М., Оршанская Я.Р., Саватеева-Любимова Т.Н., Казакова С.Б., Федосеева Д.М., Назаров А.С., Радион Е.И., Юдин С.М., Кескинов А.А., Макаров В.В., Юдин В.С., Желтухин А.О., Воробьев П.О., Кочетков Д.В., Ильинская Г.В., Липатова А.В., Чумаков П.М. Доклиническая оценка безопасности противоопухолевых препаратов на основе живых непатогенных энтеровирусов. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2024;12(4):444–462. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2024-415>

Финансирование. Исследование проводилось при финансовой поддержке ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, договор № 037310012210000079 от 03.11.2020 «Доклиническое изучение общетоксического, местнораздражающего действия, фармакологической безопасности, пирогенности, иммунотоксичности и аллергизирующих свойств препаратов из штаммов непатогенных онколитических вирусов».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Preclinical Safety Assessment of Antineoplastic Agents Based on Live Non-Pathogenic Enteroviruses

Konstantin V. Sivak¹, Kira I. Stosman^{1✉}, Elena Yu. Kalinina¹, Mikhail M. Lyubishin¹, Yana R. Orshanskaya¹, Tatiana N. Savateeva-Lyubimova¹, Svetlana B. Kazakova¹, Daria M. Fedoseeva², Anton S. Nazarov², Elizaveta I. Radion², Sergey M. Yudin², Anton A. Keskinov², Valentin V. Makarov², Vladimir S. Yudin², Andrei O. Zheltukhin³, Pavel O. Vorobyev³, Dmitry V. Kochetkov³, Galina V. Ilyinskaya³, Anastasia V. Lipatova³, Peter M. Chumakov³

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza,
15/17 Professor Popov St., St Petersburg 197376, Russian Federation

² Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks,
10/1 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russian Federation

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology,
32 Vavilov St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Kira I. Stosman kira.stosman@influenza.spb.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Developing novel medicines based on non-pathogenic enterovirus strains exhibiting oncotropic and oncolytic properties represents an up-to-date and safe approach to complex cancer treatment and postoperative metastasis prevention. Safety pharmacology studies are a necessary step in the preclinical development of medicinal products.

AIM. The study aimed to investigate the single and repeated-dose general toxicity, local tolerance, safety pharmacology, and pyrogenicity of medicinal products based on non-pathogenic LEV4, LEV7, LEV8, LEV14, and Russo enterovirus strains as part of preclinical safety studies.

MATERIALS AND METHODS. The study used medicinal products of highly purified group A, B, and C enteroviruses at a titre of 2×10^7 – 5×10^8 CPD₅₀/mL (CPD₅₀ is a cytopathogenic dose of the virus causing 50% cell lysis) and normal saline as a diluent. The viruses were propagated in Vero cells. The safety study used 220 male and female BALB/c mice, 440 male and female Wistar rats, and 18 male Soviet chinchilla rabbits. The study animals received an intravenous dose of 1×10^5 or 1×10^6 CPD₅₀/animal once (single-dose toxicity) or weekly for 90 days (repeated-dose toxicity). Clinical examination, laboratory testing, and necropsy were performed on Days 45 and 91 of the experiment. Statistical data processing was performed using Prism 8.0 software (GraphPad Software, Inc., USA).

RESULTS. Upon single administration of each of the five enterovirus medicinal products to mice and rats, the authors observed complete survival, upward trends in body weight gain, and no gross or histopathological changes in the brain, spleen, liver, kidneys, lungs, or at the injection site. Upon repeated administration at the study doses, the medicinal products caused no functional changes in the organs and systems. All the studied parameters were within the normal physiological ranges for male and female rats. Histopathological examination revealed no pathological changes or specific cytolytic and/or cytopathic effects. No local irritation was observed. None of the investigational medicinal products showed pyrogenicity.

CONCLUSIONS. The obtained preclinical results demonstrate the safety of antineoplastic agents based on live non-pathogenic LEV4, LEV7, LEV8, LEV14, and Russo enteroviruses.

Keywords: antineoplastic agents; enteroviruses; oncolytic viruses; oncolytic strains; safety pharmacology; toxicity; rats; mice; rabbits; preclinical study

For citation: Sivak K.V., Stosman K.I., Kalinina E.Yu., Lyubyshin M.M., Orshanskaya Ya.R., Savateeva-Lyubimova T.N., Kazakova S.B., Fedoseeva D.M., Nazarov A.S., Radion E.I., Yudin S.M., Keskinov A.A., Makarov V.V., Yudin V.S., Zheltukhin A.O., Vorobyev P.O., Kochetkov D.V., Ilyinskaya G.V., Lipatova A.V., Chumakov P.M. Preclinical safety assessment of antineoplastic agents based on live non-pathogenic enteroviruses. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2024;12(4):444–462. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2024-415>

Funding. The study was funded by the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical and Biological Agency under Agreement No. 037310012210000079 of 03.11.2020 (Preclinical study of general toxicity, local tolerance, safety pharmacology, pyrogenicity, immunotoxicity, and allergenicity of medicinal products based on non-pathogenic oncolytic virus strains).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительный прогресс в борьбе со злокачественными новообразованиями, поиск эффективных и более безопасных методов лечения, вызывающих селективную гибель опухолевых клеток, все еще остается актуальным. Основными методами лечения рака являются хирургическая резекция опухолей, химиотерапия и лучевая терапия, имеющие как преимущества, так и серьезные побочные эффекты. Лекарственная таргетная химиотерапия более предпочтительна, но ее возможности ограничены не только токсичностью противоопухолевых средств, но и лекарственной устойчивостью опухолей. Применение онколитических вирусов, представляющих собой класс терапевтических средств, которые позволяют эффективно разрушать злокачественные трансформируемые клетки (онколиз), не затрагивая здоровые ткани организма, является одним из перспективных методов профилактики метастазирования после резекции опухолей и лечения онкологических заболеваний [1–3]. Благодаря механизмам, отличным от действия существующих противоопухолевых препаратов, онколитические вирусы

расширяют возможности лечения опухолей различных локализаций [4]. С развитием технологий генной инженерии онколитические вирусы стали использоваться в качестве универсальной платформы для разработки новых противоопухолевых стратегий, которые могут применяться как отдельно, так и в сочетании с другими методами лечения [5]. Кроме прямого воздействия на опухолевые клетки онколитические вирусы способны активировать противоопухолевый иммунитет, защиту от ускользания опухолевых клеток от иммунного контроля [6–12].

В качестве одного из наиболее перспективных агентов для противоопухолевой терапии можно рассматривать энтеровирусы человека из семейства *Picornaviridae* [13, 14]. Многие представители энтеровирусов практически непатогенны для людей, что позволило на их основе создать живые энтеровирусные вакцины (ЖЭВ), которые применялись для профилактики и лечения сезонных вирусных заболеваний за счет феномена интерференции с болезнетворными вирусами [15, 16]. При этом наблюдался позитивный клинический эффект и в отношении злокачественных заболеваний вплоть до полного

исчезновения опухоли и метастазов [17–19]. Непатогенные штаммы энтеровирусов человека используют несколько альтернативных клеточных рецепторов для проникновения в клетку, что может определять их способность заражать опухолевые клетки, на которых в достаточном количестве экспрессируется соответствующий рецептор [8].

Ликвидация неопластических клеток может происходить за счет способности онколитических вирусов размножаться в клетках злокачественных опухолей и вызывать их лизис. Онколитические вирусы обладают не только прямой цитотоксической активностью, но и стимулируют иммунные реакции организма хозяина, что приводит к разрушению остаточных злокачественных клеток, а также к установлению прочного противоопухолевого иммунитета и индукции образования интерферона [20]. Онколитические вирусы губительно действуют на устойчивые к апоптозу опухолевые клетки и в связи с этим не имеют перекрестной резистентности к применяемой стандартной противоопухолевой терапии. Есть данные, подтверждающие, что онколитические вирусы вызывают повышение чувствительности опухолевых клеток к химио- и лучевой терапии, а также к ингибиторам контрольных иммунных точек [21–25].

Доклинические и клинические исследования препаратов на основе онколитических вирусов показали высокую эффективность лечения ряда онкологических заболеваний при сравнительно малой токсичности [26]. Однако более перспективным является использование онколитических вирусов как платформы для иммунотерапии злокачественных новообразований. Так, в настоящее время созданы рекомбинантные штаммы онколитических вирусов с целью повышения их онкоселективности и иммуногенности [27–30].

Штаммы онколитических вирусов ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ14 (энтеровирус В) и ЖЭВ8 (энтеровирус А) ранее испытывались как живые энтеровирусные вакцины, они представляют собой непатогенные энтеровирусные штаммы, выделенные из фекалий здоровых детей в возрасте от 2 до 5 лет [31–33]. Рекомбинантный штамм полиовируса 3 типа Russo (энтеровирус С) был сконструирован на основе вакцинного штамма Сэбина путем замены 5'-концевого регуляторного участка внутренней посадки рибосом на гомологичный сегмент непатогенного энтеровирусного штамма ЖЭВ14. Подобная модификация устраняет присутствующий

в полиовирусном геноме участок, способствующий репликации вируса в нейронах, что обеспечивает дополнительную безопасность вируса [34, 35]. Противоопухолевая и репликативная активность этих лекарственных средств была изучена *in vitro* с помощью титрования на культуре клеток почки обезьяны Vero. Показано, что данные вирусные штаммы обладают способностью активно реплицироваться и оказывать избирательное цитотоксическое (онколитическое) действие на неопластические клетки многих злокачественных заболеваний: глиальных опухолей головного мозга, рака яичника, легкого, молочной железы, толстого кишечника, шейки матки, простаты, почки, желудка, меланомы, мезотелиомы, миеломы, нескольких видов сарком, лимфом и ряда других патологий. При заражении опухолевых клеток вирусным препаратом происходит образование новых вирусных частиц, способных к дальнейшему распространению внутри опухоли с переходом на отдаленные опухолевые очаги (метастазы). Важной активностью препаратов является их способность уничтожать опухоль-инициирующие стволовые клетки, снижая вероятность рецидивов заболевания [36]. Приведенные сведения обосновывают актуальность разработки и проведения регистрационных исследований новых препаратов на основе апатогенных онколитических вирусов в России.

Цель работы — изучение общетоксического действия (при однократном и многократном введении), местнораздражающего действия, фармакологической безопасности и пирогенности как этапа регистрационных доклинических исследований безопасности препаратов на основе непатогенных штаммов энтеровирусов ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ8, ЖЭВ 14 и Russo.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучаемые препараты. Доклиническое исследование безопасности противоопухолевых препаратов на основе непатогенных энтеровирусов ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ8, ЖЭВ14 и Russo, ранее полученных д.б.н., чл.-корр. РАН П.М. Чумаковым в Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, было проведено в лаборатории безопасности лекарственных средств ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». Результаты исследования частично представлены в данной статье.

Штамм ЖЭВ4 — энтеровирус В. Используемые клеточные рецепторы — ITGA2 и ICAM-1. Штамм адаптирован к репликации в клетках HEK293T

и RD. При адаптации отмечено 5 нуклеотидных замен, приводящих к заменам синонимических кодонов без изменения аминокислотной структуры белка. Штамм по нуклеотидному составу наиболее близок вирусу Echo 1, штамм Farouk (79,3% гомологии).

Штамм ЖЭВ7 — энтеровирус В. Используемые клеточные рецепторы — CD55 и FCGRT. Штамм адаптирован к репликации в клетках HEK293T, NCI-H1299 и RD. При адаптации отмечено 8 нуклеотидных замен, приводящих к заменам синонимических кодонов без изменения аминокислотной структуры белка. Штамм по нуклеотидному составу наиболее близок вирусу Echo 12, штамм Travis (81,27% гомологии).

Штамм ЖЭВ8 — энтеровирус А. Используемые клеточные рецепторы — SCARB2 и CD55. Штамм адаптирован к репликации в клетках HEK293T, RD и Vero. При адаптации отмечены 3 нуклеотидные замены, приводящие к заменам синонимических кодонов без изменения аминокислотной структуры белка. Штамм по нуклеотидному составу близок вирусу Coxsackie A7, штамм Parker (96,14% гомологии).

Штамм ЖЭВ14 — энтеровирус В. Используемые клеточные рецепторы — CD55 и CXADR. Штамм адаптирован к репликации в клетках HEK293T и Vero. При адаптации отмечено 4 нуклеотидные замены, приводящие к заменам синонимических кодонов без изменения аминокислотной структуры белка. Штамм по нуклеотидному составу близок вирусу Coxsackie B5, штамм Faulkner (82,47% гомологии) и везикулярному вирусу свиней SVDV (79,12% гомологии).

Штамм Russo — рекомбинантный энтеровирус на основе вакцинного штамма полио 3 (энтеровирус С) и штамма ЖЭВ 14 (энтеровирус В). Используемый клеточный рецептор — PVR/CD155. Рекомбинантный вирус получен на основе вакцинного штамма полиовируса 3 типа (штамм Sabin). Природный 5'-концевой IRES полиовируса заменен на композитный синтетический IRES, имеющий на 5'-конце 88 нуклеотидный участок IRES полиовируса 3 типа и далее 707 нуклеотидов от IRES вируса Coxsackie B5, и дистальный участок IRES полиовируса 3 типа размером 36 нуклеотидов. Композитный IRES не содержит участок, связывающий трансляционные факторы, необходимые для репликации вируса в клетках нейронального происхождения. Штамм получен путем оживления на матрице синтетической ДНК копии рекомбинантного вируса.

Каждый из 5 препаратов является лекарственным средством для терапии онкологических заболеваний человека в лекарственной форме раствор для внутриопухолевого, внутримышечного и внутривенного введения, а также для введения в область операционной раны после хирургического удаления опухоли.

Препараты представляют собой высокоочищенные живые непатогенные энтеровирусы групп А, В или С. В 2 мл каждого раствора препарата содержится энтеровирус, выращенный в культуре клеток почки обезьяны Vero. Титр вируса: 2×10^7 – 5×10^8 ЦПД₅₀/мл (ЦПД₅₀ — цитопатогенная доза вируса, лизирующая 50% клеток). В качестве вспомогательного вещества (растворителя) использовали изотонический раствор натрия хлорида. Препараты не содержат консерванты, антибиотики, стимуляторы и другие потенциально токсические вещества. Каждый препарат представляет собой бесцветную прозрачную жидкость, хранящуюся при температуре -20 ± 2 °С, расфасованную в стеклянную ампулу, которую непосредственно перед использованием следует разморозить до комнатной температуры и встряхнуть. Стандартизацию препаратов перед исследованием проводили индивидуально для каждого штамма. Титр вируса определяли методом конечного разведения через 24 ч после инфицирования.

Животные. Экспериментальное исследование проводили с соблюдением этических принципов обращения с лабораторными животными в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» (протокол заседания от 12.05.2021 № 41). В работе использовали 220 мышей BALB/c и 440 крыс линии Wistar обоего пола, 18 кроликов самцов породы «Советская шиншилла», полученных из сертифицированного питомника лабораторных животных.

Дизайн исследования. Проведена оценка общетоксических свойств, местнораздражающего действия препаратов, изучена их фармакологическая безопасность (в отношении центральной нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной систем, почек, печени и селезенки). Согласно руководству по доклиническому исследованию биотехнологических лекарственных средств¹

¹ ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/731268/1998. EMA; 2011.

способ и частота введения должны быть максимально приближены к тем, которые предлагаются для клинического применения. Частота введения препарата лабораторным животным может быть увеличена по сравнению с предлагаемой для человека, чтобы компенсировать более быструю скорость клиренса. В клинической практике предполагается еженедельное или один раз в 2–3 недели введение препаратов в течение 12 недель в зависимости от типа патологии. Согласно проекту инструкции, составленному разработчиком препаратов, эффективная для человека доза — 1×10^5 ЦПД₅₀. В связи с этим для исследования безопасности на животных было использовано два уровня доз — 1×10^5 ЦПД₅₀/особь и в 10 раз ее превышающая (1×10^6 ЦПД₅₀/особь).

После рандомизации животные были разделены на группы согласно дизайну эксперимента (табл. 1). Для оценки токсичности при однократном введении было сформировано 11 экспериментальных групп, включающих мышей и крыс (1 группа — плацебо, 10 групп — животные), которым вводили однократно внутривенно препараты в двух дозах 1×10^5 и 1×10^6 ЦПД₅₀/особь.

Каждая группа содержала по 10 самцов и 10 самок каждого вида животных. Плацебо (0,9% раствор натрия хлорида) вводили внутривенно в объеме 0,2 мл/особь. Длительность наблюдения за животными составила 14 сут. В течение этого периода регистрировали массу тела, клиническую картину (общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие судорог, координация движений, тонус скелетных мышц, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частота и глубина дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние шерстного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, размер зрачка, положение хвоста, консистенция фекальных масс, окраска мочи), наличие летальности. После эвтаназии (в CO₂-боксе для эвтаназии, VetTech Solutions, Великобритания) проводили визуальный осмотр органов. У животных, получавших препараты в максимальной дозе, проводили гистологическое исследование тканей в месте введения препаратов, а также мозга, сердца, почек, печени, легких и селезенки.

Таблица 1. Дизайн эксперимента

Table 1. Study design

Тип исследования <i>Study type</i>	Животные <i>Animals</i>	Группа <i>Group</i>	Доза <i>Dose</i>	Количество введений <i>Number of injections</i>	Количество и пол животных в группе <i>Number and sex of animals in the group</i>
Токсичность при однократном введении <i>Single-dose toxicity</i>	Мыши, крысы <i>Mouse, rat</i>	Плацебо <i>Placebo</i>	0	1	10 М + 10 F
		Штаммы ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ8, ЖЭВ14, Russo <i>LEV4, LEV7, LEV8, LEV14, Russo</i>	1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	1	10 М + 10 F
			1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	1	10 М + 10 F
Токсичность при многократном введении <i>Repeated-dose toxicity</i>	Крысы <i>Rat</i>	Плацебо <i>Placebo</i>	0	13 (1 раз в неделю) <i>13 (once a week)</i>	10 М + 10 F
		Штаммы ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ8, ЖЭВ14, Russo <i>LEV4, LEV7, LEV8, LEV14, Russo</i>	1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>1×10^5 CPD₅₀/animal</i>		10 М + 10 F
			1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>1×10^6 CPD₅₀/animal</i>		10 М + 10 F
Пирогенность <i>Pyrogen test</i>	Кролики <i>Rabbit</i>	Плацебо <i>Placebo</i>	0	1	3 М
		Штаммы ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ8, ЖЭВ14, Russo <i>LEV4, LEV7, LEV8, LEV14, Russo</i>	1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	1	3 М

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ЦПД — цитопатогенная доза; ЦПД₅₀ — доза вируса, лизирующая 50% клеток; ЖЭВ — живой энтеровирус; Russo — рекомбинантный энтеровирус; М — самцы; F — самки.

Note. CPD, cytopathogenic dose; CPD₅₀, virus dose causing 50% cell lysis; LEV, live enterovirus; Russo, recombinant enterovirus; M, males; F, females.

При изучении токсичности при многократном введении² препараты вводили крысам внутривенно в дозах 1×10^5 и 1×10^6 ЦПД₅₀/особь на протяжении 90 сут с интервалом 7 сут. Животные были разделены на 11 групп (1 группа — плацебо, 10 групп — животные, которым вводили препараты в двух разных дозах), каждая из которых содержала по 10 самцов и 10 самок. Оценивали летальность, клиническую картину, массу и температуру тела, потребление корма и воды. Анализ мочи, гематологические и биохимические исследования проводили на 45 и 91 сут после начала исследования. Изучали структуру поведения в тесте «открытое поле» (латентный период, горизонтальные перемещения, вертикальные стойки, количество заглядываний в отверстия, болюсов, время неподвижности, груминг), используя установку «Открытое поле» (ООО «НПК Открытая Наука», Россия). Электрокардиографически (с помощью электронного блока «Поли-Спектр-8/В», Россия) оценивали функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (частоту сердечных сокращений, интервалы PQ, QT (QTc), QRS, RR, амплитуду зубцов P, R, T), а также частоту дыхания (пальпаторно).

Анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus (Diatron, Австрия — Венгрия) и регистрировали следующие показатели: количество эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в клетке, средняя концентрация гемоглобина в клетке, количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, количество тромбоцитов. Скорость оседания эритроцитов оценивали на анализаторе Ves-Matic 10 (Diesse, Италия).

Биохимические показатели (альбумин, глобулины, общий белок, аланининовая трансаминаза (АЛТ), аспарагиновая трансаминаза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), общий билирубин, глюкоза, общий холестерин, триглицериды (ТАГ), мочевины, креатинин) определяли с помощью готовых наборов для клинической биохимии на автоматическом биохимическом анализаторе KeyLab (BPC BioSed, Италия), электролиты (калий, натрий, хлориды и кальций) — на анализаторе E-Lyte Plus (High Technology Inc., США).

Протромбиновое время, активированное парциальное тромбoplastиновое время и фибриноген определяли на гемокоагулометре Coag 4D

(Diagon, Венгрия). Протромбиновый индекс и международное нормализованное отношение рассчитывались автоматически на приборе.

Анализ мочи проводили на 45 и 90 сут эксперимента. Для сбора мочи крыс помещали в обменные клетки (Tecniplast, Италия) на 16–24 ч при свободном доступе к питьевой воде. Оценивали объем диуреза, уровень глюкозы, белка, билирубина, уробилиногена, кетонов, pH, плотность, количество лейкоцитов, эритроцитов, наличие слизи. Клинический анализ мочи осуществляли с помощью тест-полосок на анализаторе Aution Eleven 4020 (Arkgray, Япония). Уровень белка и креатинина в моче определяли на биохимическом анализаторе URICKAN-БК («Эйлитон», Россия). Микроскопический анализ мочи осуществляли методом суправитальной окраски с подсчетом клеточных элементов в слайд-планшете при увеличении $\times 100$ и $\times 400$ на светоптическом микроскопе DM1000 (Leica, Германия).

После окончания эксперимента (на 91 сут) проводили патоморфологическое исследование органов (головной мозг, сердце, легкие, тимус, селезенка, костный мозг, печень, почки, надпочечники, желудок, двенадцатиперстная кишка, поджелудочная железа, яички и яичники) и места введения препаратов. Были рассчитаны массовые коэффициенты каждого органа (головного мозга, тимуса, сердца, легких, селезенки, печени, почек, надпочечников, яичек или яичников), представляющие собой отношение массы органа к массе тела животного (мг/г).

Для гистологического исследования ткани фиксировали в 10% забуференном растворе формалина («Биовитрум», Россия) и подвергали стандартной проводке в гистопроцессоре Histo-Tek VP1 (Sakura, Япония) с последующим заключением в парафин. Из парафиновых блоков делали срезы 5 мкм и стандартно окрашивали их гематоксилином и эозином. Препараты исследовали в световом микроскопе Leica DM1000 (Германия).

Пирогенность препаратов изучали на кроликах самцах породы «Советская шиншилла»³. Животные были разделены на 6 групп (1 группа — плацебо, остальные группы — 5 изучаемых препаратов), содержащих по 3 особи каждая (табл. 1). Препараты вводили внутривенно в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь. Измерение температуры проводили с интервалом 30 мин на протяжении 3 ч.

Статистическая обработка данных. Обработку полученных результатов выполняли

² Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

³ ОФС.1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

с использованием пакета статистических программ Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения (*Mean*) и его стандартного отклонения ($\pm SD$). Проверку на нормальность распределения проводили методом Шапиро–Уилка. Для выявления различий между независимыми группами использовали непараметрические критерии Краскела–Уоллиса, а при попарном сравнении критерии Данна, Бонферрони и считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка токсичности при однократном введении

При изучении токсичности при однократном введении каждый из препаратов вводили внутривенно мышам и крысам обоего пола в дозах 1×10^5 и 1×10^6 ЦПД₅₀/особь с целью регистрации нежелательных реакций, развивающихся в первые дни введения, и признаков токсичности. В течение 14 сут наблюдения у животных не регистрировалось изменений поведенческих реакций, отмечалась позитивная динамика изменения массы тела. Летальность отсутствовала. Клиническая картина у всех экспериментальных животных соответствовала таковой для здоровых особей. Изменений в величине массовых коэффициентов внутренних органов и головного мозга опытных мышей и крыс, получивших препараты в обеих дозах, по сравнению с животными из группы плацебо не было обнаружено.

Макроскопический осмотр мышей и крыс после эвтаназии не выявил внешних повреждений наружных покровов и органов. При гистологическом исследовании патологических изменений, а также специфического цитолитического и/или цитопатического вирусного действия во внутренних органах не было зарегистрировано, местнораздражающее действие отсутствовало.

Оценка токсичности при многократном введении

При оценке токсичности при многократном введении на протяжении всего эксперимента летальности крыс, получавших тестируемые препараты в обеих дозах, не отмечалось. Наблюдение за опытными животными не выявило каких-либо отклонений в их состоянии и поведении. Крысы оставались активными,

регулярно потребляли корм и воду. Осмотр каждой особи не выявил слезотечения, саливации, закрытия века, аномалии дыхательных движений, кровоизлияний. Шерстный покров, цвет слизистых оболочек были без особенностей. Судорог, тремора, аномальных движений, нетипичного положения тела отмечено не было. Наблюдалась позитивная динамика изменения массы тела по отношению к фону. Хотя следует отметить, что у крыс, получавших изучаемые препараты, отмечалась небольшая задержка в наборе веса по сравнению с животными в группе плацебо (рис. 1), которую регистрировали в основном у самцов: у особей, получавших ЖЭВ4 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, и у животных, получавших ЖЭВ14 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, — с 21 сут и до окончания эксперимента; у особей, получавших ЖЭВ8 в обеих дозах и ЖЭВ14 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь — с 35 сут и до окончания эксперимента. У самок, которым вводили ЖЭВ14 в максимальной изученной дозе, этот эффект наблюдался только на 14 и 21 сут. Все выявленные изменения не выходили за пределы диапазона нормы.

Изучение динамики потребления корма показало наличие положительного прироста данного показателя по отношению к фону у животных из всех тестируемых групп. Наряду с этим нужно отметить статистически достоверное изменение уровня потребления корма у самцов, получавших ЖЭВ4 в обеих дозах и ЖЭВ7 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, и сниженный уровень этого показателя у самок, которым вводили все изучаемые препараты, по отношению к группе плацебо (табл. 2). Практически во всех опытных группах отмечался сниженный уровень потребления воды по отношению к группе плацебо (табл. 3). Все выявленные статистически значимые изменения не выходили за пределы диапазона нормы для крыс⁴.

Оценка фармакологической безопасности

Токсического воздействия тестируемых препаратов на систему терморегуляции, на функциональное состояние центральной нервной системы крыс, оцененное в тесте «Открытое поле», не выявлено. Соотношение актов, составляющих структуру поведенческого паттерна, соответствовало нормальным значениям, присущим здоровым крысам, как на 45 сут эксперимента, так и по окончании введения препаратов.

⁴ Юшков БГ, Корнева ЕА, Черешнев ВА. Понятие нормы в физиологии и патофизиологии. Физиологические константы лабораторных животных. Екатеринбург: УрО РАН; 2021.

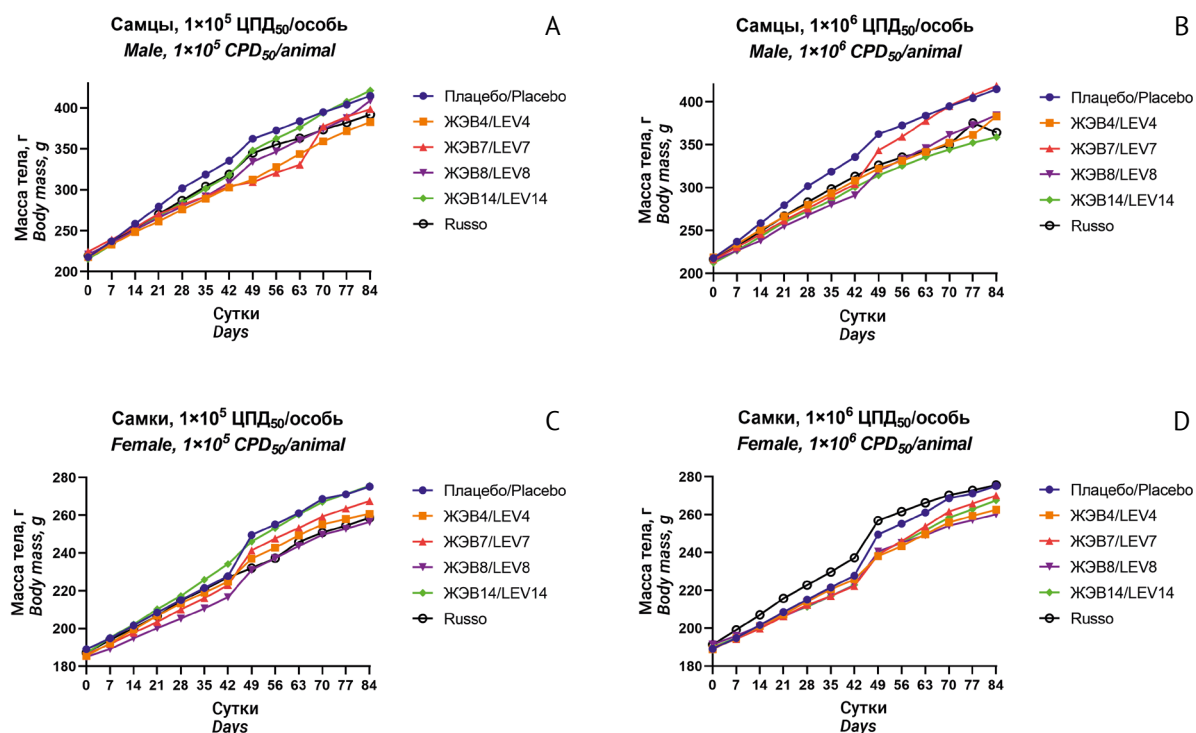


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика изменения массы тела крыс ($n=10$), получавших препараты на основе живых непатогенных энтеровирусов. А – самцы, 1×10^5 ЦПД₅₀/особь; В – самцы, 1×10^6 ЦПД₅₀/особь; С – самки, 1×10^5 ЦПД₅₀/особь; D – самки, 1×10^6 ЦПД₅₀/особь. ЦПД₅₀ – доза вируса, лизирующая 50% клеток; ЖЭВ – живой энтеровирус; Russo – рекомбинантный энтеровирус

Fig. 1. Time course of body weight changes in rats ($n=10$) treated with medicinal products based on live non-pathogenic enteroviruses. A: males, 1×10^5 CPD₅₀/animal; B: males, 1×10^6 CPD₅₀/animal; C: females, 1×10^5 CPD₅₀/animal; D: females, 1×10^6 CPD₅₀/animal. CPD₅₀, virus dose causing 50% cell lysis; LEV, live enterovirus; Russo, recombinant enterovirus

При электрокардиографическом исследовании было показано, что у всех животных имел место правильный синусный ритм сердцебиения, признаков эктопических аритмий, нарушений внутрисердечной проводимости не наблюдалось. В сердце крыс при гистологическом исследовании не было обнаружено патоморфологических изменений, гистоархитектоника миокарда и стромы соответствовала видовой норме.

Повреждающее действие тестируемых препаратов на функциональное состояние дыхательной системы крыс отсутствовало. Различий между частотой дыхательных движений у особей из всех экспериментальных групп зарегистрировано не было. В легких крыс при гистологическом исследовании не было обнаружено патоморфологических изменений, гистоархитектоника воздухоносного и дыхательного отделов соответствовала видовой норме.

Клинико-лабораторные исследования

Анализ мочи не показал клинически значимых различий между показателями функциональной активности почек у опытных животных и крыс из группы плацебо как в середине эксперимента, так и по окончании введения препаратов. Гистологическое изучение почек не выявило патологических изменений гломерулярно-эндотелиального и тубулоинтерстициального компартмента почечной ткани. Стенки сосудов органа были без признаков склероза, гиалиноза и плазматического пропитывания, капилляры – умеренного кровенаполнения, просветы канальцев – свободные, ровные, очагов воспаления или дистрофии не отмечалось. Все вышеописанное позволило говорить об отсутствии повреждающего действия тестируемых препаратов на функциональное состояние мочевыделительной системы.

Таблица 2. Динамика потребления корма крысами при многократном введении препаратов на основе живых непатогенных энтеровирусов (количество животных $n=10$)

Table 2. Time course of changes in feed consumption in rats ($n=10$) treated with repeated doses of medicinal products based on live non-pathogenic enteroviruses

Группа <i>Group</i>	Пол <i>Sex</i>	Количество потребляемого крысами корма, г <i>Amount of feed consumed by rats, g</i>						
		Фон <i>Baseline</i>	21 сутки <i>Day 21</i>	35 сутки <i>Day 35</i>	49 сутки <i>Day 49</i>	63 сутки <i>Day 63</i>	77 сутки <i>Day 77</i>	84 сутки <i>Day 84</i>
Плацебо <i>Placebo</i>	М	18,3±1,3	19,4±1,5	19,7±1,5	21,3±0,9	21,6±0,9	21,8±0,8	22,0±0,8
	Ф	13,3±0,8	13,9±0,9	19,8±1,5	21,1±1,1	21,4±1,2	21,6±1,2	21,7±1,2
ЖЭВ4, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV4, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	М	18,4±1,1	18,6±1,1*	19,1±1,1*	19,9±0,7*	20,2±0,8*	20,5±0,7*	20,7±0,8*
	Ф	14,0±1,4	14,8±1,3	15,1±1,3*	15,2±1,2*	15,5±1,2	15,7±1,2*	15,8±1,2*
ЖЭВ4, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV4, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	М	17,4±1,9	17,8±1,9*	18,2±1,9	18,8±2,3	19,1±2,3	19,3±2,3	19,4±2,3
	Ф	14,3±1,4	14,9±1,5	15,2±1,5*	15,8±1,7*	16,1±1,6	16,3±1,5	16,4±1,5*
ЖЭВ7, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV7, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	М	17,0±1,6	17,8±1,5	18,3±1,5*	19,4±0,8	16,3±7,9	20,1±0,5	20,2±0,5
	Ф	13,8±1,5	14,8±2,2	15,1±2,1*	14,3±1,5*	14,5±1,6	14,7±1,5*	14,9±1,5*
ЖЭВ7, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV7, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	М	18,5±1,6	20,0±2,3*	20,3±2,3	21,4±2,1	21,5±2,0	21,7±2,0	22,0±2,1
	Ф	14,0±1,1	14,6±1,1	14,9±1,1*	14,9±1,0*	15,1±1,0	15,4±1,0*	15,5±1,0*
ЖЭВ8, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV8, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	М	18,1±1,0	18,9±1,2	19,3±1,2	20,4±0,7	20,6±0,7	20,9±0,7	21,1±0,7
	Ф	13,9±1,5	14,5±1,7	14,7±2,2*	14,7±1,5*	14,9±1,4	15,2±1,4*	15,3±1,5*
ЖЭВ8, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV8, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	М	17,4±1,8	17,9±2,8	18,2±2,1	19,8±1,9	20,1±1,9	20,4±1,9	20,6±1,9
	Ф	14,0±1,1	14,5±1,1	14,8±1,1*	15,2±1,6*	15,3±1,5	15,6±1,5*	15,8±1,4*
ЖЭВ14, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV14, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	М	17,3±1,9	18,3±2,3	18,8±3,2	20,4±2,5	20,6±2,5	20,9±2,5	21,1±2,6
	Ф	13,3±1,7	14,2±1,4	14,5±1,3*	13,6±0,7*	13,9±0,6	14,2±0,6*	14,4±0,6*
ЖЭВ14, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV14, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	М	18,0±2,0	18,9±2,4	19,2±2,6	20,7±2,7	20,9±2,7	21,1±2,6	21,3±2,6
	Ф	13,7±1,4	14,3±1,5	14,6±1,5*	14,1±1,6*	14,3±1,6	14,6±1,6*	14,8±1,6*
Russo, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>Russo, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	М	17,8±1,9	18,4±2,2	18,6±2,1	19,8±2,3	20,1±2,3	20,4±2,3	20,6±2,2
	Ф	17,3±1,6*	17,9±1,6*	18,1±1,6*	19,1±2,0	15,7±7,1	19,0±2,0*	19,2±2,0*
Russo, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>Russo, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	М	17,5±1,8	18,2±1,9	18,4±1,9	19,2±2,1	19,4±2,2	19,7±2,2	19,9±2,2
	Ф	14,3±1,4*	15,2±2,4	15,4±2,4*	15,3±1,5*	15,6±1,4	15,9±1,4*	16,1±1,5*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Данные представлены в формате $Mean \pm SD$ – среднее и стандартное отклонение. М – самцы; Ф – самки; ЦПД – цитопатогенная доза; ЦПД₅₀ – доза вируса, лизирующая 50% клеток; ЖЭВ – живой энтеровирус; Russo – рекомбинантный энтеровирус.

* Различия статистически значимы ($p < 0,05$) по отношению к плацебо.

Note. The data are presented as $Mean \pm SD$ (mean value and standard deviation). M, males; F, females, CPD, cytopathogenic dose; CPD₅₀, virus dose causing 50% cell lysis; LEV, live enterovirus; Russo, recombinant enterovirus.

* Asterisks denote statistically significant differences from the placebo ($p < 0.05$).

Таблица 3. Динамика потребления воды крысами при многократном введении препаратов на основе живых непатогенных энтеровирусов (количество животных $n=10$)

Table 3. Time course of changes in water consumption in rats ($n=10$) treated with repeated doses of medicinal products based on live non-pathogenic enteroviruses

Группа <i>Group</i>	Пол <i>Sex</i>	Количество потребляемой крысами воды, г <i>Amount of water consumed by rats, g</i>					
		Фон <i>Baseline</i>	35 сутки <i>Day 35</i>	49 сутки <i>Day 49</i>	63 сутки <i>Day 63</i>	77 сутки <i>Day 77</i>	84 сутки <i>Day 84</i>
Плацебо <i>Placebo</i>	M	27,8±2,1	31,6±2,0	34,3±0,7	35,5±0,7	36,7±0,6	37,6±0,5
	F	23,0±2,7	31,6±1,7	34,1±1,1	35,1±1,0	36,8±1,2	37,6±1,0
ЖЭВ4, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV4, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	M	28,0±1,1	30,2±1,6*	32,2±1,5*	33,5±1,3	35,4±1,5*	35,1±1,2*
	F	22,0±2,5	26,7±3,1*	27,0±2,9*	29,2±2,3*	31,3±2,1*	32,3±2,0*
ЖЭВ4, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV4, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	M	23,4±3,4*	27,6±3,0*	28,8±1,6*	30,5±1,8*	32,3±1,7*	33,7±1,9*
	F	22,1±2,7	27,4±2,6*	30,2±2,7*	31,7±2,5*	33,7±2,6*	35,0±2,6*
ЖЭВ7, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV7, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	M	24,2±2,1	29,0±2,3*	30,8±3,0*	33,6±4,7*	34,7±4,1	35,6±4,0
	F	21,4±1,2	29,4±2,0	32,2±1,6	33,1±1,4*	34,9±1,6*	36,2±1,3*
ЖЭВ7, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV7, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	M	25,6±3,0	29,8±2,7*	32,5±2,4	33,8±2,0*	35,3±1,9	36,1±1,5
	F	23,7±2,8	27,3±2,6	31,1±1,4	32,5±1,0*	33,6±1,2*	35,1±1,6
ЖЭВ8, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV8, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	M	28,3±2,0	32,6±2,2*	35,9±1,0	37,0±0,8*	38,4±0,8*	39,2±0,5*
	F	22,1±2,3	26,1±2,5	27,5±2,2*	28,5±2,1*	30,4±1,9	31,5±1,7*
ЖЭВ8, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV8, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	M	24,9±3,1	29,7±2,7*	31,2±1,8	32,3±1,4*	34,1±1,5*	35,2±0,9
	F	23,6±2,9	26,9±3,1	30,5±3,1*	31,2±3,1*	32,6±3,0*	34,0±2,7*
ЖЭВ14, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV14, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	M	24,7±3,3	28,2±3,3*	29,3±2,4	30,5±2,6*	32,3±2,4*	33,6±1,9*
	F	21,2±1,3	25,4±1,8	27,7±1,9*	29,3±1,8*	30,4±1,9*	31,5±1,7*
ЖЭВ14, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV14, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	M	26,3±3,1	29,7±2,8*	32,1±2,3*	33,3±2,1*	34,5±1,9*	35,7±1,7*
	F	21,3±1,3	25,5±1,7	28,5±1,9*	29,8±2,0*	31,5±2,1*	32,3±1,9*
Russo, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>Russo, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>	M	20,0±2,9	31,5±2,1	33,7±1,2	34,9±1,2*	36,2±0,8	36,9±0,8
	F	25,3±3,2*	29,2±2,8	30,6±1,3	34,2±5,1	33,5±1,3	34,7±1,0
Russo, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>Russo, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	M	24,6±3,3	28,2±3,0	30,6±1,7	31,7±1,9*	33,6±1,7*	34,8±1,2*
	F	22,8±2,9	28,0±2,7	29,0±1,4*	31,4±1,4	33,4±1,4	34,5±1,5

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Данные представлены в формате *Mean±SD* – среднее и стандартное отклонение. М – самцы; F – самки; ЦПД – цитопатогенная доза; ЦПД₅₀ – доза вируса, лизирующая 50% клеток; ЖЭВ – живой энтеровирус; Russo – рекомбинантный энтеровирус.

* Различия статистически значимы ($p<0,05$) по отношению к плацебо.

Note. The data are presented as *Mean±SD* (mean value and standard deviation). M, males; F, females, CPD, cytopathogenic dose; CPD₅₀, virus dose causing 50% cell lysis; LEV, live enterovirus; Russo, recombinant enterovirus.

* Asterisks denote statistically significant differences from the placebo ($p<0.05$).

Морфологический состав крови (всех ростков кроветворения) и показатели системы плазменного гемостаза (фибриноген и протромбиновый комплекс) животных, получавших препараты, в целом соответствовали физиологической норме для крыс. По окончании введения наблюдались небольшие, но статистически значимые изменения, не выходящие за пределы физиологической нормы и не носившие дозозависимого характера⁵. В крови самцов, получавших ЖЭВ8 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, регистрировалось увеличение абсолютного, но не относительного количества лимфоцитов. При этом процентное соотношение лимфоцитов, средних

клеток и гранулоцитов не отличалось от такового в группе плацебо. У самцов, получавших ЖЭВ14 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, но не в дозе, превышающей ее, имело место сниженное количество тромбоцитов (табл. 4). Выявленная тромбоцитопения наблюдалась на фоне отсутствия различий в показателях свертываемости крови по отношению к животным из группы плацебо. Кроме этого, в абсолютном выражении количество тромбоцитов у данных животных соответствовало физиологической норме для крыс линии Wistar⁶.

По окончании введения изучаемых препаратов наблюдались статистически достоверные

Таблица 4. Гематологические показатели по окончании введения препаратов на основе живых непатогенных энтеровирусов у самцов крыс на 91 сутки эксперимента (количество животных $n=5$)

Table 4. Haematological parameters of male rats ($n=5$) upon termination of treatment with medicinal products based on live non-pathogenic enteroviruses on Day 91

Показатель <i>Parameter</i>	Группа <i>Group</i>		
	Плацебо <i>Placebo</i>	ЖЭВ8, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV8, 1×10^6 CPD₅₀/animal</i>	ЖЭВ14, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь <i>LEV14, 1×10^5 CPD₅₀/animal</i>
Лимфоциты, 10^9 /л <i>Lymphocytes, 10^9/L</i>	9,20±2,28	12,9±1,6*	10,7±3,6
Тромбоциты, 10^9 /л <i>Platelets, 10^9/L</i>	781,4±102,2	692,6±115,4	632,0±55,4*
Лимфоциты, % <i>Lymphocytes, %</i>	68,4±7,2	65,5±9,0	73,9±9,2
Средние клетки, % <i>Medium cells, %</i>	3,06±1,97	6,58±4,73	5,26±4,68
Гранулоциты, % <i>Granulocytes, %</i>	28,3±7,0	28,9±4,9	20,8±6,6
Протромбиновое время, с <i>Prothrombin time, s</i>	12,8±1,1	12,9±0,8	12,8±1,5
Протромбиновый индекс, % <i>Prothrombin index, %</i>	88,8±12,9	87,6±8,5	90,6±21,1
Международное нормализованное отношение (МНО) <i>International normalised ratio</i>	1,02±0,09	1,03±0,07	1,02±0,12
АЧТВ, с <i>aPTT, s</i>	29,5±7,8	29,6±6,1	30,7±8,2
Фибриноген, г/л <i>Fibrinogen, g/L</i>	2,43±0,56	2,36±0,40	2,36±0,38

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Данные представлены в формате *Mean±SD* – среднее и стандартное отклонение. ЦПД – цитопатогенная доза; ЦПД₅₀ – доза вируса, лизирующая 50% клеток; ЖЭВ – живой энтеровирус; Russo – рекомбинантный энтеровирус; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время.

* Различия статистически значимы ($p<0,05$) по отношению к плацебо.

Note. The data are presented as *Mean±SD* (mean value and standard deviation). CPD, cytopathogenic dose; CPD₅₀, virus dose causing 50% cell lysis; LEV, live enterovirus; Russo, recombinant enterovirus; aPTT, activated partial thromboplastin time.

* Asterisks denote statistically significant differences from the placebo ($p<0.05$).

⁵ Юшков БГ, Корнева ЕА, Черешнев ВА. Понятие нормы в физиологии и патофизиологии. Физиологические константы лабораторных животных. Екатеринбург: УрО РАН; 2021.

Макаров ВГ, Макарова МН, ред. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. СПб: ЛЕМА; 2013.

⁶ Юшков БГ, Корнева ЕА, Черешнев ВА. Понятие нормы в физиологии и патофизиологии. Физиологические константы лабораторных животных. Екатеринбург: УрО РАН; 2021.

отличия некоторых биохимических показателей по отношению к плацебо у животных из опытных групп, не выходящие за пределы физиологической нормы⁷. Результаты эксперимента представлены в *таблице 5*. Так, у самцов, получавших ЖЭВ8 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, но не в дозе, превышающей ее, имело место сниженное содержание общего белка и глобулинов; у самок, получавших ЖЭВ7 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, но не в дозе, превышающей ее, — повышенное

содержание глобулинов, а у самцов, получавших этот же препарат в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, — увеличенная активность АЛТ; у самцов, получавших ЖЭВ4 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, и у самок, получавших ЖЭВ8 также в максимальной дозе, — увеличенное содержание билирубина; у самок, получавших ЖЭВ7 и ЖЭВ8 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, и самок, получавших Russo в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, — сниженное содержание креатинина.

Таблица 5. Показатели обмена веществ у крыс по окончании введения препаратов на основе живых непатогенных энтеровирусов на 91 сутки эксперимента (количество животных $n=5$)

Table 5. Metabolism parameters in rats ($n=5$) upon termination of treatment with medicinal products based on live non-pathogenic enteroviruses on Day 91

Группа Group	Пол Sex	Общий белок, г/л Total protein, g/L	Глобулины, г/л Globulins, g/L	АЛТ, Е/л ALT, U/L	Билирубин, мкмоль/л Bilirubin, μmol/L	ТАГ, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μmol/L
Плацебо Placebo	М	72,8±3,4	34,3±4,2	75,9±8,7	3,66±1,65	0,59±0,11	76,1±5,7
	Ф	75,4±2,6	34,3±3,6	89,9±12,9	3,82±1,68	0,63±0,11	79,1±1,8
ЖЭВ4, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь LEV4, 1×10^5 CPD ₅₀ /animal	М	68,6±1,9	31,2±2,2	107,5±13,7	5,42±0,41	0,98±0,25*	70,6±2,1
	Ф	75,7±6,0	35,9±5,2	81,0±10,4	5,36±0,52	1,37±0,23*	71,9±5,5
ЖЭВ4, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь LEV4, 1×10^6 CPD ₅₀ /animal	М	68,1±6,1	31,1±2,2	108,8±23,5	7,26±1,77*	1,32±0,57	71,3±3,3
	Ф	77,3±3,6	36,9±3,1	94,2±11,3	5,88±2,43	1,52±1,02	75,3±6,3
ЖЭВ7, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь LEV7, 1×10^5 CPD ₅₀ /animal	М	74,0±3,7	35,3±3,7	99,0±13,5	4,94±0,80	1,12±0,43*	85,0±3,0
	Ф	81,2±3,8	40,3±3,4*	86,1±14,9	5,34±1,20	1,18±0,55	71,5±1,6*
ЖЭВ7, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь LEV7, 1×10^6 CPD ₅₀ /animal	М	66,6±4,9	28,7±3,9	117,8±25,9*	5,36±0,74	0,85±0,30	69,5±1,8*
	Ф	72,9±4,9	33,7±3,7	90,0±21,7	6,18±2,13	0,86±0,31	71,1±3,5*
ЖЭВ8, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь LEV8, 1×10^5 CPD ₅₀ /animal	М	61,0±6,7*	27,1±2,5*	68,2±16,8	4,18±0,89	0,77±0,37	69,0±4,0
	Ф	79,9±5,6	39,0±3,9	73,9±24,1	5,64±1,46	1,33±0,85	74,3±1,5*
ЖЭВ8, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь LEV8, 1×10^6 CPD ₅₀ /animal	М	69,4±4,1	32,1±1,9	245,6±40,1	3,34±0,62	0,57±0,07	77,1±3,5
	Ф	76,7±3,6	36,3±3,1	232,2±28,4	7,50±1,80*	2,39±0,85*	79,8±6,3
ЖЭВ14, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь LEV14, 1×10^5 CPD ₅₀ /animal	М	69,9±2,6	31,4±2,9	124,8±32,4	4,88±0,68	1,10±0,18*	76,5±2,7
	Ф	78,9±2,5	37,5±2,5	83,7±13,1	5,86±1,41	1,72±0,43*	81,9±3,8
ЖЭВ14, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь LEV14, 1×10^6 CPD ₅₀ /animal	М	70,4±3,3	32,0±2,9	134,2±16,4	4,42±1,16	1,07±0,30*	72,5±3,8
	Ф	75,8±4,7	36,2±3,5	91,5±29,1	6,62±2,77	2,09±0,98*	77,6±5,4
Russo, 1×10^5 ЦПД ₅₀ /особь Russo, 1×10^5 CPD ₅₀ /animal	М	71,4±1,7	31,8±1,6	102,8±16,1	5,18±0,48	0,88±0,14*	71,8±3,5
	Ф	75,0±5,2	35,6±4,1	96,9±15,2	4,14±0,90	0,78±0,08	75,7±3,4
Russo, 1×10^6 ЦПД ₅₀ /особь Russo, 1×10^6 CPD ₅₀ /animal	М	68,8±1,6	34,4±2,5	95,2±20,6	3,48±0,66	0,88±0,14*	70,7±2,4
	Ф	75,2±4,0	35,3±3,3	86,3±7,7	3,86±0,78	0,78±0,08	54,2±4,0*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Данные представлены в формате $Mean \pm SD$ — среднее и стандартное отклонение. М — самцы; Ф — самки; АЛТ — аланиновая трансаминаза; ТАГ — триглицериды; ЦПД — цитопатогенная доза; ЦПД₅₀ — доза вируса, лизирующая 50% клеток; ЖЭВ — живой энтеровирус; Russo — рекомбинантный энтеровирус.

* Различия статистически значимы ($p < 0,05$) по отношению к плацебо.

Note. The data are presented as $Mean \pm SD$ (Mean value and standard deviation). M, males; F, females; ALT, alanine transaminase; CPD, cytopathogenic dose; CPD₅₀, virus dose causing 50% cell lysis; LEV, live enterovirus; Russo, recombinant enterovirus.

* Asterisks denote statistically significant differences from the placebo ($p < 0.05$).

⁷ Там же.

У животных из опытных групп также было выявлено статистически достоверное повышение уровня триглицеридов, не выходявшее за пределы диапазона нормы для крыс⁸. Исключение составили самки, получавшие ЖЭВ8 в максимальной изученной дозе, и самки, которым вводили ЖЭВ14 в обеих дозах, у которых уровень триглицеридов был превышен в 1,5–2,5 раза. В то же время однозначно судить о нарушении липидного профиля не представляется возможным, так как содержание холестерина у животных из данных групп соответствовало норме и составляло $1,76 \pm 0,14$, $1,78 \pm 0,16$ и $2,01 \pm 0,28$ ммоль для ЖЭВ8 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь и для ЖЭВ14 в дозах 1×10^5 и 1×10^6 ЦПД₅₀/особь соответственно. Истинная гипертриглицеридемия могла быть обусловлена потреблением корма или нарушением всасывания липидов из кишечника, что требует дальнейшего уточняющего изучения.

Различий во влиянии на биохимические показатели, связанные с уровнем дозирования или продолжительностью введения препаратов, не было установлено.

Статистический анализ результатов изучения величины массовых коэффициентов органов свидетельствовал об отсутствии различий между животными из всех экспериментальных групп. Патоморфологическое исследование подтвердило отсутствие дистрофических, атрофических, воспалительных и некробиотических изменений печени, почек и иммунокомпетентных органов. Стенки сосудов печени и почек были без признаков склероза, гиалиноза и плазматического пропитывания, перивасальное пространство — без явлений отека, ткань не содержала непрофильной инфильтрации. Гистоархитектоника всех органов соответствовала видовой норме. Все это позволило утверждать, что выявленные отклонения со стороны белкового, углеводного, липидного, азотистого, пигментного и электролитного обменов веществ не были связаны с морфологическими изменениями внутренних органов. Препараты не проявляли гепатотоксического или нефротоксического действия.

У всех пяти исследуемых препаратов показано отсутствие пирогенного эффекта при внутривенном введении⁹, так как ни в одной экспериментальной группе суммарное максимальное изменение температуры не превышало $1,2^\circ\text{C}$, а индивидуальное повышение температуры было не больше $0,5^\circ\text{C}$. Так, у животных,

получавших ЖЭВ4, ЖЭВ7 и ЖЭВ8, суммарное максимальное изменение температуры в группе составило $0,3^\circ\text{C}$, у кроликов, получавших ЖЭВ14 — $0,2^\circ\text{C}$, а у особей, которым вводили штамм Russo, — $0,6^\circ\text{C}$.

Данные патоморфологического обследования

Макроскопический осмотр наружных покровов, внутренних полостей и органов животных из контрольной и опытных групп как в середине эксперимента, так и по его окончании продемонстрировал типичное строение всех особей, отсутствие внешних повреждений. По результатам микроскопического исследования повреждающего действия препаратов на органы и системы, а также местнораздражающего действия выявлено не было.

Микроскопическое исследование органов гемопоэза не выявило каких-либо патологических изменений. Эритропоэтический островок костного мозга был образован преимущественно полихромными и оксифильными эритробластами. Эритропоэз соответствовал нормобластическому типу. Гранулоцитоэтические островки были представлены базофильными миелоцитами и метамиелоцитами, лимфоцитарный росток — пролимфоцитами, моноцитарный росток — единичными промоноцитами, тромбоцитоэтические островки — мегакариоцитами. В клеточном составе коркового вещества тимуса преобладали лимфоциты и плазматические клетки, также определялись апоптотические лимфоциты, макрофаги с базофильными цитоплазматическими включениями. Мозговое вещество было инфильтровано лимфоцитами, макрофагами и эпителиоретикулярными клетками. Белая пульпа селезенки была представлена лимфоидными фолликулами. Красная пульпа содержала эритроциты и большую популяцию моноцитов, макрофагов и плазматических клеток. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что гематотоксическое и иммунотоксическое действие у тестируемых препаратов отсутствует.

Большинство онколитических вирусов индуцируют терапевтический эффект без развития тяжелых побочных эффектов, что показано в многочисленных доклинических и клинических исследованиях по изучению токсичности различных препаратов на основе

⁸ Юшков БГ, Корнева ЕА, Черешнев ВА. Понятие нормы в физиологии и патофизиологии. Физиологические константы лабораторных животных. Екатеринбург: УрО РАН; 2021.

⁹ ОФС.1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

онколитических вирусов, в том числе и из семейства *Picornaviridae* [37–43].

Полученные нами результаты оценки фармакологической безопасности исследуемых препаратов на основе живых непатогенных энтеровирусов в дозах 1×10^5 и 1×10^6 ЦПД₅₀/особь свидетельствуют об отсутствии нефротоксического, гепатотоксического, кардиотоксического действия и негативного влияния на дыхательную систему. Показатели обмена веществ, системы гемостаза, а также морфологический состав крови у животных соответствовали физиологической норме. Все выявленные в ходе эксперимента статистически значимые изменения не выходили за пределы диапазона нормы для самцов и самок крыс. Исключение составил повышенный уровень триглицеридов у самок, получавших ЖЭВ8 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, и у самок, которым вводили ЖЭВ14 в обеих изученных дозах, наблюдавшийся на фоне нормального содержания холестерина. Существенные изменения величин массовых коэффициентов органов и их морфологии отсутствовали. Местнораздражающее действие не выявлено. Все тестируемые препараты на основе онколитических штаммов энтеровирусов в изученной дозе не обладали пирогенным эффектом. Доза, не вызвавшая патологических изменений (по observed adverse effect level, NOAEL), составила 1×10^6 ЦПД₅₀/особь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное экспериментальное доклиническое исследование безопасности новых противоопухолевых препаратов на основе живых непатогенных штаммов энтеровирусов ЖЭВ4, ЖЭВ7, ЖЭВ8, ЖЭВ14 и Russo показало, что их однократное и многократное внутривенное введение мышам и крысам в дозах 1×10^5 и 1×10^6 ЦПД₅₀/особь не приводило к летальному исходу, нарушению структуры поведения, не влияло на величину массовых коэффициентов внутренних органов. Местнораздражающее действие отсутствовало. Не наблюдалось пирогенного эффекта при внутривенном введении всех препаратов в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь. Не выявлено повреждающее воздействие тестируемых препаратов в отношении систем, функции которых критически важны для жизнедеятельности организма (дыхательная, сердечно-сосудистая и центральная нервная система).

При оценке органов и систем, функции которых могут быть временно нарушены вследствие неблагоприятных фармакодинамических эффектов без причинения необратимого вреда

(мочевыделительная система, системы крови и обмена веществ), установлено, что в крови самцов, получавших ЖЭВ8 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, регистрировалось увеличение абсолютного, но не относительного, количества лимфоцитов. При этом процентное соотношение лимфоцитов, средних клеток и гранулоцитов не отличалось от такового у животных в группе плацебо. У самцов, получавших ЖЭВ14 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, наблюдалось сниженное количество тромбоцитов. При введении препарата в более высокой дозе такого эффекта не отмечалось. Тромбоцитопения у животных, которым вводили ЖЭВ14 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, наблюдалась на фоне отсутствия различий в показателях свертываемости крови по отношению к животным из группы плацебо, при этом в абсолютном выражении количество тромбоцитов у животных данной группы соответствовало физиологической норме.

По окончании введения изучаемых препаратов наблюдались статистически достоверные отличия некоторых биохимических показателей у животных из опытных групп и групп плацебо, не выходящие за пределы физиологической нормы. Так, у самцов, получавших ЖЭВ8 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, но не в дозе, ее превышающей, имело место сниженное содержание общего белка и глобулинов; у самок, получавших ЖЭВ7 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, но не в дозе, ее превышающей, — повышенное содержание глобулинов, а у самцов, получавших этот же препарат в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, — увеличенный уровень АЛТ; у самцов, получавших ЖЭВ4 в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, и у самок, получавших ЖЭВ8 также в максимальной дозе, — повышенное содержание билирубина; у самок, получавших ЖЭВ7 и ЖЭВ8 в дозе 1×10^5 ЦПД₅₀/особь, и самок, получавших Russo в дозе 1×10^6 ЦПД₅₀/особь, — сниженная концентрация в крови креатинина. У животных из опытных групп было выявлено статистически значимое повышение уровня триглицеридов (один из показателей липидного обмена), не выходящее за пределы диапазона нормы для крыс. Исключение составили самки, получавшие ЖЭВ8 в максимальной изученной дозе, и самки, которым вводили ЖЭВ14 в обеих дозах. В крови этих животных уровень триглицеридов был выше в 1,5–2,5 раза, в то же время содержание холестерина соответствовало норме. Различий во влиянии на биохимические показатели, связанные с уровнем дозирования или продолжительностью введения препаратов, не было установлено. При этом дистрофические,

атрофические, воспалительные и некробиотические изменения печени, почек и иммунокомпетентных органов отсутствовали.

По совокупности полученных результатов все изучаемые препараты являются перспективными для проведения дальнейших исследований.

Литература / References

1. Глухов АИ, Сивохин ДА, Серяк ДА, Родионова ТС, Камынина МИ. Онколитические вирусы как иммунотерапевтические агенты в лечении злокачественных новообразований. *Вестник РАМН*. 2019;74(2):108–17. Glukhov AI, Sivokhin DA, Seriak DA, Rodionova TS, Kamynina MI. Oncolytic viruses as immunotherapeutic agents for the treatment of malignant tumors. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2019;74(2):108–17 (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/vramn1091>
2. de la Nava D, Selvi KM, Alonso MM. Immunovirotherapy for pediatric solid tumors: a promising treatment that is becoming a reality. *Front Immunol*. 2022;13:866892. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.866892>
3. Воробьева ИВ, Жирнов ОП. Современные подходы к лечению рака онколитическими вирусами. *Microbiology Independent Research Journal*. 2022;9(1):91–112. Vorobjeva IV, Zhirnov OP. Modern approaches to treating cancer with oncolytic viruses. *Microbiology Independent Research Journal*. 2022;9(1):91–112 (In Russ.). <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2022-9-1-91-112>
4. Чернякова АП, Бороздина СА. Механизмы действия и клинические эффекты препаратов онколитических аденовирусов, герпесвирусов, реовирусов и вируса кори. *Juvenis Scientia*. 2020;6(6):6–17. Cherniakova AP, Borozdina SA. Mechanisms and clinical effects of drugs based on oncolytic adenoviruses, herpes viruses, reoviruses and measles virus. *Juvenis Scientia*. 2020;6(6):6–17 (In Russ.). <https://doi.org/10.32415/jscientia.2020.6.6.6-17>
5. Lin D, Shen Y, Liang T. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):156. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>
6. Yang L, Gu X, Yu J, Ge Sh, Fan X. Oncolytic virotherapy: from bench to bedside front. *Cell Dev Biol*. 2021;9:790150. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.790150>
7. Ramelyte E, Tastanova A, Balázs Z, Ignatova D, Turko P, Menzel U, et al. Oncolytic virotherapy-mediated anti-tumor response: a single-cell perspective. *Cancer Cell*. 2021;39(3):394–406.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.12.022>
8. Russell SJ, Bell JC, Engeland CE, McFadden G. Advances in oncolytic virotherapy. *Commun Med (Lond)*. 2022;2:33. <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00098-4>
9. Чумаков ПМ. Обеспечат ли онколитические вирусы революцию в онкологии? *Вестник РАН*. 2019;89(5):475–84. Chumakov PM. Could oncolytic viruses provide a breakthrough in oncology? *Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2019;89(5):475–84 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0869-5873895475-484>
10. Shalhout SZ, Miller DM, Emerick KS, Kaufman HL. Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(3):160–77. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00719-w>
11. Rahman MM, McFadden G. Oncolytic viruses: newest frontier for cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5452. <https://doi.org/10.3390/cancers13215452>
12. Bommarreddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(8):498–513. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0014-6>
12. Malogolovkin A, Gasanov N, Egorov A, Weener M, Ivanov R, Karabelsky A. Combinatorial approaches for cancer treatment using oncolytic viruses: projecting the perspectives through clinical trials outcomes. *Viruses*. 2021;13:1271. <https://doi.org/10.3390/v13071271>
13. McCarthy C, Jayawardena N, Burga LN, Bostina M. Developing picornaviruses for cancer therapy. *Cancers*. 2019;11:685. <https://doi.org/10.3390/cancers11050685>
14. Леа ТХ, Липатова АВ, Вольская МА, Тихонова ОА, Чумаков ПМ. Состояние сигнального пути JAK/STAT влияет на чувствительность опухолевых клеток к онколитическим энтеровирусам. *Молекулярная биология*. 2020;54(4):634–42. Lea TH, Lipatova AV, Volskaya MA, Tikhonova OA, Chumakov PM. The state of the JAK/STAT signaling pathway affects the sensitivity of tumor cells to oncolytic enteroviruses. *Molecular Biology*. 2020;54(4):634–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0026898420040102>
15. Ворошилова МК. Энтеровирусные инфекции человека. М.: Медицина; 1979. Voroshilova MK. *Human enterovirus infections*. Moscow: Meditsina; 1979 (In Russ.).
16. Чумаков МП, Ворошилова МК, Анцупова АС, Бойко ВМ, Блинова МИ, Приймаги ЛС и др. Живые энтеровирусные вакцины для экстренной профилактики массовых респираторных заболеваний во время осенне-зимних эпидемий гриппа и острых респираторных заболеваний. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1992;69(11–12):37–40. Chumakov MF, Voroshilova MK, Antsupova AS, Boiko VM, Blinova MI, Priimiagi LS, et al. Live enterovirus vaccines for emergency prophylaxis of mass respiratory diseases during fall and winter epidemics of influenza and acute respiratory diseases. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1992;69(11–12):37–40 (In Russ.). EDN: ZXJVL
17. Нетесов СВ, Кочнева ГВ, Локтев ВБ, Святченко ВА, Сергеев АН, Терновой ВА и др. Онколитические вирусы: достижения и проблемы. *Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария*. 2011;(3):26–33. Netyosov SV, Kochneva GV, Loktev VB, Svyatchenko VA, Sergeev AN, Ternovoj VA, et al. Oncolytic viruses: advances and challenges. *Medical Alphabet. Epidemiology and Sanitation*. 2011;(3):26–33 (In Russ.). EDN: OXGJHP
18. Ворошилова МК. Вирусологические и иммунологические аспекты применения ЖЭВ при онкологиче-

- ских заболеваниях. В кн.: *Полезные для организма непатогенные штаммы энтеровирусов: профилактическое и лечебное их применение*. М.: Изд-во Минздрава СССР; 1988. С. 24–9.
- Voroshilova MK. Virologic and immunologic aspects of LEV use in cancer. In: *Non-pathogenic strains of enteroviruses beneficial to health: prophylactic and therapeutic application*. Moscow: Publishing house of the USSR Ministry of Health; 1988. P. 24–9 (In Russ.).
19. Чумаков ПМ, Морозова ВВ, Бабкин ИВ, Байков ИК, Нетесов СВ, Тикунова НВ. Онколитические энтеровирусы. *Молекулярная биология*. 2012;46(5):712–25. Chumakov PM, Morozova BB, Babkin IV, Baikov IK, Netesov SV, Tikunova NV. Oncolytic enteroviruses. *Molecular Biology*. 2012;46(5):712–25 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0026893312050032>
20. Клаан НК, Акиншина ЛП, Пронина ТА. Онколитические вирусы в терапии злокачественных новообразований. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(4):6–19. Klaan NK, Akin'shina LP, Pronina TA. Oncolytic viruses in the therapy of malignant neoplastic diseases. *Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(4):6–19 (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-4-6-19>
21. Chiu M, Armstrong EJJ, Jennings V, Foo S, Crespo-Rodriguez E, Bozhanova G, et al. Combination therapy with oncolytic viruses and immune checkpoint inhibitors. *Expert Opin Biol Ther*. 2020;20(6):635–52. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1729351>
22. Martin NT, Bell JC. Oncolytic virus combination therapy: killing one bird with two stones. *Mol Ther*. 2018;26(6):1414–22. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.04.001>
23. Ghonime MG, Cassady KA. Combination therapy using ruxolitinib and oncolytic HSV renders resistant MPNSTs susceptible to virotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(12):1499–510. <https://doi.org/10.1158/2326-6066>
24. Tanaka R, Goshima F, Esaki S, Sato Y, Murata T, Nishiyama Y, et al. The efficacy of combination therapy with oncolytic herpes simplex virus HF10 and dacarbazine in a mouse melanoma model. *Am J Cancer Res*. 2017;7(8):1693–703. PMID: 28861325
25. O'Donoghue C, Doecker MP, Zager JS. Talimogene laherparepvec: overview, combination therapy and current practices. *Melanoma Manag*. 2016;3(4):267–72. <https://doi.org/10.2217/mmt-2016-002>
26. Zhang S, ed. *Progress in cancer immunotherapy*. Springer; 2016. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7555-7>
27. Chiocca EA, Rabkin SD. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4):295–300. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0015>
28. Shakiba Y, Vorobyev PO, Mahmoud M, Hamad A, Kochetkov DV, Yusubalieva GM, et al. Recombinant strains of oncolytic vaccinia virus for cancer immunotherapy. *Biochemistry (Mosc)*. 2023;88(6):823–41. <https://doi.org/10.1134/S000629792306010X>
29. Lal G, Rajala MS. Recombinant viruses with other anti-cancer therapeutics: a step towards advancement of oncolytic virotherapy. *Cancer Gene Ther*. 2018;25(9–10):216–26. <https://doi.org/10.1038/s41417-018-0018-1>
30. Gromeier M, Nair SK. Recombinant poliovirus for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med*. 2018;69:289–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-104655>
31. Voroshilova MK. Interferon-producing enterovirus vaccines (Live enterovirus vaccines, their interfering and interferonogenic activity and their use for prophylaxis of enteroviral and respiratory infections). *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1970;117–8.
32. Voroshilova MK. Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease. *Prog Med Virol*. 1989;36:191–202. PMID: 2555836
33. Ворошилова МК, Магазаник СС, Чумаков ПМ. *Полезные вирусы человека. Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний*. Ташкент: Медицина; 1980. Voroshilova MK, Magazanik SS, Chumakov PM. Useful human viruses. *Actual questions of epidemiology, microbiology and infectious diseases*. Tashkent: Meditsina; 1980 (In Russ.).
34. Gromeier M, Alexander L, Wimmer E. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(6):2370–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2370>
35. Gromeier M, Lachmann S, Rosenfeld MR, Gutin PH, Wimmer E. Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(12):6803–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6803>
36. Soboleva AV, Seryak DA, Gabdrakhmanova AF, Sosnovtseva AO, Le TH, Kochetkov DV, et al. Glioblastoma multiforme stem cells are highly sensitive to some human non-pathogenic enteroviruses. *J Pharm Sci Res*. 2018;10(4):936–9. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1285619>
37. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol*. 2017;3(6):841–49. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064>
38. Pol J, Buque A, Aranda F, Bloy N, Cremer I, Eggermont A, et al. Trial watch — oncolytic viruses and cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2016;5(2):e1117740. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2015.1117740>
39. Warner SG, O'Leary MP, Fong Y. Therapeutic oncolytic viruses: clinical advances and future directions. *Curr Opin Oncol*. 2017;29(5):359–65. <https://doi.org/10.1097/cco.0000000000000388>
40. Jia Y, Miyamoto S, Soda Y, Takishima Y, Sagara M, Liao J, et al. Extremely low organ toxicity and strong antitumor activity of miR-34-regulated oncolytic coxsackievirus B3. *Mol Ther Oncolytics*. 2019;12:246–58. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.01.003>
41. Sakamoto A, Inoue H, Miyamoto S, Ito S, Soda Y, Tani K. Coxsackievirus A11 is an immunostimulatory oncolytic virus that induces complete tumor regression in a human non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2023;13(1):5924. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33126-x>
42. Lin D, Shen Y, Liang T. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):156. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *К.В. Сивак* — дизайн и планирование эксперимента, общее научное руководство, анализ полученных результатов, доработка текста рукописи; *К.И. Стосман* — анализ литературы, написание текста рукописи, анализ полученных результатов; *Е.Ю. Калинина* — проведение патоморфологических исследований; *М.М. Любышин* — оценка пирогенности препаратов, проведение электрокардиографии; *Я.Р. Оршанская* — получение данных и статистический анализ; *Т.Н. Саватеева-Любимова* — изучение токсичности при однократном и многократном введении, анализ полученных результатов, доработка текста рукописи; *С.Б. Казакова* — изучение поведения животных; *Д.М. Федосеева*, *А.С. Назаров*, *Е.И. Радион* — экспертный анализ результатов, доработка текста рукописи; *С.М. Юдин* — разработка концепции использования панелей онколитических энтеровирусов для повышения терапевтической эффективности; *А.А. Кескинов*, *В.В. Макаров*, *В.С. Юдин* — дизайн исследования; *А.О. Желтухин* — наработка препаратов онколитических энтеровирусов в культуре клеток; *П.О. Воробьев* — очистка препаратов онколитических энтеровирусов; *Д.В. Кочетков* — оценка специфической инфекционной активности препаратов онколитических энтеровирусов на всех стадиях наработки и очистки; *Г.В. Ильинская* — проведение контроля качества и чистоты препаратов онколитических энтеровирусов; *А.В. Липатова* — дизайн и разработка рекомбинантного полиовируса Russo, разработка методики очистки препаратов онколитических энтеровирусов; *П.М. Чумаков* — разработка концепции использования панелей онколитических энтеровирусов для повышения, терапевтической эффективности, доработка текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Все исследования были выполнены в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств») и рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Исследования были одобрены на заседаниях биоэтической комиссии ФГБУ «Института гриппа им. А.А. Смородинцева» (протокол заседания от 12.05.2021 № 41).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Konstantin V. Sivak* designed and planned the study, provided general scientific guidance, analysed the study results, and finalised the manuscript. *Kira I. Stosman* analysed literature, drafted the manuscript, and analysed the study results. *Elena Yu. Kalinina* performed necropsy. *Mikhail M. Lyubishin* performed pyrogen tests and electrocardiography. *Yana R. Orshanskaya* obtained data and performed statistical analysis. *Tatiana N. Savateeva-Lyubimova* performed single and repeated-dose toxicity experiments, analysed the study results, and finalised the manuscript. *Svetlana B. Kazakova* conducted the behavioral study. *Daria M. Fedoseeva*, *Anton S. Nazarov*, *Elizaveta I. Radion* reviewed the study results and finalised the manuscript. *Sergey M. Yudin* developed the concept of using panels of oncolytic enteroviruses to increase therapeutic efficacy. *Anton A. Keskinov*, *Valentin V. Makarov*, *Vladimir S. Yudin* designed the study. *Andrei O. Zheltukhin* produced the oncolytic enterovirus preparations in cell culture. *Pavel O. Vorobyev* purified the oncolytic enterovirus preparations. *Dmitry V. Kochetkov* assessed the infectivity of the oncolytic enterovirus preparations at all stages of production and purification. *Galina V. Ilyinskaya* controlled the quality and purity of the oncolytic enterovirus preparations. *Anastasia V. Lipatova* designed and developed the Russo recombinant poliovirus strain and the purification procedure for the oncolytic enterovirus preparations. *Peter M. Chumakov* developed the concept of using panels of oncolytic enteroviruses to increase therapeutic efficacy and finalised the manuscript.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the principles of good laboratory practice (Eurasian Economic Commission Council decision No. 81 of 03.11.2016 on approval of the Rules of Good Laboratory Practice of the Eurasian Economic Union) and the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. The studies were approved by the Bioethics Committee at the Smorodintsev Research Institute of Influenza (Approval No. 41 of 12.05.2021).

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Сивак Константин Владимирович, д-р биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4064-5033>
Стосман Кира Иосифовна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7959-2376>
Калинина Елена Юрьевна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7077-3584>
Любишин Михаил Михайлович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2447-5222>
Оршанская Яна Рафаеловна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0216-7931>
Саватеева-Любимова Татьяна Николаевна, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4516-3308>
Казакова Светлана Борисовна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7286-3778>
Федосеева Дарья Михайловна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3479-8252>
Назаров Антон Сергеевич, канд. хим. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4864-3462>
Радион Елизавета Ивановна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3225-434X>
Юдин Сергей Михайлович, д-р мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>
Кескинов Антон Артурович, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7378-983X>
Макаров Валентин Владимирович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9495-0266>
Юдин Владимир Сергеевич, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9199-6258>
Желтухин Андрей Олегович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2292-8382>
Воробьев Павел Олегович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7567-913X>
Кочетков Дмитрий Владимирович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9696-8113>
Ильинская Галина Владимировна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-0016-8902>
Липатова Анастасия Валерьевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4501-8514>
Чумаков Петр Михайлович, член-корреспондент РАН, д-р биол. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8078-2908>

Поступила 25.12.2023

После доработки 20.02.2024

Принята к публикации 06.03.2024

Online first 04.06.2024

Konstantin V. Sivak, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4064-5033>
Kira I. Stosman, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7959-2376>
Elena Yu. Kalinina, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7077-3584>
Mikhail M. Lyubishin, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2447-5222>
Yana R. Orshanskaya
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0216-7931>
Tatiana N. Savateeva-Lyubimova, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4516-3308>
Svetlana B. Kazakova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7286-3778>
Daria M. Fedoseeva, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3479-8252>
Anton S. Nazarov, Cand. Sci. (Chim.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4864-3462>
Elizaveta I. Radion, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3225-434X>
Sergey M. Yudin, Dr. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>
Anton A. Keskinov, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7378-983X>
Valentin V. Makarov, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9495-0266>
Vladimir S. Yudin, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9199-6258>
Andrei O. Zheltukhin, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2292-8382>
Pavel O. Vorobyev, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7567-913X>
Dmitry V. Kochetkov, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9696-8113>
Galina V. Ilyinskaya, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-0016-8902>
Anastasia V. Lipatova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4501-8514>
Peter M. Chumakov, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8078-2908>

Received 25 December 2023

Revised 20 February 2024

Accepted 6 March 2024

Online first 4 June 2024