

В.Б. Локтев<sup>1, 2</sup>, Т.Ю. Иванькина<sup>1</sup>, С.В. Нетесов<sup>1, 3</sup>, П.М. Чумаков<sup>3, 4, 5</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», Новосибирск

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

<sup>4</sup> ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

<sup>5</sup> Научно-исследовательский институт при клинике Лернера, Кливленд, США

## Онколитические парвовирусы. Новые подходы к лечению раковых заболеваний

Парвовирусы, и прежде всего парвовирус Н-1 (Н-1PV), способны селективно инфицировать и лизировать клетки раковых опухолей. При этом парвовирусы вызывают иммуномодулирующий эффект, приводя к элиминации опухолевых клеток посредством усиления противоракового иммунитета. Один из возможных механизмов противоопухолевого действия связан с прямой индукцией апоптоза белками 11кДа и NS1 парвовирусов. Векторные системы на основе генома парвовирусов также перспективны для генной терапии различных онкологических и генетических заболеваний человека. Парвовирусы были успешно использованы для экспериментального лечения глиомы, нейробластомы, лимфомы, гепатомы, карциномы поджелудочной железы и опухолей молочной железы человека в экспериментах на животных. Первый онколитический препарат ParvOryx на основе парвовируса Н-1 проходит клинические испытания фазы I/IIa на пациентах с мультиформной глиобластомой.

**Ключевые слова:** парвовирусы, онколитические вирусы, глиома, раковые заболевания.

42

Парвовирусы (*Parvoviridae*) — семейство самых мелких ДНК-содержащих сферических вирусов, лишенных липопротеидной оболочки. Вирионы имеют диаметр 18–26 нм и содержат 60 капсомеров, тип симметрии икосаэдрический Т1. Геном вируса содержит одноцепочечную ДНК (геном около 5 kb), обычно имеющую две открытые рамки трансляции. Рамка считывания, расположенная на 5'-конце генома, кодирует неструктурные белки, а вирионные белки закодированы ближе к 3'-концу генома. На концах генома формируются шпильчатые структуры [1, 2]. Вирусы семейства парвовирусов делятся на два подсемейства — *Parvovirinae* и *Densovirinae*, паразитирующих на позвоночных и беспозвоночных, соответственно. В состав подсемейства *Parvovirinae*

входят 5 родов: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Amdovirus*, *Bocavirus* и *Dependovirus*. Род *Parvovirus* объединяет 12 видов вирусов, которые инфицируют различные виды позвоночных, включая человека. Типовым представителем рода определен мелкий мышинный вирус (*minute virus of mice*). Парвовирусы вызывают заболевания животных, поражая преимущественно желудочно-кишечный тракт и кроветворную систему. Представители данного рода (например, парвовирус Н-1) обладают онколитическими свойствами.

Род *Erythrovirus* состоит из 4 видов вирусов. Типовой представитель рода — парвовирус человека В19, являющийся возбудителем инфекционной эритемы у детей, способный вызывать апластические кризы при хрони-

V.B. Loktev<sup>1, 2</sup>, T.Y. Ivan'kina<sup>1</sup>, S.V. Netesov<sup>1, 3</sup>, P.M. Chumakov<sup>3, 4, 5</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics of SB RAS, Novosibirsk

<sup>3</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk

<sup>4</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology of RAS, Moscow

<sup>5</sup> Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland

## ONCOLYTIC PARVOVIRUSES. A NEW APPROACHES FOR CANCER THERAPY

*Parvoviruses such as parvovirus H-1 (H-1PV) may selectively infect and lysis cancer cells. The parvoviruses also induce an immune system to eliminate the tumor cells through the formation of anti-cancer immunity. One of the possible mechanisms of antitumor activity is associated with the direct induction of apoptosis by parvoviral proteins NS1 and 11 kDa. Parvovirus-based vectors are promising for gene therapy of oncological diseases and genetic disorders in humans. Parvoviruses were successfully used for the experimental treatment on animal models of human glioma, neuroblastomas, lymphomas, pancreatic carcinoma, carcinomas and breast tumors. ParvOryx is the first oncolytic preparation constructed on the base of H-1PV; its phase I/IIa clinical trials in patients with glioblastoma multiforme are in process.*

**Keywords:** parvoviruses, oncolytic viruses, glioma, cancer.

ческой анемии. Остальные виды вызывают заболевания у обезьян.

Единственный представитель рода *Amdovirus* — вирус Алеутской болезни норок.

В род *Vocavirus* пока что входят два вида: парвовирус коров и мелкий вирус собак. По всей вероятности, бока-вирусы человека, открытые в 2005 году, будут отнесены к этому роду [3]. Данный род вирусов вызывает поражение респираторного и желудочно-кишечного трактов.

Род *Dependovirus* объединяет 12 видов аденоассоциированных вирусов человека, крупного рогатого скота, лошадей, овец, собак и птиц. Депендовirusы, в отличие от других парвовирусов, дефектны, то есть размножаются только в присутствии вирусов-помощников. Полноценными вирусами-помощниками могут служить аденовирусы; герпесвирусы также способны выполнять некоторые из необходимых функций вируса-помощника, однако полноценные инфекционные частицы парвовирусов в этом случае не образуются.

### Особенности репликации парвовирусов

По способности к размножению в клетках хозяина парвовирусы делят на две группы — дефектные (род *Dependovirus*) и автономные (остальные вирусы семейства *Parvoviridae*). Автономные парвовирусы способны к самостоятельной репродукции, и для этого они используют соответствующие ферменты клетки-хозяина, прежде всего клеточную ДНК-полимеразу [4]. Репликация автономных парвовирусов происходит в ядрах клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, то есть во время удвоения клеточной ДНК. Репликация парвовирусов, как правило, ограничена активно пролиферирующими тканями, что может вызывать аномалии развития у эмбрионов и поражения тканей новорожденного. Во взрослом организме парвовирусная инфекция часто протекает бессимптомно [5]. Многие парвовирусы способны активно реплицироваться в трансформированных и/или раковых клетках, не затрагивая при этом нормальные клетки организма [6]. Именно это их свойство позволяет рассматривать парвовирусы как простейшие ДНК-содержащие вирусы, обладающие выраженной онколитической активностью.

При инфицировании перmissивных клеток автономными парвовирусами наблюдается, как правило, литический тип инфекции. Репликация вирусов происходит в ядре клетки. Цикл репликации парвовирусов напрямую зависит от ряда клеточных факторов, связанных с пролиферацией и дифференциацией клетки [7–9]. В зависимости от их типа и физиологического состояния клеток, инфицированных парвовирусами, гибель последних может происходить путем некроза или апоптоза [10–12]. Круг животных-хозяев для каждого вида парвовирусов обычно строго ограничен, поэтому для развития литической инфекции парвовирусов клетки-мишени должны происходить из соответствующих видов животных. Прямая цитотоксичность парвовирусов в отношении опухолевых клеток, их онкотропные и онколитические свойства по сравнению с клетками нормального фенотипа подробно описаны для многих типов клеток [13–19]. Онколитическое действие было показано не только в отношении перевиваемых опухолевых клеток, но и для первичных культур из опухолей молочной железы, карциномы печени и глиомы [20, 21]. Известно также, что ряд парвовирусов способен защитить лабораторных животных от развития раковой опухоли [5, 12, 22]. Способность

подавлять развитие опухолей на животных показали парвовирус Н-1(Н-1РV), парвовирус собак, вирус Килхема (или вирус крыс), парвовирус крыс, мелкий мышинный вирус и вирус мышинной лейкемии [21, 23–26].

### Онколитическое действие парвовирусов

По всей вероятности, онкотропизм парвовирусов не связан с более эффективным проникновением вируса в трансформированную клетку, а обусловлен преимущественной репликацией вируса в раковых клетках [12]. При этом парвовирусы блокируют пути активации интерферона первого типа, особенно в трансформированных фибробластах [27, 28]. Особую роль в онколитической активности парвовирусов играет основной неструктурный белок NS1 [29]. Хеликазная активность NS1 необходима для репликации вируса [30], и он также является главным фактором, ответственным за онколитическую и цитотоксическую активность. Парвовирусный белок NS1 в относительно низкой концентрации способен вызвать гибель раковых клеток, но той же концентрации недостаточно для индукции апоптоза у клеток с нормальным фенотипом [12]. Для белка NS1 характерен более высокий уровень экспрессии в трансформированных клетках по сравнению с нормальными клетками [28]. Механизм, с помощью которого NS1, накапливаясь, в конечном итоге убивает клетки мишени, до сих пор не совсем понятен. NS1 влияет на многие функции клетки, и его цитотоксичность может быть обусловлена нарушением регуляции транскрипции, повреждением ДНК и взаимодействием с некоторыми регуляторными белками [11, 28].

Другим белком парвовирусов, способным индуцировать апоптоз, является малый неструктурный белок 11кДа парвовируса В19 [31]. Установлено, что этот белок локализуется преимущественно в цитоплазме в отличие от белка NS1, находящегося в ядре инфицированной клетки. При этом 11кДа белок экспрессируется в клетках более чем в 100 раз активнее, чем парвовирусный белок NS1. Апоптоз клеток-предшественников эритроцитов, по всей вероятности, связан в основном с этим белком парвовируса В19, и его роль в индукции апоптоза существенно выше, чем у белка NS1. Ингибиторы каспаз, в частности ингибитор каспазы 10, предотвращает развитие апоптоза, что свидетельствует о вовлечении каспаз в индукцию апоптоза белком 11 кДа парвовируса.

Парвовирусы могут также модулировать противоопухолевый иммунитет. В результате гибели опухолевых клеток, индуцированной парвовирусом, нередко высвобождаются антигены, характерные для раковых клеток и их молекулярные комплексы. Это стимулирует представление опухолевых антигенов иммунной системе организма и вызывает формирование более выраженного иммунного ответа против клеток опухоли [12, 32]. Онколитические парвовирусы способны вызывать индукцию гамма-интерферона и тем самым существенно усиливать клеточный иммунный ответ на раковые клетки [33]. При этом стимулируется противоопухолевая активность макрофагов, цитотоксических лимфоцитов и повышается презентующая активность дендритных клеток [32]. Также существенно усиливается активность клеток-киллеров (NK) [34]. Сочетанная терапия парвовирусом Н-1 и гамма-интерфероном приводит к увеличению почти в два раза продолжительности жизни крыс с раком поджелудочной железы, что свидетельствует об индукции более выраженного противоопухолевого иммунитета [33, 35].

Онколитическая активность парвовирусов может быть ограничена некоторыми факторами. Так, парвовирусы обладают весьма выраженной специфичностью в отношении хозяина и, как правило, способны реплицироваться в клетках только одного вида [16–18, 36, 37]. Ограничение репликации парвовирусов также связано с фазами клеточного цикла, и трансформация клеток не всегда отменяет это ограничение [29, 38].

Из онколитических парвовирусов наибольший прогресс достигнут в работах с парвовирусом крыс Н-1, который показал выраженные онколитические свойства в экспериментах на животных. Линии клеток глиобластом и глиосарком крыс и человека так же, как клетки глиомы человека на ранних пассажах (*ex vivo*), высокочувствительны к поражающему действию Н-1РV при относительно низкой множественности заражения [21]. При этом нормальные клетки мозга крыс показывают устойчивость к вирусному цитопатическому действию. Эти эксперименты стали основанием для проведения лабораторных испытаний Н-1РV в качестве онколитического средства на животных моделях глиом человека [39]. Онколитическая терапия парвовирусом Н-1 показала значительное улучшение выживаемости животных, причем полная ремиссия и уничтожение глиобластом человека стало основным исходом онколитической терапии [28]. Онколитическое действие Н-1РV изучалось также на различных опухолях человека, таких как лимфома [40], карцинома поджелудочной железы [41], глиобластомы [10, 21], гепатома [42] и опухоли молочной железы [20, 43, 44]. Некоторые парвовирусы имеют тропизм к лимфоидной ткани, и гемопоэтические опухоли могут служить подходящей мишенью для онколитической терапии. Ряд линий клеток лимфомы человека и лейкомии человека особенно чувствительны к онколитическому действию парвовирусов Н-1 [45–47]. Парвовирусы крыс также обладают тропизмом к клеткам эндотелия, что открывает потенциальные возможности для их использования против эндотелиальных опухолей сосудов и гиперплазий эндотелия. Наблюдаемое онколитическое действие парвовируса Н-1РV связывают с развитием апоптоза или некроза инфицированных клеток [40–42]. У экспериментально инфицированных добровольцев Н-1РV не вызывал проявления значительных клинических симптомов развития инфекционного заболевания, и при введении вируса в раковую опухоль он также был нетоксичен для человека [5].

Совокупность полученных результатов дала основание для создания на основе парвовируса Н-1 перспективного препарата ParvOryx (Oryx GmbH & Co, KG Industry, Германия) для проведения клинических испытаний с привлечением пациентов (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01301430>). В рамках этих клинических испытаний препарат ParvOryx будет использован для лечения первичных и рецидивирующих мультиформных глиобластом при внутривенном и интрацеребральном введении. Первую часть клинических испытаний стадий I/IIa планируется завершить в конце 2012 года. Возможно, этот препарат окажется эффективным и при испытании его онколитической активности в отношении других видов опухолей человека, например рака поджелудочной железы, печени, молочной железы и лимфом.

#### Векторные системы на основе парвовирусов

Геном парвовирусов представлен относительно небольшой ДНК, что облегчает проведение генетиче-

ских манипуляций в лабораторных условиях, а также его использование в качестве вектора для онколитической и генной терапии [48–54]. Однако упаковочные возможности парвовирусного капсида ограничены его небольшим размером и скромными размерами генома парвовирусов [55–57]. Это накладывает ограничения на введение больших вставок, однако позволяет включать в состав вектора гены, кодирующие сравнительно небольшие молекулы, например гены токсинов, цитокинов, ферментов и белков, вызывающих апоптоз [58–63]. С целью формирования иммунного ответа, в том числе против опухолей, парвовирусные векторы могут использоваться также для доставки ряда иммуномодулирующих белков [64]. За последние годы более 15 различных генов были успешно встроены и экспрессировались в векторах, созданных на основе парвовирусов [65].

Для усиления онколитической активности парвовирусов были сконструированы многочисленные рекомбинантные парвовирусы [48, 55, 57–60, 62, 63, 66–68]. При их конструировании обычно сохраняют последовательности, кодирующие белки NS1 и NS2 под контролем парвовирусного промотора Р4, а встройка целевого гена проводится по второй рамке трансляции для структурного белка парвовируса под промотором Р38 [65]. Предполагается, что такая компоновка рекомбинантного парвовируса может обеспечить несколько потенциальных преимуществ: 1) рекомбинантные геномы сохраняют оригинальный парвовирусный промотор Р38, что обеспечивает высокоэффективную экспрессию целевого гена в клетках; 2) 5'- и 3'-концевые вирусные последовательности обеспечивают высокий уровень репликации рекомбинантной вирусной ДНК в клетке; 3) вирусный белок NS1 вызывает апоптоз опухолевых клеток, что усиливает онколитическую активность вектора и, по всей вероятности, может повышать иммуногенность опухоли, стимулируя представление дендритным клеткам опухоль-ассоциированных антигенов из погибающих опухолевых клеток и индуцируя образование цитотоксических Т лимфоцитов, направленных против клеток опухоли [32].

Предложен также подход по усилению онколитических свойств парвовирусов путем введения в их геном участка, содержащего неметилированные кластеры CpG динуклеотидов. В отличие от бактерий, в геноме млекопитающих динуклеотид CpG встречается очень редко (менее 1%), преимущественно вблизи промоторных участков генов. Такие последовательности в массе подвергаются метилированию, что важно для регуляции транскрипции [69]. Богатая неметилированными CpG нуклеотидами ДНК бактерий и вирусов является мишенью для распознавания рецептором TLR9. Это взаимодействие способствует активации дендритных клеток, макрофагов и натуральных киллеров [70–72]. Таким образом, введенные в геном парвовируса последовательности CpG способны усиливать противоопухолевый иммунитет. Онколитическая активность подобного вектора на основе парвовируса Н-1 была продемонстрирована на модели метастатической гепатомы крыс. При введении сегмента CpG отмечалось значительное усиление иммуномодулирующего эффекта, что приводило к супрессии большинства метастазов у крыс [73].

В качестве весьма заманчивых векторов для генной терапии раковых заболеваний было также предложено использовать аденоассоциированные вирусы (AAV) рода *Dependovirus* [74, 75]. Для этих вирусов неизвестны заболевания человека. AAV могут реплицироваться только в присутствии аденовируса-помощника [76]. Они обла-

дают низкой иммуногенностью и обеспечивают продолжительную экспрессию целевого продукта. В качестве векторов наиболее широко используются вирусы AAV2, AAV1, AAV5 и AAV7. Векторные системы, созданные на базе AAV, успешно прошли ряд клинических испытаний и активно применяются для генной терапии соматических заболеваний человека [77]. Использование AAV представляется весьма перспективным и для разработок в области генной терапии злокачественных заболеваний, поскольку они открывают новые возможности для создания онколитических препаратов с высоким уровнем безопасности и индивидуальной специфичностью в отношении разных типов опухолей.

Таким образом, онколитические парвовирусы представляют новый перспективный класс биологических препаратов для онколитической терапии злокачественных заболеваний. Помимо прямого онколитического действия, наблюдаемого как в системе *in vitro*, так и *in vivo*, эти вирусы способны также оказывать иммуномодулирующий эффект, способствуя удалению из организма инфицированных вирусом клеток опухоли. Благодаря этому онколитические парвовирусы способ-

ствуют презентации опухолевых антигенов иммунным системам организма, что может усиливать противоопухолевое действие парвовирусов. Векторные системы, основанные на использовании генома парвовирусов, потенциально безопасны и обладают некоторым преимуществом по сравнению с ретро- и аденовирусными векторами. Применение онколитических парвовирусов и векторных систем на их основе будет способствовать разработке подходов к лечению широкого круга болезней человека, в первую очередь онкологических заболеваний. Достигнутые в этой области успехи уже позволили перейти к проведению клинических испытаний для лечения злокачественных заболеваний.

### Благодарности

Работа была частично поддержана грантом Президента Российской Федерации НШ-65387.2010.4 и Договором Минобрнауки № 11.G34.31.0034, грантом программы преемства РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ 11-04-00410.

### REFERENCES

- Maxwell I.H., Terrell K.L., Maxwell F. Autonomous parvovirus vectors. *Methods*. 2002; 28 (2): 168–181.
- Tattersall P. The evolution of parvoviral taxonomy. In *The parvoviruses*. ed. J.R. Kerr, M.E. Bloom, R.M. Linden et al. *Hodder Arnold: London*. 2006. P. 5–14.
- Chow B.D., Esper F.P. The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med*. 2009; 29 (4): p. 695–713.
- Berns K.I., Parvovirus replication. *Microbiol Rev*. 1990; 54 (3): 316–329.
- Rommelaere J., Giese N., Cziepluch C., Cornelis J.J. Parvoviruses as anti-cancer agents. In *Viral therapy of human cancers*. ed. J.G. Sinkovics, J.C. Horvath. *Marcel Dekker: New York*. 2005. P. 627–675.
- Rommelaere J., Cornelis J.J. Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods*. 1991; 33 (3): 233–251.
- Spalholz B.A., Tattersall P. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol*. 1983; 46 (3): 937–943.
- Young N.S. Parvovirus infection and its treatment. *Clin Exp Immunol*. 1996; 104 (Suppl. 1): 26–30.
- Deleu L., Pujol A., Faisst S. et al. Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol*. 1999; 73 (5): 3877–3885.
- Di Piazza M., Mader C., Geletneky K. et al. Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol*. 2007; 81 (8): 4186–4198.
- Nuesch J.P., Rommelaere J. A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104 (30): 12482–12487.
- Cornelis J.J., Deleu L., Koch U. et al. Parvovirus oncosuppression in The parvoviruses. *Hodder Arnold: London*. 2006. P. 365–384.
- Chen Y.Q., de Foresta F., Hertoghs J. et al. Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res*. 1986; 46 (7): 3574–3579.
- Cornelis J.J., Becquart P., Duponchel N. et al. Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J Virol*. 1988; 62 (5): 1679–1686.
- Cornelis J.J., Spruyt N., Spegelaere P. et al. Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J Virol*. 1988; 62 (9): 3438–3444.
- Van Hille B., Duponchel N., Salome N. et al. Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras-transformed rat cells to minute virus of mice. *Virology*. 1989; 171 (1): 89–97.
- Guetta E., Mincberg M., Mousset S. et al. Selective killing of transformed rat cells by minute virus of mice does not require infectious virus production. *J Virol*. 1990; 64 (1): 458–462.
- Salome N., van Hille B., Duponchel N. et al. Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMP is restricted to specific oncogenes. *Oncogene*. 1990; 5 (1): 123–130.
- Mousset S., Ouadrhiri Y., Caillet-Fauquet P. et al. The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J Virol*. 1994; 68 (10): 6446–6453.
- Van Pachterbeke C., Tuynder M., Cosyn J.P. et al. Parvovirus H-1 inhibits growth of short-term tumor-derived but not normal mammary tissue cultures. *Int J Cancer*. 1993; 55 (4): 672–677.
- Herrero Y.C.M., Cornelis J.J., Herold-Mende C. et al. Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *Int J Cancer*. 2004; 109 (1): 76–84.
- Faisst S., Guittard D., Benner A. et al. Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection. *Int J Cancer*. 1998; 75 (4): 584–589.
- Ball-Goodrich L.J., Leland S.E., Johnson E.A. et al. Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup. *J Virol*. 1998; 72 (4): 3289–3299.
- McKisic M.D., Paturzo F.X., Smith A.L. Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T-cell effector functions. *Transplantation*. 1996; 61 (2): 292–299.
- Lacroix J., Leuchs B., Li J. et al. Parvovirus H1 selectively induces cytotoxic effects on human neuroblastoma cells. *Int J Cancer*. 2010; 127 (5): 1230–1239.
- Rommelaere J., Cornelis J.J. Autonomous parvoviruses., in *Replication-Competent Viruses for Cancer Therapy*. *Karger: Basel*. 2001. P. 100–128.

27. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 2008; 89 (1): 1–47.
28. Rommelaere J., Geletneky K., Angelova A.L. et al. Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21 (2–3): 185–195.
29. Cotmore S.F., Tattersall P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res.* 1987; 33: 91–174.
30. Niskanen E.A., Ihalainen T.O., Kalliollina O. et al. Effect of ATP binding and hydrolysis on dynamics of canine parvovirus NS1. *J Virol.* 2010; 84 (10): 5391–5403.
31. Chen A.Y., Zhang E.Y., Guan W. et al. The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood.* 2010; 115 (5): 1070–1080.
32. Moehler M.H., Zeidler M., Wilsberg V. et al. Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum Gene Ther.* 2005; 16 (8): 996–1005.
33. Grekova S.P., Aprahamian M., Daeffler L. et al. Interferon gamma improves the vaccination potential of oncolytic parvovirus H-1PV for the treatment of peritoneal carcinomatosis in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011; 12 (10): 888–895.
34. Bhat R., Dempe S., Dinsart C. et al. Enhancement of NK cell antitumor responses using an oncolytic parvovirus. *Int J Cancer.* 2011; 128 (4): 908–919.
35. Raykov Z., Grekova S., Galabov A.S. et al. Combined oncolytic and vaccination activities of parvovirus H-1 in a metastatic tumor model. *Oncol Rep.* 2007; 17 (6): 1493–1499.
36. Jacoby R.O., Ball-Goodrich L.J., Besselsen D.G. et al. Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci.* 1996; 46 (4): 370–380.
37. Hueffler K., Parrish C.R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6 (4): 392–398.
38. Cotmore S.F., Tattersall P. Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res.* 2007; 70: 183–232.
39. Geletneky K., Herrero Y.C.M., Rommelaere J. et al. Oncolytic potential of rodent parvoviruses for cancer therapy in humans: a brief review. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 20015; 52 (7–8): 327–330.
40. Angelova A.L., Aprahamian M., Balboni G. et al. Oncolytic rat parvovirus H-1PV, a candidate for the treatment of human lymphoma: In vitro and in vivo studies. *Mol Ther.* 2009; 17 (7): 1164–1172.
41. Angelova A.L., Aprahamian M., Grekova S.P. et al. Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1PV. *Clin Cancer Res.* 2009; 15 (2): 511–519.
42. Moehler M., Blechacz B., Weiskopf N. et al. Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther.* 2001; 8 (3): 158–167.
43. Dupressoir T., Vanacker J.M., Cornelis J.J. et al. Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1989; 49 (12): 3203–3208.
44. Van Pachterbeke C., Tuynder M., Brandenburger A. et al. Varying sensitivity of human mammary carcinoma cells to the toxic effect of parvovirus H-1. *Eur J Cancer.* 1997; 33 (10): 1648–1653.
45. Faisst S., Schlehofer J.R., zur Hausen H. Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for parvovirus H-1 propagation. *J Virol.* 1989; 63 (5): 2152–2158.
46. Telerman A., Tuynder M., Dupressoir T. et al. A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90 (18): 8702–8706.
47. Rayet B., Lopez-Guerrero J.A., Rommelaere J. et al. Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol.* 1998; 72 (11): 8893–8903.
48. Russell S.J., Brandenburger A., Flemming C.L. et al. Trans-formation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J Virol.* 1992; 66 (5): 2821–2828.
49. Ponnazhagan S., Weigel K.A., Raikwar S.P. et al. Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythroid cell-specific delivery and expression of transduced genes. *J Virol.* 1998; 72 (6): 5224–5230.
50. Malerba M., Daeffler L., Rommelaere J. et al. Replicating parvoviruses that target colon cancer cells. *J Virol.* 2003; 77 (12): 6683–6691.
51. Singh P., Destito G., Schneemann A. et al. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *J Nanobiotechnology.* 2006; 4: 2.
52. Wetzel K., Struyf S., Van Damme J. et al. MCP-3 (CCL7) delivered by parvovirus MVMp reduces tumorigenicity of mouse melanoma cells through activation of T lymphocytes and NK cells. *Int J Cancer.* 2007; 120 (6): 1364–1371.
53. Enderlin M., Kleinmann E.V., Struyf S. et al. TNF-alpha and the IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma. *Cancer Gene Ther.* 2009; 16 (2): 149–160.
54. Palmer G.A., Tattersall P. Autonomous parvoviruses as gene transfer vehicles in Parvoviruses, from Molecular Biology to Pathology and Therapeutic Uses. *Karger: Basel.* 2000. P. 178–202.
55. Brandenburger A., Coessens E., El Bakkouri K. et al. Influence of sequence and size of DNA on packaging efficiency of parvovirus MVM-based vectors. *Hum Gene Ther.* 1999; 10 (7): 1229–1238.
56. Brandenburger A., Velu T. Autonomous parvovirus vectors: preventing the generation of wild-type or replication-competent virus. *J Gene Med.* 2004; 6 (Suppl. 1): 203–211.
57. Kestler J., Neeb B., Struyf S. et al. cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum Gene Ther.* 1999; 10 (10): 1619–1632.
58. Haag A., Menten P., Van Damme J. et al. Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther.* 2000; 11 (4): 597–609.
59. Dupont F., Avalosse B., Karim A. et al. Tumor-selective gene transduction and cell killing with an oncotropic autonomous parvovirus-based vector. *Gene Ther.* 2000; 7 (9): 790–796.
60. Gancberg D., Zeicher M., Bakkus M. et al. Oncoselective transduction of CD80 and CD86 in tumor cell lines using an autonomous recombinant parvovirus. *Anticancer Res.* 2000; 20 (3A): 1825–1832.
61. Olijslagers S., Dege A.Y., Dinsart C. et al. Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther.* 2001; 8 (12): 958–965.
62. Wetzel K., Menten P., Opendakker G. et al. Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med.* 2001; 3 (4): 326–337.
63. Giese N.A., Raykov Z., DeMartino L. et al. Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther.* 2002; 9 (5): 432–442.
64. Palmer G.A., Brogdon J.L., Constant S.L. et al. A nonproliferating parvovirus vaccine vector elicits sustained, protective humoral immunity following a single intravenous or intranasal inoculation. *J Virol.* 2004; 78 (3): 1101–1108.
65. Cornelis J.J., Salome N., Dinsart C. et al. Vectors based on autonomous parvoviruses: novel tools to treat cancer? *J Gene Med.* 2004; 6 (Suppl. 1): 193–202.
66. Kimsey P.B., Engers H.D., Hirt B. et al. Pathogenicity of fibroblast- and lymphocyte-specific variants of minute virus of mice. *J Virol.* 1986; 59 (1): 8–13.
67. Dupont F., Karim A., Dumon J.C. et al. A novel MVMp-based vector system specifically designed to reduce the risk of replication-

- competent virus generation by homologous recombination. *Gene Ther.* 2001; 8 (12): 921–929.
68. El Bakkouri K., Servais C., Clement N. et al. In vivo anti-tumour activity of recombinant MVM parvoviral vectors carrying the human interleukin-2 cDNA. *J Gene Med.* 2005; 7 (2): 189–197.
  69. Krieg A.M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5 (6): 471–484.
  70. Ashkar A.A., Rosenthal K.L. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med.* 2002; 2 (6): 545–556.
  71. Dalpke A., Zimmermann S., Heeg K. Immunopharmacology of CpG DNA. *Biol Chem.* 2002; 383 (10): 1491–1500.
  72. Davila E., Velez M.G., Heppelmann C.J. et al. Creating space: an antigen-independent, CpG-induced peripheral expansion of naive and memory T lymphocytes in a full T-cell compartment. *Blood.* 2002; 100 (7): 2537–2545.
  73. Raykov Z., Grekova S., Leuchs B. et al. Arming parvoviruses with CpG motifs to improve their oncosuppressive capacity. *Int J Cancer.* 2008; 122 (12): 2880–2884.
  74. Young S.M., McCarty J.D.M., Degtyareva N. et al. Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J Virol.* 2000; 74 (9): 3953–3966.
  75. Park K., Kim W.J., Cho Y.H. et al. Cancer gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Front Biosci.* 2008; 13: 2653–2659.
  76. Ni T.H., McDonald W.F., Zolotukhin I. et al. Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J Virol.* 1998; 72 (4): 2777–2787.
  77. Herzog R.W., Cao O., Srivastava A. Two decades of clinical gene therapy — success is finally mounting. *Discov Med.* 2010; 9 (45): 105–111.

FOR CORRESPONDENCE

**Loktev Valerii**, doctor of biology, professor, head of the department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis of the FSIS SSC VB «Vektor»

**Address:** Koltsovo, Novosibirsk region, Russian Federation 630559, **phone:** (383) 363-47-53, **fax:** (383) 363-74-09, **e-mail:** loktev@vector.nsc.ru , valeryloktev@gmail.com

**Ivan'kina Tat'yana**, chief expert of the department of coordination of SRW and RD of the FSIS SSC VB «Vektor»

**Address:** Koltsovo, Novosibirsk region, Russian Federation 630559, **phone:** (383) 336-61-32, **fax:** (383) 363-74-09, **e-mail:** ivankina@vector.nsc.ru

**Netesov Sergei**, doctor of biology, professor, Corresponding member of the RAS, pro-rector for the scientific work of the Novosibirsk National Research State University

**Address:** Pirogova street, 2, Novosibirsk, Russian Federation, 630090, **phone:** (383) 330-22-42, **fax:** (383) 330-32-55, **e-mail:** nauka@nsu.ru

**Chumakov Mikhail**, doctor of biology, professor, head of the laboratory of V.A. Engelhardt Institute of molecular biology of RAS

**Address:** 119991, Vavilova street, 32, Moscow, Russian Federation, **phone:** (926) 769-01-90, **fax:** (499) 135-14-05, **e-mail:** peter@chumakov.com