



Ряполова Анастасия Владимировна

**Изучение противоопухолевых свойств рекомбинантного вируса
везикулярного стоматита, экспрессирующего комбинацию
иммуностимулирующих факторов**

1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
PhD
Минская Екатерина Сергеевна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Биология опухолей.....	11
1.2. Онколитическая виротерапия – перспективный метод лечения опухолей	13
1.3. Характеристика вируса везикулярного стоматита (VSV)	15
1.4. Модификации VSV с целью повышения безопасности и улучшения онколитических свойств.....	17
1.4.1. Модификации вирусных белков VSV	18
1.4.2. Усиление противоопухолевых свойств VSV за счет встройки трансгенов.....	21
1.4.3. Модификации VSV путем направленной эволюции	27
1.4.4. Модификации для создания полуреplikативных ОБ	28
1.5. Изменение транскриптома раковых клеток под воздействием ОБ	29
1.6. Комбинированная терапия	32
1.6.1. Комбинация с радиотерапией.....	32
1.6.2. Комбинация с химиотерапией.....	34
1.6.3. Комбинация с иммунотерапией	35
1.7. Клинические исследования с использованием VSV	36
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1. Материалы и приборы	39
2.1.1. Питательные среды и растворы	39
2.1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды	39
2.1.3. Принадлежности	40
2.1.4. Приборы.....	40
2.2. Методы генетической инженерии.....	42
2.2.1. Дизайн генетических конструкций и синтез генов	42
2.2.2. Полимеразная цепная реакция	43
2.2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	44
2.2.4. Очистка фрагментов ДНК и выделение плазмидной ДНК	44
2.2.5. Сборка ДНК методом рестрикции-лигирования.....	44
2.2.6. Трансформация клеток <i>E. coli</i> с помощью метода теплового шока и ПЦР-скрининг колоний.....	45
2.2.7. Получение плазмидной ДНК	46

2.2.8. Выделение РНК и обратная транскрипция	46
2.2.9. Количественная ПЦР для оценки изменения уровня экспрессии генов	47
2.3. Методы клеточной биологии	48
2.3.1. Клеточные линии.....	48
2.3.2. Получение вируса и его последующая наработка	48
2.3.3. Определение вирусного титра методом TCID ₅₀	49
2.3.4. Получение моноклона вируса VSV из бляшки	49
2.3.5. Электронная микроскопия	50
2.3.6. Проведение вестерн-блоттинга	50
2.3.7. Определение экспрессии mIL12 и mGMCSF в супернатантах после заражения rVSV-mIL12-mGMCSF	51
2.3.8. Заражение клеточных линий и прижизненная визуализация	52
2.3.9. Заражение клеточных линий и последующая проточная цитометрия.....	52
2.3.10. Заражение клеточных линий для оценки экспрессии генов	53
2.3.11. Проточная цитометрия клеток опухолевого узла	53
2.4. In vivo исследования	56
2.4.1. Сингенная модель меланомы B16-F10 и конфокальная микроскопия опухолевого узла B16-F10	56
2.4.2. Сингенная модель рака толстой кишки CT26.WT и анализ популяций иммунных клеток в опухолевом узле у мышей	57
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
3.1. Проверка вклада в репликативную активность мутации в М белке VSV.....	59
3.2. Сборка генетической конструкции с геном слитой молекулы mIL12-mGMCSF	60
3.3. Получение rVSV, несущего вставку слитой молекулы mIL12-mGMCSF	61
3.4. Определение функциональной активности mIL12 и mGMCSF	63
3.5. Определение онколитической активности rVSV-GFP методом прижизненной визуализации.....	65
3.6. Оценка изменения уровня экспрессии генов под воздействием rVSV-GFP.....	67
3.7. Определение онколитической активности rVSV в культурах опухолевых клеток	69
3.8. Противоопухолевая активность rVSV-GFP <i>in vivo</i>	72
3.9. Противоопухолевая активность rVSV-mIL12-mGMCSF на модели B16-F10 <i>in vivo</i>	74
3.10. Противоопухолевая активность rVSV-mIL12-mGMCSF на модели CT26.WT <i>in vivo</i>	76
3.11. Влияние внутриопухолевого введения rVSV на активацию иммунного ответа.....	81
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	89

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
ВЫВОДЫ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	95
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Анализ экспрессии генов раковых клеток в ответ на заражение rVSV-GFP in vitro	124
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Анализ инфильтрации опухолевого узла иммунными клетками на модели СТ26.WT.....	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в развитых странах [1]. Внедрение в клиническую практику методов иммунотерапии позволило значительно увеличить эффективность лечения ряда онкологических заболеваний. Первые препараты этого класса, моноклональные антитела против антигенов PD-1/PD-L1 и CTLA-4, позволяют достичь длительных ответов на терапию у 20-40% пациентов с метастатической меланомой, раком легкого и другими метастатическими опухолями [2]. Впервые удалось достичь контроля над заболеванием, а в ряде случаев полного исчезновения опухолевых очагов у столь значительного числа больных, ранее считавшихся неизлечимыми.

Однако существующие методы иммунотерапии эффективны лишь при определенных разновидностях злокачественных опухолей, составляющих примерно треть от всех случаев онкологических заболеваний [3]. И даже при этих разновидностях онкологических заболеваний ответ на терапию развивается примерно у трети пациентов. Основные причины отсутствия эффективности иммунотерапии – недостаточная иммуногенность опухолевых клеток, слабое проникновение иммунокомпетентных клеток в иммуносупрессивное опухолевое микроокружение (tumor microenvironment, TME) и наличие иммуносупрессивных клеточных популяций, подавляющих активность иммунных клеток. Для преодоления устойчивости к иммунотерапии необходим запуск локальной воспалительной реакции в ткани опухоли в сочетании с активным подавлением механизмов опухоли-индуцированной иммуносупрессии.

Онколитические вирусы (ОВ) – это новый класс лекарственных препаратов на основе вирусов, способных специфично размножаться в опухолевых клетках, уничтожать их и активировать иммунную систему пациента, не поражая при этом здоровые клетки человека [4]. Модифицированные для экспрессии иммуностимулирующих молекул ОВ являются потенциальным решением проблемы малой эффективности существующих методов иммунотерапии. В настоящее время ведется разработка различных ОВ. Первый зарегистрированный препарат в этом классе (Imlygic™, США) был одобрен в США в 2015 году, однако его эффективность невысока в силу того, что механизм действия ограничен экспрессией одного цитокина гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) и прямым цитолитическим действием. При этом большинство исследователей отмечают крайне высокий уровень безопасности терапии ОВ [5, 6].

Степень разработанности темы

К середине XX века было накоплено достаточно сведений, согласно которым некоторые вирусы могут разрушать опухоли, не причиняя чрезмерного вреда пациенту. Регрессию опухоли, опосредованную вирусом, чаще всего наблюдали, когда пациенты имели ослабленную иммунную систему, но такие ремиссии, как правило, были кратковременными и неполными.

Эти и другие предпосылки привели к появлению концепции терапии ОВ и серии связанных исследований. В 1950-х и 1970-х годах было проведено множество клинических испытаний с использованием природных вирусов для лечения опухолей, но из-за невозможности на тот момент ограничить патогенность вирусов изучение ОВ было замедлено. Только в 1980-х годах появление новых методов генной инженерии сделало возможным модификацию геномов вирусов, после чего появились аттенуированные, безопасные и высокоселективные вирусы. Однако на сегодняшний день только 4 препарата ОВ были одобрены к терапевтическому применению [7].

По сравнению с другими видами иммунотерапии опухолей, ОВ имеют ряд преимуществ, таких как высокая эффективность уничтожения раковых клеток, меньшее количество побочных эффектов и сравнительно низкая стоимость производства и хранения препаратов. Все это делает онколитическую виротерапию перспективной стратегией для борьбы с раком по сравнению с хирургическими вмешательствами, химиолучевой и таргетной терапиями.

В настоящее время в России основной объем исследований по поиску эффективного ОВ осуществляется отдельными научными коллективами, при этом потенциал темы остается огромным.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является оценка противоопухолевой эффективности рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (Vesicular stomatitis virus, VSV), кодирующего комбинацию иммуностимулирующих факторов, для создания нового генотерапевтического препарата.

Для ее достижения были сформулированы следующие задачи:

1. Сконструировать рекомбинантный вариант VSV (recombinant VSV, rVSV), экспрессирующий слитую иммуностимулирующую молекулу mIL12-mGMCSF с последующей проверкой *in vitro*.
2. Проанализировать онколитическую активность rVSV-mIL12-mGMCSF в сравнении с rVSV-GFP на панели мышинных опухолевых клеток разного происхождения.
3. Оценить противоопухолевую эффективность rVSV-mIL12-mGMCSF и rVSV-GFP *in vivo* в сингенных моделях.
4. Исследовать влияние rVSV-mIL12-mGMCSF на TME в сравнении с rVSV-GFP.

Объект исследования

Объектами данного исследования были варианты rVSV, созданные методами обратной генетики.

Предмет исследования

Предметом исследования был способ эффективной терапии онкологических заболеваний путем создания rVSV, кодирующего комбинацию иммуностимулирующих факторов.

Научная новизна

В рамках работы с применением методов обратной генетики был создан rVSV, кодирующий комбинацию иммуностимулирующих факторов в формате слитого белка. Функциональная активность каждого из трансгенов была подтверждена *in vitro*. Изучение терапевтических эффектов такого ОБ потенциально позволяет создать новый лекарственный препарат для иммунотерапии опухолей.

В данной работе показано, что rVSV, кодирующий комбинацию иммуностимулирующих факторов, обладает онколитической активностью против различных ноозоологий рака мыши *in vitro*. Терапевтический эффект был подтвержден на сингенных моделях меланомы B16-F10 и рака толстой кишки CT26.WT *in vivo*. Установлено, что способность к подавлению роста опухоли преимущественно осуществляется за счет прямого онколиза. Помимо этого, показано, что терапия rVSV приводит к снижению количества M2-подобных макрофагов в опухолевом узле.

Теоретическая и практическая значимость

В рамках работы дополнены современные представления о терапевтической эффективности ОБ, в частности нового варианта VSV, кодирующего комбинацию иммуностимулирующих факторов. Полученный ОБ может быть использован для разработки таргетных лекарственных препаратов против онкозаболеваний. Слитая молекула иммуностимулирующих факторов, закодированная в геноме VSV, потенциально способна привлекать иммунные клетки в ТМЕ при внутриопухолевой инъекции, что повышает эффективность терапии. Кроме того, дальнейшее изучение механизма действия этого ОБ позволит грамотно подобрать подходы для комбинированной иммунотерапии, эффективность которой предпологаемо будет еще выше.

Результаты получены при финансовой поддержке исследования, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение №18-03 от 10 сентября 2024 г.).

Методология и методы исследования

Методология исследования включала создание rVSV путем обратной генетики, его верификацию *in vitro* и апробацию терапевтической эффективности *in vivo*.

Получение необходимых генетических конструкций, культивирование эукариотических клеток, трансфекция и трансдукция осуществлялись стандартными методами генной и клеточной инженерии.

Верификация полученного в работе rVSV проводилась с применением комплекса физико-биологических методов, включающих электронную микроскопию, титрование методом TCID₅₀, вестерн-блоттинг, проточную цитометрию, иммуноферментный анализ (ИФА).

Терапевтическая активность rVSV была апробирована на животных моделях *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Впервые создан рекомбинантный вариант вируса везикулярного стоматита (rVSV-mIL12-mGMCSF), кодирующий комбинацию иммуностимулирующих факторов IL12 и GMCSF мыши в формате слитого белка, который обладает противоопухолевым потенциалом в сингенных моделях меланомы B16-F10 и рака толстой кишки CT26.WT.
2. Способность к замедлению роста опухоли зависит от прямой онколитической способности рекомбинантного вируса и способности иммуностимулирующих факторов IL12 и GMCSF, закодированных в геноме вируса, влиять на иммунные клетки в иммуносупрессированной среде опухоли.

Степень достоверности

Степень достоверности обеспечивается статистически значимым объемом экспериментальных данных и их воспроизводимостью в серии независимых экспериментов. Все проведенные исследования были направлены на достижение поставленных задач. Дополнительным подтверждением валидности результатов служит их апробация в виде публикаций в ведущих рецензируемых отечественных и международных изданиях, индексируемых в международных базах данных.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на итоговой аттестации научного центра трансляционной медицины АНОО ВО «Университет «Сириус», а также на 6 конференциях:

1. Precision medicine and orphan drugs, 2023, online.
2. Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех», 2024, Федеральная территория «Сириус», Россия.
3. Физико-химическая биология, приуроченная к 40-летию ИХБФМ СО РАН, 2024, Новосибирск, Россия.
4. Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех», 2025, Федеральная территория «Сириус», Россия.

5. Неделя онкоурологии в Уфе, 2025, Уфа, Россия.
6. The 1st International Electronic Conference on Medicinal Chemistry and Pharmaceutics, 2025, online.

По результатам, представленным в диссертационном исследовании, было опубликовано 4 печатные работы, в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science:

1. **Ryapolova A.** et al. Development of recombinant oncolytic rVSV-mIL12-mGMCSF for cancer immunotherapy // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 25. – №. 1. – С. 211.
2. Zinovieva M., **Ryapolova A.** et al. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus: Optimisation Strategies for Anti-Cancer Therapies // Frontiers in Bioscience-Landmark. – 2024. – Т. 29. – №. 11. – С. 374.
3. **Ryapolova A.** et al. Recombinant Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Expressing Mouse Interleukin-12 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (rVSV-dM51-mIL12-mGMCSF) for Immunotherapy of Lung Carcinoma // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 17. – С. 8567.
4. **Ryapolova A.** et al. Enhanced Antitumor Effect of Oncolytic Virotherapy Combined with mRNA-Encoded Immunoadjuvants in Colorectal Carcinoma (CT26) Tumor Model // Applied Biosciences. – 2025. – Т. 5. – №. 1. – С. 1.

Личный вклад автора

Все представленные в работе результаты получены автором лично либо при его непосредственном участии. Автор самостоятельно выполнил экспериментальную и теоретическую части исследования, провел обработку и анализ данных, а также подготовил тексты публикаций. *In vivo* исследование с использованием клеточной линии CT26.WT выполнено на базе ИБХ РАН (С.А. Кондратьевой, Д.А. Дидычем, О.А. Безбородовой). Обсуждение дизайна экспериментов и результатов проходило с научным руководителем Е.С. Минской.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 123 страницах, построена по следующему плану: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, обсуждение, выводы, приложение. Библиографический список включает 312 источников. Работа проиллюстрирована 35 рисунками и содержит 17 таблиц.

Благодарности

Автор приносит искреннюю благодарность научному руководителю, Минской Екатерине Сергеевне, за чуткое руководство, ценные рекомендации и внимательность на всех этапах

подготовки диссертации. Особая признательность выражается коллегам и соавторам Решетникову В.В., Кондратьевой С.А., Торопко М.С., Журавлёву И.Ю. за плодотворные дискуссии, содействие в проведении экспериментов и неизменную поддержку.

Автор глубоко признателен сотрудникам направления «Генная терапия» Университета «Сириус» за оказанное содействие. Отдельная благодарность Шевыреву Д.В. за его существенный вклад в интерпретацию данных иммунофенотипирования.

Сердечная благодарность семье автора за понимание и поддержку. Особые слова признательности Засядько И.А. за его решающий вклад в биологическую специализацию автора, заботу и поддержку.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биология опухолей

Злокачественные новообразования представляют широкий спектр патологий, ключевая черта которых – бесконтрольное деление опухолевых клеток, ведущее к их аномальному росту. Трансформация здоровой клетки в раковую может произойти с клеткой любого происхождения, чем и объясняется клиническое разнообразие форм онкозаболеваний. При всем многообразии форм малигнизированные клетки объединяет ряд универсальных признаков: отклонения в процессах роста и деления, сдвиг метаболизма, морфологическое несоответствие между опухолевыми клетками и здоровой тканью, способность к метастазированию, а также системное нарушение работы пораженных органов [8].

Толчком к злокачественной трансформации служат мутации, поражающие гены, которые отвечают за клеточный цикл, пролиферацию, дифференцировку и клеточную гибель. Однако, согласно полиэтиологической теории, огромную роль в малигнизации играют внешние факторы [9]. Помимо биологических агентов, к экзогенным причинам относят химические вещества (техногенные канцерогены, некоторые лекарства, др.) и физические воздействия (радиация, рентгеновское и ультрафиолетовое облучение).

Однако накопленные знания свидетельствуют о том, что формирование иммуносупрессивного ТМЕ может оказать существенное влияние на исход заболевания [10]. Состав ТМЕ чрезвычайно сложен, поскольку практически все типы иммунных клеток, включая макрофаги, полиморфноядерные клетки, тучные клетки, клетки естественные киллеры (natural killers cells, NK), дендритные клетки (dendritic cells, DC), а также Т- и В-лимфоциты, могут проникать в раковые ткани [11]. Роль этих типов иммунных клеток в развитии и росте опухоли разнообразна и тесно связана с молекулами, которые они экспрессируют [12].

Важную роль в противоопухолевом ответе играют CD8⁺ Т-лимфоциты, они участвуют в распознавании и уничтожении раковых клеток. Но прежде, чем проявить цитотоксические функции, эти клетки должны пройти «обучение» у антигенпрезентирующих клеток (antigen-presenting cells, APC) – а именно у DC. На сегодняшний день известно, что встреча наивных Т-клеток со зрелыми DC происходит не только во вторичных лимфоидных органах, но и внутри самой опухоли или рядом с ней [13]. NK тоже способны атаковать опухоль, но делают это без предварительной «подготовки» со стороны APC [14]. Для поддержания адекватного

противоопухолевого ответа важны CD4⁺ Т-клетки, секретирующие цитокины, важные для пролиферации Т-клеток и активации макрофагов [15].

Противоположную роль в ТМЕ играют иммунные клетки, способствующие росту опухоли. К ним относятся М2-подобные макрофаги и миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC), которые стимулируют разрастание стромы опухоли, образование новых сосудов и миграцию раковых клеток [11]. Кроме того, эти и другие клетки способны подавлять местный иммунный ответ, яркий пример иммуносупрессоров – регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты (regulatory T cells, Treg). Они либо самостоятельно выделяют иммуносупрессивные молекулы, либо способствуют их синтезу, также Treg влияют на работу APC [16].

Макрофагам в ТМЕ свойственна пластичность: они могут проявлять как провоспалительные, так и противовоспалительные эффекты. М1-подобные макрофаги синтезируют цитокины, усиливающие противоопухолевый ответ, тогда как М2-подобные макрофаги стимулируют деление фибробластов, отложение внеклеточного матрикса и иммунную супрессию [17]. Популяции иммунных клеток в ТМЕ нельзя строго классифицировать как «противоопухолевые» или «проопухолевые», потому что результирующий фенотип определяется сложными взаимодействиями между всеми типами клеток, формирующих опухоль. Однако опухолевые и стромальные клетки играют ключевую роль: именно они во многом задают состав ТМЕ, регулируют привлечение клеток, их фенотип и активацию.

Основными характеристиками физико-химической среды опухоли являются низкие уровни глюкозы и рН, гипоксия и окислительный стресс [18]. Пониженное содержание глюкозы способствует пролиферации эндотелиальных клеток сосудов, а гипоксия способствует ангиогенезу. В то же время гипоксия также приводит к усилению процессов гликолиза и накоплению молочной кислоты в ТМЕ, что приводит к снижению рН и, следовательно, влияет на распознавание клетками иммунной системы опухоли [19].

Многие солидные опухоли классифицируются иммунологически «холодными» из-за снижения уровня презентации опухолевых антигенов (tumor associated antigens, ТАА) и инфильтрации иммунными клетками-супрессорами опухоли [20]. Некоторые подходы позволяют избирательно влиять на иммуносупрессивную ТМЕ, создавая иммунологически «горячую» среду, благоприятствующую действию иммунной системы хозяина для элиминации опухоли. Доставка разных иммуностимулирующих агентов позволяет значительно изменить динамику заболевания.

IL12 играет ключевую роль в регуляции иммунных реакций. Он способен активировать цитотоксические CD8⁺ Т-клетки и стимулировать активность APC, что делает его мощным противоопухолевым модулятором, который уже продемонстрировал свою эффективность на

животных моделях [21, 22]. Терапия мышей mIL12 индуцировала секрецию IFN- γ и CD8+ Т-клеточно-зависимую регрессию опухоли, что коррелировало с привлечением в ТМЕ Т-хелперов 1 типа (T helper 1, Th1) [23]. GMCSF также играет важную роль в регуляции иммунного ответа, контролируя дифференцировку субпопуляций миелоидных клеток (таких как нейтрофилы, моноциты, макрофаги и DC) в ответ на стресс, инфекцию и опухолевую прогрессию [24]. Более ранние исследования показали, что имплантация мышам живых или облученных опухолевых клеток, экспрессирующих GMCSF, приводила к рекрутированию APC в опухоль, индукции противоопухолевого иммунитета и отторжению опухоли [25]. Впоследствии GMCSF продемонстрировал клиническую эффективность в комбинации с ипилимумабом [26]. Сочетание эффектов IL12 и GMCSF потенциально может привести к их синергетическому действию: IL12 в первую очередь активирует адаптивный иммунитет, GMCSF стимулирует врожденный иммунный ответ. Вместе эти цитокины могут улучшить общий противоопухолевый иммунный ответ, повышая эффективность цитотоксических Т-лимфоцитов и DC, приводя к более эффективному изменению иммуносупрессивного ТМЕ в сторону иммунологически «горячего».

1.2. Онколитическая виротерапия – перспективный метод лечения опухолей

Терапия опухолевых заболеваний отличается высокой вариабельностью эффективности лечения, так химио-, лучевая, гормональная терапии, а также таргетная терапия в ряде случаев оказываются неэффективными и токсичными для пациента. Поиск принципиально нового по своему механизму действия противоопухолевого препарата – важная задача для исследований в области рака. ОВ способны избирательно размножаться в злокачественных клетках и активировать иммунную систему пациента против опухоли [4]. На сегодняшний день в мире зарегистрированы лишь 4 препарата на основе ОВ (RIGVIR™, Oncorine™, Imlygic™ и Adstiladrin™), однако число клинических исследований, зарегистрированных на www.clinicaltrials.gov и основанных на применении ОВ, неуклонно растет [7, 27]. Oncorine™, созданный на основе аденовируса человека 5-го типа (adenovirus 5 type, AdV5), рекомендованный для лечения поздней стадии рефрактерного рака носоглотки, был одобрен в Китае в 2005 году [28]. Терапия на основе энтеровируса RIGVIR™ (ECHO-7) была одобрена в Латвии в 2004 году для лечения меланомы, однако ввиду производственных сложностей разрешение на использование было отозвано. Imlygic™, модифицированный вирус простого герпеса 1-го типа (herpes simplex virus 1 type, HSV-1), доставляющий GMCSF для лечения меланомы, был одобрен в 2005 году в Китае и в 2015 году в США [29]. Delytact™, рекомбинантный HSV-1 для лечения

глиобластомы, был зарегистрирован в 2021 году [30]. Adstiladrin™, нереплицирующийся AdV, продуцирующий интерферон $\alpha 2b$ (interferon alpha 2b, IFN- $\alpha 2b$) для лечения рака мочевого пузыря, был одобрен в США в 2022 году [31].

Способность ОВ избирательно реплицироваться только в раковых клетках достигается за счет особенностей этих клеток, выработанных эволюционно. Раковые клетки отличаются от здоровых высокой скоростью деления, нестабильностью генома, а также способностью ускользать от иммунной системы организма, при этом они часто оказываются неспособны сопротивляться вирусной инфекции [32, 33]. Неспособность к синтезу IFN, проявляющего противовирусную активность, – черта раковой клетки, более того, она утрачивает способность реагировать на действие экзогенного IFN, вырабатываемого здоровыми клетками. Перечисленные факты обуславливают эффективность многих вирусов при терапии онкологических заболеваний [4, 34–36]. Селективность ОВ может быть усилена с помощью методов направленной эволюции и биоинженерии за счет удаления из вирусного генома компонентов, участвующих в подавлении тех или иных защитных механизмов организма, и введения в вирусный геном дополнительных элементов [34]. В геном вируса могут быть добавлены иммуностимулирующие гены, мобилизующие организм пациента на борьбу с опухолевыми клетками. Другой важной особенностью терапии на основе ОВ, обуславливающей ее перспективность, является то, что вирусы способны стимулировать длительный противоопухолевый иммунный ответ. Попадание ОВ в клетку сопровождается выбросом широкого спектра биологически активных молекул: ТАА, патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular pattern signals, PAMP), молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждениями (danger-associated molecular pattern signals, DAMP), и цитокинов. Эти сигнальные каскады индуцируют созревание APC и последующую активацию эффекторных Т-клеток, опосредующих развитие противоопухолевого иммунного ответа.

Многие клинические исследования с использованием ОВ проводятся в формате комбинированной терапии. Также выявлено, что ОВ в сочетании с лучевой терапией (ЛТ) оказывают синергический противоопухолевый эффект [39]. ОВ могут повышать радиочувствительность опухолевых клеток [40]. Кроме того, радиация может ускорить захват и репликацию вируса, что приводит к гибели злокачественных клеток. Химиотерапия остается лидером среди традиционных методов лечения рака первой линии, но в отличие от хирургического вмешательства или ЛТ, она оказывает системный терапевтический эффект и остается неотъемлемой частью лечения онкологических больных с метастазирующей формой заболевания [3].

Однако проблема доставки любого терапевтического агента к дальним метастазам остается краеугольным камнем лечения онкологических заболеваний. Во-первых, системное введение препарата позволяет увеличить распространение лекарства в организме, но при этом не дает гарантий успешности достижения всех опухолевых очагов. Во-вторых, системное введение требует значительно более высокой дозы препарата. И в-третьих, на пути эффективного проникновения препарата в опухоль стоят физические и биологические барьеры ТМЕ, снижающие эффективность терапии. По этим причинам сочетание различных терапевтических подходов и способов введения препаратов, а также сама схема терапии – предмет активных клинических исследований. Комбинированная терапия может сделать лечение более комфортным для пациентов, поскольку благодаря эффекту взаимного усиления можно применять эффективные противоопухолевые препараты в меньших дозах, снижая их токсичность на организм, и в течение более короткого времени [41].

1.3. Характеристика вируса везикулярного стоматита (VSV)

VSV – это несегментированный вирус с отрицательной РНК, относящийся к отряду *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Vesiculovirus*. Относительно небольшой геном VSV длиной 11 т.п.н. кодирует пять белков: нуклеокапсидный белок (N), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и большую субъединицу полимеразы (L), гены которых разделены участками из двух нуклеотидов C/GA [42, 43]. Лидерная последовательность длиной 47 нуклеотидов на 3'-конце генома отвечает за связывание с РНК-зависимой РНК-полимеразой (RNA-depended RNA-polymerase, RdRp), репликацию и транскрипцию генома [44]. 5'-концевая последовательность длиной 54 нуклеотида содержит последовательности, необходимые для репликации и упаковки вновь синтезированных РНК в частицы [45]. Подобно другим несегментированным РНК-вирусам, транскрипция VSV начинается с промотора 3'-концевого проксимального гена N, а моноцистронная мРНК синтезируется при последовательной транскрипции каждого гена, что является необходимым условием для транскрипции [46]. Таким образом, проксимальный ген транскрибируется в наибольшем количестве, а количество каждого последующего гена уменьшается примерно на 25-30% [42]. Этот процесс называется аттенуацией и происходит из-за диссоциации RdRp во время транскрипции [47].

Каждый белок VSV выполняет уникальную и важную функцию для репликации вируса (Рисунок 1.1). Весь вирусный геном инкапсулирован белком N с образованием рибонуклеопротеинового комплекса (ribonucleoprotein complex, RNP). G белок на поверхности

вируса отвечает за проникновение в клетку через рецептор липопротеидов низкой плотности (low-density lipoprotein receptor, LDLR) [48]. Этот трансмембранный белок участвует в поглощении молекул холестерина, связанных с липопротеидами, и это может объяснить широкую тропность VSV к различным клеткам [49]. Проникновение в клетку происходит в результате актин-зависимого клатрин-опосредованного эндоцитоза после слияния мембраны вируса с клеткой-хозяином [50, 51]. RdRp, ответственный за транскрипцию и репликацию, содержится в белке L, ассоциированном с RNP через Р белок [52]. RNP после взаимодействия с М белком конденсируется в спиральную структуру с гликопротеином G на поверхности [53, 54]. Переключение комплекса RdRp с транскрипции генома на трансляцию белка активируется накоплением вирусных белков, причем N белок играет наиболее важную роль в этом процессе [55]. Белок М участвует в сборке вируса, ингибирует экспрессию генов клетки-хозяина, а также защищает сам вирус от врожденных иммунных реакций организма-хозяина [56–58].

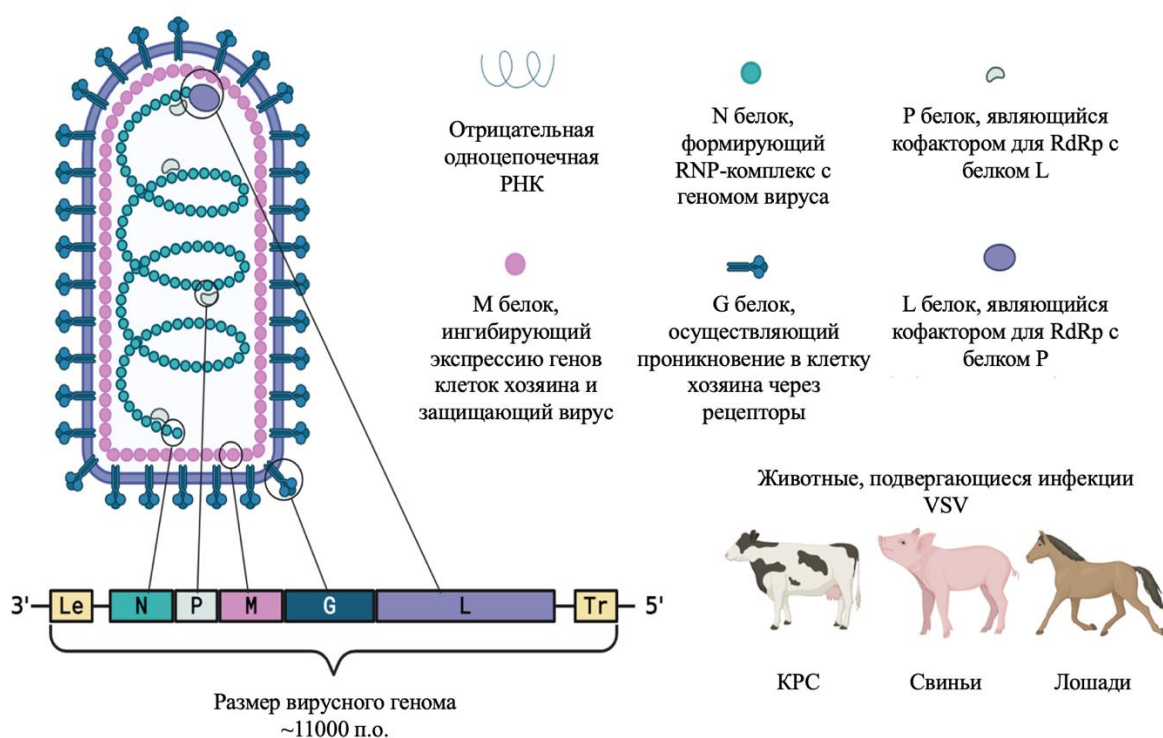


Рисунок 1.1 – Схематическое изображение строения VSV с указанием функций его белков

VSV поражает различных животных, таких как лошади, крупный рогатый скот и свиньи, а также вызывает редкие спорадические вспышки заболевания [55, 59]. В то же время заражение этим вирусом не является смертельным для животных и преимущественно характеризуется появлением волдырей в полости рта. Однако наиболее важными аспектами является то, что этот вирус не является патогеном человека и инфекция протекает бессимптомно, а вирусный геном

может быть легко модифицирован. Эти характеристики делают VSV популярной платформой для создания вакцин, например, против гриппа, вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) и вируса Эбола [60].

1.4. Модификации VSV с целью повышения безопасности и улучшения онколитических свойств

Чтобы повысить избирательность VSV в отношении раковых клеток и сделать его более безопасным без потери онколитических свойств, необходимо модифицировать вирус дикого типа (wild-type VSV, WT-VSV) [41, 61]. Для создания эффективного противовирусного препарата на основе VSV используются несколько подходов (Рисунок 1.2):

1. Модификация белка М для снижения подавления противовирусного ответа в здоровых клетках;
2. Внесение в G белок мутации для ограничения тропизма VSV к определенным клеткам;
3. Аттенуация VSV нарушением нормального порядка генов;
4. Использование полурепликативных форм VSV;
5. Добавление в геном VSV генов для усиления иммунного и противоопухолевого ответа;
6. Внесение в геном VSV мишеней для микроРНК, экспрессирующихся в нормальных клетках, для снижения токсичности, связанной с VSV.

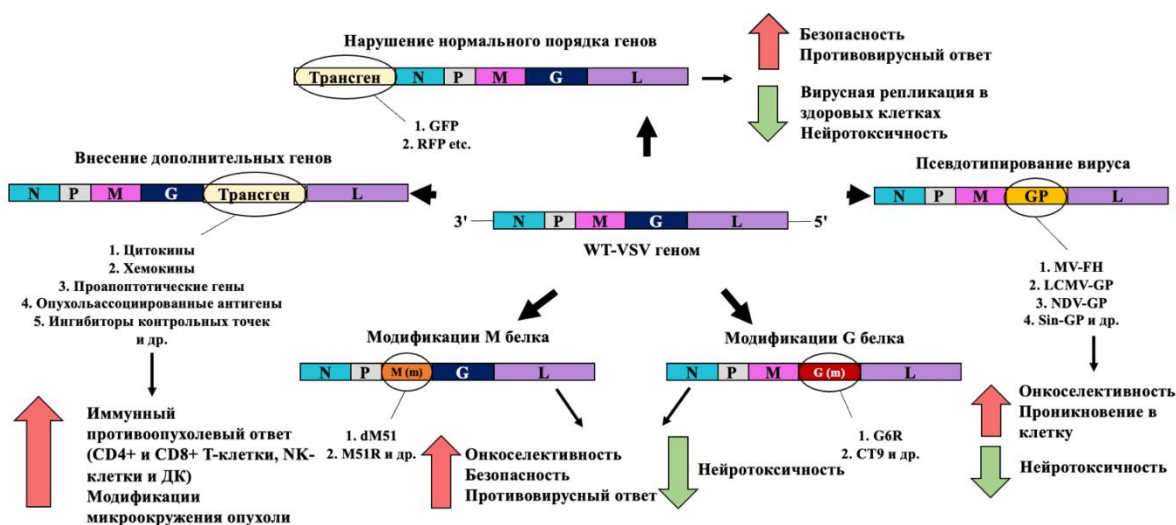


Рисунок 1.2 – Распространенные стратегии для модификации VSV

1.4.1. Модификации вирусных белков VSV

Онкоселективность WT-VSV недостаточна, поскольку М белок способен подавлять эффекты IFN I типа, что приводит к его накоплению в ядерной оболочке, ингибированию транспорта мРНК в цитоплазму и снижению экспрессии противовирусных генов как в здоровых, так и в раковых клетках [62]. Из-за этой особенности WT-VSV обладает высокой токсичностью, особенно нейротоксичностью, у мышей и приматов [63, 64]. Эту проблему можно решить путем введения мутаций в М белок. Вирус с мутацией или делецией метионина в положении 51 (M51) не может связываться с комплексом мРНК, поэтому он не подавляет противовирусный ответ в инфицированных клетках. При этом в большинстве раковых клеток с нарушениями в сигнальном пути IFN репликация вируса не ограничена [65]. VSV, у которого в белке М в позиции 51 была проведена замена аминокислоты на аргинин, показал свою эффективность *in vivo* на модели аденокарциномы поджелудочной железы при внутриопухолевом введении 1×10^8 PFU голым мышам с имплантированными клетками Раис 03.27 [66]. Авторы предположили, что онколиз, опосредованный VSV, может стимулировать адаптивный иммунитет путем активации высвобождения ТАА. Стимулированные NK и другие APC могут затем активировать Т- и В-лимфоциты против опухолевых клеток. В другом исследовании VSV с мутацией M51 также показал свою эффективность при лечении колоректального рака. Его вводили внутриопухолево в количестве 6×10^8 PFU. Интересно, что клетки колоректального рака сохранили некоторую способность передавать сигналы IFN, но это не повлияло на онколитические эффекты вируса в чувствительных клетках [67]. Вирус с делецией M51 в белке М также продемонстрировал эффективность *in vitro* на 15 клеточных линиях глиобластомы человека, полученных путем хирургической резекции *ex vivo*. Кроме того, такая терапия показала эффективность *in vivo* без признаков нейротоксичности при внутриопухолевом введении в дозе 1×10^7 PFU мышам со злокачественной глиомой U87 или U118 [68].

Хотя модификация белка М путем замены или делеции метионина является довольно распространенной и в основном сочетается с другими модификациями вирусного генома, повысить онкоселективность вируса можно и другим способом [69]. Замена белка G VSV на модифицированный белок или на гетерогенные гликопротеины – распространенное изменение VSV. G отвечает за распознавание рецептора и последующее проникновение вируса в клетку, поэтому этот белок становится основной мишенью для выработки гуморального иммунного ответа [48]. Гетерогенные гликопротеины нужны для повышения тропности к определенным типам злокачественных клеток. Например, исследование показало, что полная регрессия гепатоцеллюлярной карциномы (модель Hep3B) наблюдалась в 70% случаев при

внутриопухолевом введении 1×10^7 TCID₅₀ VSV-FH, при этом белок G был заменен белками F и H вируса кори (VSV-FH) [70]. В другом исследовании предложили способ лечения классической лимфомы Ходжкина, при которой наблюдается экспрессия CD30. Для этого был получен вирус VSV-CD30, где G заменили на последовательность, кодирующую гибридный белок FHmut-CD30scFv. Модифицированный вирус показал увеличение выживаемости и способность подавлять рост опухоли на модели ксенотрансплантата KM-H2 у мышей NSG. Это происходило как при внутриопухолевом введении в дозах 3×10^6 или 3×10^8 TCID₅₀, так и при внутривенном введении в дозе 3×10^8 TCID₅₀ [71].

Еще один распространенный подход – замена G VSV на гликопротеин вируса лимфоцитарного хориоменингита (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV). Получившийся вирус VSV-GP безопасен при системном, внутрочерепном и внутриопухолевом введении мышам с иммунодефицитом и эффективен на модели сингенной меланомы B16-OVA [72–75]. Исследования VSV-GP на различных моделях рака предстательной железы также показали многообещающие результаты. Например, две внутриопухолевые инъекции 1×10^7 PFU приводили к полной элиминации Du145-опухолей. Одна внутриопухолевая инъекция $2,3 \times 10^8$ PFU привела к такому же результату при опухолях, индуцированных 22Rv1. А три внутриопухолевые инъекции 1×10^8 PFU значительно увеличили медиану выживаемости и снизили рост опухоли в сингенной модели TRAMP-C1 [76].

Интересная модификация G белка VSV заключается в его замене на гликопротеин вируса Синдбис (Sindbis GP), который модифицирован и содержит Fc-связывающий домен белка А золотистого стафилококка (Sindbis-ZZ). Этот вирус показал свою эффективность *in vitro* против клеток рака молочной железы человека при наличии человеческих моноклональных антител, направленных против рецептора Her2/neu [77]. VSV-gp160G, содержащий ВИЧ-1 gp160 вместо нативного G белка, продемонстрировал высокую эффективность против Т-клеточного лейкоза взрослых – агрессивного рака CD4⁺/CD25⁺ Т-клеток, вызываемого Т-клеточным лимфотропным вирусом человека (human T-lymphotropic virus type 1, HTLV-1). VSV-gp160G, который воздействует только на CD4⁺ клетки, показал свою безопасность при тестировании на здоровых человеческих CD4⁺ Т-клетках *ex vivo*. Также этот вирус замедлил рост опухоли и уменьшил метастазы на мышинной модели TLO-m1-luc NSG при внутрибрюшинном введении в двух дозах по 2×10^6 PFU и в одной дозе по 1×10^7 PFU вируса, при этом не было обнаружено нейротоксичности [78].

Введение мутаций в ген G также может быть использовано для ограничения тропизма VSV. Например, мутант VSV G6R индуцирует IFN-ответы I типа более эффективно, чем M51R, вызывая усиленный противовоспалительный ответ, однако противоопухолевый ответ на вариант VSV M51 был более разнообразным и выраженным [79, 80].

Также есть информация об оптимальном онколитическом фенотипе против определенных видов рака и снижении вирусной активности после введения чужеродных генов перед вирусными генами. Например, VSV-CT9-M51 с делецией в белке М и VSV-p1-GFP, экспрессирующий GFP в позиции 1 генома, были эффективны при лечении глиобластомы [81]. В другом исследовании уменьшение цитоплазматического домена G-белка с 29 до 9 аминокислот в VSV-CT9 и экспрессия белка оболочки ВИЧ обеспечивали безопасность вируса у мышей [82]. Последовательность, кодирующая GFP, введенная перед вирусными генами в случае VSV-p1-GFP снижала вирулентность [83]. VSV-p1-GFP показал наибольшую эффективность при внутривенном введении 5×10^6 PFU мышам SCID, которым имплантировали клетки U87 в полосатое тело головного мозга. Более того, инфицирование VSV-p1-GFP приводило к уменьшению объема опухоли [81].

Для улучшения профиля безопасности VSV можно ослабить, изменив порядок расположения вирусных генов, принимая во внимание тот факт, что уровень экспрессии генов зависит от положения, при этом ген, расположенный на 3'-конце генома (1'-я позиция гена), экспрессируется на самом высоком уровне, как было показано в случае с VSV-p1-GFP [83, 84]. Другое исследование продемонстрировало, что все мыши Swiss Webster в группе, получавшей интраназальное введение 5×10^4 PFU VSV-12'GFP (с нормальным порядком генов), выжили, в то время как все животные в группе, получавшей VSV-G/GFP, умерли от нейротоксичности [85]. По сравнению с быстро размножающимся немодифицированным VSV, вставка двух генов на 3'-конец вирусного генома привела к сильно ослабленному вирусному фенотипу с точки зрения кинетики роста *in vitro* и улучшенной переносимости *in vivo*. В результате более низкая скорость репликации вируса защищала близлежащие неинфицированные клетки, предоставляя инфицированным клеткам больше времени для усиления противовирусного ответа, основанного на IFN, что может еще больше замедлить распространение VSV [85].

Нормальный порядок генов также может быть нарушен без трансгенной вставки, но путем перегруппировки последовательностей, кодирующих белки, необходимые для репликации вируса. Например, средняя смертельная доза (lethal dose 50%, LD50) VSV, введенная интраназально мышам Swiss Webster, увеличилась в 3000 раз после переноса гена N в положение 4', в то время как положения других генов остались неизменными по сравнению с WT-VSV. Кроме того, было отмечено значительное снижение уровня репликации вируса и побочных эффектов, связанных с нейротоксичностью [86]. Однако расположение последовательности, кодирующей G белок, должно учитываться, поскольку повышенная выработка вируснейтрализующих антител была продемонстрирована в результате переноса гена G в положение 1' и переноса гена N в положение 4'. Выработка антител к G, содержащих основные вирусные эпитопы, может привести к резистентности и быстрому снижению эффективности

терапии на основе VSV. Хотя описано всего несколько случаев аттенуации VSV за счет нарушения нормального порядка генов, этот подход имеет большие перспективы для лечения злокачественных новообразований центральной нервной системы и головного мозга, которые ограничены вирусной нейротоксичностью.

1.4.2. Усиление противоопухолевых свойств VSV за счет встройки трансгенов

Одним из самых популярных генов, встраиваемых в геном VSV, является ген *IFN-β*. Он стимулирует врожденный иммунный ответ в здоровых клетках, но не в раковых, поскольку последние имеют дефект в сигнальном пути IFN I типа. При этом IFN-β также стимулирует противоопухолевый ответ [87, 88]. Было доказано, что VSV со встроенным геном *IFN-β* способен избирательно реплицироваться в опухолевых клетках и вызывать их гибель именно из-за нарушенных врожденных иммунных реакций [89]. Многие исследования показали, что вирус с геном *IFN-β* не проявляет признаков нейротоксичности [87]. Хотя было продемонстрировано, что различные типы IFN способны защищать здоровые клетки от воздействия вируса, IFN-α2a показал гораздо большую эффективность против раковых клеток, чем IFN-β, но оказал такое же действие на нормальные клетки [90]. Например, мыши с иммунодефицитом хорошо переносили внутриопухолевую инъекцию VSV-hIFN-β в дозе 1×10^7 TCID50 или внутривенную инъекцию в дозе 1×10^6 TCID50 [91]. Однако из-за того, что hIFN-β биологически чужероден животным, часть мышей после внутриопухолевого введения умирала от нейротоксичности, при этом после внутривенного введения такие эффекты не наблюдались. Это указывает на распространение вируса после внутриопухолевой инъекции. Несмотря на токсичность, в обоих случаях детектировалась полная регрессия опухоли. Важно отметить, что VSV-mIFN-β продемонстрировал высокую эффективность *in vivo*. Он увеличил среднюю выживаемость в 3 раза и защитил животных от повторного приживания раковых клеток на модели немелкоклеточного рака легкого [92]. Кроме того, VSV-hIFN-β показал свою эффективность и полную безопасность при однократном внутриопухолевом и внутривенном введении 5×10^8 PFU на 21-й день после трансплантации клеток плоскоклеточного рака FAT7 крысам Fischer-344 на модели плоскоклеточного рака головы и шеи [93].

Альтернативный способ модифицировать VSV – добавить ген симпортера йодида натрия (sodium/iodide symporter, NIS). Благодаря экспрессии NIS можно использовать специальные радиоактивные индикаторы для неинвазивной визуализации биораспределения вируса [94]. Несмотря на то, что VSV-IFN-β и VSV-IFN-β-NIS безопаснее, чем WT-VSV, даже эти варианты

вируса вызывают сильную нейротоксичность при метастазировании миеломы в центральную нервную систему [95].

Помимо IFN- β , существуют и другие белки, которые усиливают противоопухолевые свойства вируса. VSV может усилить противоопухолевые иммунные реакции организма хозяина за счет доставки провоспалительных цитокинов, молекул, стимулирующих активность Т-клеток, ТАА, ингибиторов иммунных контрольных точек (immune checkpoint inhibitors, ICI) и генов клеточного самоубийства [35, 36, 96]. Основные иммуностимулирующие трансгены и их доставка с помощью ОБ, включая VSV, представлены в Таблице 1.

Таблица 1.1 – Примеры ОБ-доставляемых трансгенов

Трансген	Примеры	Источники
Иммуностимулирующие гены		
<i>GM-CSF</i>	VV-GM-CSF	[97, 98]
	HSV-GM-CSF (T-Vec)	[99]
	AdV-GM-CSF	[100]
	VSV-GM-CSF	[101]
<i>TNF-α</i>	AdV-TNF- α	[102]
	VSV-TNF- α	[103]
<i>IL-2</i>	AdV-IL-2	[104, 105]
	HSV-IL-2	[106]
	VV-IL-2	[107]
<i>IL-12</i>	AdV-IL-12	[108]
	MeVac-IL-12	[109]
	NDV-IL-12	[110]
	Sin-IL-12	[111]
	VSV-IL-12	[112]
<i>IL-15</i>	VV-IL-15	[113]
	AdV-IL-15	[114]
	VSV-IL-15	[115]
<i>IL-18</i>	HSV-IL-18	[116]
<i>IL-21</i>	VV-IL-21	[117]
<i>IL-23</i>	VV-IL-23	[118]
	VSV-IL-23	[119]
<i>IL-24</i>	AdV-IL-24	[120]
	VV-IL-24	[113]
	NDV-IL-24	[121]
<i>IFN-β</i>	VV- IFN- β	[122]
	AdV-IFN- β	[123]
	VSV- IFN- β	[124]
Хемокины		
<i>CCL5</i>	AdV-CCL5	[125]
<i>CCL20</i>	AdV-CCL20	[126]
<i>CXCL4L1</i>	H-1 PV-CXCL4L1	[127]
<i>CXCL10</i>	AdV-CXCL10	[128]
	H-1 PV-CXCL10	[127]
<i>CXCL9</i>	VSV-CXCL9	[129]
	AAV-CXCL9	[130]
Проапоптотические гены		
<i>p53</i>	AdV-p53	[131]
	NDV-p53	[132]
	VSV-p53	[133]
<i>PTEN (P10)</i>	HSV-P10	[134]
	AdV-PTEN	[135]
<i>p16</i>	SVA-p16	[136]

Продолжение Таблицы 1.1

Трансген	Примеры	Источники
Проапоптотические гены		
<i>TRAIL</i>	Ad-TRAIL	[137, 138]
	NDV-TRAIL	[139]
<i>Smac</i>	VV-Smac	[136]
	VSV-Smac	[140]
Антиангиогенные гены		
<i>VEGI</i>	AdV-VEGI	[141]
<i>VEGF</i>	AdV-VEGF	[142]
Опухолеассоциированные антигены		
<i>Claudin-6</i>	MV-CLDN6	[143]
<i>CEA</i>	AdV-CEA	[137]
	MV-CEA	[144]
<i>PSA</i>	AdV-PSA	[145]
<i>hDCT</i>	AdV-hDCT	[146]
<i>CD133</i>	MV-CD133	[147]
	AdV-CD133	[148]
	VSV-CD133	[147]
Ингибиторы контрольных точек		
<i>PD-L1</i>	VV-iPD-L1	[149]
	MV-a-PD-L1	[150]
	HSV-a-PD-L1	[151]
	AdV-a-PD-L1	[152]
	VSV-a-PD-L1	[153]
Костимулирующие иммунные гены		
<i>OX40L</i>	NDV-OX40L	[154]
	AdV-OX40L	[155]
	IaV-OX40L	[156]
<i>CD30</i>	MV-CD30	[71]
<i>CD40L</i>	AdV-CD40L	[155]
	HSV-CD40L	[157]
	VV-CD40L	[158]
	VSV-CD40L	[159]
<i>4-1BBL</i>	VV-4-1BBL	[160]
Клеточные суицидальные гены		
<i>HSV-TK</i>	VV-HSV-TK	[161]
	AdV-HSV-TK	[162]
	VSV-HSV1-sr39tk	[163]
Цитозиндеаминаза (<i>Cytosine deaminase (CD)</i>)	HSV-1-yCD	[164]
	VG9-CD	[165]
	MV-CD	[166]
	VSVΔ51-CD::UPRT	[167]
Нитроредуктаза (<i>Nitroreductase (NTR)</i>)	HSV-NTR (HSV1790)	[168]
	AdV-NTR	[169]
<i>Цитохром P450</i>	HSV-P450	[170]

Включение провоспалительных цитокинов в вирусный геном является перспективным подходом, поскольку многие из цитокинов играют важную роль в привлечении иммунных клеток в опухоль [171]. К часто используемым иммуностимулирующим генам относятся *GMCSF*, фактор некроза опухоли α (tumor necrosis factor α , *TNF- α*), различные интерлейкины (*IL-2*, *IL12*, *IL-15*, *IL-18*, *IL-21* и *IL-24*) и хемокины (*CCL5*, *CCL20*, *CCL21*, *CXCL4L1* и *CXCL10*) [97–99].

Одним из успешных применений модифицированного VSV, доставляющего мышиный IL-12, было ежедневное внутривенное введение 1×10^7 PFU VSV-mIL12 на протяжении 5 дней мышам C3H/HeJ в модели плоскоклеточной карциномы SCC VII [112]. Было продемонстрировано достоверное уменьшение опухоли и увеличение медианы выживаемости по сравнению с VSV-F, кодирующим слитый белок, при отсутствии токсичности. Использование VSV, кодирующего хемокины, дало некоторые противоречивые результаты, которые требуют дальнейших исследований. Например, внутривенное введение 5×10^7 TCID50 VSV-mCXCL9 приводило к увеличению выживаемости и ингибированию роста опухоли в модели сингенной плазмцитомы 5TGM1, но не показало существенной разницы по сравнению с группой плацебо в сингенной модели немелкоклеточного рака легкого LM2 при внутриопухолевом введении 5×10^8 TCID50 [129]. VSV, кодирующий IL-15 человека (VSV-ΔM51-opt.hIL-15), продемонстрировал свою эффективность при первичной и метастатической опухоли толстой кишки CT26 на мышинной модели BALB/c с внутривенным введением трех доз 5×10^8 PFU вируса. Стоит упомянуть, что VSV-GFP не показал эффективности против метастазов опухоли в легких, что указывает на влияние IL-15 на привлечение иммунных клеток [115]. Ген мышиного гаммагерпесвируса 68 M3 кодирует белок, который связывается с широким спектром хемокинов (C, CC, CCC и CX3C) с высокой аффинностью [172]. Внутрипеченочное введение rVSV(MΔ51)-M3, экспрессирующего секретлируемую форму M3, в дозах 5×10^8 и 5×10^9 PFU, привело к длительной ремиссии у 40% и 50% крыс с гепатоцеллюлярной карциномой McA-RH7777 соответственно [65].

В соответствии с описанными стратегиями, некоторые VSV были модифицированы для экспрессии генов-супрессоров опухолей или проапоптотических генов, таких как *p53*, *PTEN*, *p16*, *Rb*, *TRAIL* и *Smac* [173–175]. Поскольку многие типы злокачественных новообразований имеют мутации в *p53*, экспрессия этих трансгенов в раковых клетках может повышать эффективность ОБ и способствовать апоптозу опухоли. VSV-M(mut)-mp53, в котором аминокислоты DTY в положении 52–54 белка M были заменены на аланины, показал эффективность на модели аденокарциномы молочной железы TS/A у мышей с BALB/c при внутривенном введении вируса в дозе 5×10^7 PFU [133]. Менее 50% мышей умерли в течение 120 дней, однако увеличение дозы до 5×10^8 PFU снижало медиану выживаемости до 75 дней. Доказано, что миметики Smac повышают чувствительность опухолевых клеток к противоопухолевой терапии. VSV, кодирующий ген *Smac* (VSV-S), показал свою повышенную активность в модели рака молочной железы мышей 4T1 BALB/c при трехкратном внутриопухолевом введении 3×10^6 PFU и в модели рака молочной железы T-47D при однократной инъекции 1×10^5 PFU [140]. Показано, что терапия VSV приводит к уменьшению объемов опухоли и деградации злокачественных тканей. Одна из популярных стратегий противоопухолевого эффекта, направленная на антиангиогенез,

опирается на экспрессию ингибитора фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor inhibitor, VEGFI) и уже показала многообещающие результаты [141].

В дополнение к обсуждаемым подходам, ОВ, вооруженные соответствующими ТАА, также обеспечивают перспективные терапевтические стратегии для лечения солидных опухолей, индуцируя стойкий системный противоопухолевый ответ. Клаудин-6, раково-эмбриональный антиген (carcinoembryonic antigen, CEA), простат-специфический антиген (prostate specific antigen, PSA) и допахром таутомераза человека (human dopachrome tautomerase, hDCT) являются одними из широко используемых мишеней [137, 176–178]. CD133 является наиболее изученным маркером различных карцином [179]. Терапия VSV-CD133 привела к увеличению выживаемости мышей NOD/SCID в модели гепатоцеллюлярной карциномы NuH7 [147]. Только мыши, которым внутриопухолево вводили 4 дозы 1×10^6 TCID50 VSV-CD133, остались в живых через 40 дней исследования. Тем не менее, остальные животные, получавшие внутривенно VSV-CD133 на модели глиомы NCH644, погибли на 8-й день из-за тяжелой нейротоксичности, которая накладывает определенные ограничения на использование VSV.

ICI, такие как PD-L1, CTLA-4 и CD40, могут быть эффективно использованы для того, чтобы позволить Т-клеткам проявлять свою цитотоксическую активность, которая обычно может быть ингибирована из-за аберрантной функции злокачественных клеток [173]. Существует также несколько успешных исследований костимулирующих членов суперсемейства рецепторов TNF, таких как OX40L, CD30, CD40L и 4-1BB [180, 181]. Интересно, что VSV, доставляющий *CD40L*, не показал повышенного противоопухолевого ответа по сравнению с VSV-GFP в модели мышинной меланомы B16OVA, хотя использование AdV, кодирующего *CD40L*, помогло вылечить 75% мышей. Каждая группа животных получала шесть внутриопухолевых инъекций любой из вирусных терапий: репликативно-активный VSV-GFP (5×10^8 PFU), VSV-CD40L (5×10^8 PFU), AdV-GFP с дефектом репликации (1×10^9 PFU) или AdV-CD40L (1×10^9 PFU). Ожидалось, что экспрессия CD40L приведет к увеличению числа CD4⁺ и CD8⁺ опухолеспецифичных Т-клеток. Несмотря на то, что дозы, используемые для обоих вирусов, были схожими, разница в исходе терапии может быть связана со скоростью, с которой эти ОВ вызывают провоспалительную реакцию. VSV вызывает быструю воспалительную реакцию в злокачественных клетках, активацию неспецифических для опухоли CD8⁺ Т-клеток в селезенке и сильную экспрессию провоспалительных цитокинов, особенно IFN- γ , в течение нескольких дней после лечения. Было показано, что наивным Т-клеткам в качестве антигенов представлены преимущественно вирусные эпитопы. Таким образом, противоопухолевый эффект после введения VSV-CD40L неотличим от VSV-GFP. Эффект AdV может наблюдаться только через несколько дней после введения, и AdV-экспрессируемый CD40L способен выполнять свою костимулирующую роль для ТАА-специфичных Т-клеток и приводить к повышенному

ингибированию опухоли по сравнению с AdV-GFP. Это говорит о важности правильного выбора ОВ для успешной терапии в зависимости от типа рака [159].

Гены клеточного самоубийства интересны еще и тем, что они могут безопасно экспрессироваться в клетке, после чего вызывают гибель клетки путем апоптоза при активации лекарственным средством или антителом, что позволяет создать эффективную комбинированную терапию. Кроме того, эти гены способны оказывать воздействие на соседние опухолевые клетки, предотвращая метастазирование [173]. К этим генам относятся, в частности, тимидинкиназа HSV (HSV thymidine kinase, HSV-TK), цитозиндезаминаза, гибридный ген *FCU1*, нитроредуктаза и цитохром *P450* [182–184]. VSV-HSV1-sr39tk, кодирующий улучшенную версию тимидинкиназы-репортера (*sr39tk*) HSV-1, продемонстрировал возможность высокочувствительной визуализации *in vivo* с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) на модели гепатоцеллюлярной карциномы у крыс [163]. Однако в будущем этот вирус может быть использован в комбинированной терапии с пролекарством ганцикловир (ganciclovir, GCV), что усилит противоопухолевый ответ.

Важной и эффективной стратегией с использованием генов клеточного самоубийства является экспрессия фермента слияния цитозиндезаминазы/урацилфосфорибозилтрансферазы (CD/UPRT) и системная доставка нетоксичного 5-фторцитозина (5FC), который дезаминируется ферментами и превращается в химиотерапевтический препарат 5-фторурацил (5FU) [167]. В этом случае эффективность VSV-C (VSV Δ 51-CD::UPRT) в комбинации с 5FC была продемонстрирована на моделях аденокарциномы груди TSA или T-клеточной лимфомы EG7 при двойной внутривенной инъекции 2×10^7 PFU с оптимизацией введения 5FC для достижения синергического эффекта без признаков токсичности. Такой подход комбинированной терапии приводил к более выраженному подавлению роста опухоли и увеличению выживаемости животных, чем применение обоих препаратов по отдельности [185].

Другой многообещающий вариант основан на использовании небольших трансмембранных белков, ассоциированных со слиянием (fusion-associated small transmembrane, FAST). Например, VSV, кодирующий FAST белок *p14* (VSV-p14), продемонстрировал повышенную противоопухолевую активность по сравнению с VSV-GFP на моделях первичного и метастатического рака молочной железы и метастатического рака толстой кишки. Исследование было проведено на мышах BALB/c, которым были трансплантированы клетки трижды негативного рака молочной железы 4T1 и метастатической карциномы толстой кишки CT26 с последующим внутривенным введением трех доз VSV-p14 и VSV-GFP в дозах 1×10^8 PFU и 1×10^7 PFU соответственно. В результате этой терапии было отмечено увеличение выживаемости и уменьшение количества и размера метастазов [186].

Интересным решением является доставка микроРНК с помощью VSV, кодирующего микроРНК-143, участвующую в процессе метастазирования остеосаркомы [187]. Этот вирус продемонстрировал сильное цитопатическое действие на клетки остеосаркомы мыши (LM8) и человека (143В, HOS, Saos-2 и MG-63) *in vitro*, к сожалению, такого же эффекта не удалось достичь в эксперименте *in vivo* [188, 189].

1.4.3. Модификации VSV путем направленной эволюции

Рекомбинантные VSV с повышенной онкоселективностью могут быть получены путем направленной эволюции, во время которой вирусы адаптируются к репликации в злокачественных клетках. В недавнем исследовании VSV-ΔM51 продемонстрировал повышенную перmissивность и цитотоксичность в отношении эмбриональных фибробластов мыши (mouse embryonic fibroblasts, MEF) с нокаутом *p53* и низкую адаптацию к клеткам MEF без нокаута *p53*. Анализ полумаксимальной эффективной дозы (effective concentration 50%, EC50) показал, что вирусы, полученные в результате серийных пассажей на злокачественных клетках, были более эффективны против модели *p53*- рака молочной железы 4T1, но не имели преимуществ по сравнению с WT-VSV против *p53*+ модели рака толстой кишки CT26 [190]. Один из эволюционировавших вирусов был особенно эффективен против *p53*- клеток 4T1 при введении двух инъекций 1×10^8 PFU вируса мышам BALB/c. Этот вирус L3 содержал мутацию G1456U в гене *P* и мутацию G5129A в гене *L*, что свидетельствует об эволюционном характере его эффективности в линии раковых клеток *p53*-/[190].

Кроме того, направленная эволюция VSV-G-GFP в клетках глиобластомы человека после положительного отбора в ходе множественных пассажей привела к образованию мутанта VSV-rp30a с четырьмя мутациями по сравнению с исходным VSV-G-GFP [191]. Внутривенное введение 5×10^7 PFU VSV-rp30a мышам SCID в модели ксенотрансплантата саркомы Юинга (клеточная линия A673) привело к усиленному нацеливанию на глиобластому в мышинной модели ксенотрансплантата, а также к 11-кратному уменьшению объема опухоли по сравнению с VSV-G-GFP [192, 193].

1.4.4. Модификации для создания полуреplikативных ОВ

У пациентов с тяжелыми онкологическими заболеваниями возможность неконтролируемого распространения ОВ может поставить под угрозу безопасность такого лечения [59]. Одним из способов повышения онкоселективности и безопасности является создание условно репликативных ОВ [173]. Первый подход основан на удалении вирусных генов, необходимых для репликации вируса, например, генов в областях E1A или E1B для векторов на основе AdV и HSV-TK (или области g34.5/joint) для векторов на основе HSV. Промотор E1A может быть заменен специфичным для раковых клеток промотором, который, как известно, активен в целевых опухолевых клетках. Кроме того, специфичные для опухоли промоторы, такие как обратная транскриптаза теломеразы человека (human telomerase reverse transcriptase, hTERT), которая неактивна в большинстве здоровых клеток, но активируется в опухолевых клетках, может служить избирательным ограничителем вирусной транскрипции [194]. Интересным вариантом этого подхода является разделение генов, необходимых для репликации VSV, на две плазмидные конструкции. Комбинация VSV* Δ G и VSV Δ L-DsRed продемонстрировала свою исключительную эффективность и безопасность на модели глиобластомы человека, когда две дозы $2,8 \times 10^5$ TCID50 srVSV(Δ G/ Δ L) вводили внутриопухолево мышам NOD/SCID с опухолями G62. Применение аналогичных доз WT-VSV приводило к гибели от нейротоксичности в 90% случаев, в то время как терапия srVSV(Δ G/ Δ L) приводила к регрессии 80% опухолей без каких-либо побочных эффектов [195].

Второй подход сравнительно проще, он основан на химической модификации вирусного капсида с помощью pH-чувствительного полимера. Эта стратегия основана на том, что pH в опухолях ниже, чем в здоровых тканях [196]. Однако у этого подхода есть свои недостатки: во-первых, химические модификации не сохраняются после репликации, во-вторых, онколитическая активность, проявляемая ОВ, может быть значительно ослаблена из-за защиты генома полимером [173]. Ковалентная модификация VSV-mIFN- β с помощью PEG 5000 приводила к увеличению персистенции вируса в крови даже в присутствии нейтрализующих антител, доставке вируса к месту опухоли и снижению гепатотоксичности. Исследование проводили на мышах BALB/c, которым прививали клетки мышинной плазматической миеломы MPC11 с последующим внутривенным введением пегилированного вируса в дозе $2,5 \times 10^8$ TCID50 [197]. Другое исследование показало, что воздействие ультрафиолетового облучения на VSV приводит к образованию нереплицирующихся вирусных частиц [59]. Несмотря на потерю способности к репликации, VSV сохранял цитотоксичность *in vitro*. Хотя точный механизм селективности таких нереплицирующихся частиц VSV неясен, другое исследование показало,

что предварительно облученный ультрафиолетом VSV-dM51-GFP усиливал рост опухоли в иммунокомпетентной мышинной модели протоковой аденокарциномы поджелудочной железы PDAC [198].

1.5. Изменение транскриптома раковых клеток под воздействием ОБ

Хотя ОБ изучаются давно, в их взаимодействии с раковыми клетками остается много неизученного. Относительно новым направлением исследований является анализ транскриптома раковых клеток при вирусном воздействии. Выявление закономерностей, объясняющих, почему одни раковые клетки чувствительны к виротерапии, а другие нет, позволит определить наиболее эффективные мишени для лечения [199].

Для репликации в опухолевой клетке ОБ модулируют множество сигнальных каскадов, в то же время исходные нарушения именно в этих путях, характерные для разных видов опухолевых клеток, во многом определяют жизненный цикл самого вируса [200]. В связи с этим современные транскриптомные исследования сфокусированы на нескольких ключевых аспектах: на поиске молекулярных причин чувствительности или устойчивости к вирусу у гистологически сходных опухолей, на изучении влияния вирусной инфекции на микроокружение опухоли и пост-терапевтическое поведение неоплазий и на сравнительном анализе экспрессии генов в инфицированных и интактных опухолевых клетках [118, 201–205]. Выявляемые изменения экспрессии, как правило, являются следствием исходных дефектов сигналинга в раковых клетках и приводят к реорганизации таких фундаментальных процессов, как противовирусная защита, пролиферация, метастазирование, апоптоз и другие механизмы клеточной гибели.

Проникновение ОБ в опухолевую клетку запускает врожденный иммунный ответ. Ключевую роль здесь играют паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptors, PRR), которые распознают как вирусные ДНК, так и РНК [206]. Сигналы от этих сенсоров активируют транскрипционные факторы, регулирующие выработку провоспалительных медиаторов: через NF-κB индуцируются цитокины (IL-1α, IL-1β, TNF-α), а через факторы ответа IFN запускается продукция IFN I типа [207]. Последние стимулируют секрецию хемокинов и цитокинов, рекрутирующих лимфоциты и макрофаги в очаг поражения, поддерживают популяции CD8+ Т-лимфоцитов и NK, способствуют дифференцировке моноцитов в зрелые DC, а также активируют наивные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти [208]. Совокупность этих механизмов лежит в основе активного противоопухолевого иммунитета, ограничивая не только

локальный рост опухоли, но и ее метастазирование, эпителиально-мезенхимальный переход и ангиогенез [209, 210].

Наибольшую активность ОБ проявляют при дефектах сигналинга IFN I типа [211]. При этом показано, что IFN- β играет более важную роль в защите опухолевых клеток от лизиса VSV по сравнению с IFN- α , хотя для сохранности здоровых клеток значимы оба типа IFN [90]. Однако прямая корреляция здесь отсутствует: уровень экспрессии генов, вовлеченных в сигнальные пути IFN I и II типа, не всегда служит надежным предиктором чувствительности или резистентности опухоли к ОБ, что подчеркивает сложность и многокомпонентность данного процесса [212].

Существенную роль в регуляции иммунных реакций играют и IFN II типа, единственным представителем которых является IFN- γ [213]. Этот цитокин производят главным образом иммунные клетки как врожденного иммунитета (NK), так и адаптивного (CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты) [214]. Примечательно, что IFN I типа способствуют выработке IFN- γ : они направляют наивные CD4⁺ Т-клетки в сторону Th1-фенотипа и активируют NK [208]. В контексте противоопухолевого ответа секреция IFN- γ в тандеме с гранзимом В и перфорином запускает гибель раковых клеток [215]. Кроме того, IFN- γ участвует в перепрограммировании макрофагов из M2-подобного в M1-подобный фенотип, а также усиливает узнавание ТАА эффекторными Т-лимфоцитами [216].

Однако в ТМЕ IFN- γ способен участвовать и в опухолевой инвазии [217]. Высокие дозы IFN- γ запускают классический путь JAK/STAT (противоопухолевый ответ), а низкие – переключают сигнал на каскад PI3K-AKT, что влечет к приобретению стволовых свойств у раковых клеток [218]. Однако при некоторых типах рака активируются оба пути независимо от концентраций цитокина, причины этих изменений ещё предстоит выяснить [219].

Среди генов, активируемых IFN (interferon-stimulated genes, ISG), особое семейство представляют белки с тетраэрикопептидными повторами (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats, IFIT). Их роль в опухолевой прогрессии неоднозначна: во-первых, устойчивая гиперэкспрессия IFIT1 способствует подавлению врожденного иммунитета по принципу отрицательной обратной связи, ингибируя синтез IFN I типа, во-вторых, высокая экспрессия IFIT1 коррелирует с приобретением опухолевыми клетками стволового фенотипа и усилением метастатического потенциала [220, 221]. Под действием низких концентраций IFN- γ незрелые нейтрофилы трансформируются в иммуносупрессивные клетки, экспрессирующие PD-L1 и IFIT1, что индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход и способствует истощению Т-лимфоцитов [222]. Многочисленные исследования подтверждают, что именно белки семейства IFIT являются ключевыми драйверами эпителиально-мезенхимального перехода и развития резистентности к иммунотерапии, что связано с нарушением регуляции экспрессии ISG [223].

Основным источником IL-1 β , в норме запускающего лихорадку и воспалительные реакции, служат моноциты и макрофаги [224]. Секреция IL-1 β привлекает нейтрофилы и повышает их выживание, после чего поврежденные и отмирающие ткани разрушаются с запуском каскада врожденного и приобретенного иммунитета [225]. Кроме того, IL-1 β усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов и участвует в их апоптозе. Биологическая активность IL-1 β контролируется на уровне транскрипции и трансляции, а также через синтез цитокинов-антагонистов (IL-1Ra и IL-1R AcP), блокирующих связывание IL-1 β с его рецепторами [226]. В ТМЕ повышенный уровень IL-1 β запускает индукцию метастазирования через эпителиально-мезенхимальный переход, подавляя иммунитет и стимулируя ангиогенез [227].

Ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (retinoic acid-inducible gene 1, RIG-I), представляет собой рецептор, распознающий вирусную РНК и инициирующий дальнейший каскад выработки IFN типа I. В случае VSV именно сигналинг через RIG-I играет решающую роль в противовирусной защите [228, 229]. Это обуславливает двойственный эффект RIG-I в контексте онколитической терапии: его активность снижает эффективность репликации VSV, однако она важна для стимуляции противоопухолевого иммунитета [230]. Подтверждением онкопротективной функции служат данные о том, что низкая экспрессия *RIG-I* в опухолях ассоциирована с плохим ответом на терапию, тогда как его активация усиливает чувствительность к химио- и иммунотерапевтическим агентам [231, 232].

Процесс эпителиально-мезенхимального перехода и последующее метастазирование опухоли тесно связаны с «кадгериновым переключением», при котором подавление экспрессии E-кадгерина сопровождается повышением уровня N-кадгерина [233]. Взаимодействуя с рецепторами эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) и фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor receptor, FGFR), N-кадгерин усиливает подвижность и миграцию клеток, участвует в ангиогенезе и, что наиболее важно, его гиперэкспрессия коррелирует с метастазированием и неблагоприятным прогнозом при многих типах рака [234–236]. Исследования показывают, что в отдаленных метастазах экспрессия E-кадгерина может восстанавливаться, способствуя формированию вторичных очагов опухоли [237]. Более того, в ТМЕ E-кадгерин способен подавлять функцию DC и стимулировать поляризацию макрофагов в проопухолевый фенотип [238]. Несмотря на то, что классическое «переключение кадгеринов» характерно для многих опухолей, ключевым фактором агрессивности остается именно N-кадгерин: доказано, что даже при стабильной экспрессии E-кадгерина повышенный уровень N-кадгерина сам по себе усиливает метастатический потенциал [239].

ОВ запускают ICD через апоптоз, аутофагию, пироптоз и некроз [240]. Центральная роль в апоптозе принадлежит p53: во внутреннем пути он ингибирует антиапоптотические белки Bcl-2, во внешнем увеличивает количество рецепторов смерти, что в итоге активирует каспазы 3 и 7,

приводя клетку к гибели [241]. Будучи классическим опухолевым супрессором, p53 подавляет ангиогенез, поддерживает аутофагию, регулирует различные типы гибели клетки и влияет на микроокружение опухоли [242]. Интересно, что для виротерапии потеря функции p53 может быть полезна: VSV активнее размножается в клетках с дефектным p53, что позволяет рассчитывать на высокую эффективность лечения таких опухолей [243].

Белок SMAC в процессе апоптоза покидает митохондрии, после чего попадает в цитозоль и связывается с ингибиторами апоптоза (inhibitor of apoptosis proteins, IAP), в результате чего высвобождаются каспазы 3 и 9 [244]. Было показано, что индукция экспрессии SMAC с помощью малых молекул или ОВ, кодирующих этот ген, запускает апоптоз в раковых клетках [245]. Однако нарушение баланса между SMAC и IAP приводит к пролиферации опухоли и ее лекарственной устойчивости [246]. В большинстве раковых клеток экспрессия SMAC снижена как на уровне мРНК, так и на уровне белка [247]. Однако в тех опухолевых тканях, где экспрессия SMAC не снижена, этот белок включается в процессы везикулярного транспорта и синтеза липидов, что может способствовать дальнейшему перепрограммированию ТМЕ в сторону иммуносупрессивного фенотипа [248].

Пироптоз, одна из разновидностей программируемой клеточной гибели, реализуется с участием белков семейства гасдерминов, но ключевая роль принадлежит гасдермину E (gasdermin E, GSDME) [249]. Этот белок не только запускает пироптоз, но и участвует в регуляции апоптоза, выступая в роли медиатора p53-зависимого апоптоза [250]. GSDME относится к опухолевым супрессорам: он вызывает как апоптоз, так и пироптоз раковых клеток, попутно активируя противоопухолевый иммунитет [251]. Более того, присутствие GSDME в ТМЕ способствует привлечению NK, макрофагов и CD8⁺ Т-лимфоцитов [252]. Однако было показано, что пироптоз нормальных тканей, опосредованный GSDME, лежит в основе побочных эффектов химиотерапии [253]. В большинстве раковых клеток экспрессия GSDME снижена по сравнению со здоровыми тканями.

1.6. Комбинированная терапия

1.6.1. Комбинация с радиотерапией

ЛТ играет важную роль в лечении рака. Несмотря на то, что режимы облучения со временем улучшились, эффект локальной ЛТ ограничен при запущенных и метастатических опухолях. Многие исследования показали, что сочетание ОВ с ЛТ усиливает противоопухолевый

эффект [39]. В то время как ОВ могут повышать радиочувствительность опухолевых клеток, ЛТ, в свою очередь, может ускорять захват и размножение вируса, приводя к гибели клеток [40]. Например, комбинация М белка VSV и ЛТ привела к благоприятному противоопухолевому иммунному ответу [254]. Авторы этого исследования использовали интересный подход: формировали комплекс плазмиды, кодирующей М белок VSV, с липосомой (Lip-MP). Мыши с карциномой легкого или саркомой получали внутриопухолевые или внутривенные инъекции Lip-MP и ЛТ, и это приводило к значительному уменьшению опухоли по сравнению с любым из методов лечения в отдельности. Авторы выделили следующие причины такого результата: М белок и ЛТ индуцируют апоптоз опухолевых клеток, ЛТ улучшает трансфекцию и эффективность трансдукции, введение комплекса Lip-MP индуцирует неспецифическую противоопухолевую активность, М белок активирует NK-ответ, Lip-MP усиливает индуцированный ЛТ апоптоз клеток опухоли. Другое доклиническое исследование предоставило дополнительные доказательства того, что комбинация VSV и ЛТ (с последующим повторным курсом ЛТ) может оказывать синергический противоопухолевый эффект за счет сильной инфильтрации иммунными клетками опухоли [255]. В результате в группе комбинированного лечения наблюдалось значительное ингибирование роста опухоли и повышение выживаемости у мышей с раком головы и шеи по сравнению с группами, получавшими только одно лечение.

Было показано, что VSV-IFN- β в комбинации с ЛТ оказывает более мощный противоопухолевый эффект, чем любое другое лечение, назначаемое по отдельности [256]. Синергия комбинации была подтверждена в ходе доклинического исследования на моделях подкожного ксенотрансплантата предстательной железы PC3, ортотопического ксенотрансплантата предстательной железы LNCaP и сингенной модели опухоли предстательной железы RM9. В ходе этого исследования у мышей с опухолью RM9, получавших лечение, наблюдалось увеличение количества CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и полная устойчивость к повторному приживлению клеток опухоли. По мнению авторов, ЛТ усиливала активность VSV-опосредованного онколиза за счет ослабления врожденного противовирусного ответа, что приводило к усилению репликации VSV и формированию адаптивного иммунного ответа, о чем свидетельствовало увеличение количества CD8⁺ лимфоцитов и противоопухолевой активности. Локальное облучение опухоли в сочетании с инъекцией VSV-IFN- β приводило к гибели опухолевых клеток в сочетании с выраженным противоопухолевым иммунитетом.

1.6.2. Комбинация с химиотерапией

Химиотерапия остается лидером в традиционной терапии рака первой линии [4]. В отличие от хирургического вмешательства или ЛТ, химиотерапия оказывает системный терапевтический эффект и остается неотъемлемой частью лечения онкологических больных с диссеминированным заболеванием. Недавние исследования показали, что химиотерапевтические препараты также способны индуцировать ICD в злокачественных клетках [257, 258]. Поскольку доставка ОБ к местам метастазирования остается сложной задачей, комбинация химиотерапии, оказывающей системное воздействие, с местной терапией является многообещающим подходом, который активно исследуется.

Сочетание стандартного препарата для лечения рака поджелудочной железы гемцитабина с VSV показало, что в ходе лечения повышается противоопухолевая эффективность в иммунокомпетентной мышинной модели протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [259]. На основании результатов доклинических исследований была продемонстрирована эффективность комбинации VSV с LCL161 [260]. Этот подход позволил замедлить рост опухоли у мышей с рабдомиосаркомой, когда монотерапия VSV или LCL161 была неэффективна у животных контрольной группы. Эффективность этого подхода основана на опосредованной ОБ индукции секреции цитокинов и хемокинов, прямо или косвенно приводящей к гибели раковых клеток в результате привлечения и активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета, нацеленных на опухоль. Однако исследование, опубликованное в 2022 году, продемонстрировало, что добавление ингибитора EGFR гефитиниба отдельно или вместе с IFN приводило к приобретению устойчивости к VSV в клеточных линиях, чувствительных к VSV, и в культурах первичной глиомы [261]. Кроме того, гиперэкспрессия белка Her2 наблюдалась на VSV-чувствительных клеточных линиях, но не на VSV-резистентных, что позволяет предположить, что Her2 потенциально может быть использован в качестве биомаркера чувствительности опухоли к VSV-терапии. И основной вывод этого исследования заключается в том, что комбинация гефитиниба с IFN-чувствительными ОБ неэффективна для пациентов с более высокой экспрессией Her2.

Следует отметить, что комбинированная терапия с ОБ является распространенной практикой во всем мире [262]. Однако существует не так много исследований, посвященных изучению эффектов комбинированного лечения VSV и химиотерапевтическими препаратами.

1.6.3. Комбинация с иммунотерапией

Успехам иммунотерапии рака препятствуют иммунологически «холодные» опухоли, которые трудно поддаются лечению. В частности, широкий спектр клинически одобренных иммунотерапевтических средств, включая химерные антигенрецепторные Т-клетки (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) и ICI, эффективен лишь у небольшого числа онкологических больных, поскольку опухоли у большей части пациентов являются иммунологически «холодными» [263, 264]. Таким образом, стратегии, использующие ОВ для «разогревания» ТМЕ, привлекательны, поскольку они повышают эффективность ICI. В настоящее время проводятся многочисленные клинические испытания, в ходе которых оценивается комбинация VSV с ICI. Например, CTLA-4 и PD-1 рецепторы, экспрессирующиеся на поверхности Т-клеток, стали терапевтическими мишенями для коррекции ТМЕ и укрепления противоопухолевого иммунитета [61].

Несколько доклинических исследований, в которых использовалась комбинация VSV и ICI, выявили многообещающие кандидаты лекарств [265]. Сообщалось, что VSV, экспрессирующий mIFN β и NIS, в сочетании с анти-PD-1 антителом приводит к значительному увеличению количества внутриопухолевых CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с VSV-терапией или только анти-PD-1-терапией на сингенной модели острого миелоидного лейкоза. Более того, комбинированная терапия антителами к PD-1 и VSV привела к значительному замедлению роста опухоли и увеличению выживаемости по сравнению с монотерапией VSV. Другой подход к лечению рака основан на активации NK, которые играют важную роль в иммунологическом надзоре за опухолью и противоопухолевом иммунитете. Например, одно из исследований с использованием мышиных моделей рака поджелудочной железы показало, что активация NK в сочетании с VSV, доставляющим IL-15, усиливает противоопухолевый иммунный ответ против раковых клеток поджелудочной железы, что приводит к увеличению регрессии опухоли и общего времени выживания [266]. Авторы также продемонстрировали, что, хотя монотерапия анти-PD-1 была неэффективной, добавление анти-PD-1 антитела к комбинированной иммунотерапии еще больше усиливало и продлеvalo иммунный ответ, что увеличивало выживаемость. IL-15 является провоспалительным цитокином, необходимым для выживания и функционирования многих противоопухолевых иммунных клеток, включая NK, и, как было показано, этот цитокин повышает сопротивляемость к прогрессированию рака. Сочетание VSV, экспрессирующего проапоптотический белок Smac, с анти-PD-1 антителом значительно увеличило выживаемость мышей и изменило состав ТМЕ [267].

В совокупности эти исследования продемонстрировали, что комбинации ОБ с традиционными методами радио-, химиотерапии и иммунотерапии предлагают улучшенную стратегию для индукции противоопухолевого иммунного ответа путем улучшения активации иммунных клеток и инфильтрации ими опухолевых тканей. Доклинические исследования показали, что VSV является многообещающим ОБ, поэтому в настоящее время проводятся клинические испытания с использованием VSV.

1.7. Клинические исследования с использованием VSV

Терапевтический эффект монотерапии VSV все еще ограничен, и больше внимания уделяется стратегиям лечения, которые сочетают ОБ-терапию с другими существующими методами лечения. Недавно общее количество зарегистрированных на www.clinicaltrials.gov клинических исследований на основе ОБ достигло 220. Большинство клинических исследований относятся к I фазе (n = 132). Сообщается о 42 дополнительных клинических испытаниях в фазе I/II, 39 в фазе II, 3 в фазе III, 1 в фазе II/III и 3 в фазе IV. Только 12 клинических испытаний, перечисленных в таблице 1.2, основаны на VSV, однако важно отметить, что VSV обладает хорошим профилем безопасности, что было доказано активным использованием вакцины против вируса Эбола [268].

Таблица 1.2 – Клинические исследования с использованием VSV, направленные на терапию злокачественных новообразований

VSV	Номер NCT	Вид рака	Путь введения	Фаза
VSV-IFNbetaTYRP1	NCT03865212	Меланома III-IV стадии	ВО, ВВ	I
VSV-IFN-beta	NCT01628640	Рефракторный рак печени или солидные опухоли с неблагоприятным прогнозом	ВО	I
VSV-hIFNbeta-NIS	NCT03120624	Метастатический или рекуррентный эндометриальный рак	ВВ	I
VSV-hIFNbeta- NIS	NCT03017820	Рецидивирующая или рефракторная мультиформная миелома, острая миелоидная лейкемия или лимфома	ВВ	I
VSV-IFNbeta-NIS	NCT02923466	Злокачественные солидные опухоли	ВВ, ВО	I
VSV-GP128	NCT04046445	Рак толстой кишки IV стадии	ВВ	I
VSV-IFNβ-NIS	NCT03647163	Солидные опухоли	ВВ	I/II
VSV (Revottack)	NCT05644509	Злокачественные солидные опухоли с неблагоприятным прогнозом	ВВ	I
VSV-IFNβ-NIS	NCT04291105	Рак толстой кишки, карцинома головы и шеи, меланома	ВО	II
VSV-GP154	NCT05846516	Рак поджелудочной железы	ВВ	I

Продолжение Таблицы 1.2

VSV-GP (BI 1831169)	NCT05155332	Метастазирующие солидные опухоли с неблагоприятным прогнозом	BB, BO	I
VSV-GP (BI 1821736)	NCT05839600	Солидные опухоли с неблагоприятным прогнозом	BB	I
VSV (OVV-00)	NCT07307053	Редкие солидные опухоли	BB	I/II
VSV-02	NCT07260591	Запущенные солидные опухоли	BB, BO	I
VSV-hIFN β -NIS	NCT06508463	Периферическая Т-клеточная лимфома	BB	I

BB – внутривенный путь введения, BO – внутриопухолевый путь введения.

Терапевтические стратегии на основе ОВ включают в себя как монотерапию, так и их комбинации с традиционной и иммунотерапией. За последние годы количество клинических исследований выросло, и ожидается, что эта тенденция сохранится. Кроме того, предварительные данные прогнозируют, что в ближайшем будущем ОВ, вероятно, станут неотъемлемой частью иммунотерапии рака. Большинство клинических исследований, основанных на VSV, являются комбинированной терапией, и наиболее распространенными методами лечения в сочетании с ОВ являются ICI.

Было завершено только одно исследование на основе VSV (NCT02923466). Его основная цель заключалась в определении профиля безопасности после внутриопухолевого или внутривенного введения однократной дозы VSV-IFN β -NIS или комбинированной внутриопухолевой инъекции VSV-IFN β -NIS с последующим системным введением авелумаба каждые две недели у пациентов с рефрактерными распространенными/метастатическими солидными опухолями. Авелумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1 и предотвращает его взаимодействие с рецептором PD-1. Несмотря на то, что он одобрен в ряде стран в качестве монотерапии, важно отметить, что высокие уровни экспрессии PD-L1 были обнаружены вокруг первичной опухоли, но не в отдаленных метастазах, что привело к резистентности к этой иммунотерапии [269, 270]. VSV-IFN β -NIS в настоящее время находится в фазе I/II исследования (NCT03647163) в комбинации с пембролизумабом (анти-PD-1 антителом) у пациентов с немелкоклеточным раком легкого и раком головы и шеи, а также в комбинации с ипилимумабом/ниволумабом у пациентов с рецидивирующими или рефрактерными нейроэндокринными опухолями. Текущие данные свидетельствуют о том, что инъекции VSV-IFN β -NIS в дозах до $1,7 \times 10^{11}$ TCID₅₀ безопасны и, вероятно, более эффективны. VSV-hIFN β -NIS также тестируется в комбинации с циклофосфамидом и ипилимумабом у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой, острым миелоидным лейкозом или лимфомой (NCT03017820). Циклофосфамид представляет собой химиотерапевтический препарат, который оказывает свое действие посредством алкилирования ДНК, в то время как ипилимумаб представляет собой гуманизированное моноклональное анти-CTLA-4 антитело, одобренное Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых

продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) в 2011 году, увеличивающее эффект противоопухолевой терапии [272, 273]. VSV-IFN β -NIS также находится в исследовании II фазы (NCT04291105) в комбинации с цемиплимабом (анти-PD-1 антитело) у пациентов с колоректальной карциномой, карциномой головы и шеи, а также меланомой. Согласно дизайну исследования, VSV-IFN β -NIS будет вводиться внутриопухолево в 1-й день и каждые 3 недели до тех пор, пока наблюдается клинический эффект, в то время как цемиплимаб будет вводиться внутривенно. Другие VSV с аналогичными вставками также изучаются на предмет их противораковых преимуществ (NCT03120624, NCT02923466), но в настоящее время они находятся в фазе I, как и VSV, используемый в комбинации с ингибитором PD-1 (торипалимабом) у пациентов с распространенными злокачественными солидными опухолями (NCT05644509).

VSV-IFN β TYRP1, который экспрессирует человеческие IFN и TYRP1, секретирующиеся в основном меланоцитами и опухолевыми клетками меланомы, может вызывать сильный иммунный ответ, направленный на клетки опухоли. Этот ОБ тестируется путем внутривенных и внутриопухолевых инъекций у пациентов с ранее леченной метастатической меланомой (NCT03865212). В исследовании I фазы изучаются побочные эффекты и оптимальная доза VSV-IFN β TYRP1, а также собираются предварительные данные о частоте ответа на терапию и времени выживаемости без продолжения терапии VSV-IFN β TYRP1 среди пациентов. VSV-IFN-beta протестирован в I фазе исследования (NCT01628640) против рефрактерного рака печени или солидных опухолей с поражениями, которые распространились на другие части тела и не поддавались лечению. Одной из целей является оценка частоты ответа опухоли, частоты инъецируемых поражений и некроза отдаленных поражений, а также общей выживаемости. VSV-GP128, который несет гликопротеин оболочки висцерального ненейротропного штамма WE-HPI вируса LCMV, является составной частью режима прайм-буста вместе с ATR128 (NCT04046445) в исследовании I фазы у пациентов с колоректальным раком IV стадии.

Существует недавнее исследование, где вирусолог в эксперименте, проводимом над собой, использовал многократные инъекции ОБ (в том числе и VSV) [274]. В работе продемонстрирован переход от прогрессирования местно-рецидивирующего мышечно-инвазивного рака молочной железы к неинвазивной резекции опухоли. Внутриопухолевая вирусная терапия хорошо переносилась, а удаленная через 2 месяца опухоль показала сильную лимфоцитарную инфильтрацию с увеличением количества CD20+ В-клеток, CD8+ Т-клеток и макрофагов. Хотя данный случай и является единичным, он побуждает к рассмотрению VSV в качестве перспективного терапевтического агента.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и приборы

2.1.1. Питательные среды и растворы

LB: 1 % бакто-триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1% NaCl.

LB-агар: 1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% бакто-агар.

SOC: 2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 20 мМ глюкоза, pH 7,0.

1x TAE: 40 мМ Tris-HCl, 40 мМ уксусная кислота, 2 мМ ЭДТА, pH 8.0.

PBS: 2,7 мМ KCl, 2 мМ K₂HPO₄, 137 мМ NaCl, 10 мМ Na₂HPO₄, pH 7.2-7.5.

DMEM: неорганические соли, витамины, аминокислоты, глюкоза 4,5 г/л, феноловый красный, pH 7,5-8,1.

RPMI-1640: неорганические соли, витамины, аминокислоты, глюкоза 2 г/л, феноловый красный, pH 7,0-7,6.

Растворы для электрофореза по Лэммли и вестерн-блоттинга:

4% концентрирующий гель: 4% акриламид, 0,125 М Tris-HCl, SDS 0,1%, pH 6.8.

12% разделяющий гель: 12-17% акриламид, 0,375 М Tris-HCl, SDS 0,1%, pH 8.8.

10x буферный раствор для переноса: 48мМ Tris, 39 мМ глицин, pH 9.2.

TBS pH 7,4: 10 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 7.4.

Блокирующий раствор: TBS pH 7,4, 5% молоко.

2.1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды

В работе был использован штамм *E.coli* NEB® Stable (*F'* *proA*+*B*+ *lacIq* Δ (*lacZ*)*M15* *zzf*::*Tn10* (*TetR*)/ Δ (*ara-leu*) 7697 *araD139 fhuA* Δ *lacX74 galK16 galE15 e14-* Φ 80*dlacZ* Δ *M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL* (*StrR*) *rph spoT1* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrB*).

Векторы для сборки целевых конструкций и для получения rVSV-mIL12-mGMCSF, используемые в работе, представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Используемые векторы

Название вектора	Гены	Размер, п.о.	Описание
pAG110-mIL12	<i>AmpR, mIL12</i>	4536	Содержит последовательность гена белка mIL12.
pAG110-mGMCSF	<i>AmpR, mGMCSF</i>	3327	Содержит последовательность гена mGMCSF репортерного белка Katushka2S и TurboRFP под конститутивными промоторами <i>gpsL</i> и <i>gapdh</i> . Используется для оценки эффективности трансформации штаммов <i>Streptomyces</i> .
pVSV-dM51-GFP	<i>AmpR, gfp</i>	15027	Содержит гены структурных белков VSV и репортерного белка GFP.
pCAG-T7pol	<i>AmpR, T7pol</i>	7452	Содержит ген T7 полимеразы под сильным синтетическим промотором CAG.
pCAG-VSVP	<i>AmpR, P</i>	5598	Содержит ген P белка VSV под сильным синтетическим промотором CAG.
pCAG-VSVL	<i>AmpR, L</i>	11130	Содержит ген L белка VSV под сильным синтетическим промотором CAG.
pCAG-VSVN	<i>AmpR, N</i>	6069	Содержит ген N белка VSV под сильным синтетическим промотором CAG.
pCAG-VSVG	<i>AmpR, G</i>	6336	Содержит ген G белка VSV под сильным синтетическим промотором CAG.
pVSV-dM51-mIL12-mGMCSF	<i>AmpR, mIL12-mGMCSF</i>	16240	Содержит гены структурных белков VSV и слитого белка mIL12-mGMCSF.

2.1.3. Принадлежности

Для выделения плазмидной ДНК использовали наборы Plasmid Miniprep или Plasmid Midiprep 3.0 (Евроген, Россия). Для выделения фрагментов ДНК использовался набор Cleanup Standard (Евроген, Россия). Для выделения РНК использовали реагент «Лира» (Биолабмикс, Россия).

2.1.4. Приборы

Для измерения оптической плотности ДНК и бактериальных клеток использовали спектрофотометр NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Амплификацию фрагментов ДНК проводили методом ПЦР с использованием амплификатора Thermal Cycler T100 (BioRad, США). Оптическую плотность в *in vitro* экспериментах с использованием эукариотических клеточных линий измеряли на мультипланшетном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия). В работе использовали центрифуги Eppendorf 5418R, 5910R (Eppendorf Geratebau, Германия), термостат Thermo-Shaker TS-100C (Biosan, Латвия), воздушные термостатированные шейкеры Innova 44 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, США), CO₂-инкубаторы Binder C 150 (Binder GmbH,

Германия), комплекты оборудования для электрофореза Gel Electrophoresis Cell Model 150 (Bio-Rad, США), источники постоянного тока BioRad PowerPac Basic (Bio-Rad, США), конфокальный микроскоп LSM 980 Airyscan на базе Axio Observer 7 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), электронный микроскоп Carl Zeiss CrossBeam 550 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

2.2. Методы генетической инженерии

2.2.1. Дизайн генетических конструкций и синтез генов

Был сделан дизайн генетической конструкции, кодирующей химерный ген, состоящий из фрагмента мышинного IL-12 и GMCSF (mIL12-mGMCSF). Для ее получения был заказан синтез последовательностей mIL12 и mGMCSF в коре плазмиды pAG110 (Евроген, Россия).

Таблица 2.2 – Нуклеотидные последовательности целевых генов

Название фрагмента	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Длина фрагмента, п.о.
mIL12	GGTCTCTATGGAGACAGACACCCTCCTGCTCTGGGTGCTCTTGCTCTGGGTC CCAGGCTCAACGGGGGCTGGCGGGAAGCCTTCTGGAGGCCGGGTAATTCC AGTGTCTGGGCCGGCCCGTGTCTGAGCCAAAGCCGGAATCTACTGAAGAC TACAGATGACATGGTGAACCCGCGAGAGAAAACTAAAACACTACTCAT GCACGGCAGAAGACATTGACCATGAGGATATTACCAGGGACCAAACATCC ACCCTCAAAACATGTCTTCCGCTTGAAGTGCATAAAAATGAGAGTTGCCTG GCCACCCGGGAGACTTCCCTCCACAACCTAGAGGCTCCTGCTTGCCTCCTCAG AAGACATCTCTGATGATGACTCTCTGTCTGGGCTCCATTTATGAAGACCTTA AAATGTACCAGACAGAGTTTCAGGCCATCAATGCTGCGCTCCAGAACCATA ACCACCAGCAGATTATACTAGATAAGGGCATGCTGGTGGCCATTGATGAGC TCATGCAGAGTCTGAATCACAATGGTGAACCCCTCAGGCAGAAGCCTCCGG TAGGGGAGGCAGACCCCTATCGCGTGAAGATGAAGCTGTGCATCCTCCTCC ATGCCTTCTCCACCCGTGTGGTCACAATCAACAGGGTGTGATGGGCTACCTGT CATCTGGCGGAGGTGGGTCTGGTGGGGCGGATCAGGAGGTGGGGGTAGC ATGTGGAGTTAGAGAAAGATGTTTATGTGTTGGAGGTGGACTGGACACC AGATGCTCCCGAGAGACTGTAACCTGACTTGTGACACTCCAGAGGAAG ATGATATTACCTGGACTAGCGACCAAAGGCATGGTGTGCATCGGCAGCGGA AAAACATTAACCATCACCGTTAAAGAATTTCTGGACGCAGGCCAATATAACC TGCCACAAGGGAGGAGAGACGTTGTGCACTCTCACCTGCTCCTTCATAAG AAGGAGAATGGAATCTGGTCAACGGAGATCCTGAAGAACTTCAAGAACAA AACCTTCTGAAATGTGAGGCCCCCACTATTCAGGCCGCTTTACCTGCTC GTGGCTGGTTCAAAGAAACATGGACTTGAATTTAACATTAAGTCCAGTAG TAGCTCCCCTGACAGCAGAGCAGTCACCTGTGGGATGGCATCATTATCTGC TGAAAAGGTGACTCTGGATCAGCGTACTACGAGAAGTACAGTGTCTCTTG CCAGGAGGACGTGACTTGTCCAACGGCTGAGGAAACCCTCCCCATAGAAGT TGCTTTGGAAGCACGACAACAGAACAAGTATGAAAACACTACAGCACAAGTT TCTTTATAAGAGACATCATCAAGCCAGATCCTCCAAAAAATCTTCAGATGA AACCCCTGAAGAACAGCCAGGTAGAAGTGAGCTGGGAATATCCTGATAGC TGGAGACCCCTCACTCCTACTTCTCTTAAATTCTTCGTTTCGAATCCAGC GGAAGAAAGAGAAGATGAAGGAAACAGAAGAGGGCTGCAACCAGAAAGG GGCCTTTTTGGTGGAGAAAACGAGTACAGAAGTTCAGTGCAAGGGTGGCA ATGTCTGTGTGACAGGCTCAGGATAGGTAACAACCTCCTCATGCAGTAAGT GGGCTGTGTCCCTGTAGAGTTAGGAGCTAATAGAGAGACC	1664
mGMCSF	GGTCTCTATGGAGACTGACACACTTCTACTATGGGTGCTTTTACTCTGGGTC CCTGGTTCTACAGGAGCTCCTACTCGCTCACCCATCACTGTTACAAGGCCCT GGAAGCACGTGGAGGCCATCAAGGAGGCTCTCAACCTGCTGGATGACATG CCTGTACGCTGAATGAAGAAGTGAAGTAGTTAGTAATGAGTTTTCTCCTC AAGAAGCTCACCTGTGTGCAGACAAGATTGAAAATATTTGAGCAAGGCTTG CGGGGCAACTCACGAACTGAAAGGAGCGCTGAACATGACTGCCAGTA TTACCAGACCTACTGCCCCCACTCCAGAAACAGACTGTGAGACACAGGT GACCACCTATGCAGACTTCATTGATAGCCTGAAAACCTTCTGACAGATAT TCCGTTTGAATGCAAGAAACCAGGGCAGAAGGCATAATAGAGAGACC	455

2.2.2. Полимеразная цепная реакция

Получение фрагментов генов, используемых в данной работе, проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Также метод ПЦР использовали для анализа экспрессии генов клеток после заражения вирусом.

Аmplификация генов для получения слитой молекулы mIL12-mGMCSF была проведена с помощью ПЦР в объеме 50 мкл. Фрагменты ДНК были амплифицированы с помощью фьюжн ДНК-полимеразы (Pfu-Sso7d) (Биолабмикс, Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя фермента, представленными в Таблицах 2.3 и 2.4.

Таблица 2.3 – Условия для проведения ПЦР

Компонент	Количество
5x реакционный буфер для Фьюжн ДНКполимеразы	10 мкл
Прямой и обратный праймеры 2 мкМ	По 5 мкл
Образец ДНК	20 нг
50x смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP)	1 мкл
Фьюжн ДНК-полимераза, 2 е.а./мкл	1 мкл
Деионизированная вода	до 50 мкл

Таблица 2.4 – Протокол проведения ПЦР

Стадия	Температура и время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95-98°C, 120 сек	1 цикл
Денатурация	95°C, 10 сек	25 циклов
Отжиг праймеров	60°C, 30 сек	
Элонгация	72°C, 60 сек	
Финальная элонгация	72°C, 300 сек	1 цикл

Праймеры для создания генетической конструкции pVSV-dM51-mIL12-mGMCSF представлены в Таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Праймеры для генетической конструкции pVSV-dM51-mIL12-mGMCSF

Название	Последовательность 5'-3'
mIL12_Nhe_f	CAGTAAGCTAGCGACATGGAGACAGACACCCCTCCTGC
mIL12_link_r	CCACCTCCAGAACCACCTCCTCCGCTCCTAACTCTACAGGGGAC
mGMCSF_link_f	GGTGGTTCTGGAGGTGGTGGTTCGGCTCCTACTCGCTCACCCATCAC
mGMCSF_Avr_r	CAGTAACCTAGGTTATGCCTTCTGCCCTGGTTTCTT
mIL12_seq1f	CAGAGTCTGAATCACAATGGTG
mIL12_seq2f	CTGACAGCAGAGCAGTCACCTGT
mIL12_seq3f	CATCAAGGAGGCTCTCAACCTGC
G_end_seqf	CATTCAAGACGCTGCTTCGCAAC
L_start_seqr	CAATATCATCACTAATTAGAGG

2.2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Анализ размера амплифицированных фрагментов ДНК проводили методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с использованием источника питания Bio-Rad при напряжении 100 В. Агарозу растворяли в 1× ТАЕ, перед полимеризацией геля в раствор добавляли бромистый этидий до конечной концентрации 1,5 мкг/мл. К образцам перед нанесением на гель добавляли 4× буфер для нанесения ДНК на гель «БиК» (Биолабмикс, Россия). В качестве электродного буфера использовали 1× ТАЕ. После электрофореза ДНК в геле анализировали в ближнем ультрафиолетовом свете (356 нм).

2.2.4. Очистка фрагментов ДНК и выделение плазмидной ДНК

Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля проводили электрофорез в геле 1%-ной агарозы. После окрашивания бромистым этидием гель анализировали в ближнем ультрафиолетовом свете (356 нм). Вырезали зоны геля, содержащие целевые фрагменты. Экстракцию образца из геля проводили с использованием набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Для выделения фрагментов ДНК из реакционной смеси также использовали набор Cleanup Standard (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Получение и очистку плазмидного вектора проводили из ночной культуры клеток *E. coli*, содержащих целевую конструкцию, с помощью наборов Plasmid Miniprep или Plasmid Midiprep 3.0 (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

2.2.5. Сборка ДНК методом рестрикции-лигирования

Рестрикцию ПЦР-ампликона mIL12-mGMCSF и коровой плазмиды pVSV-dM51-GFP проводили с помощью эндонуклеаз рестрикции NheI (AsuNHI) и AvrII (AspA2I) в SE-буфере Y (Сибэнзим, Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя в течении 2 часов при 37°C. По истечению времени проводили электрофорез в 1,5%-ном агарозном геле при 90 В 90 минут.

После проведения электрофореза фрагменты ДНК целевого размера вырезали из геля для последующей очистки с использованием набора Cleanup Standard (Евроген, Россия).

Концентрацию полученных фрагментов ДНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США).

При приготовлении реакционной смеси для лигирования использовали соотношение вектор:вставка 1:3. Реакцию лигирования провели с использованием T4-лигазы (NEB, США) в течение ночи при +4 °С.

2.2.6. Трансформация клеток *E. coli* с помощью метода теплового шока и ПЦР-скрининг колоний

К аликвоте компетентных клеток *E. coli* добавляли полный объем лигазной смеси, после чего суспензию клеток оставляли на льду в течение 30 минут. Температурный шок проводили при 42°C в течение 1 минуты. После охлаждения во льду в течение 5 минут клетки ресуспендировали в 1 мл среды SOC. После инкубации при 37°C в течение часа клеточную суспензию переносили на чашки с твердой средой LB и антибиотиками для селекции. Культивирование проводили при 30°C в течение ночи.

Выросшие колонии были отобраны и ресуспендированы в 20 мкл среды LB и одновременно инокулированы в 25 мкл готовой смеси для ПЦР, содержащей специфические для вставки праймеры и 5× ScreenMix (Евроген, Россия). Условия и режим ПЦР были выбраны в соответствии с протоколом производителя и представлены в Таблицах 2.6 и 2.7. Молекулярный вес ПЦР-продуктов был определен электрофоретически в 1% агарозном геле вместе с ДНК-маркером молекулярного веса SkyHigh (Биолабмикс, Россия).

Таблица 2.6 – Условия для проведения ПЦР

Компонент	Количество
5× ScreenMix	5 мкл
Прямой и обратный праймеры 2 мкМ	По 5 мкл
Образец ДНК	Переменное*
деионизированная вода	до 25 мкл

* - На кончике одноразового наконечника пипетки.

Таблица 2.7 – Протокол проведения ПЦР

Стадия	Температура и время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95°C, 300 сек	1 цикл
Денатурация	95°C, 30 сек	30 циклов
Отжиг праймеров	60°C, 30 сек	
Элонгация	72°C, 130 сек	
Финальная элонгация	72°C, 300 сек	1 цикл

2.2.7. Получение плазмидной ДНК

Клоны *E. coli*, содержащие целевую плазмиду, инокулировали в 10 мл LB среды с антибиотиком, являющимся маркером селективности для выбранной плазмиды. После культивирования в орбитальном шейкере New Brunswick™ Innova® 44 (Eppendorf, Германия) при 200 об/мин и 30°C в течение ночи плазмидный вектор выделяли и очищали с помощью наборов Plasmid Miniprep или Plasmid Midiprep 3.0 (Евроген, Россия) в соответствии с задачами исследования и согласно протоколу производителя. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США).

Полученные после ПЦР-скрининга нуклеотидные последовательности проверяли рестрикционным анализом, после чего передавали на секвенирование в ресурсный центр генетической инженерии АНО ВО «Университет Сириус» (Сочи, Россия). Клоны *E. coli* с корректно верифицированными плазмидами были заморожены в среде с 30%-ным содержанием глицерина при -80°C.

2.2.8. Выделение РНК и обратная транскрипция

Выделение РНК проводили с использованием реагента «Лири» (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США). кДНК была получена по матрице РНК с использованием БиоМастер RNAscribe RT Plus (5×) (Биолабмикс, Россия) согласно протоколу производителя (Таблицы 2.8 и 2.9).

Таблица 2.8 – Условия для проведения ПЦР

Компонент	Количество
БиоМастер RNAscribe RT Plus (5×)	5 мкл
Образец РНК	1 мкг
деионизированная вода	до 20 мкл

Таблица 2.9 – Протокол проведения ПЦР

Стадия	Температура и время	Количество циклов
Отжиг праймеров	25°C, 120 сек	1 цикл
Элонгация	55°C, 600 сек	1 цикл
Инактивация	95°C, 60 сек	1 цикл

2.2.9. Количественная ПЦР для оценки изменения уровня экспрессии генов

Количественная ПЦР (кПЦР) была проведена с использованием HS-qPCR SYBR Blue буфера (Биолабмикс, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя (Таблицы 2.10 и 2.11) на приборе StepOnePlus с использованием ПО StepOne Software (Thermo Fisher Scientific, США). Для выполнения протокола были использованы следующие праймеры (Таблица 2.12).

Таблица 2.10 – Условия для проведения ПЦР

Компонент	Количество
БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)	5 мкл
Прямой и обратный праймеры 2 мкМ	По 5 мкл
Образец кДНК	5 мкл
деионизированная вода	до 25 мкл

Таблица 2.11 – Протокол проведения ПЦР

Стадия	Температура и время	Количество циклов
Денатурация	95°C, 300 сек	1 цикл
Денатурация	95°C, 20 сек	40 циклов
Отжиг праймеров	65°C, 30 сек	
Элонгация	72°C, 40 сек	
Денатурация	95°C, 15 сек	1 цикл
Отжиг	65°C, 60 сек	1 цикл
Денатурация	95°C, 15 сек	1 цикл

Таблица 2.12 – Праймеры для проведения кПЦР

Ген	Направл.	Последовательность (5' - 3')
<i>GAPDH</i>	Forward:	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	Reverse:	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
<i>IFIT1</i>	Forward:	TACAGGCTGGAGTGTGCTGAGA
	Reverse:	CTCCACTTTCAGAGCCTTCGCA
<i>RIG-I</i>	Forward:	AGCCAAGGATGTCTCCGAGGAA
	Reverse:	ACACTGAGCACGCTTTGTGGAC
<i>N-кадгерин</i>	Forward:	TGAAACGGCGGGATAAAGAG
	Reverse:	GGCTCCACAGTATCTGGTTG
<i>p53</i>	Forward:	CACAGCACATGACGGAGGTC
	Reverse:	TCCTTCCACCCGGATAAGATG
<i>IFN-β1</i>	Forward:	CAGCACTGGGTGGAATGAGA
	Reverse:	GTGGAGAGCAGTTGAGGACA
<i>IFN-γ</i>	Forward:	CAGCAACAGCAAGGCGAAAAGG
	Reverse:	TTTCCGCTTCCTGAGGCTGGAT
<i>IL-1β</i>	Forward:	TGGACCTTCCAGGATGAGGACA
	Reverse:	GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG
<i>E-кадгерин</i>	Forward:	GGTTTCTACAGCATCACCG
	Reverse:	GCTTCCCCATTTGATGACAC
<i>SMAC</i>	Forward:	TGGAGACCACTTGGATGACAGC
	Reverse:	GATTCCTGGCAGTTATGGAGGC
<i>GSDME</i>	Forward:	ACGGACACCAATGTAGTGCTGG
	Reverse:	CTCTCATGCTCGAAGCCACCAT

2.3. Методы клеточной биологии

2.3.1. Клеточные линии

Клеточные линии HEK293TN, ВНК-21, В16-F10 были получены из ATCC (Манассас, США). Клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в среде DMEM с 10% содержанием фетальной бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS).

Клеточная линия LL/2 была получена из ECACC (Солсбери, Великобритания). Клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в среде DMEM с 10% содержанием FBS.

Клеточная линия SCC VII была получена из НМИЦ онкологии им Н.Н.Блохина. Клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в среде DMEM с 10% содержанием FBS.

Репортерная клеточная линия HEK-Blue™ IL-12 была получена из InvivoGen (Сан-Диего, США). Клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в среде DMEM с 10% содержанием FBS.

Клеточная линия H22 была получена из ИБХ РАН. Клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в среде RPMI-1640 с 10% содержанием FBS.

Клеточная линия CT26.WT была получена из ИБХ РАН. Клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в среде RPMI-1640 с 10% содержанием FBS.

Первичная клеточная линия мезенхимальных стволовых клеток мыши (mouse mesenchymal stem cells, mMSC) костного мозга была получена из АНО ВО «Университет Сириус» (Сочи, Россия). Клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в среде DMEM с 10% содержанием FBS.

Пассирование клеточных линий проводили каждые 3-4 дня при достижении конfluence 70-80%. Раствор 0,25% трипсина (ПанЭко, Россия) был использован для снятия клеток с поверхности культурального пластика, инактивацию раствора трипсина проводили добавлением избытка полной питательной среды. В качестве красителя для определения жизнеспособности использовали трипановый синий (ПанЭко, Россия).

2.3.2. Получение вируса и его последующая наработка

Вирусы rVSV-GFP (rVSV-dM51-GFP) и rVSV-wtM-GFP были любезно предоставлены сотрудниками направления «Генная терапия» АНО ВО «Университет Сириус» (Сочи, Россия).

rVSV-mIL12-mGMCSF был получен путем котрансфекции клеток HEK293TN. Выращенные до 70-80% конфлюэнтности клетки HEK293TN были трансфицированы плазмидами pCAG-T7pol, pCAG-VSVP, pCAG-VSVL, pCAG-VSVN, pCAG-VSVG и pVSV-dM51-mIL12-mGMCSF в соотношении 5:5:1:3:4:5 с полиэтиленимином (polyethylenimine, PEI). Через 12 часов среду меняли на свежую DMEM с 5% FBS, после чего клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂. Через 96 часов супернатант собирали, фильтровали с помощью шприцевого фильтра с размером пор 0,45 мкм и использовали для заражения клеток ВНК-21. Клетки ВНК-21, выращенные до 70-80% конфлюэнтности, были инфицированы 500 мкл супернатанта rVSV-mIL12-mGMCSF. Надосадочные жидкости собирали через 72 часа, центрифугировали при 3000 × g в течение 10 мин при 4 °C и фильтровали с помощью шприцевого фильтра с размером пор 0,45 мкм. Полученные супернатанты были использованы в последующих экспериментах.

2.3.3. Определение вирусного титра методом TCID₅₀

10 000 клеток ВНК-21 инокулировали в 96-луночный планшет, через 24 часа в лунки добавляли растворы последовательных разведений вируса в 6 повторах для каждого разведения. Через 72 часа была проведена микроскопия для определения цитопатического эффекта (ЦПЭ). Конечные титры (TCID₅₀/мл) были получены с использованием формулы Рида-Менча. Каждый вновь полученный вирусный препарат был проанализирован для определения вирусного титра.

2.3.4. Получение моноклона вируса VSV из бляшки

800 000 клеток ВНК-21 инокулировали в 6-луночный планшет, через 24 часа в лунки добавляли растворы разведений вируса в 2 повторностях для каждого разведения в 1 мл среды DMEM без содержания FBS. Планшет с клетками, зараженными вирусом, инкубировали 1 час при 37°C в 5% атмосфере CO₂. После завершения инкубации из каждой лунки планшета отбирали культуральную жидкость и добавляли по 2 мл среды DMEM с содержанием 2% FBS и 0,5% легкоплавкой агарозы, после чего культивировали планшет 24 часа (или более) при 37°C в 5% атмосфере CO₂ до появления отдельных бляшек.

После появления бляшек в лунке проводили отбор вирусного клона, который ресуспендировали в 1 мл среды DMEM без содержания FBS. Эту суспензию наносили на

предварительно подготовленные 800 000 клеток ВНК-21 в 6-луночной планшете для культивирования в течение 72 часов (до появления ЦПЭ) при 37°C в 5% атмосфере CO₂.

2.3.5. Электронная микроскопия

Обнаружение вирусных частиц в супернатантах проводили методом просвечивающей электронной микроскопии в ресурсном центре биоматериалов АНО ВО «Университет Сириус» (Сочи, Россия).

Вирусный образец наносили на обработанные плазмой воздуха медные сетки formvar/carbon (200 mesh) (EMCN, Китай), инкубировали в течение 2 минут, после чего сетку промывали бидистиллированной водой и контрастировали 1% раствором уранилацетата в течение 1 минуты. Полученные сетки с образцом были высушены на воздухе при комнатной температуре. Съемку проводили на просвечивающем электронном микроскопе Carl Zeiss CrossBeam 550 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) при ускоряющем напряжении 30 кВ.

2.3.6. Проведение вестерн-блоттинга

Для проведения вестерн-блоттинга предварительно проводили вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. Составы концентрирующего и разделяющего гелей приведены в Таблицах 2.13 и 2.14. Равные объемы супернатантов, собранных после заражения клеток rVSV, наносили в карманы концентрирующего геля. Методом полусухого переноса белки из геля переносили на мембрану PVDF толщиной 0,45 мкм (Cytiva Amersham, Великобритания) на приборе Trans-Blot Turbo (Bio-rad, США). Использовали кроличьи антитела к белку G VSV (1:1000, ab83196, Abcam, США) и конъюгированный с пероксидазой хрена (horseradish peroxidase, HRP) анти-крысиный IgG (1:5000, кат. № AS028, ABclonal, Ухань, Китай), в качестве субстрата использовали SuperSignal West Pico Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Сигнал хемилюминисценции определяли с помощью системы обнаружения ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Таблица 2.13. Состав концентрирующего геля

Компонент	Объем, мл
Дистиллированная вода	1,64 мл
30% акриламид/бис-акриламид	1,32 мл
10% SDS	0,04 мл
1,5 М Tris-HCl, pH 6,8	1 мл
10% APS	20 мкл
TEMED	2 мкл

Таблица 2.14. Состав Разделяющего геля

Компонент	Объем, мл
Дистиллированная вода	3,28 мл
30% акриламид/бис-акриламид	2,64 мл
10% SDS	0,08 мл
1,5 М Tris-HCl, pH 8,8	2 мл
10% APS	40 мкл
TEMED	4 мкл

2.3.7. Определение экспрессии mIL12 и mGMCSF в супернатантах после заражения rVSV-mIL12-mGMCSF

В качестве образцов были использованы очищенные от клеточного дебриса супернатанты клеток ВНК-21 спустя 96 часов после заражения rVSV-mIL12-mGMCSF.

Наличие функционального mIL12 проверяли с использованием репортерной клеточной линии НЕК-Blue™ IL-12 (InvivoGen, Франция), стабильно экспрессирующей рецептор IL-12 и гены сигнального пути IL-12, а также репортерный ген щелочной фосфатазы, индуцируемый фактором транскрипции STAT4. Связывание IL-12 с IL-12R на поверхности клеток IL-12 НЕК-Blue™ запускает сигнальный каскад, ведущий к активации STAT-4 с последующей продукцией щелочной фосфатазы. Измерение оптической плотности при 620 нм проводили на приборе ClarioStar (BMG Labtech, Германия). Статистический анализ проводился с использованием однофакторного ANOVA-анализа и теста множественного сравнения Сидака в ПО GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., США).

Наличие mGMCSF было подтверждено при помощи ИФА набора mGMCSF ELISA Kit (EM0089, FineTest, Ухань, Китай) по протоколу производителя. Измерение оптической плотности при 450 нм проводили на приборе ClarioStar (BMG Labtech, Германия). Статистический анализ проводился с использованием однофакторного ANOVA-анализа в ПО GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., США).

2.3.8. Заражение клеточных линий и прижизненная визуализация

Для оценки кинетики вируса методом прижизненной визуализации $1,5 \times 10^6$ клеток линий B16-F10 и LL/2 были инфицированы rVSV-GFP в дозах 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 TCID50. Флуоресценцию GFP, возникающую из-за репликации вируса, измеряли каждые 2 часа в течение 48 часов с использованием системы визуализации и анализа живых клеток Incucyte S3 (Sartorius, Германия). Флуоресценцию GFP анализировали как общую площадь зеленых объектов ($\text{мкм}^2/\text{изображение}$). Данные, полученные с помощью ПО Incucyte, были проиллюстрированы с помощью ПО GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., США).

2.3.9. Заражение клеточных линий и последующая проточная цитометрия

Для оценки различий ЦПЭ вирусных препаратов на разных клеточных линиях 150 000 клеток были инфицированы вирусами в дозе 1×10^6 TCID50, спустя 24 часа культивирования при 37°C в 5% атмосфере CO_2 клетки были трипсинизированы, отмыты и ресуспендированы в FACS буфере с йодидом пропидия (propidium iodide, PI) в соотношении 1:1000. Помимо клеточных популяций GFP+/-, PI+/-, анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (median fluorescence intensity, MFI). Проточная цитометрия была проведена на приборе CytoFLEX B2-R2-V0 (Beckman Coulter Life Sciences, США), стратегия гейтирования отражена на Рисунке 2.1. Статистический анализ данных проточной цитометрии проводился с использованием однофакторного ANOVA-анализа в ПО GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., США).

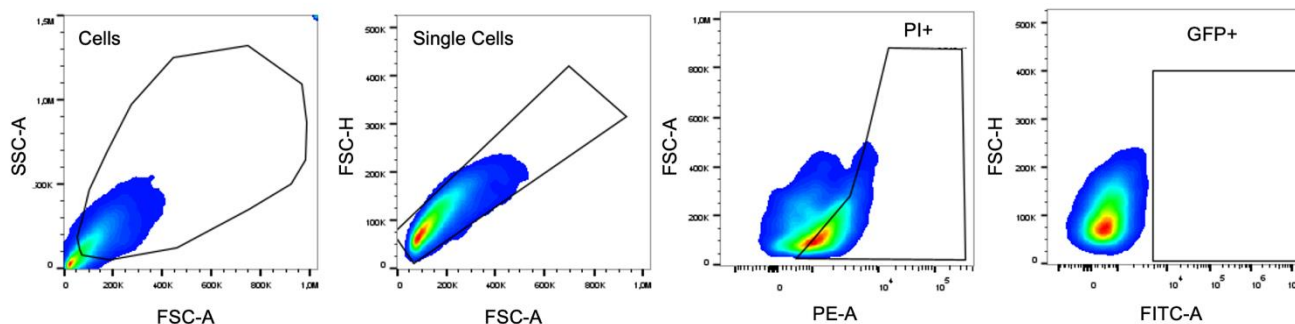


Рисунок 2.1 – Стратегия гейтирования

2.3.10. Заражение клеточных линий для оценки экспрессии генов

Для оценки экспрессии генов $1,5 \times 10^6$ клеток были инфицированы вирусами в дозе 1×10^6 TCID₅₀, спустя 12 часов культивирования при 37°C в 5% атмосфере CO₂ клетки были трипсинизированы, отмыты и использованы для выделения РНК. Статистический анализ данных проводился с использованием непарного t-теста в ПО GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., США).

2.3.11. Проточная цитометрия клеток опухолевого узла

Суспензию опухолевых клеток сначала инкубировали с блокирующими антителами к мышиным CD16/CD32 (мышиный BD Fc Block™) в течение 10 минут при комнатной температуре, чтобы исключить неспецифическое окрашивание клеток. После этого суспензию делили на аликвоты по 1×10^6 клеток и окрашивали соответствующей панелью антител в течение 10 минут и DAPI в течение 5 минут (PureBlu™ DAPI Nuclear Staining Dye, Bio-Rad) на льду в темноте. Обе панели включали конъюгированные антитела против панлейкоцитарного маркера CD45. Панель Т-клеток включала антитела против CD3, CD4, CD8 и CD44, панель миелоидных клеток - против F4/80, CD206, CD11b и CD11c. Из аликвотных суспензий опухолевых клеток с использованием специфических антител были также получены контрольные образцы для компенсации. Кроме того, были получены контрольные образцы с флуоресценцией минус один (fluorescence minus one, FMO) для точного определения клеток-мишеней. Все подробности, касающиеся антител, приведены в Таблице 2.15. После окрашивания клетки промывали FACS-буфером (PBS, 2 мМ ЭДТА) с использованием центрифугирования (4°C, 500 g, 7 минут) и фильтровали через клеточное сито с диаметром пор 40 мкм. Анализ клеточной популяции проводили с использованием программного обеспечения BD FACSAria III (BD Biosciences) и BD FACSDiva (BD Biosciences). Параметры BD FACSAria III были предварительно скорректированы в соответствии с контролем компенсации и FMO. Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo X 10.0.7r2 (FlowJo, LLC).

Стратегии выделения популяций клеток-мишеней с использованием панелей Т-клеток и миелоидных клеток показаны на Рисунках 2.2, 2.3 и 2.4. Клеточный дебрис и мертвые клетки были исключены на основании прямого и бокового рассеяния и окрашивания DAPI. Анализ целевых популяций в образцах проводился среди одиночных клеток, отобранных по параметрам FSC-H/FSC-A.

Таблица 2.15. Используемая панель антител

Маркер	Флуорофор	Разведение	Производитель	Каталожный номер	Целевая популяция	Панель
CD45	PerCP-Cy5.5	1:30	BioLegend	103132	Лейкоциты	Т-клетки и миелоидные клетки
CD3	APC	1:15		100236	Т-клетки	Т-клетки
CD4	AlexaFluor 488	1:30		100423	Хелперные Т-клетки	Т-клетки
CD8a	APC-Cy7	1:30		100713	Цитотоксические Т-клетки	Т-клетки
CD44	PE	1:30		103007	Активированные Т-клетки	Т-клетки
F4/80	PE	1:30		123110	Макрофаги	Миелоидные клетки
CD206	APC	1:15		141707	М2-подобные макрофаги	Миелоидные клетки
CD11b	AlexaFluor 488	1:30		101217	Макрофаги и дендритные клетки	Миелоидные клетки
CD11c	APC-Cy7	1:30		117324	Макрофаги и дендритные клетки	Миелоидные клетки

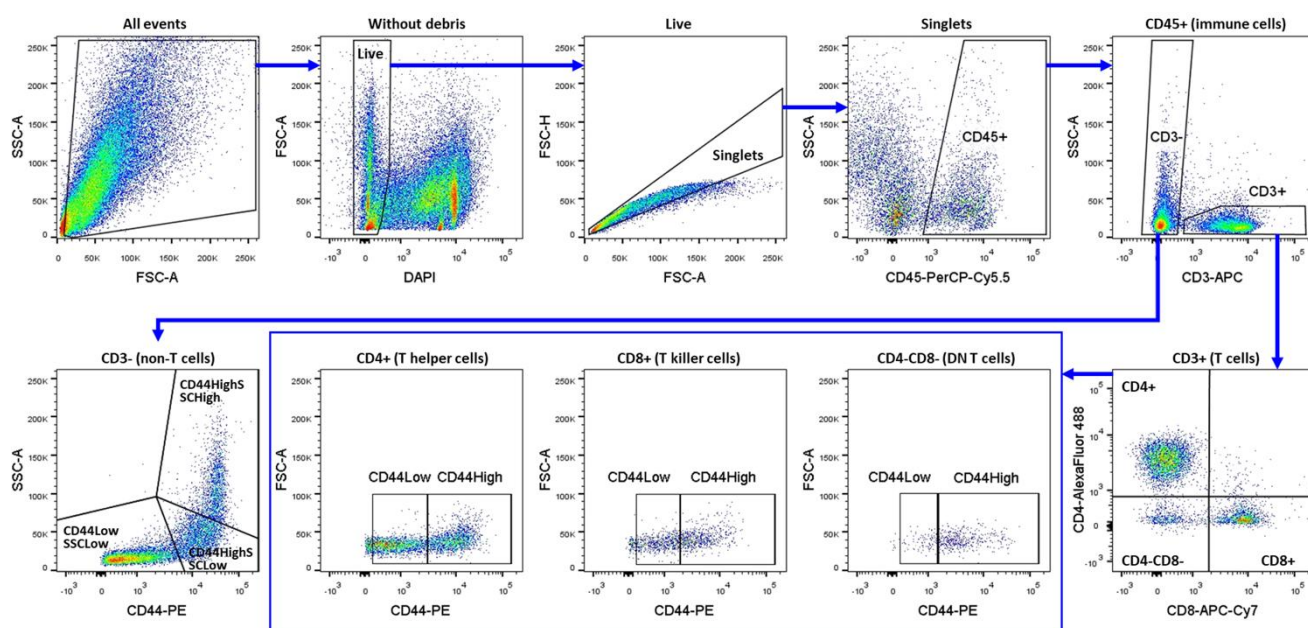


Рисунок 2.2 – Стратегия гейтирования для Т-клеточной панели

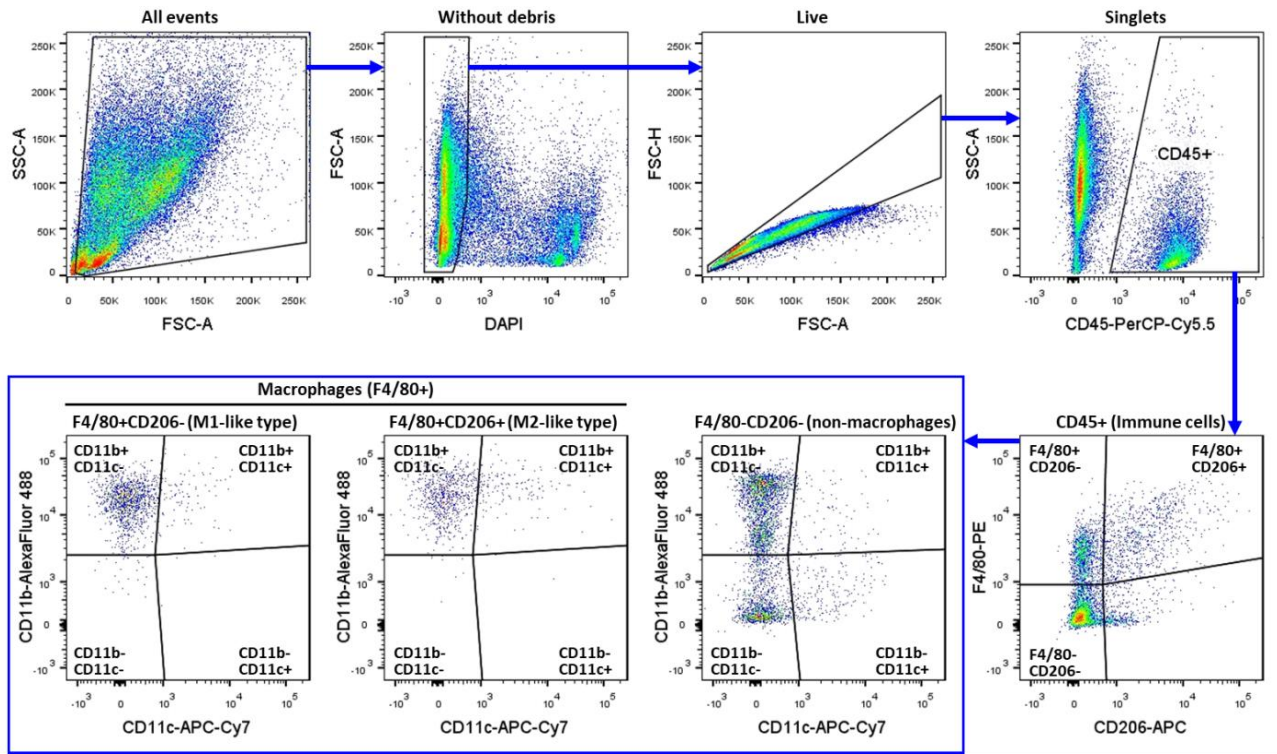


Рисунок 2.3 – Стратегия гейтирования для панели миелоидных клеток

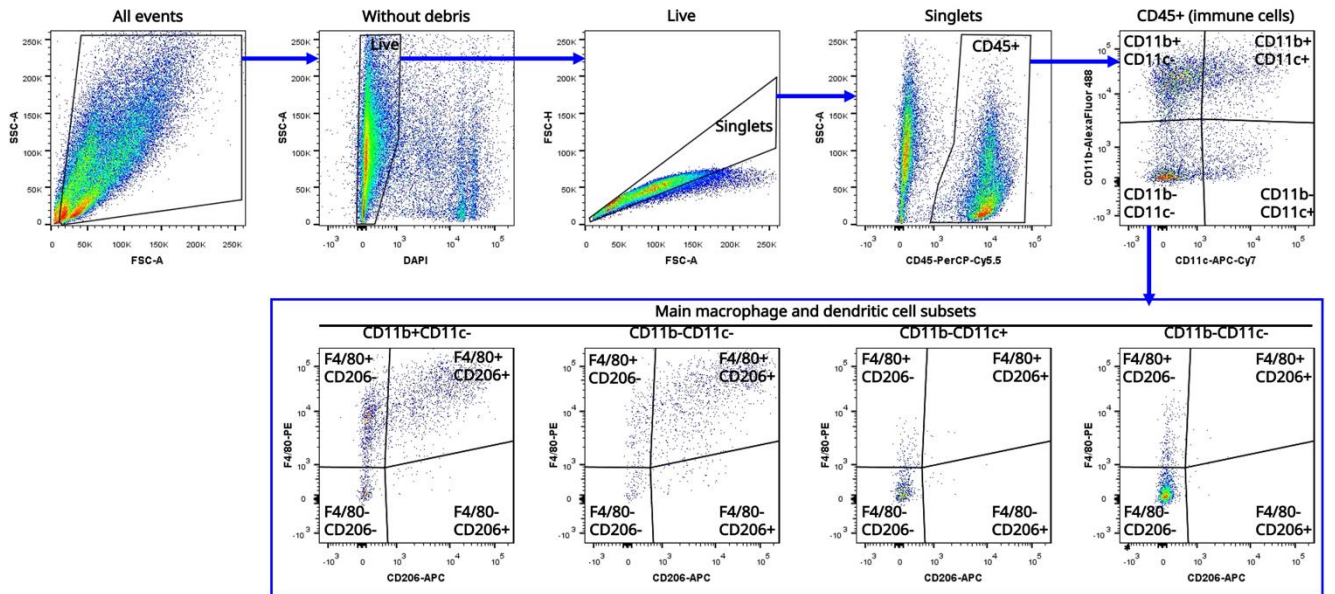


Рисунок 2.4 – Дополнительная стратегия гейтирования для панели миелоидных клеток

Статистический анализ данных проточной цитометрии проводился с однофакторного ANNOVA-анализа в ПО GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., США).

2.4. In vivo исследования

Эксперименты на животных проводились в соответствии с международными рекомендациями по уходу за экспериментальными животными. В зависимости от места проведения, эксперименты на животных были одобрены этическим комитетом АНО ВО «Университет Сириус» (Сочи, Россия) или комитетом по экспериментальным животным ИБХ РАН (Москва, Россия).

2.4.1. Сингенная модель меланомы B16-F10 и конфокальная микроскопия опухолевого узла B16-F10

Самцы мышей C57Bl/6 в возрасте не старше 12 недель были приобретены в питомнике SPF Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Все животные содержались в стандартных полипропиленовых клетках при контролируемой температуре ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), освещенности (12 часов по циклам «свет – темнота») и относительной влажности ($65 \pm 5\%$). Животные были обеспечены пищей и водой в неограниченном количестве.

1×10^6 клеток B16-F10 в 200 мкл PBS вводили подкожно в левый бок. Размеры опухоли измеряли каждые 2 дня с помощью штангенциркуля, после чего рассчитывали объем опухоли по формуле $\text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота} \times 0,52$. Когда средний объем опухоли достигал 500 мм^3 , мышам внутриопухолево вводили rVSV в дозе 1×10^6 TCID₅₀ или PBS дважды с интервалом в 3 дня. Индекс торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле $(V_c - V_t)/V_c \times 100$, где V_c – средний объем необработанных опухолей, а V_t – средний объем обработанных опухолей. Противоопухолевую эффективность лечения оценивали путем измерения размера опухоли и мониторинга выживаемости животных. Умиравших мышей умерщвляли путем шейной дислокации.

Были проведены два независимых эксперимента для оценки динамики роста опухоли и подбора терапевтической дозы используемых rVSVs. В первом эксперименте животные были разделены на группы PBS и rVSV-GFP в двух дозах. Во втором эксперименте животные были разделены на группы PBS, rVSV-GFP и rVSV-IL12-mGMCSF.

Во втором эксперименте для подтверждения персистенции rVSV-GFP в опухоли, у мыши с инокулированными B16-F10 клетками на 21 день после первой инъекции rVSV-GFP был удален опухолевый узел. Флуоресцентный сигнал GFP в опухоли детектировали с помощью

инвертированного точечного сканирующего конфокального микроскопа LSM 980 Airyscan на базе Axio Observer 7 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) с объективом 10× ECPlan-Neofluar (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Изображения были получены в режиме Airyscan. GFP был возбужден лазером с длиной волны 488 нм. Излучаемый свет пропускался через эмиссионный фильтр Airyscan (495-550 нм). Коэффициент усиления детектора был установлен на 850 В. Масштаб конфокального сканирования был установлен на 2×, а размер изображения - на 1045 × 1045 пикселей. Параметры изображения были установлены следующим образом: время выдержки пикселя - 1,96 мкс (скорость сканирования - 6); размер пикселя - $dx = dy = 0,39$ мкм. Необработанные изображения Airyscan были обработаны алгоритмом обработки Airyscan (уровень обработки 3.9). Изображения были получены с использованием ПО Zen Blue 3.2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Статистический анализ проводили с использованием ПО GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., США), а графическую визуализацию создавали с использованием Microsoft Excel (Microsoft, США). Статистическую значимость определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Кривые выживаемости мышей строили с помощью анализа Каплана-Мейера, p -value < 0,05 рассматривали как статистически значимый показатель.

2.4.2. Сингенная модель рака толстой кишки CT26.WT и анализ популяций иммунных клеток в опухолевом узле у мышей

Самки мышей BALB/c были получены из лаборатории разведения лабораторных животных (филиал Института биоорганической химии им. Шенякина-Овчинникова РАН, Пущино, Россия) и содержались в виварии ИБХ РАН (Москва, Россия). Животные имели доступ к пище и воде в неограниченном количестве.

4×10^5 жизнеспособных клеток CT26.WT в 100 мкл PBS вводили подкожно в правый бок мышей. Ширину, длину и высоту опухоли измеряли с помощью штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали по формуле $\text{ширина} \times \text{длина} \times \text{высота} \times 0,52$. Когда объем опухоли достигал 25 ± 7 мм³, мышам внутриопухолево вводили 100 мкл rVSV в дозе 1×10^6 TCID₅₀ или PBS трижды с интервалом в 3 дня. Индекс торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле $(V_c - V_t)/V_c \times 100$, где V_c – средний объем необработанных опухолей, а V_t – средний объем обработанных опухолей. Противоопухолевую эффективность лечения оценивали путем измерения размера опухоли и мониторинга выживаемости животных. Умиравших мышей умерщвляли путем шейной дислокации.

Были проведены два независимых эксперимента для оценки динамики роста опухоли. День инокуляции опухолевых клеток считался 0-м днем роста опухоли. Рост опухоли регистрировали в последующие дни роста опухоли в соответствии с планом эксперимента. Животные были разделены на группы PBS, rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF. В первом эксперименте отслеживалась динамика роста отдельных опухолей. После инокуляции опухолевых клеток животные оставались в эксперименте в течение всего периода наблюдения. Во втором эксперименте также отслеживалась динамика роста отдельных опухолей.

Статистический анализ проводили с использованием ПО GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., США), а графическую визуализацию создавали с использованием Microsoft Excel (Microsoft, США). Статистическую значимость определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Кривые выживаемости мышей строили с помощью анализа Каплана–Мейера, p -value < 0,05 рассматривали как статистически значимый показатель.

Для анализа популяций иммунных клеток в опухолевом узле у мышей во втором эксперименте на сингенной модели рака толстой кишки CT26.WT по четыре животных из каждой группы были отобраны на 11 (2 дня после первой инъекции rVSVs) и 20 (5 дней после третьей инъекции rVSVs) дни роста опухоли для анализа иммунных популяций в соответствии с планом эксперимента.

Для проточной цитометрии мышей подвергали эвтаназии путем шейной дислокации. Опухоль каждой мыши промывали PBS и помещали в 3 мл лизирующего раствора (DMEM/F12, 1% FBS, раствор антибиотика-антимикотика, 1 мг/мл коллагеназы D из Clostridium histolyticum (1088866001, Roche, Германия)) и разрезали ножницами на кусочки размером 2-3 мм³. Полученную предварительную суспензию инкубировали при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 2 часов, затем перелили в пробирку объемом 15 мл и интенсивно перемешивали пипеткой для получения однородной суспензии. Полученную суспензию отфильтровывали через сетчатый фильтр диаметром 40 мкм (93040, SPL LifeSciences, Южная Корея) и центрифугировали при 500 g в течение 7 минут при температуре 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл буфера для лизиса эритроцитов Hybri-Max (R7757, Sigma, Великобритания) и инкубировали в течение 1 минуты при комнатной температуре. Затем к клеточной суспензии в буфере Hybri-Max добавляли 14,5 мл PBS и полученную суспензию центрифугировали при 400 g в течение 7 минут при температуре 4°C. Осадок клеток ресуспендировали в 3-5 мл PBS, затем количество клеток в суспензии подсчитывали и хранили на льду до дальнейшего окрашивания антителами.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Проверка вклада в репликативную активность мутации в М белке VSV

Неоднократно было продемонстрировано, что метионин в положении 51 белка М имеет решающее значение для ингибирования иммунного ответа, опосредованного IFN типа I [275]. У полученного ранее rVSV-dM51-GFP эта аминокислота была делетирована по сравнению с rVSV-wtM-GFP, что предотвращает связывание rVSV-dM51-GFP с комплексом экспорта мРНК Rae1-Nup98, необходимым для клеточного транспорта мРНК и последующей трансляции [69]. Сравнительный анализ репликативной активности двух версий rVSV (rVSV-wtM-GFP и rVSV-dM51-GFP) на трех линиях раковых клеток мышей: B16-F10, LL/2 и SCC VII показал, что rVSV-wtM-GFP обладает более высокой активностью по сравнению с rVSV-dM51-GFP через 24 часа после заражения, о чем свидетельствуют количество GFP+ клеток, значения MFI и количество PI+ клеток (Рисунок 3.1).

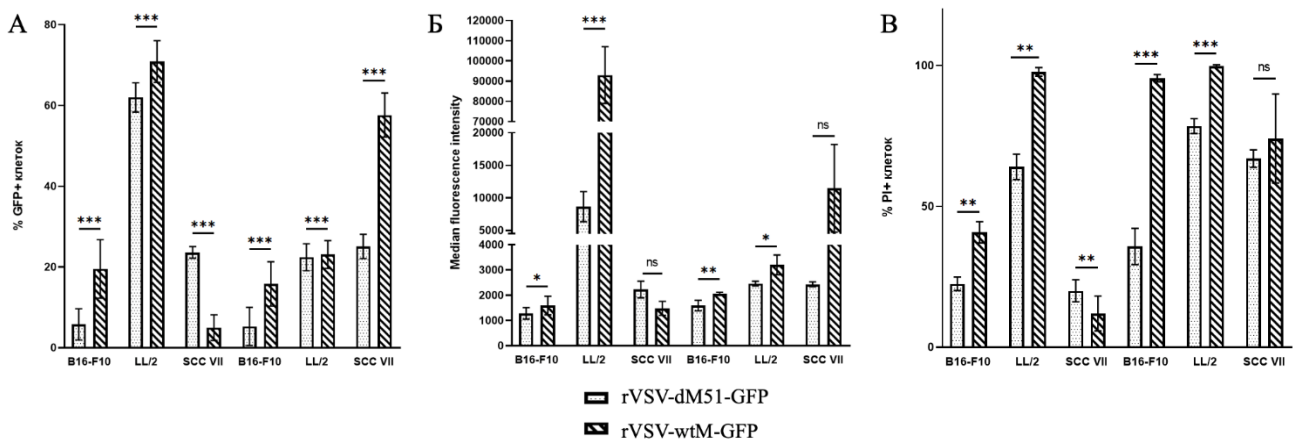


Рисунок 3.1 – Анализ клеток B16-F10, LL/2 и SCC VII методом проточной цитометрии через 24 и 48 часов после заражения rVSV-dM51-GFP и rVSV-wtM-GFP. Количество GFP+ клеток (А), значения MFI (Б) и количество PI+ клеток (В). (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

Инфицирование клеток B16-F10 rVSV-dM51-GFP привело к 5,8% GFP+ (MFI 1279) и 22,5% PI+ клеток, в то время как клетки LL/2 в аналогичных условиях демонстрировали 62% GFP+ (MFI 8635) и 64% PI+ клеток. Воздействие же rVSV-wtM-GFP на клетки B16-F10 привело к 19,5% GFP+ (MFI 1593) и 40,8% PI+ клеток, в то время как для клеток LL/2 наблюдалось 70,9% GFP+ (MFI 93004) и 97,8% PI+ клеток. Интересно, что для клеток SCC VII наблюдалась

противоположная тенденция: rVSV-dM51-GFP был более активен, чем rVSV-wtM-GFP в течение первых 24 часов после заражения. Причина, по которой этот конкретный тип клеток изначально более восприимчив к rVSV-dM51-GFP, но не к репликации вируса с М белком дикого типа еще предстоит изучить в будущем.

Наблюдаемое уменьшение количества клеток GFP+ и более низкие значения MFI через 48 часов после заражения rVSV были обусловлены тем, что большинство клеток были лизированы вирусами и превращались в клеточный дебрис, исключаясь из анализа в соответствии со стратегией гейтирования. Примечательно, что к этой временной точке тенденция для клеток SCC VII изменилась, и заражение rVSV-wtM-GFP привело к появлению 57,6% клеток GFP+ (MFI 11455), что больше, чем в случае rVSV-dM51-GFP. Статистический анализ полученных данных (t-критерий) подтвердил, что наблюдаемые различия между rVSV-dM51-GFP и rVSV-wtM-GFP были статистически значимыми.

По результатам сравнения двух версий rVSV (wtM и dM51) на трех линиях опухолевых клеток подтвердилась гипотеза о снижении репликационного потенциала у rVSV-dM51-GFP, несущего делецию метионина в М белке. Однако на основании опыта клинических исследований было принято решение о последующем использовании только вирусов с мутацией в М белке, т.к. они считаются более безопасными в качестве терапевтических агентов.

3.2. Сборка генетической конструкции с геном слитой молекулы mIL12-mGMCSF

Последовательности генов mIL12 и mGMCSF были получены после синтеза в векторе pAG110 (Евроген, Россия). С использованием модифицированных праймеров и постановкой трех ПЦР-реакций был получен ген слитой молекулы mIL12-mGMCSF, где фрагменты соединены через GS-линкер, обеспечивающий подвижность молекулы. Далее эта последовательность по сайтам рестрикции ферментов NheI и AvrII была клонирована в полученный ранее вектор pVSV-dM51-GFP между последовательностями G и L генов вместо гена GFP. Генетическая карта конструкции представлена на Рисунке 3.2.

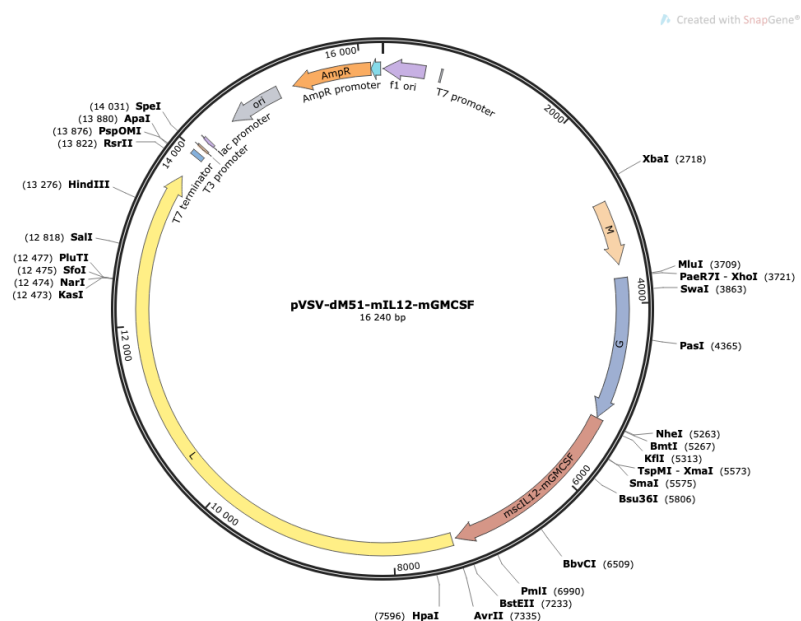


Рисунок 3.2 – Карта генетической конструкции, кодирующей ген слитого белка mIL12-mGMCSF

3.3. Получение rVSV, несущего вставку слитой молекулы mIL12-mGMCSF

Рекомбинантный вирус rVSV-mIL12-mGMCSF получали стандартной методикой котрансфекции с модификациями, описанными ранее. Предполагаемый механизм действия и расположение трансгена в геноме получаемого rVSV представлены на Рисунке 3.3.

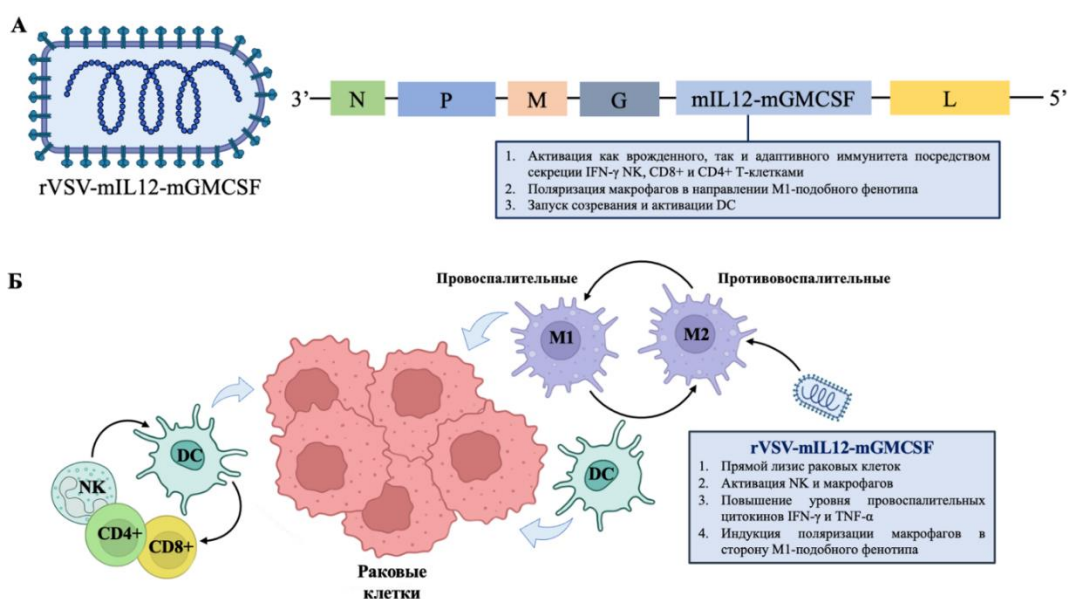


Рисунок 3.3 – Расположение трансгена (А) в геноме получаемого rVSV-mIL12-mGMCSF и потенциальный механизм действия (Б)

Спустя 72 часа после трансфекции клеток HEK293TN плазмидами, экспрессирующими белки VSV, полимеразу T7 и генетической конструкцией pVSV-dM51-mIL12-mGMCSF наблюдался ЦПЭ. Через 72 часа после трансфекции супернатант был собран и использован для амплификации rVSV-mIL12-mGMCSF в клетках ВНК-21, где ЦПЭ наблюдался уже через 24 часа. После 72 часов культивирования супернатант был отделен от клеточного дебриса ВНК-21 и использован для последующих экспериментов. Электронная микроскопия аликвоты полученного вирусного препарата подтвердила наличие «пулеподобных» вирусных частиц (Рисунок 3.4).

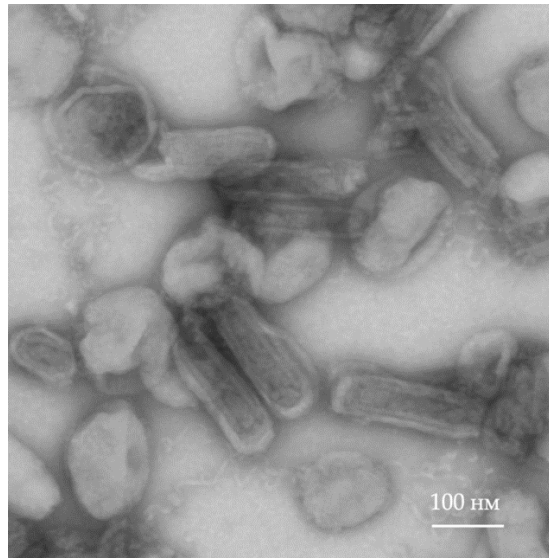


Рисунок 3.4 – Морфологическая характеристика полученного препарата rVSV-mIL12-mGMCSF методом электронной микроскопии

Для подтверждения принадлежности полученного рекомбинантного вируса к роду *Vesiculovirus* был проведен вестерн-блоттинг с антителами к G белку VSV. На дорожке, куда был нанесен супернатант клеток после инфекции rVSV-mIL12-mGMCSF, наблюдается такой же бенд G белка VSV (67 кДа), как и на дорожке с супернатантом клеток после инфекции rVSV-GFP (Рисунок 3.5).

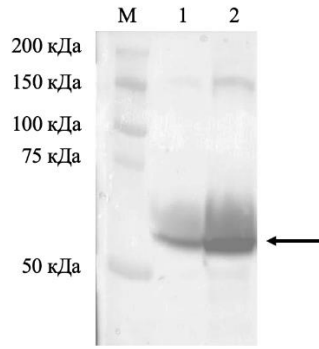


Рисунок 3.5 – Вестерн-блоттинг с антителами к G белку VSV. М – маркер молекулярного веса, супернатанты клеток, инфицированные: 1 – rVSV-GFP, 2 – rVSV-mIL12-mGMCSF. Стрелкой отмечен бенд G белка VSV (67 кДа)

Результаты электронной микроскопии (наличие «пулеподобных» вирусных частиц) и вестерн-блоттинга (бенд ~67 кДа) подтвердили получение вируса, который относится к роду *Vesiculovirus*.

3.4. Определение функциональной активности mIL12 и mGMCSF

Для оценки функциональных свойств mIL12, закодированного в формате слитой молекулы в геноме rVSV-mIL12-mGMCSF, проводили анализ активности mIL12 в кондиционированной культуральной жидкости ВНК-21.

Через 16 часов после культивирования клеток HEK-Blue™ IL-12 с клеточными супернатантами после вирусного заражения аликвоты супернатантов были использованы для инкубации с реактивом QUANTI-Blue в течение 6 часов. По результатам измерения оптической плотности при длине волны 620 нм была обнаружена разница между значениями отрицательного контроля и значениями положительного контроля IL-12 (10 нг/мл) и со значениями кондиционированной rVSV-mIL12-mGMCSF среды (Рисунок 3.6).

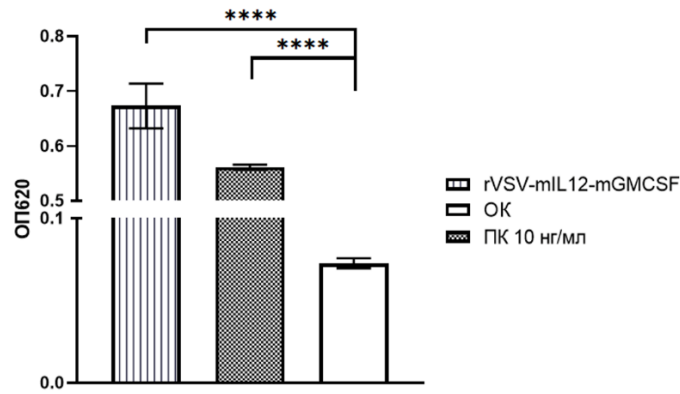


Рисунок 3.6 – Анализ функциональной активности mIL-12 на репортерной клеточной линии HEK-Blue™ IL-12. ОП620 – оптическая плотность при 620 нм, ОК – отрицательный контроль, ПК – положительный контроль. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

Для оценки связывания mGMCSF, закодированного в формате слитой молекулы в геноме rVSV-mIL12-mGMCSF, проводили ИФА кондиционированной культуральной жидкости ВНК-21. После выполнения протокола производителя ИФА-набора по результатам изменения оптической плотности при длине волны 450 нм была обнаружена разница в значениях положительного контроля (125 пг/мл), кондиционированной rVSV-mIL12-mGMCSF культуральной жидкости и отрицательного контроля (Рисунок 3.7).

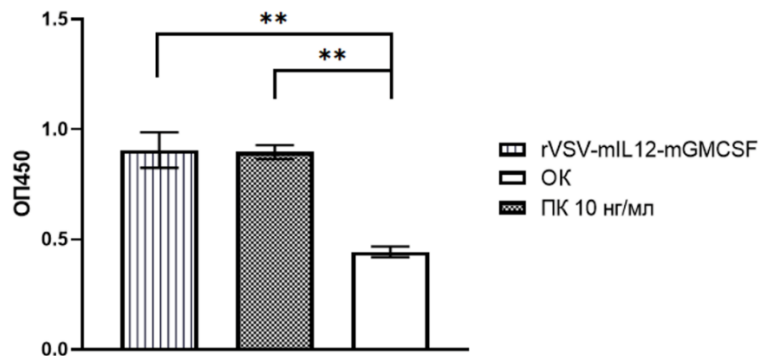


Рисунок 3.7 – Анализ связывания mGMCSF методом ИФА. ОП450 – оптическая плотность при 450 нм, ОК – отрицательный контроль, ПК – положительный контроль. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

Проведенные эксперименты продемонстрировали сохранение функциональной активности трансгенов, закодированных в формате слитой молекулы в геноме rVSV-mIL12-mGMCSF.

3.5. Определение онколитической активности гVSV-GFP методом прижизненной визуализации

Так как в разных исследованиях используемые дозы вируса отличаются, был проведен анализ влияния инфекции гVSV-GFP *in vitro* методом прижизненной визуализации на приборе IncuCyte S3 (Sartorius, Германия) на мышинных клетках меланомы B16-F10 и легочной карциномы Льюиса LL/2.

Кривые интенсивности флуоресценции GFP, свидетельствующие о проникновении гVSV-GFP в клетку, запуске репликации и, как следствие, экспрессии GFP, выявили первый пик флуоресценции через 10, 12 и 16 часов после заражения B16-F10 для доз 1×10^7 , 1×10^6 и 1×10^5 TCID50 соответственно (Рисунок 3.8). Однако через 24 часа и до 48 часов количество областей зеленой флуоресценции снижается для всех доз, что свидетельствует о вирусном онколизе, приводящем к гибели клеток.

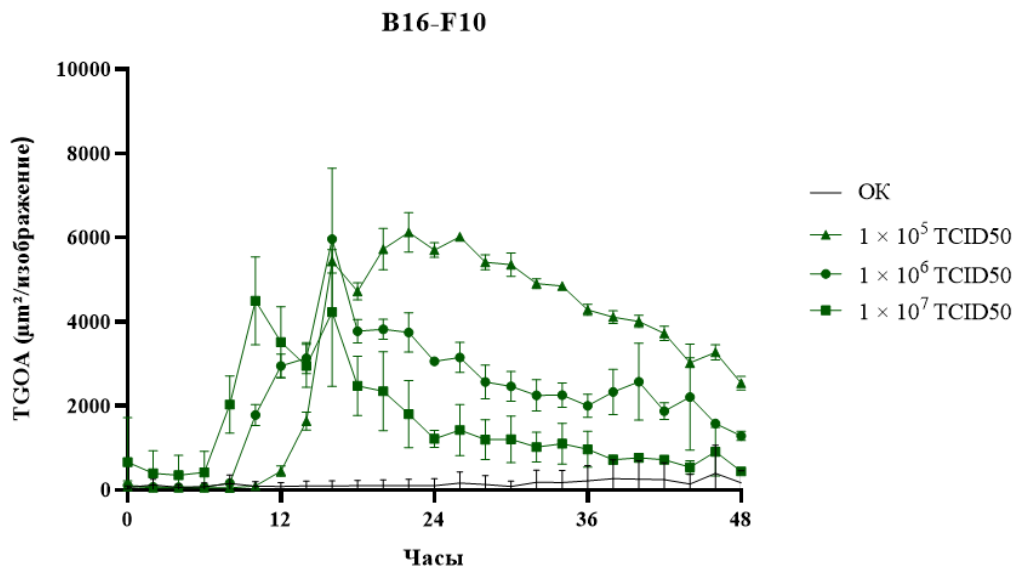


Рисунок 3.8 – Прижизненная визуализация клеток B16-F10 после заражения гVSV-GFP в разных дозах TCID50. TGOA – total green object area, ОК – отрицательный контроль

Кривые интенсивности флуоресценции GFP, свидетельствующие о проникновении гVSV-GFP в клетку и запуске репликации, выявили первый пик флуоресценции через 6, 8 и 10 часов после заражения LL/2 для доз 1×10^7 , 1×10^6 и 1×10^5 TCID50 соответственно (Рисунок 3.9). Однако уже через 16 часов после инфекции количество областей зеленой флуоресценции снижается для всех доз, что свидетельствует о вирусном онколизе, приводящем к гибели клеток.

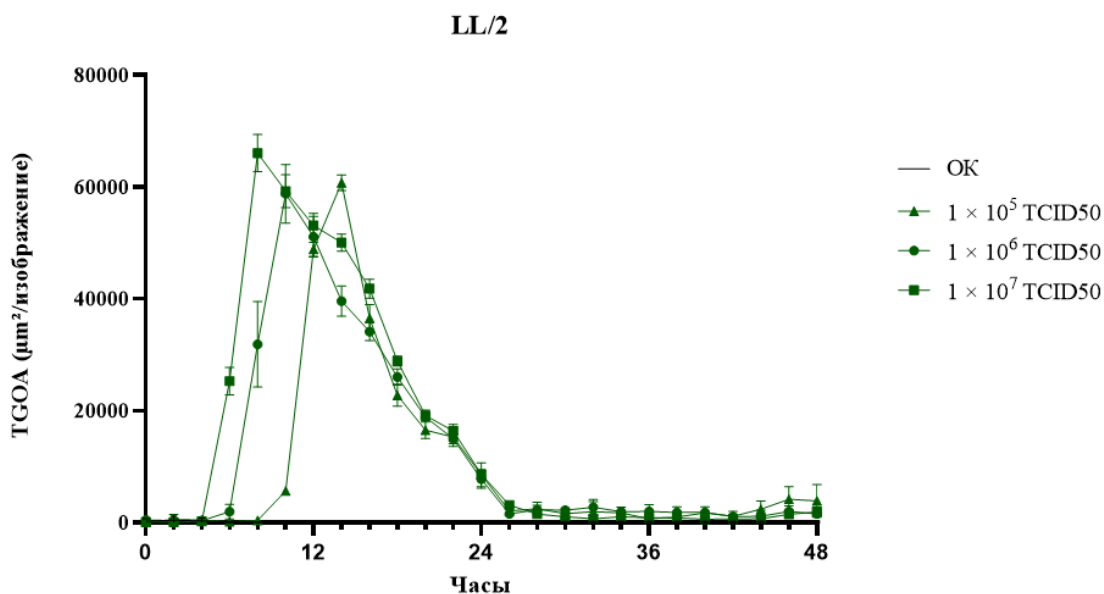


Рисунок 3.9 – Прижизненная визуализация клеток LL/2 после заражения rVSV-GFP в разных дозах TCID50. TGOA – total green object area, ОК – отрицательный контроль

Анализ кинетики репликации rVSV-GFP на двух линиях мышинных опухолевых клеток методом прижизненной визуализации выявил четкую дозозависимую динамику вирусной инфекции. Как и ожидалось, более высокая исходная доза вируса (1×10^7 TCID50) обеспечивала наиболее быстрое проникновение и начало репликации, о чем свидетельствует ранний пик GFP-сигнала через 10 (4492 $\mu\text{m}^2/\text{изображение}$) и 6 (25283 $\mu\text{m}^2/\text{изображение}$) часов для B16-F10 и LL/2 соответственно. Более позднее появление пика GFP-сигнала при снижении дозы до 1×10^5 TCID50 (5435 $\mu\text{m}^2/\text{изображение}$ через 16 часов для B16-F10 и 5650 $\mu\text{m}^2/\text{изображение}$ через 10 часов для LL/2) отражает необходимость времени для такого накопления вирусных частиц, при котором сигнал флуоресценции может быть детектирован. Примечательно, что при заражении клеток линии LL/2 наблюдалась более ускоренная кинетика развития вирусной инфекции по сравнению с B16-F10: пик флуоресценции и ее интенсивность регистрировались на 4-6 часов раньше при соответствующих дозах, что указывает на изначально более высокую чувствительность клеток данной линии к заражению VSV. Последующее снижение уровня флуоресценции после достижения пика (24 часа для B16-F10 и 16 часов для LL/2), вероятно, обусловлено вирус-индуцированным онколизом, приводящим к гибели зараженных клеток, что сопровождается потерей флуоресцентного сигнала.

3.6. Оценка изменения уровня экспрессии генов под воздействием rVSV-GFP

Уровень восприимчивости к онколизу, опосредованному вирусом, зависит от способности определенных типов раковых клеток бороться с вирусной инфекцией. Поэтому мы решили изучить уровни экспрессии определенных противовирусных (таких как *IFN-β1*, *IFN-γ*, *IFIT1* и *RIG-I*), проапоптотических (таких как *p53*, *SMAC*, *GSDME*), метастатических (таких как *N-кадгерин* и *E-кадгерин*) и провоспалительных (*IL-1β*) генов в линиях раковых клеток B16-F10 и LL/2 в ответ на вирусное заражение (Рисунок 3.10, Приложение А).

Чувствительность раковых клеток к ОВ (по сравнению со здоровыми клетками) в основном объясняется низким уровнем экспрессии IFN типа I (*IFN-α* и *IFN-β*) и в целом различными дефектами в рецепторах и активных участниках передачи сигналов IFN типа I. Оценка уровней экспрессии *IFN-β1* методом кПЦР через 12 часов после заражения rVSV-GFP показала, что экспрессия *IFN-β1* в клетках LL/2 была выше по сравнению с клетками B16-F10. При этом экспрессия *IFN-γ*, продукт которого в ТМЕ участвует в перепрограммировании макрофагов из M2- в M1-подобный фенотип, статистически значимо не изменилась. Уровень экспрессии проапоптотического белка *p53* в клетках LL/2 был выше по сравнению с клетками B16-F10, при этом экспрессия *SMAC* и *GSDME* для клеток линии не менялась. Уровни экспрессии двух противовирусных генов (*IFIT1* и *RIG-I*) были выше в клетках B16-F10, что может объяснить большую устойчивость этих клеток к наблюдаемому онколизу rVSV-GFP по сравнению с другими клеточными линиями. Экспрессия же метастатического *N-кадгерина* снижалась на фоне заражения клеток вирусом, однако изменений в уровне *E-кадгерина* не происходило. Также на двух клеточных линиях не происходило статистически значимого изменения уровня *IL-1β*, повышение уровня которого в ТМЕ свидетельствует о более агрессивном фенотипе опухоли. Данные об относительных уровнях экспрессии *IFIT1* и *RIG-I* демонстрируют силу раннего противовирусного ответа со стороны B16-F10, который менее чувствителен к онколизу VSV. Однако важно отметить, что наличие транскриптов мРНК свидетельствует об успешной транскрипции, но не означает успешной трансляции белка.

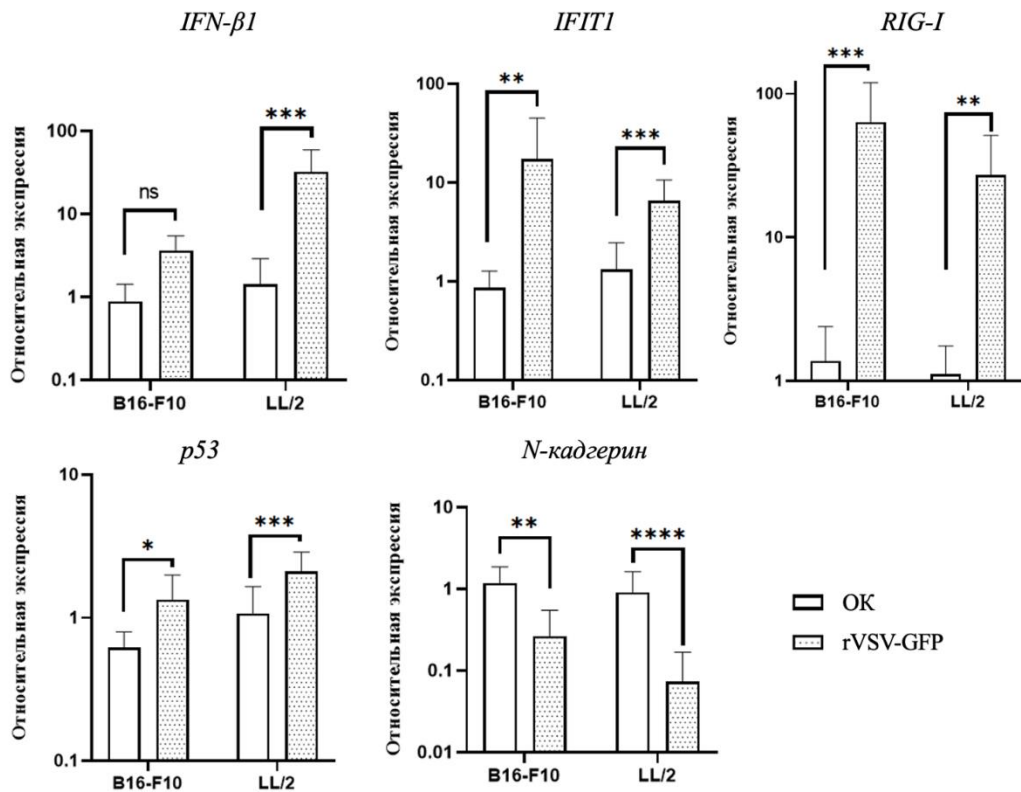


Рисунок 3.10 – Анализ методом кПЦР клеток B16-F10 и LL/2, инфицированных rVSV-GFP, через 12 часов после заражения. ОК – отрицательный контроль. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

Анализ методом кПЦР транскриптов мРНК генов в ответ на VSV-инфекцию клеточных линий меланомы B16-F10 и карциномы легких Льюиса LL/2 потенциально может дать ответ на наблюдаемые методом прижизненной визуализации различия в онколизе. Противовирусный ответ включает обнаружение вирусной РНК с помощью RIG-I и запуск сигнального каскада для выработки $IFN-\beta$, который затем индуцирует экспрессию IFIT. Ингибирование трансляции вирусного белка с помощью IFIT предотвращает репликацию вируса. Наши данные кПЦР показали, что уровни экспрессии *IFN-β1* и *p53* были ниже в клетках B16-F10, в то время как уровни экспрессии *IFIT*, *RIG-I* и *N-кадгерина* были выше по сравнению с клетками LL/2. Ситуация с низким уровнем *IFN-β1*, но более высокими уровнями *IFIT1* и *RIG-I*, наблюдаемая в клетках B16-F10, указывает на то, что эти клетки пытаются избежать противовирусного ответа, ингибируя передачу сигналов, несмотря на первоначальное распознавание опасности, которую представляет VSV, с помощью RIG-I. Высокая экспрессия *IFIT1* указывает на то, что нижестоящие гены, индуцируемые *IFN-β1*, могут быть активны, при этом значительно более низкая экспрессия *IFN-β1* указывает на дисфункцию сигнального каскада после активации *RIG-I*, но до выработки $IFN-\beta$ клетками меланомы. Также возможно, что противовирусный ответ является неполным или нарушенным. С другой стороны, в клетках LL/2 наличие высоких

уровней *IFN-β1*, но низких уровней *RIG-I* и *IFIT1* указывает на подавленный или дисфункциональный противовирусный ответ и, следовательно, на снижение способности блокировать размножение вируса. В то время как вырабатываются высокие уровни *IFN-β1*, не обусловленные активацией *RIG-I* и, вероятно, поддерживаемые другими механизмами, более низкие уровни *RIG-I* и *IFIT1* указывают на то, что клетки LL/2 не обнаруживают VSV или не реагируют на него эффективно.

Изменение экспрессии p53 происходит в ответ на повреждение ДНК и клеточные стрессы, что приводит к таким последствиям, как остановка клеточного цикла, апоптоз или старение, в зависимости от клеточного контекста, однако решающее значение для его стабильности и функциональной активации играет фосфорилирование [276]. Ввиду того, что статистически значимых изменений в экспрессии близких по функциям генов *SMAC* и *GSDME* не произошло, утверждение о клеточной гибели по пути апоптоза на основании экспрессии p53 преждевременно.

Важно отметить, что ключевым ограничением этой части исследований является отсутствие валидации на уровне белка, препятствующее получению окончательных выводов о функциональной активности продуктов исследуемых генов. В будущем исследования необходимо интегрировать данные секвенирования ДНК/РНК и иммуногистохимии для понимания механизмов функционирования клеток в ответ на проникновение VSV. Также важно учесть, что условия эксперимента *in vitro* не отражают достоверно взаимодействие вируса с раковыми клетками и иммунными клетками в пределах ТМЕ в течение терапии *in vivo*.

Несмотря на эти ограничения, наши результаты предоставляют новые данные, способствующие пониманию динамики ответа раковой клетки на проникновение VSV с точки зрения разных аспектов. Для изучения клинических последствий необходимы дальнейшие исследования с использованием дополнительного набора методов.

3.7. Определение онколитической активности rVSV в культурах опухолевых клеток

Исследование онколитической активности rVSV-mIL12-mGMCSF в сравнении с исходным rVSV-GFP проводили на панели опухолевых клеток мыши разного происхождения методом проточной цитометрии с использованием PI в качестве маркера жизнеспособности. В нашем исследовании мы оценивали специфическую гибель клеток, инфицированных rVSV-mIL12-mGMCSF или rVSV-GFP при инфекции 1×10^6 TCID50. В работе использовали пять линий опухолевых клеток: меланомы B16-F10, легочной карциномы Льюиса LL/2,

плоскоклеточной карциномы SCC VII, гепатомы H22, рака толстой кишки CT26.WT. Также была проведена апробация заражения клеток mMSC rVSV ввиду их участия в формировании стромы опухоли [277].

В то время как в ходе *in vitro* экспериментов rVSV-GFP оказывал более сильный онколитический эффект, чем rVSV-mIL12-mGMCSF, на все используемые клеточные линии, наблюдались различия в чувствительности клеточных линий к вирусу (Рисунок 3.11).

Так, в случае клеток меланомы B16-F10 rVSV-mIL12-mGMCSF не показал статистически значимых отличий в количестве мертвых клеток относительно контроля, при этом количество мертвых клеток при инфицировании rVSV-GFP значимо отличалось от контрольных значений. Интересно, что инфекция клеток легочной карциномы Льюиса LL/2 привела к более эффективному лизису клеток по сравнению с клетками меланомы. Похожая тенденция наблюдалась и при вирусной трансдукции rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF клеток гепатомы H22, однако количество мертвых клеток было значительно выше, и эти данные продемонстрировали высокую статистическую значимость. Клетки линии плоскоклеточной карциномы SCC VII продемонстрировали схожую с клетками линии B16-F10 тенденцию: через 24 часа после заражения rVSV-GFP среднее значение количества мертвых клеток составило 20%, в то время как для зараженных rVSV-mIL12-mGMCSF клеток этот показатель достиг только 10%. Среднее количество мертвых клеток CT26.WT после инфекции rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF было 40%.

Опухоль представляет собой сложную систему, состоящую из раковых и здоровых клеток: иммунных клеток, эндотелиальных клеток, фибробластов, MSC и других компонентов, которые тесно взаимодействуют друг с другом для поддержания роста опухоли [278]. В частности, MSC могут стимулировать пролиферацию раковых клеток, подавлять апоптоз и способствовать ангиогенезу и метастазированию. В нашем эксперименте показано, что rVSV активно размножались в mMSC: более 40% и почти 100% инфицированных rVSV-mIL12-mGMCSF- и rVSV-GFP-клеток, соответственно, были мертвыми. Это интересное открытие, которое потенциально может помочь противодействовать негативным эффектам MSC в TME, а также подтверждается опубликованным исследованием, которое продемонстрировало, что здоровые MSC, как и злокачественные клетки, имеют дефекты в реакции на IFN I типа, что объясняет их восприимчивость к опосредованному ОБ лизису.

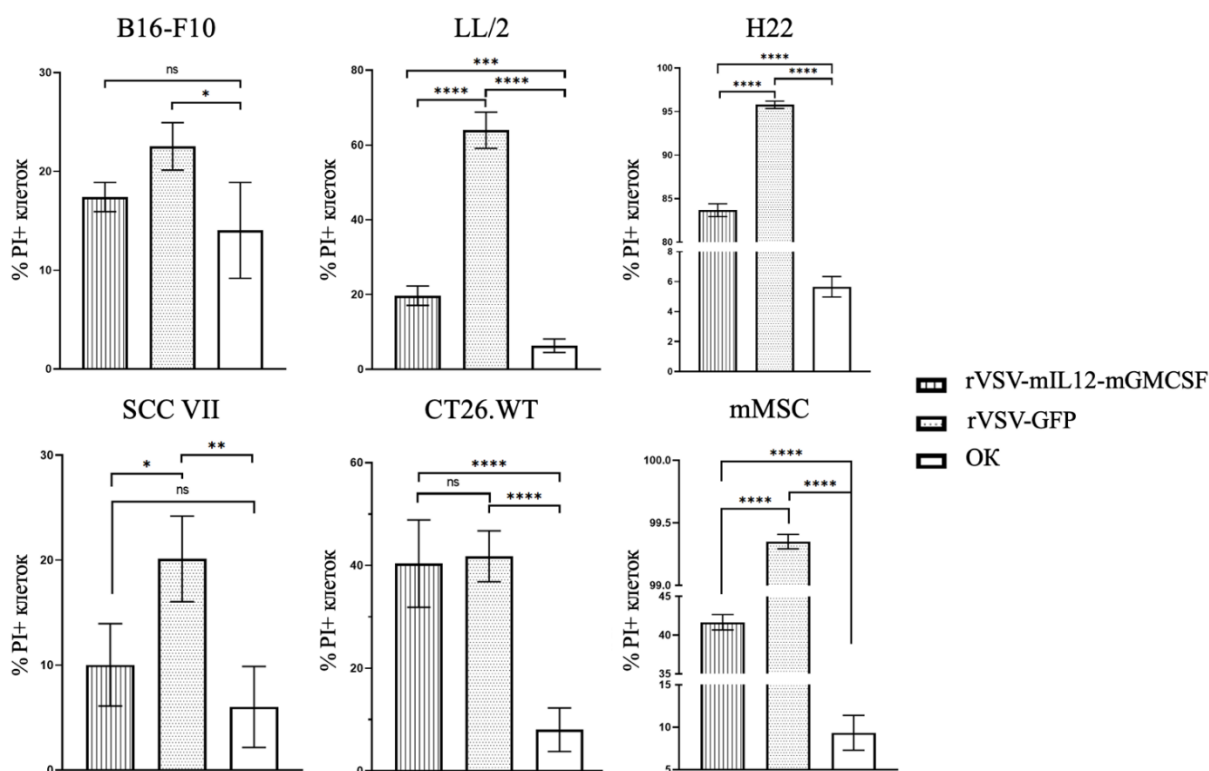


Рисунок 3.11 – Онколитическая активность rVSV-mIL12-mGMCSF и rVSV-GFP в опухолевых клетках различного происхождения и в MSC мыши через 24 часа после заражения. ОК – отрицательный контроль. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

Успешное проникновение вируса зависит от набора рецепторов. Согласно опубликованным исследованиям, LDLR служит основной точкой входа для VSV, а широко распространенная экспрессия этих рецепторов объясняет пантропизм VSV [279]. Несколько линий подтверждают связь между LDLR и карцинами, демонстрируя увеличение представленности этих рецепторов в фазе роста клетки и уменьшение их количества у покоящихся клеток [280]. VSV, как и некоторые другие оболочечные вирусы, также взаимодействует с EGFR, облегчая проникновение и размножение вируса, и стимулирует сигнальные пути эндоцитоза EGFR/АКТ [281, 282]. EGFR – это высоко гликозилированная и фосфорилированная трансмембранная рецепторная тирозинкиназа, которая регулирует пролиферацию клеток, выживаемость, онкогенез и передачу сигналов IFN I типа [283]. Избыточная экспрессия EGFR коррелирует с риском метастазирования, резистентностью к химиотерапии и низкой выживаемостью пациентов с раком молочной железы, некоторыми типами меланомы, плоскоклеточным раком головы и шеи и немелкоклеточным раком легкого [284, 285]. Как было ранее продемонстрировано, уровень экспрессии EGFR в клетках LL/2 значительно выше, чем в клетках B16-F10, что может объяснить их разницу в восприимчивости к онколизу на основе VSV [286]. В нескольких исследованиях было использовано преимущество

усиления регуляции EGFR при определенных злокачественных новообразованиях для повышения терапевтической специфичности ОБ [287–289], и есть данные, свидетельствующие о том, что активация пути EGFR обходит IFN-регулируемый противовирусный ответ, приводя к репликации вируса [290, 291].

3.8. Противоопухолевая активность rVSV-GFP *in vivo*

Для подтверждения онколитических способностей VSV *in vivo* эффективность rVSV-GFP была изучена на модели меланомы B16-F10. Для этого мышам C57BL/6 подкожно трансплантировали 1×10^6 клеток B16-F10. Лечение rVSV-GFP началось на 8-й день после инфузии, когда средний размер опухоли достиг $\sim 400 \text{ мм}^3$. Две инъекции rVSV-GFP с интервалом в 3 дня были сделаны внутриопухолево мышам 1 группы (1×10^8 TCID50) и 2 группы (1×10^6 TCID50).

Быстрый опухолевый рост наблюдался во всех трех группах из-за агрессивной природы меланомы, индуцированной B16-F10, но в группе плацебо этот процесс протекал быстрее (Рисунок 3.12). На 9, 13 и 17-й дни у животных 1-й группы, получавших большую дозу вируса, наблюдалось уменьшение объема опухоли (p -value $< 0,05$). Однако у животных 2-й группы статистически значимое уменьшение объема опухоли происходило только на 9 и 17-й дни (p -value $< 0,05$). Тем не менее, важно отметить, что различия между группами, получавшими лечение rVSV-GFP в разных дозах, не наблюдались. У мышей 1 и 2 групп наблюдалось частичное подавление роста опухоли по сравнению с мышами 3 группы (индекс ТРО 52,5% и 41,8%, соответственно на 11 день) (Рисунок 3.13). Увеличение средней продолжительности жизни мышей в 1 группе составило 6,1 дня по сравнению с показателями в 3 группе (анализ выживаемости по Каплану-Мейеру).

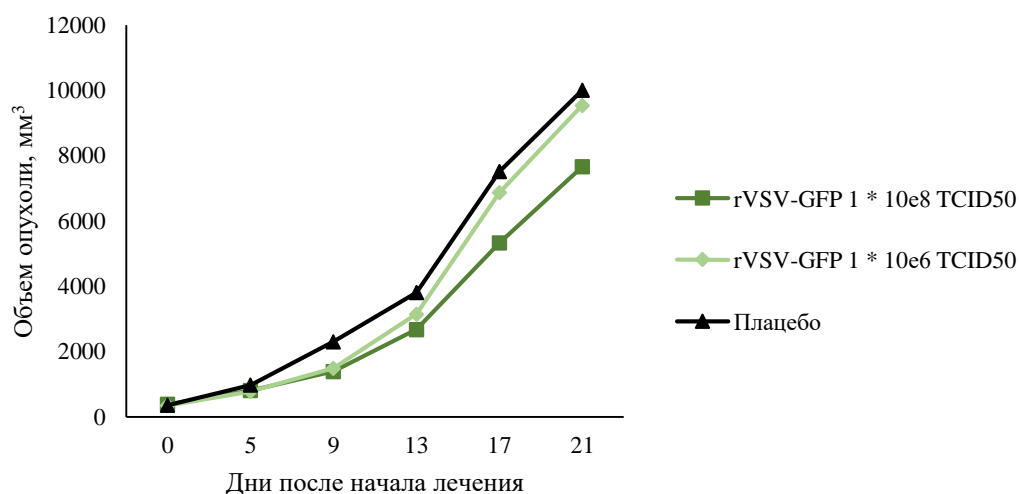


Рисунок 3.12 – Динамика роста B16-F10-индуцированной опухоли на фоне лечения rVSV-GFP в двух дозах

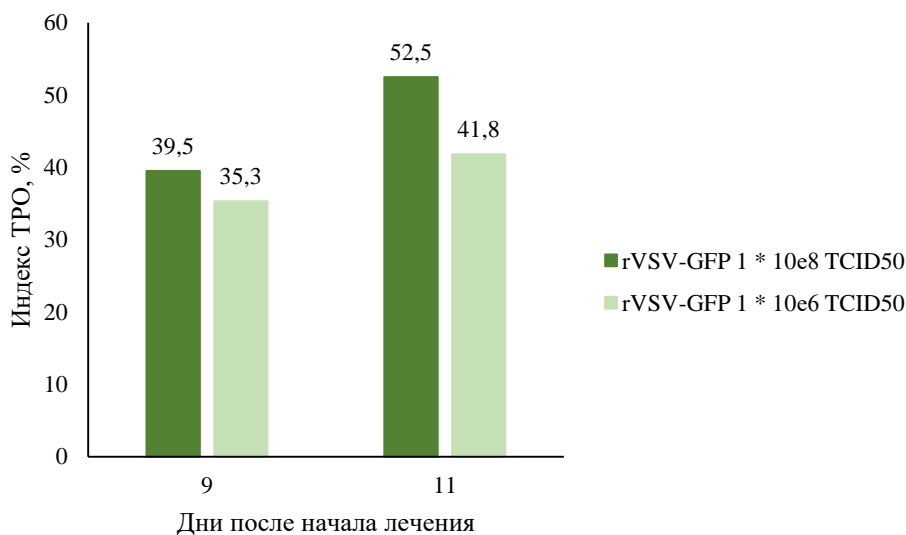


Рисунок 3.13 – Значения индекса ТРО на 9 и 11 дни после начала лечения B16-F10-индуцированной опухоли препаратом rVSV-GFP в двух дозах

Чтобы подтвердить персистенцию rVSV-GFP в опухоли, у мыши из группы, получавшей терапию в дозе 1×10^8 TCID50, на 21-й день после первой инъекции был удален злокачественный узел, и флуоресценция GFP в опухоли была подтверждена с помощью конфокальной микроскопии (Рисунок 3.14). Эти результаты указывают на то, что rVSV-GFP эффективно инфицировал и сохранялся в злокачественных клетках более 20 дней.

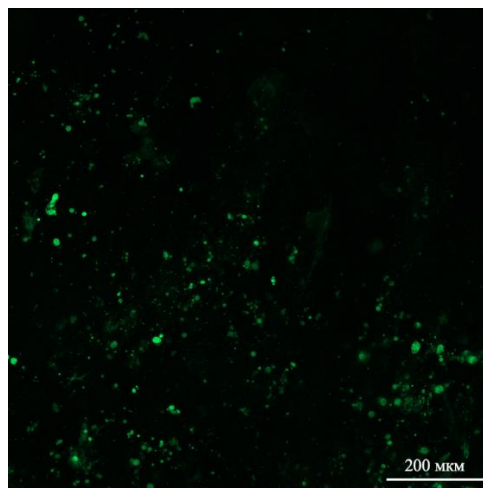


Рисунок 3.14 – Конфокальная микроскопия опухолевого узла после лечения B16-F10-индуцированной опухоли препаратом rVSV-GFP

Полученные результаты согласуются с тенденцией использования вирусных векторов для доставки иммуностимулирующих молекул в ТМЕ. Это распространенный подход, позволяющий добиться длительной экспрессии закодированной в геноме вируса молекулы, как было показано нами на примере вируса, экспрессирующего GFP.

3.9. Противоопухолевая активность rVSV-mIL12-mGMCSF на модели B16-F10 *in vivo*

После подтверждения онколитической эффективности rVSV-GFP был протестирован терапевтический эффект rVSV-mIL12-mGMCSF. Аналогично первому эксперименту *in vivo*, мышам C57BL/6 подкожно вводили 1×10^6 клеток B16-F10, и размеры опухоли измеряли каждые 2 дня (Рисунок 3.15). Лечение препаратами rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF началось на 11-й день после инфузии, когда средний размер опухоли достиг ~500 мм³.

Две инъекции препаратов rVSV (1×10^7 TCID₅₀) с интервалом в 3 дня вводили внутриопухолево мышам 1-й группы (rVSV-GFP) и 2-й группы (rVSV-mIL12-mGMCSF). У мышей экспериментальных групп наблюдалось частичное подавление роста опухоли по сравнению с мышами 3-й группы (значение ТРО 27,1% в 1-й и 36,9% во 2-й группах на 9-й день) (Рисунок 3.16). В случае rVSV-mIL12-mGMCSF-терапии с 5-го по 21-й дни после первой инъекции средний размер опухоли был значительно меньше, чем в контрольной группе (p -value < 0,05), достигнув своего максимума на 13-й день (p -value < 0,005). Лечение же rVSV-GFP показало значимые различия в среднем размере опухоли относительно контроля только на 13-й день (p -value < 0,005). В целом, выживаемость мышей в 3-й группе была ниже выживаемости

животных в экспериментальных группах (анализ выживаемости Каплана-Мейера).

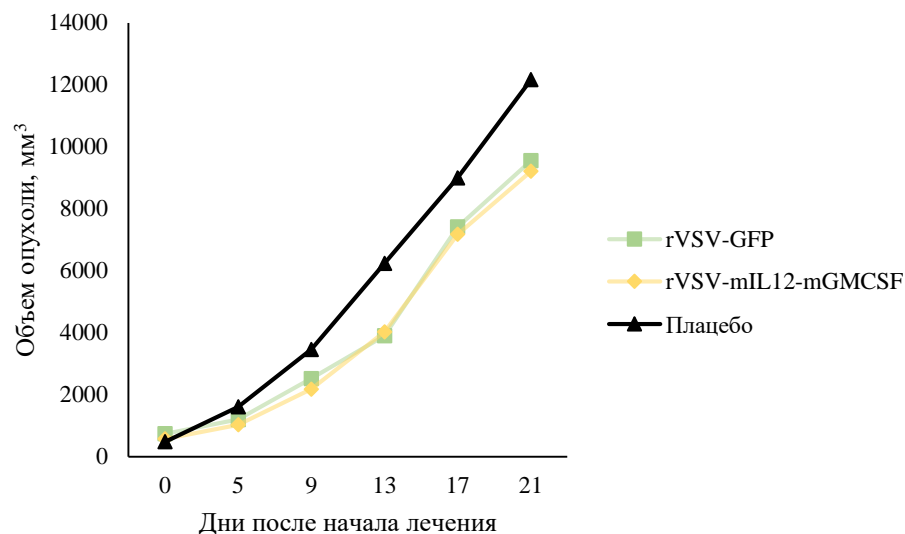


Рисунок 3.15 – Динамика роста B16-F10-индуцированной опухоли на фоне лечения rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF

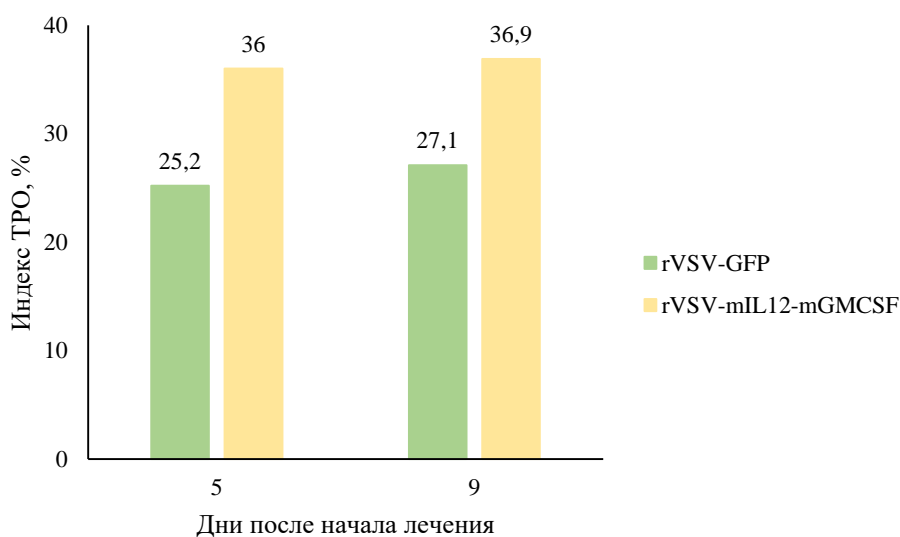


Рисунок 3.16 – Значения индекса ТРО на 5 и 9 дни после начала лечения B16-F10-индуцированной опухоли препаратами rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF

Это исследование продемонстрировало, что лечение как rVSV-GFP, так и rVSV- mIL12-mGMCSF, приводило к снижению роста опухоли и увеличению выживаемости животных в исследуемых группах, при этом значения уровня ТРО были относительно низкими (около 40%).

Успешный исход экспериментов *in vivo* во многом зависит от дизайна эксперимента,

который включает в себя размер опухоли на день старта лечения, дозу и кратность введения ОВ. Эти параметры сильно варьируются от исследования к исследованию и нуждаются в оптимизации. Например, было продемонстрировано, что 4 инъекции 1×10^9 TCID₅₀ rVSV-mIFN β замедлили рост опухоли B16-F10 у мышей, однако даже использование такой высокой дозы не приводило к регрессии опухоли [292]. В другом исследовании на иммунокомпетентной модели миеломы 5TGM1 было показано, что однократное введение VSV-IFN β в высокой дозе значительно продлевает выживаемость животных [293]. Три внутриопухолевые инъекции рекомбинантного вируса коровьей оспы, кодирующего ген miPDL1-mGMCSF, приводили к более значительному ингибированию роста опухоли B16-F10 по сравнению вирусом без вставки [149].

Вероятно, как выбранная агрессивная модель меланомы B16-F10, так и схема лечения (две инъекции rVSV-GFP/rVSV-mIL12-mGMCSF в дозе 1×10^7 TCID₅₀ с интервалом в четыре дня) влияют на успешность терапии. Также важно отметить, что лечение двумя препаратами rVSV начиналось, когда средний размер опухоли достигал ~ 500 мм³, что свидетельствует о поздней стадии развития опухоли. Можно предположить, что для повышения эффективности и долгосрочного успеха терапии для лечения меланомы B16-F10 потребуются корректировка доз вируса и кратности его введения, а также размера опухоли на момент введения первой дозы препарата, как показали наши последующие результаты.

3.10. Противоопухолевая активность rVSV-mIL12-mGMCSF на модели CT26.WT *in vivo*

Сравнительная противоопухолевая активность rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF была также исследована на сингенной модели рака толстой кишки CT26.WT. Эта модель представляет собой активно используемую платформу для оценки различных видов иммунотерапии, поскольку ей не присущ агрессивный характер многих других опухолевых моделей, что дает достаточно времени для активации иммунного ответа [294, 295]. Для этого мышам BALB/c подкожно трансплантировали 4×10^5 клеток CT26.WT. Лечение rVSV началось, когда средний размер опухоли достиг ~ 25 мм³, что является значительным изменением по сравнению с предыдущими экспериментами на модели B16-F10. Три инъекции препаратов rVSV-GFP/rVSV-mIL12-mGMCSF в дозе 1×10^6 TCID₅₀ с интервалом в 3 дня вводили внутриопухолево мышам экспериментальных групп. Снижение дозы при увеличении кратности введения вируса – модификации, продиктованные как большей чувствительностью клеток CT26.WT к заражению *in vitro*, так и неудовлетворительной эффективностью предыдущих экспериментов *in vivo*.

В контрольной группе у всех животных наблюдался прогрессирующий рост опухоли в течение всего периода наблюдения. Индивидуальные кривые роста характеризовались устойчивым увеличением объема опухоли (Рисунок 3.17). Несмотря на прогрессирование опухоли в контрольной группе, медиана выживаемости составила 34,7 дня. В группе rVSV-GFP индивидуальные кривые роста опухоли также демонстрировали неоднородность. У большинства животных наблюдался прогрессирующий рост опухоли различной интенсивности. В группе rVSV-mIL12-mGMCSF динамика роста опухоли характеризовалась значительной межиндивидуальной вариабельностью.

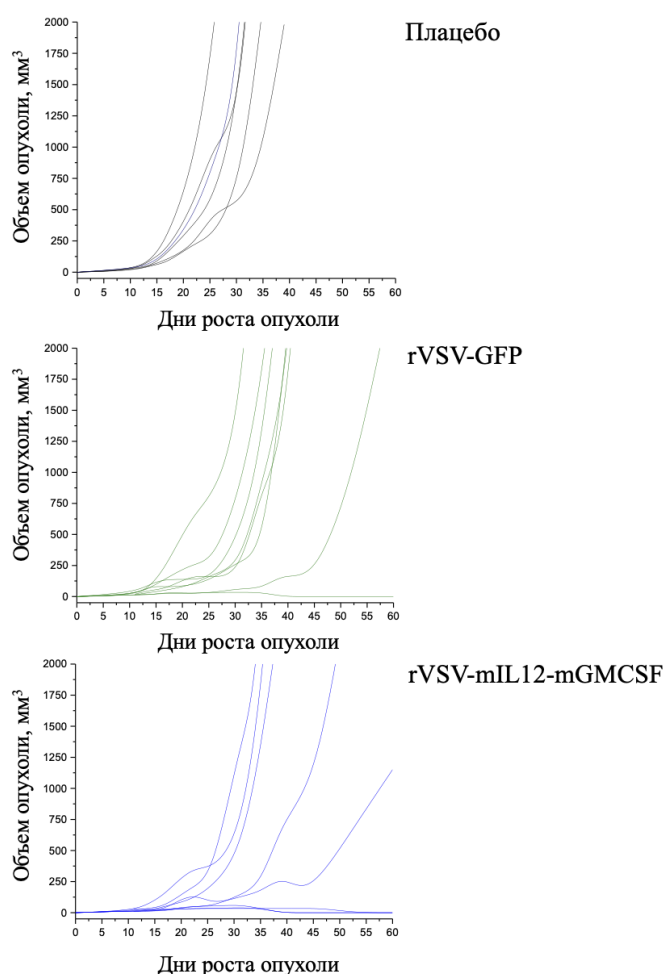


Рисунок 3.17 – Динамика индивидуальных кривых роста СТ26.WT-индуцированной в группах экспериментальных животных

Анализ выживаемости показал, что на протяжении 90 дней наблюдений 37,5% животных, получавших терапию rVSV-mIL12-mGMCSF, остались живы, в то время как аналогичный показатель для терапии rVSV-GFP составил 12,5% (Рисунок 3.18). При этом наблюдаемые различия в выживаемости животных в группах, получавших лечение rVSV, не были

статистически достоверны.

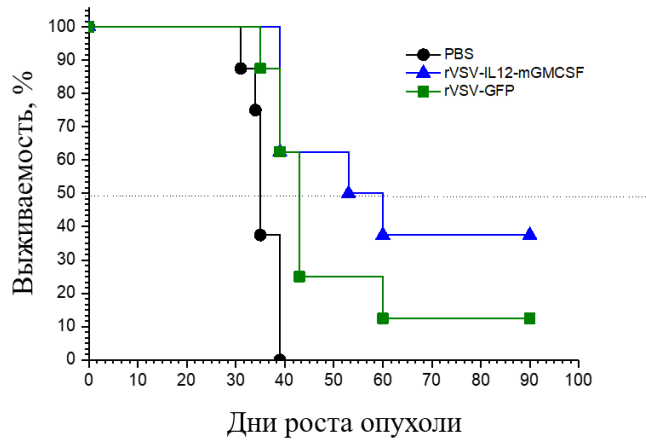


Рисунок 3.18 – Анализ выживаемости животных с СТ26.WT-индуцированной опухолью

Значение индекса ТРО достигло максимума в 80% у животных, получавших терапию rVSV-mIL12-mGMCSF, и 67% у животных, получавших терапию rVSV-GFP, на 26 день исследования, после чего началось снижение (Рисунок 3.19). Изменения в индексе ТРО может быть объяснено как меньшей агрессивностью индуцированных СТ26.WT-опухолей, так и большей репликационной активностью rVSV в опухолевых клетках этой линии. Действительно активное увеличение количества вирионов в опухолевой клетке может коррелировать с количеством высвобождаемых DAMP, PAMP и ТАА. Однако наблюдаемые различия между вирусами наглядно демонстрируют большую эффективность rVSV-mIL12-mGMCSF, что может быть связано с действием слитой молекулы.

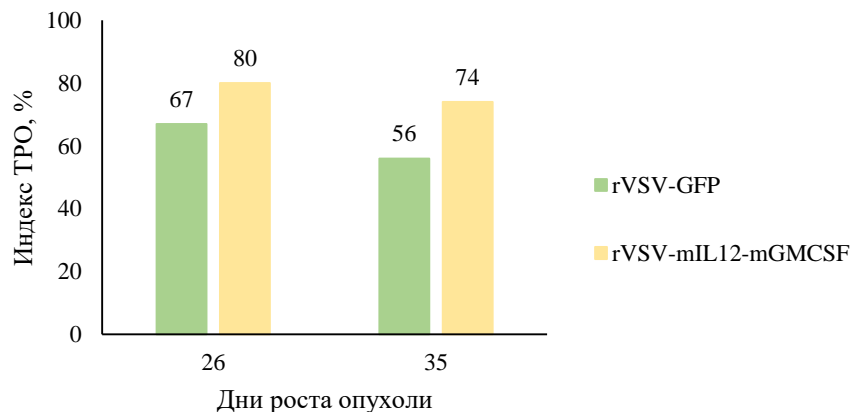


Рисунок 3.19 – Значения индекса ТРО на 26 и 35 дни роста СТ26.WT-индуцированной опухоли препаратами rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF

Различия в групповых размерах опухоли показали, что у животных, получавших rVSV-mIL12-mGMCSF-терапию, с 14-го дня роста опухоли отмечается значимое снижение размера опухоли по сравнению с контролем (p -value < 0,005) и эти различия в объемах опухолей сохраняются и во всех последующих точках измерения вплоть до 31-го дня после привития клеток опухоли. При этом у животных, получавших rVSV-GFP-терапию статистически значимые различия в объеме опухоли по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения, детектируются только с 22-го дня (p -value < 0,05). Несмотря на более выраженное влияние терапии rVSV-mIL12-mGMCSF на объем опухоли, статистически значимых различий между группами rVSV не наблюдалось. По всей вероятности, эффекты слитой молекулы mIL12-mGMCSF, доставляемой в геноме VSV, оказывают умеренный эффект на торможение роста опухоли, однако ограниченное количество животных в группах и большая вариабельность ответов на терапию внутри групп не позволяют этим различиям достигнуть статистической значимости.

Во втором эксперименте на модели СТ26.WT-индуцированных опухолей, проводимого для последующего фенотипирования иммунных клеток опухолевого узла, была также проанализирована индивидуальная динамика роста опухоли у животных, а также оценена выживаемость животных в течение периода наблюдения. Опухоли от четырех животных из каждой группы были собраны на 11-й и 20-й дни роста опухоли для иммунофенотипирования.

В контрольной группе индивидуальные кривые роста опухоли характеризовались устойчивым, прогрессирующим увеличением объема опухоли на протяжении всего периода наблюдения (Рисунок 3.20). В группе rVSV-GFP индивидуальные кривые роста опухоли также демонстрировали неоднородность. У большинства животных наблюдался прогрессирующий рост опухоли различной интенсивности. В группе rVSV-mIL12-mGMCSF динамика роста опухоли характеризовалась значительной межиндивидуальной вариабельностью. У некоторых животных наблюдался прогрессирующий рост опухоли с различной скоростью, в то время как у других рост опухоли был менее выражен в ранние и средние сроки.

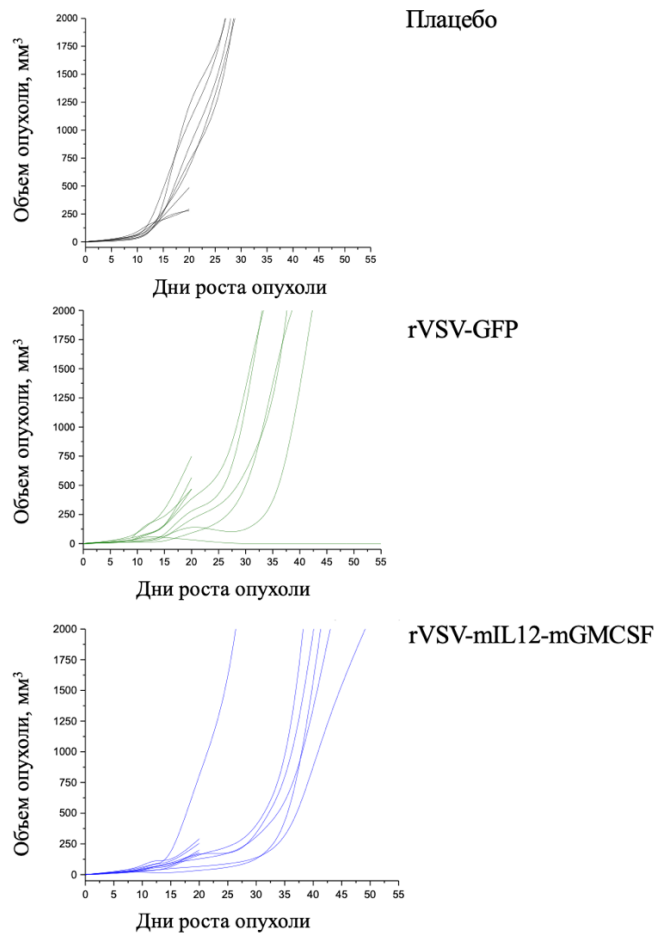


Рисунок 3.20 – Динамика индивидуальных кривых роста СТ26.WT-индуцированной в группах экспериментальных животных

Несмотря на прогрессирование опухоли в контрольной группе, медиана выживаемости составила 32,6 дня, в то время как для rVSV-mIL12-mGMCSF-группы медиана выживаемости составила 42,7 дня (Рисунок 3.21). Анализ выживаемости показал, что одно животное в rVSV-GFP группе оставалось жизнеспособным к концу эксперимента, в то время как остальные животные погибли на более ранних стадиях наблюдения. Примечательно, в повторном эксперименте нет полной сходимости полученных результатов. Однако эти различия были продемонстрированы на небольших выборках экспериментальных животных, а тенденции изменений (индекс ТРО, межгрупповая вариабельность у животных с rVSV-mIL12-mGMCSF-терапией) повторяли предыдущий эксперимент.

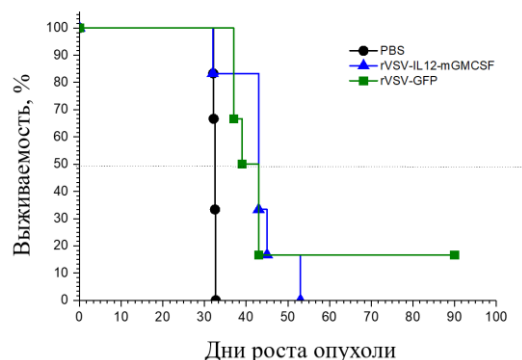


Рисунок 3.21 – Анализ выживаемости животных с СТ26.WT-индуцированной опухолью

Статистический анализ по результатам второго эксперимента показал устойчивое снижение размера опухоли, начиная с 15-го дня после привития клеток опухоли (p -value < 0,0001) и до 27 дня (p -value < 0,05) у мышей, получивших препарат rVSV-mIL12-mGMCSF. При этом терапия rVSV-GFP также обеспечила снижение размера опухоли, однако различия были менее выражены (на 15-й и 2-й дни p -value < 0,005).

Возможно, значительная индивидуальная вариабельность размеров опухолей у мышей, получавших rVSV-mIL12-mGMCSF, может быть связана как с индивидуальной реакцией на слитую молекулу, так и с ее отдельными компонентами (mIL12 и mGMCSF). Точный ответ на этот вопрос требует изучения терапевтической эффективности мономерных вариантов mIL12 и mGMCSF. Кроме того, в других исследованиях была продемонстрирована гетерогенность вирусной восприимчивости в субпопуляциях клеток СТ26.WT в связи с приобретенной агрессивностью клонов клеток [296], что тоже может вносить вклад в наблюдаемые эффекты, если рассматривать процесс опухолеобразования с точки зрения микроэволюции. Однако описанные результаты, полученные на сингенной модели рака толстой кишки СТ26.WT, воодушевляющие. Значимую роль в этом сыграли следующие параметры: объем опухоли в первый день лечения ($\sim 30 \text{ мм}^3$), кратность введения вируса, большая перmissивность клеток к заражению rVSV и более низкая агрессивность этой раковой модели.

3.11. Влияние внутриопухолевого введения rVSV на активацию иммунного ответа

Для оценки влияния rVSV-терапии на локальный иммунитет мы изучали инфильтрацию опухолей различными популяциями лимфоидных и миелоидных клеток, используя поверхностные маркеры CD45, CD3, CD4, CD8a, CD44, F4/80, CD206, CD11b и CD11c на 11-й и 20-й дни после привития опухолевых клеток. Наиболее интересными были потенциальные

изменения популяционных отношений в пределах лейкоцитарной фракции, определяемой по экспрессии CD45, и степень инфильтрации опухоли различными популяциями иммунных клеток. Интересно, что не были обнаружены статистически значимые различия между изучаемыми группами в общем количестве CD45+ клеток и в количестве CD4+ и CD8+ Т-клеток в обе временные точки (Рисунки 3.22 и 3.23).

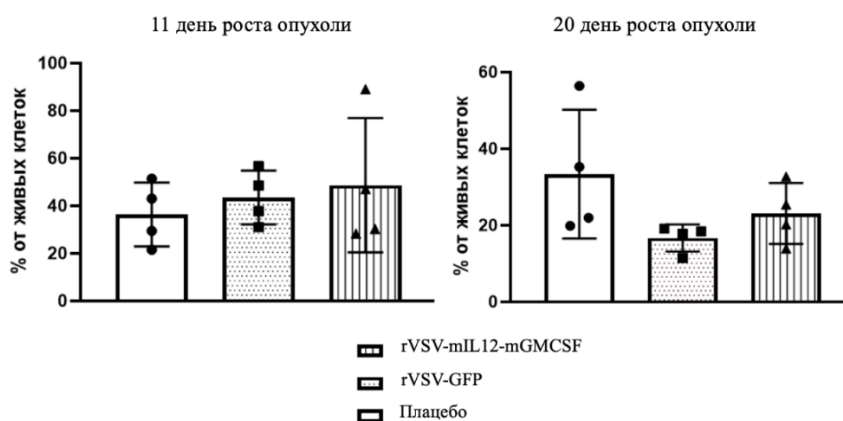


Рисунок 3.22 – Анализ количества CD45+ клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11-й и 20-й дни роста опухоли у животных экспериментальных групп

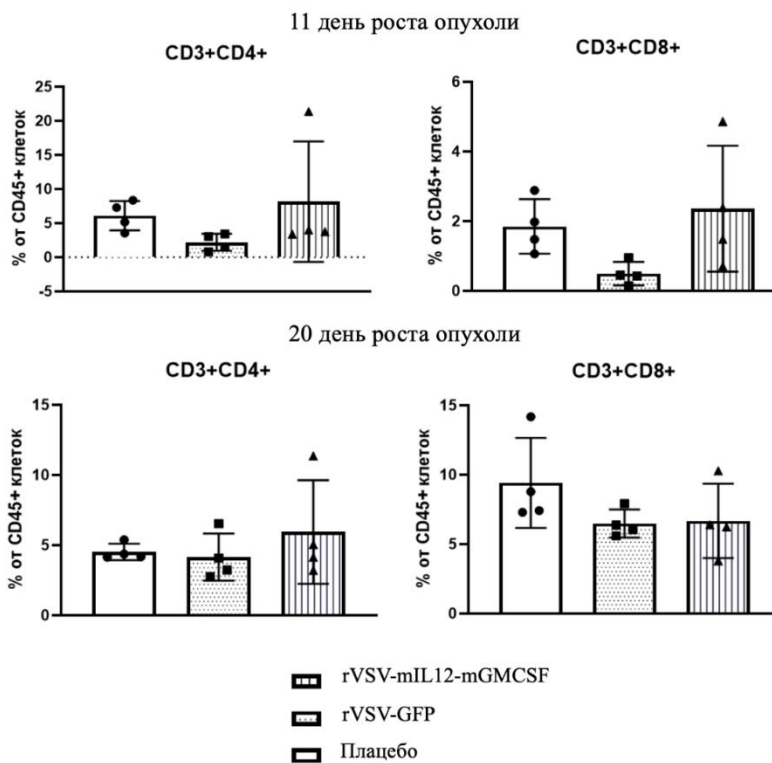


Рисунок 3.23 – Анализ количества CD4+ и CD8+ Т-клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11-й и 20-й дни роста опухоли у животных экспериментальных групп

Однако стоит отметить, что мы обнаружили значительное снижение содержания редких и плохо изученных CD3+CD4-CD8- и CD3+CD4+CD8+ популяций Т-клеток с фенотипами на 11-й день для группы животных, получавших rVSV-GFP-терапию. Эти субпопуляции по некоторым данным могут быть связаны с проопухолевым действием (Рисунок 3.24) [297–299].

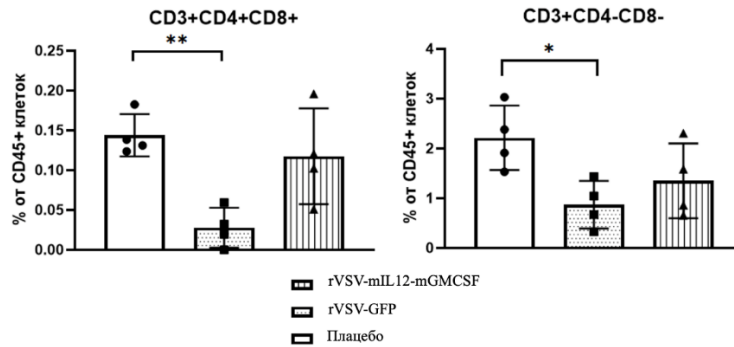


Рисунок 3.24 – Анализ количества CD3+CD4-CD8- и CD3+CD4+CD8+ Т-клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11-й день роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

Анализ фракции миелоидных лейкоцитов внутри CD45+ субпопуляции также не выявил достоверных различий между группами по содержанию популяций M1- (F4/80+CD206-) и M2-подобных (F4/80+CD206+) макрофагов (Рисунок 3.25).

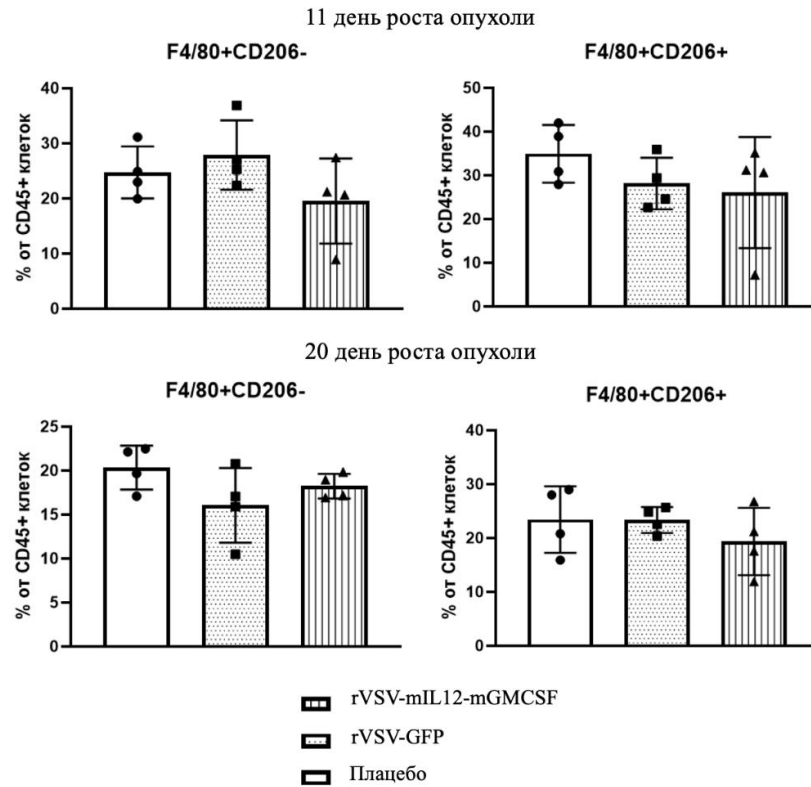


Рисунок 3.25 – Анализ количества F4/80+CD206⁻ и F4/80+CD206⁺ клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11-й и 20-й дни роста опухоли у животных экспериментальных групп

При этом наблюдались некоторые флуктуации относительного содержания минорных субпопуляций. Так на 11-й день происходило повышение содержания клеток с фенотипом инфильтрирующих моноцитов (F4/80-CD206-CD11b+CD11c⁻) и снижение содержания активированных DC с высоким миграционным потенциалом (F4/80-CD206-CD11b-CD11c⁺) в группе rVSV-GFP (Рисунок 3.26).

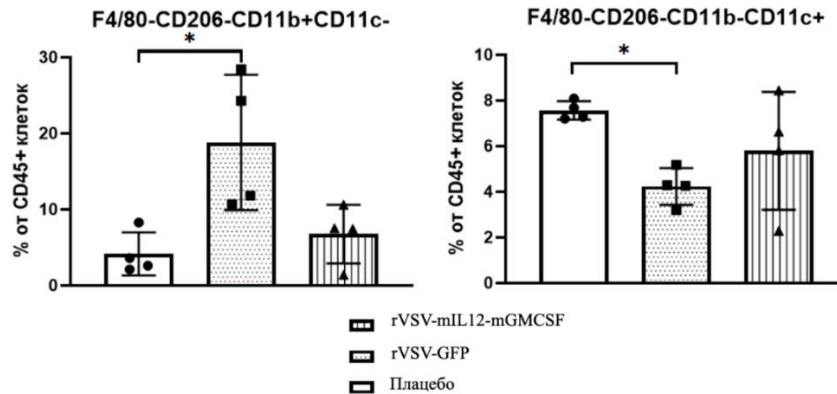


Рисунок 3.26 – Анализ количества F4/80-CD206-CD11b+CD11c⁻ и F4/80-CD206-CD11b-CD11c⁺ клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11-й день роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value < 0.05, (**) p -value < 0.01, (***) p -value < 0.001, (****) p -value < 0.0001, not significant (ns) – p -value > 0.05

Дополнительно было оценено содержание лимфоидных и миелоидных популяций относительно всех живых клеток, полученных из опухоли (Приложение Б). Под воздействием терапии rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF к 20-му дню происходило значительное снижение инфильтрации опухолей M2-подобными макрофагами с фенотипом F4/80+CD206+, при этом количество M1-подобных макрофагов с фенотипом F4/80+CD206- статистически значимо не менялось (Рисунок 3.27).

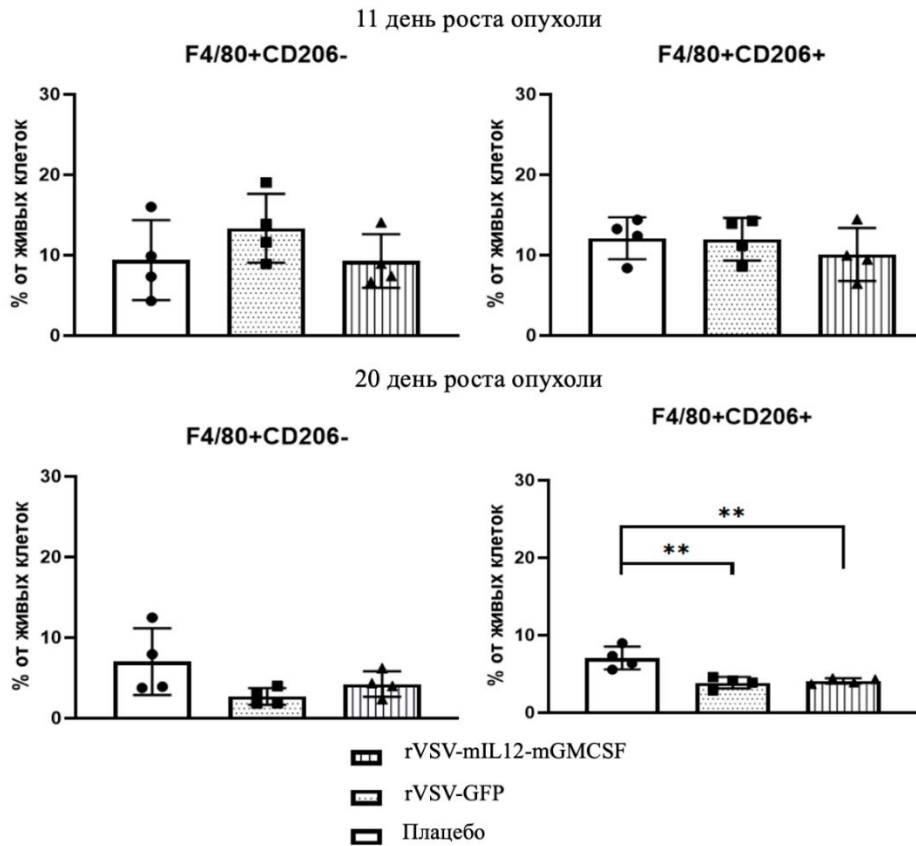
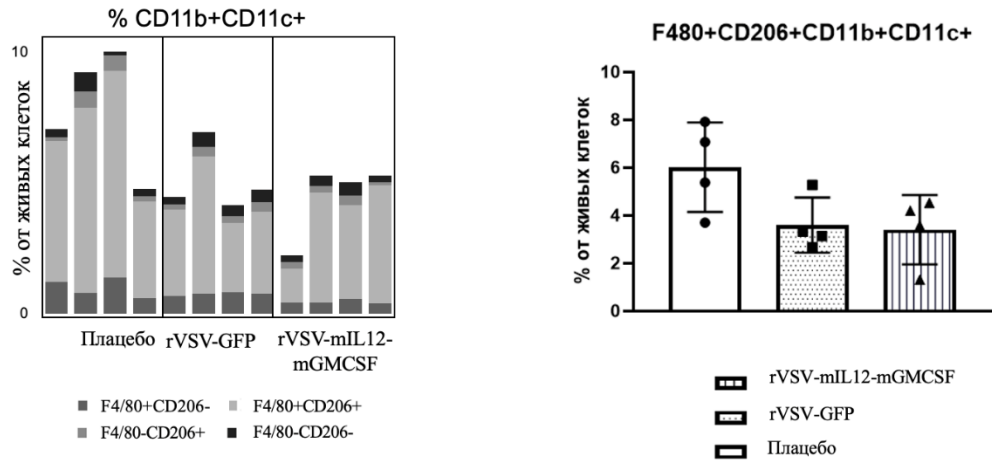


Рисунок 3.27 – Анализ количества F4/80+CD206- и F4/80+CD206+ клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11-й и 20-й дни роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

Кроме того, к 11-му дню наблюдалась тенденция (p -value < 0,09) к снижению, а к 20-му происходило значительное (p -value < 0,01) снижение содержания ключевых супрессорных субпопуляций опухоль-ассоциированных макрофагов (tumor-associated macrophages, TAM) с фенотипами F4/80+CD206+CD11b+CD11c+ и F4/80+CD206+CD11b+CD11c- (Рисунки 3.28 и 3.29). При этом разницы по содержанию M1-подобных F4/80+CD206- макрофагов между тестируемыми и контрольной группами не наблюдалось.

11 день роста опухоли



20 день роста опухоли

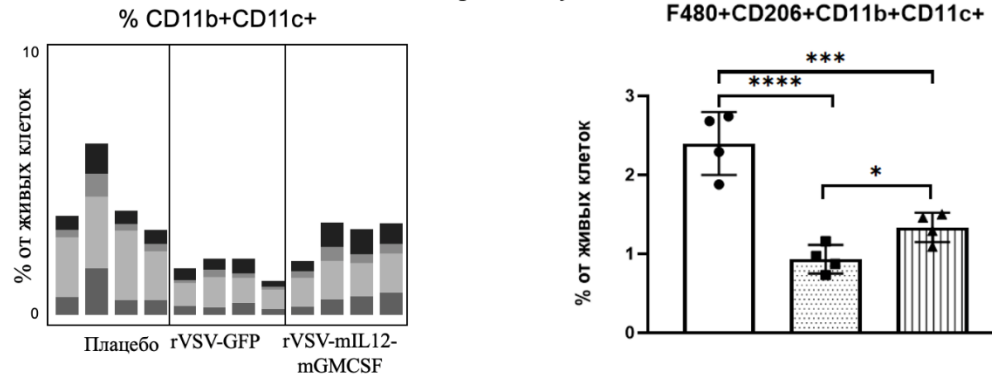


Рисунок 3.28 – Анализ количества F4/80+CD206+CD11b+CD11c+ клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11-й и 20-й дни роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value < 0.05, (**) p -value < 0.01, (***) p -value < 0.001, (****) p -value < 0.0001, not significant (ns) – p -value > 0.05

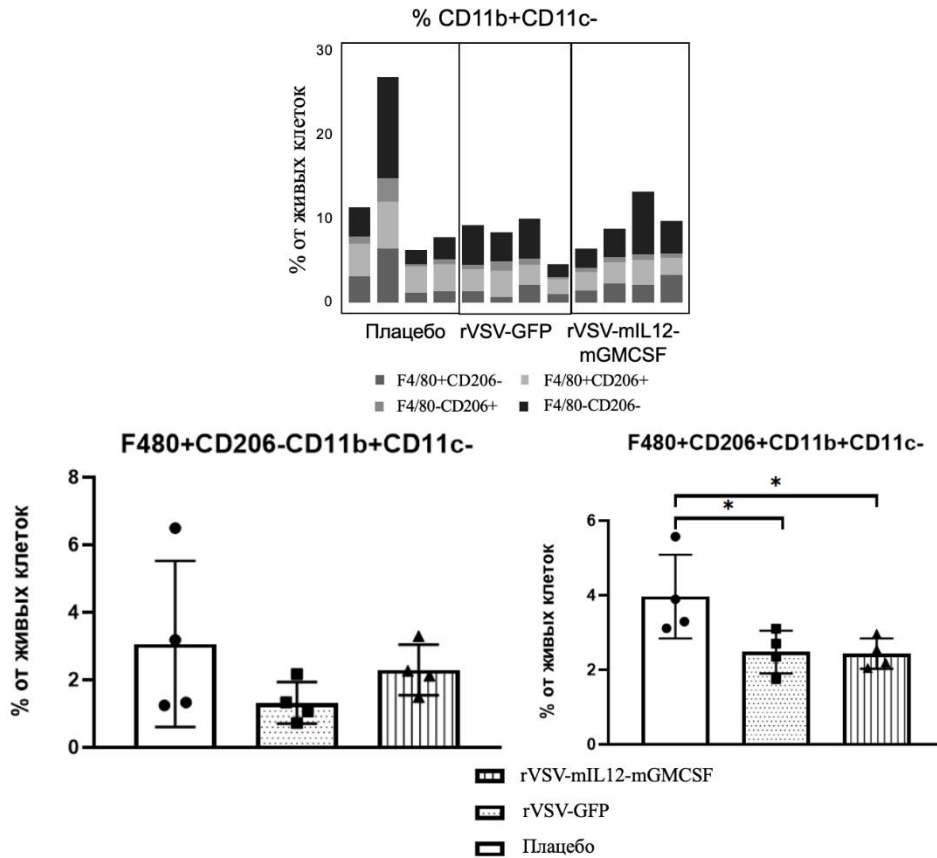


Рисунок 3.29 – Анализ количества F4/80+CD206+CD11b+CD11c- и F4/80+CD206-CD11b+CD11c- клеток, инфильтрирующих опухоль, на 20-й день роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

Фенотипирование иммунных клеток в опухолевом узле проводилось на 11-й и 20-й дни роста опухоли для того, чтобы определить различия, происходящие во время лечения. Так, на 11-й день роста опухоли прошло 2 дня после первой инъекции rVSV, а на 20 день – 5 дней после последней инъекции. На первой точке забора мы ожидали увидеть ранний иммунный ответ, в случае ОВ представленный активацией PAMP- и DAMP-механизмов, а на 20-й день предполагали наличие эффектов адаптивного иммунитета, направленного на элиминацию опухоли ввиду активного высвобождения ТАА, опосредованного применением rVSV. Таким образом, две кардинально разные фазы развития опухоли и ее взаимодействия с иммунной системой планировалось изучить.

Полученные данные демонстрируют, что терапия на основе rVSV оказывает избирательное влияние на инфильтрацию опухоли клетками иммунной системы. Отсутствие различий в общем количестве лейкоцитов и среди основных субпопуляций Т-клеток, по-видимому, связано с тем, что на данном этапе развития опухоли не происходит активного привлечения лимфоцитов из циркулирующих иммунных клеток [300]. Повышенная

инфильтрация опухолей активированными моноцитами под влиянием rVSV на 11-й день с последующим снижением содержания зрелых активированных DC с высоким миграционным потенциалом на 20-й день, по-видимому, отражает динамику развития адаптивного иммунного ответа [300, 301]. Так на 11-й день опухолевого развития происходит рекрутинг, созревание и активация DC, а на 20-й день активированные DC мигрируют из опухоли в лимфатические узлы для формирования иммунного ответа.

Наблюдаемое под воздействием rVSV снижение содержания популяций дважды негативных (CD3+CD4-CD8-) и дважды позитивных (CD3+CD4+CD8+) Т-клеток может способствовать развитию противоопухолевого иммунитета. Эти популяции малоизучены, однако в настоящее время накапливаются данные об их проопухолевом действии и способности подавлять иммунный ответ через секрецию противовоспалительных цитокинов [297–299].

Наиболее значимые изменения происходили в миелоидном компартменте. По-видимому, они определяют клинически значимые эффекты увеличения продолжительности жизни в группах терапии rVSV. Снижение численности иммуносупрессивных MDSC- и M2-подобных популяций, а также субпопуляций TAM с фенотипами F4/80+CD206+CD11b+CD11c+/- к 20-му дню свидетельствует о перестройке опухолевого микроокружения и значительном ослаблении иммуносупрессии [302–304]. Поскольку TAM играют ключевую роль в поддержании опухолевого роста, обеспечивают ангиогенез и метастазирование, снижение их содержания напрямую способствует ограничению прогрессии опухоли [303]. Примечательно, что под влиянием rVSV не происходило сопутствующего истощения M1-подобной популяции. Возможно, это свидетельствует о переключении баланса M1/M2 в пользу противоопухолевого фенотипа, что улучшает общий прогноз и отражается в лучшей выживаемости и продолжительности жизни мышей в группах rVSV [305, 306].

В совокупности эти данные демонстрируют потенциал rVSV-терапии как средства, способного влиять на иммунный ландшафт опухоли и ослаблять центральные механизмы уклонения опухолей от иммунного ответа, что указывает на перспективность применения rVSV не только как онколитических агентов, но и как модуляторов ТЕМ.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Терапия, основанная на ОВ, является многообещающим подходом к лечению онкологических заболеваний, особенно тех, которые устойчивы к традиционным методам лечения. С момента открытия онколитических свойств некоторых вирусов были использованы различные стратегии их улучшения с целью повышения онкоселективности и усиления подавленного иммунного ответа организма-хозяина против рака. Из-за сильной нейротоксичности WT-VSV, его безопасность повышается путем различных модификаций [307]. К настоящему времени для создания безопасной и эффективной терапии на основе VSV было использовано множество подходов, затрагивающих как оптимизацию природных белков вируса, так и внесение чужеродных фрагментов [61]. Однако стоит отметить, что вставка дополнительных последовательностей в геном вируса, особенно достаточно крупных, имеет тенденцию снижать вирусную активность обратно пропорционально размеру вставки [308, 309]. Предварительный скрининг *in vitro* rVSV на различных типах раковых клеток чрезвычайно важен для будущего успеха доклинических исследований, поскольку восприимчивость к лизису, опосредованному VSV, различается между разными клетками и является одной из ключевых характеристик успешности ОВ терапии. Гетерогенность малигнизированных клеток наблюдается не только между перевиваемыми клеточными линиями, но и между пациентами, эти различия часто определяют терапевтический эффект. На основании результатов *in vitro* тестов, представленных в этом исследовании, было проведено ранжирование раковых клеток мыши по чувствительности к VSV. Так клетки линии B16-F10 и SCC VII были наименее подвержены вирусному онколизу, в то время как клетки линий LL/2 и H22 демонстрировали высокую чувствительность. Однако в будущих исследованиях важно учитывать, что одна используемая в работе раковая линия не дает исчерпывающих знаний о чувствительности всех раковых линий выбранной нозологии, поэтому важно проанализировать различные линии одного рака к ОВ, чтобы спрогнозировать его будущую терапевтическую эффективность.

В работе продемонстрировано, что клеточная линия B16-F10 не обладает высокой чувствительностью к VSV-опосредованной гибели. Поэтому мы сначала сравнили способность двух версий rVSV (wtM и dM51) к лизису в трех линиях опухолевых клеток: меланоме B16-F10, карциноме легких Льюиса LL/2 и плоскоклеточной карциноме SCC VII. Как и ожидалось, rVSV-wtM-GFP оказался более репликативно активным на всех трех линиях по сравнению с rVSV-dM51-GFP, причем клетки LL/2 были гораздо более чувствительны к лизису, чем B16-F10. С точки зрения чистой эффективности, rVSV-wtM-GFP выглядит предпочтительнее, и наши данные *in vitro* это подтверждают. Однако вариант dM51 важен для клинического применения:

именно мутантные по белку М версии VSV доминируют в исследованиях на людях, поскольку они уже подтвердили свою безопасность. Настоящее исследование также показало, что здоровые mMSC были еще более восприимчивы к онколизу VSV, чем клетки LL/2. Это интересное и важное открытие, поскольку было показано, что MSC в TME стимулируют пролиферацию раковых клеток, подавляют апоптоз и способствуют метастазированию, а их очевидная восприимчивость к VSV-опосредованному онколизу в результате дефектов в их реакции на IFN I типа может помочь противодействовать их негативному воздействию на опухолевую прогрессию.

Проникновение вируса в клетку напрямую зависит от репертуара рецепторов. Согласно данным литературы, основные ворота входа VSV в клетку это LDLR [279]. Ряд работ подтверждает связь LDLR с карциномами: показано увеличение количества этих рецепторов в активно делящихся клетках и подавление роста опухоли у мышей с нокаутом LDLR [280]. Кроме того, VSV, как и некоторые другие оболочечные вирусы, взаимодействует с EGFR [281]. Гиперэкспрессия EGFR коррелирует с метастазированием, химиорезистентностью и низкой выживаемостью при раке молочной железы, некоторых типах меланомы, плоскоклеточном раке головы и шеи, а также немелкоклеточном раке легкого [284, 285]. Как ранее показали Лайет и соавторы, уровень EGFR в клетках LL/2 значительно выше, чем в B16-F10, что может объяснять их повышенную чувствительность к VSV-онколизу [286]. В ряде исследований повышенную экспрессию EGFR при злокачественных новообразованиях использовали для повышения селективности ОБ, более того, есть данные, что активация сигнального пути EGFR позволяет обходить IFN-зависимый противовирусный ответ, обеспечивая репликацию вируса [291, 310].

Анализ экспрессии панели генов методом кПЦР в ответ на VSV-инфекцию клеточных линий меланомы B16-F10 и карциномы легких Льюиса LL/2 *in vitro* проводился для поиска причин наблюдаемых различий в вирусном онколизе методом прижизненной визуализации. Противовирусный ответ клетки начинается с распознавания вирусной РНК с помощью сенсора RIG-I, после чего запускается каскад, приводящий к выработке IFN- β , который индуцирует экспрессию гена *IFIT1*. Белок IFIT1 блокирует трансляцию вирусных белков, тем самым подавляя репликацию вируса. Наши данные кПЦР показали, что в клетках B16-F10 уровни *IFN- β 1* и *p53* ниже, а уровни *IFIT1*, *RIG-I* и *N-кадгерина* выше, чем в клетках LL/2. Такие изменения в экспрессии генов клеток B16-F10 указывают на то, что эти клетки пытаются избежать противовирусного ответа, ингибируя передачу сигналов, несмотря на первоначальное распознавание RIG-I опасности, которую представляет VSV. Напротив, в клетках LL/2 мы видим высокий уровень *IFN- β 1* (в 9 раз выше, чем в B16-F10), но низкие уровни *RIG-I* и *IFIT1*. Это указывает на подавленный или нефункциональный противовирусный ответ и, следовательно, на сниженную способность блокировать размножение вируса. Иными словами, в LL/2 проходит

активный синтез мРНК IFN- β , но это не связано с активацией RIG-I (вероятно, работают другие механизмы), а низкие уровни RIG-I и IFIT1 означают, что клетки не распознают ОВ или не реагируют на него должным образом.

Помимо высоких уровней экспрессии IFIT1 и RIG-I, в клетках меланомы обнаружено более чем четырехкратное повышение транскриптов N-кадгерина. Это может свидетельствовать о том, что IFIT1 стимулирует метастазирование, в таком случае ингибиторы IFIT1 могли бы улучшить терапевтические результаты. Однако необходимо учитывать несколько факторов, ограничивающих интерпретацию полученных данных: выбранная временная точка анализа, отражающая раннюю стадию заражения клетки, и тот факт, что уровни мРНК часто не коррелируют напрямую с уровнями и активностью белков, а также то, что условия эксперимента *in vitro* не воспроизводят взаимодействие вируса с раковыми и иммунными клетками в реальном ТМЕ. Для того, чтобы сделать обоснованные выводы на основе кПЦР-данных, необходимо дополнительное тщательное исследование с использованием вестерн-блоттинга, иммуногистохимии и других релевантных методов, подтверждающие наблюдаемые изменения уровней экспрессии на белковом уровне.

Наши исследования *in vivo* вопреки полученным *in vitro* данным показали, что использование rVSV-mIL12-mGMCSF повышало эффективность терапии по сравнению с вирусом без иммуностимулирующей нагрузки и приводило к статистически значимому уменьшению объема опухоли и увеличению продолжительности жизни мышей с меланомой B16-F10 по сравнению с контролем. Однако ввиду неудовлетворенности полученными результатами на данной модели (максимальное значение индекса ТРО ~40%), мы переключились на сингенную модель CT26.WT, отличающуюся по своей чувствительности к VSV. Более того, мы скорректировали дизайн исследования, увеличив количество инъекций, уменьшив количество имплантируемых опухолевых клеток и скорректировав размер опухоли на момент введения первой дозы препарата. Терапия rVSV-mIL12-mGMCSF привела к долгосрочной выживаемости 37,5% животных (против 12,5% в группе rVSV-GFP) и достижению ТРО 80%. Хотя по результатам фенотипирования иммунных клеток опухоли общее количество CD45+ и основных субпопуляций Т-клеток не изменилось, были обнаружены сдвиги в миелоидном компартменте для обеих групп rVSV. По всей видимости, эти изменения происходили ввиду описанной ранее способности VSV инфицировать M2-подобные макрофаги [311]. Однако наблюдаемое снижение содержания M2-подобных макрофагов важно для перепрограммирования ТМЕ, ибо содержание этой субпопуляции иммунных клеток наряду с MDSC ассоциировано с негативным прогнозом. Полученные данные свидетельствуют о преимущественном эффекте прямого онколиза (отсутствие статистически достоверных различий между группами лечения rVSV), а не иммуностимулирующей вставки. Поэтому для уточнения и расширения понимания наблюдаемой

противоопухолевой эффективности rVSV-mIL12-mGMCSF необходимы дополнительные эксперименты *in vivo*.

Описанные в работе результаты были получены с использованием иммуностимулирующих факторов мыши. Это было сделано потому, что апробация терапии на сингенных моделях значительно дешевле, чем на моделях ксенотрансплантата. К тому же система «иммунитет мыши-цитокины мыши» позволяет моделировать релевантные иммунные ответы, которые наиболее приближены к реальной терапии на людях. Мышиный и человеческий IL-12 являются гетеродимерными цитокинами, обладающими значительной структурной гомологией, но отличающимися видовой специфичностью. Примечательно, что mIL12 действует как на мышинные, так и на человеческие клетки, при этом человеческий IL12 активирует только человеческие клетки [312]. Эта видовая специфичность определяется субъединицей p35 гетеродимера IL12, поскольку аминокислотные последовательности мышинового и человеческого p35 идентичны на 60%, а последовательности p40 – на 70%. Для GMCSF наблюдается схожая история: человеческий и мышинный GMCSF гомологичны на 56%. Таким образом, хотя использование мышинных вариантов цитокинов в сингенных моделях дает ценную информацию о механизмах противоопухолевого ответа *in vivo*, прямого переноса этих данных в модели с человеческими клетками и факторами быть не может. Перекрестная специфичность mIL12 в отношении человеческих клеток позволяет предположить, что некоторые эффекты, наблюдаемые на мышинных моделях, могут частично воспроизводиться и в человеческом микроокружении. Однако различия в аминокислотных последовательностях и потенциальные отличия в аффинности связывания с рецепторами означают, что для клинической трансляции необходимы дополнительные исследования с использованием человеческих клеток и человеческих вариантов цитокинов. Тем не менее, сингенные модели остаются незаменимым инструментом для предварительной оценки эффективности и безопасности иммунотерапевтических подходов на основе VSV, а полученные на них результаты следует рассматривать как обоснование для последующих испытаний на человеческих моделях и, в конечном счете, в клинических исследованиях.

Представленные результаты подтверждают, что разработка ОБ с использованием нескольких подходов к увеличению их терапевтической активности (добавление иммуномодулирующих трансгенов, внесение мутаций в белки вируса и т.д.) является перспективной стратегией, сочетающей прямую литическую активность с ремоделированием ТМЕ. Вероятно, для дальнейшего увеличения эффективности использования rVSV необходима оптимизация доз и режимов введения, а также комбинация с другими видами терапии (химио-, радио-, иммунотерапия) для преодоления гетерогенности опухолей и достижения устойчивых ответов у пациентов с агрессивными злокачественными новообразованиями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты подтверждают, что терапия на основе VSV является перспективным подходом к лечению злокачественных новообразований, особенно резистентных к стандартной терапии. rVSV-mIL12-mGMCSF продемонстрировал умеренную эффективность на сингенной модели меланомы B16-F10 и более высокую на сингенной модели рака толстой кишки CT26.WT. При этом дизайн *in vivo* экспериментов отличался как в количестве имплантируемых клеток, так и в схеме лечения. Положительные результаты, полученные на модели CT26.WT с улучшенным экспериментальным дизайном, вселяют надежду на повышение эффективности используемой терапии даже на агрессивной модели меланомы B16-F10 при условии использования новой терапевтической схемы. Основной вклад в терапевтический эффект, по-видимому, вносит прямой онколиз. Аспект экспрессии иммуностимулирующей вставки в TME, к сожалению, остался неизученным, но с ним может быть связано отсутствие статистически значимых изменений в количестве основных популяций иммунных клеток в опухоли.

Важным ограничителем трансляции результатов в опыт клинических исследований является видовая специфичность использованных мышинных цитокинов: несмотря на частичную перекрестную активность mIL12 в отношении человеческих клеток, для клинического применения необходимо подтверждение эффекта человеческих вариантов цитокинов. Тем не менее, сингенные мышинные модели остаются адекватным инструментом для предварительной оценки эффективности и безопасности терапии.

Комбинированные стратегии модификации VSV (мутации в белке M, добавление трансгенов, оценка противовирусного ответа клеток опухоли) являются многообещающими, но требуют дальнейшей оптимизации доз, режимов введения и комбинации с другими видами терапии для преодоления гетерогенности новообразований и достижения устойчивых клинических ответов.

ВЫВОДЫ

1. С помощью методов обратной генетики был получен новый рекомбинантный вирус rVSV-mIL12-mGMCSF, кодирующий слитую молекулу mIL12-mGMCSF, где функциональная активность обоих компонентов иммуностимулирующей молекулы подтверждена *in vitro*.
2. rVSV-mIL12-mGMCSF проявлял меньшую онколитическую активность, чем rVSV-GFP *in vitro*, при этом наиболее перmissive к вирусному заражению были клетки гепатомы мыши H22, тогда как клетки плоскоклеточной карциномы SCC VII оставались наименее чувствительными.
3. rVSV-mIL12-mGMCSF на сингенных моделях B16-F10 и CT26.WT обладал более высоким противоопухолевым действием в сравнении с rVSV-GFP, однако статистически значимых различий в размерах опухолей и выживаемости животных между группами, получавшими rVSV не было.
4. По результатам фенотипирования иммунных клеток опухолей, индуцированных приживлением клеток CT26.WT, не обнаружено статистически значимых различий в представленности субпопуляций у животных, получавших rVSV-mIL12-mGMCSF или rVSV-GFP, при этом в экспериментальных группах наблюдалось понижение количества иммуносупрессивных M2-подобных макрофагов (F4/80+CD206+).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brown J.S., Amend S.R., Austin R.H., Gatenby R.A., Hammarlund E.U., Pienta K.J. Updating the definition of cancer // *Molecular Cancer Research*. — 2023. — Т. 21. — № 11. — С. 1142-1147.
2. Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer // *Journal of experimental & clinical cancer research*. — 2019. — Т. 38. — № 1. — С. 255.
3. Debela D.T., Muzazu S.G., Heraro K.D., Ndalama M.T., Mesele B.W., Haile D.C., Kitui S.K., Manyazewal T. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives // *SAGE open medicine*. — 2021. — Т. 9. — С. 20503121211034366.
4. Lin D., Shen Y., Liang T. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions // *Signal transduction and targeted therapy*. — 2023. — Т. 8. — № 1. — С. 156.
5. Bommareddy P.K., Shettigar M., Kaufman H.L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy // *Nature Reviews Immunology*. — 2018. — Т. 18. — № 8. — С. 498-513.
6. Hu H., Xia Q., Hu J., Wang S. Oncolytic Viruses for the Treatment of Bladder Cancer: Advances, Challenges, and Prospects // *Journal of Clinical Medicine*. — 2022. — Т. 11. — № 23.
7. Zinovieva M., Ryapolova A., Karabelsky A., Minskaia E. Oncolytic vesicular stomatitis virus: optimisation strategies for Anti-Cancer therapies // *Frontiers in Bioscience-Landmark*. — 2024. — Т. 29. — № 11. — С. 374.
8. Weinberg R.A., Weinberg R.A. *The biology of cancer*. — WW Norton & Company, 2006.
9. Parsa N. Environmental factors inducing human cancers // *Iranian journal of public health*. — 2012. — Т. 41. — № 11. — С. 1.
10. Benavente S., Sánchez-García A., Naches S., LLeonart M.E., Lorente J. Therapy-induced modulation of the tumor microenvironment: new opportunities for cancer therapies // *Frontiers in oncology*. — 2020. — Т. 10. — С. 582884.
11. Giraldo N.A., Sanchez-Salas R., Peske J.D., Vano Y., Becht E., Petitprez F., Validire P., Ingels A., Cathelineau X., Fridman W.H. The clinical role of the TME in solid cancer // *British journal of cancer*. — 2019. — Т. 120. — № 1. — С. 45-53.
12. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy // *Nature Reviews Cancer*. — 2004. — Т. 4. — № 1. — С. 11-22.
13. Dieu-Nosjean M., Giraldo N.A., Kaplon H., Germain C., Fridman W.H., Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers // *Immunological reviews*. — 2016. — Т. 271. — № 1. — С. 260-275.
14. Morvan M.G., Lanier L.L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks // *Nature Reviews Cancer*. — 2016. — Т. 16. — № 1. — С. 7-19.

15. Haabeth O.A.W., Lorvik K.B., Hammarström C., Donaldson I.M., Haraldsen G., Bogen B., Corthay A. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer // *Nature communications*. — 2011. — T. 2. — № 1. — C. 240.
16. Josefowicz S.Z., Lu L.-F., Rudensky A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function // *Annual review of immunology*. — 2012. — T. 30. — C. 531-564.
17. Mantovani A., Marchesi F., Malesci A., Laghi L., Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology // *Nature reviews Clinical oncology*. — 2017. — T. 14. — № 7. — C. 399-416.
18. Cui Y., Sun Y., Li D., Zhang Y., Zhang Y., Cao D., Cao X. The crosstalk among the physical tumor microenvironment and the effects of glucose deprivation on tumors in the past decade // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. — 2023. — T. 11. — C. 1275543.
19. Singh L., Nair L., Kumar D., Arora M.K., Bajaj S., Gadewar M., Mishra S.S., Rath S.K., Dubey A.K., Kaithwas G. Hypoxia induced lactate acidosis modulates tumor microenvironment and lipid reprogramming to sustain the cancer cell survival // *Frontiers in Oncology*. — 2023. — T. 13. — C. 1034205.
20. Volovat S.R., Scripcariu D.V., Vasilache I.A., Stolniceanu C.R., Volovat C., Augustin I.G., Volovat C.C., Ostafe M.-R., Andreea-Voichița S.-G., Bejusca-Vieriu T. Oncolytic virotherapy: a new paradigm in cancer immunotherapy // *International journal of molecular sciences*. — 2024. — T. 25. — № 2. — C. 1180.
21. Beck J.D., Reidenbach D., Salomon N., Sahin U., Türeci Ö., Vormehr M., Kranz L.M. mRNA therapeutics in cancer immunotherapy // *Molecular cancer*. — 2021. — T. 20. — № 1. — C. 69.
22. Liebl K., Aschenbrenner I., Schiller L., Kerle A., Protzer U., Feige M.J. Modeling of the human interleukin 12:receptor complex allows to engineer attenuated cytokine variants // *Molecular Immunology*. — 2023. — T. 162. — C. 38-44.
23. Hewitt S.L., Bailey D., Zielinski J., Apte A., Musenge F., Karp R., Burke S., Garcon F., Mishra A., Gurumurthy S. Intratumoral IL12 mRNA therapy promotes TH1 transformation of the tumor microenvironment // *Clinical Cancer Research*. — 2020. — T. 26. — № 23. — C. 6284-6298.
24. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: a double-edged sword in cancer immunotherapy // *Frontiers in immunology*. — 2022. — T. 13. — C. 901277.
25. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., Mulligan R.C. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1993. — T. 90. — № 8. — C. 3539-3543.

26. Tarhini A.A., Joshi I., Garner F. Sargramostim and immune checkpoint inhibitors: combinatorial therapeutic studies in metastatic melanoma // *Immunotherapy*. — 2021. — T. 13. — № 12. — C. 1011-1029.
27. Donina S., Strele I., Proboka G., Auziņš J., Alberts P., Jonsson B., Venskus D., Muceniece A. Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study // *Melanoma Research*. — 2015. — T. 25. — № 5. — C. 421-426.
28. Liang M. Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China // *Current cancer drug targets*. — 2018. — T. 18. — № 2. — C. 171-176.
29. Liu K. Clinical considerations for oncolytic viral therapies: a regulatory perspective // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. — 2017. — T. 101. — № 5. — C. 580-582.
30. Frampton J.E. Teserpaturev/G47Δ: First Approval: JE Frampton // *BioDrugs*. — 2022. — T. 36. — № 5. — C. 667-672.
31. Narayan V.M., Meeks J.J., Jakobsen J.S., Shore N.D., Sant G.R., Konety B.R. Mechanism of action of nadofaragene firadenovec-vncg // *Frontiers in Oncology*. — 2024. — T. 14. — C. 1359725.
32. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 12 (1): 31–46. — 2022.
33. Bell J., McFadden G. Viruses for tumor therapy // *Cell Host and Microbe*. — 2014. — T. 15. — № 3. — C. 260-265.
34. Vähä-Koskela M.J., Heikkilä J.E., Hinkkanen A.E. Oncolytic viruses in cancer therapy // *Cancer letters*. — 2007. — T. 254. — № 2. — C. 178-216.
35. Kaufman H.L., Kohlhapp F.J., Zloza A. Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2015. — T. 14. — № 9. — C. 642-662.
36. Zheng M., Huang J., Tong A., Yang H. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances // *Molecular Therapy - Oncolytics*. — 2019. — Vol. 15. — *Oncolytic Viruses for Cancer Therapy*. — P. 234-247.
37. Bell J., McFadden G. Viruses for Tumor Therapy // *Cell Host & Microbe*. — 2014. — Vol. 15. — No. 3. — P. 260-265.
38. Bell J., McFadden G. Viruses for tumor therapy // *Cell host & microbe*. — 2014. — T. 15. — № 3. — C. 260-265.
39. Hu H., Xia Q., Hu J., Wang S. Oncolytic viruses for the treatment of bladder cancer: advances, challenges, and prospects // *Journal of Clinical Medicine*. — 2022. — T. 11. — № 23. — C. 6997.
40. Touchefeu Y., Vassaux G., Harrington K.J. Oncolytic viruses in radiation oncology // *Radiotherapy and Oncology*. — 2011. — T. 99. — № 3. — C. 262-270.

41. 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. — T. 13. — № 7. — C. 1271.
42. Wertz G.W., Moudy R., Ball L.A. Adding genes to the RNA genome of vesicular stomatitis virus: positional effects on stability of expression // *Journal of virology*. — 2002. — T. 76. — № 15. — C. 7642-7650.
43. Walker P.J., Firth C., Widen S.G., Blasdel K.R., Guzman H., Wood T.G., Paradkar P.N., Holmes E.C., Tesh R.B., Vasilakis N. Evolution of Genome Size and Complexity in the Rhabdoviridae // *PLoS Pathogens*. — 2015. — T. 11. — № 2.
44. Keene J.D., Thornton B.J., Emerson S.U. Sequence-specific contacts between the RNA polymerase of vesicular stomatitis virus and the leader RNA gene. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1981. — T. 78. — № 10. — C. 6191-6195.
45. Rose J., Schubert M. Rhabdovirus genomes and their products // *The rhabdoviruses*. — Springer, 1987. — C. 129-166.
46. Abraham G., Banerjee A.K. Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1976. — T. 73. — № 5. — C. 1504-1508.
47. Iverson L.E., Rose J.K. Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription // *Cell*. — 1981. — T. 23. — № 2. — C. 477-484.
48. Eshaghi S., Niegowski D., Kohl A., Molina D.M., Lesley S.A., Nordlund P. Crystal structure of a divalent metal ion transporter CorA at 2.9 angstrom resolution // *Science*. — 2006. — T. 313. — № 5785. — C. 354-357.
49. Nikolic J., Belot L., Raux H., Legrand P., Gaudin Y., Albertini A. Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein // *Nature communications*. — 2018. — T. 9. — № 1. — C. 1029.
50. Johannsdottir H.K., Mancini R., Kartenbeck J., Amato L., Helenius A. Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry // *Journal of virology*. — 2009. — T. 83. — № 1. — C. 440-453.
51. Cureton D.K., Massol R.H., Saffarian S., Kirchhausen T.L., Whelan S.P.J. Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization // *PLoS Pathogens*. — 2009. — T. 5. — № 4.
52. Banerjee A.K., Barik S. Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA // *virology*. — 1992. — T. 188. — № 2. — C. 417-428.
53. Newcomb W.W., Brown J. Role of the vesicular stomatitis virus matrix protein in maintaining the viral nucleocapsid in the condensed form found in native virions // *Journal of virology*. — 1981. — T. 39. — № 1. — C. 295-299.

54. Liang B., Li Z., Jenni S., Rahmeh A.A., Morin B.M., Grant T., Grigorieff N., Harrison S.C., Whelan S.P.J. Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy // *Cell*. — 2015. — T. 162. — № 2. — C. 314-327.
55. Arnheiter H., Davis N.L., Wertz G., Schubert M., Lazzarini R.A. Role of the nucleocapsid protein in regulating vesicular stomatitis virus RNA synthesis // *Cell*. — 1985. — T. 41. — № 1. — C. 259-267.
56. Blondel D., Harmison G.G., Schubert M. Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus // *Journal of virology*. — 1990. — T. 64. — № 4. — C. 1716-1725.
57. Cytopathogenesis and Inhibition of Host Gene Expression by RNA Viruses : / *рук.* Lyles D.S., 2000. — 709-724 c.
58. Lichty B.D., Power A.T., Stojdl D.F., Bell J.C. Vesicular stomatitis virus: Re-inventing the bullet // *Trends in Molecular Medicine*. — 2004. — T. 10. — № 5. — C. 210-216.
59. Felt S.A., Grdzlishvili V.Z. Recent advances in vesicular stomatitis virus-based oncolytic virotherapy: a 5-year update // *Journal of General Virology*. — 2017. — T. 98. — № 12. — C. 2895-2911.
60. Geisbert T.W., Feldmann H. Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections // *The Journal of infectious diseases*. — 2011. — T. 204. — № suppl_3. — C. S1075-S1081.
61. Melzer M.K., Lopez-Martinez A., Altomonte J. Oncolytic vesicular stomatitis virus as a viro-immunotherapy: defeating cancer with a “hammer” and “anvil” // *Biomedicines*. — 2017. — T. 5. — № 1. — C. 8.
62. Petersen J.M., Her L.-S., Varvel V., Lund E., Dahlberg J.E. The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes // *Molecular and cellular biology*. — 2000. — T. 20. — № 22. — C. 8590-8601.
63. Johnson J.E., Nasar F., Coleman J.W., Price R.E., Javadian A., Draper K., Lee M., Reilly P.A., Clarke D.K., Hendry R.M. Neurovirulence properties of recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates // *Virology*. — 2007. — T. 360. — № 1. — C. 36-49.
64. Shinozaki K., Ebert O., Suriawinata A., Thung S.N., Woo S.L.C. Prophylactic Alpha Interferon Treatment Increases the Therapeutic Index of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Virotherapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma in Immune-Competent Rats // *Journal of Virology*. — 2005. — T. 79. — № 21. — C. 13705-13713.
65. Wu L., Huang T., Meseck M., Altomonte J., Ebert O., Shinozaki K., García-Sastre A., Fallon J., Mandeli J., Woo S.L. rVSV (MΔ51)-M3 is an effective and safe oncolytic virus for cancer therapy // *Human gene therapy*. — 2008. — T. 19. — № 6. — C. 635-647.

66. Blackham A.U., Northrup S.A., Willingham M., Sirintrapun J., Russell G.B., Lyles D.S., Stewart IV J.H. Molecular determinants of susceptibility to oncolytic vesicular stomatitis virus in pancreatic adenocarcinoma // *Journal of Surgical Research*. — 2014. — T. 187. — № 2. — C. 412-426.
67. Stewart Jh., Ahmed M., Northrup S., Willingham M., Lyles D. Vesicular stomatitis virus as a treatment for colorectal cancer // *Cancer gene therapy*. — 2011. — T. 18. — № 12. — C. 837-849.
68. Lun X., Senger D.L., Alain T., Oprea A., Parato K., Stojdl D., Lichty B., Power A., Johnston R.N., Hamilton M. Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV Δ M51) on multifocal and invasive gliomas // *Journal of the National Cancer Institute*. — 2006. — T. 98. — № 21. — C. 1546-1557.
69. Hastie E., Grdzlishvili V.Z. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer // *Journal of General Virology*. — 2012. — T. 93. — № 12. — C. 2529-2545.
70. Nagalo B.M., Breton C.A., Zhou Y., Arora M., Bogenberger J.M., Barro O., Steele M.B., Jenks N.J., Baker A.T., Duda D.G. Oncolytic virus with attributes of vesicular stomatitis virus and measles virus in hepatobiliary and pancreatic cancers // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2020. — T. 18. — C. 546-555.
71. Hanauer J.D., Rengstl B., Kleinlützum D., Reul J., Pfeiffer A., Friedel T., Schneider I.C., Newrzela S., Hansmann M.-L., Buchholz C.J. CD30-targeted oncolytic viruses as novel therapeutic approach against classical Hodgkin lymphoma // *Oncotarget*. — 2018. — T. 9. — № 16. — C. 12971.
72. Muik A., Kneiske I., Werbizki M., Wilflingseder D., Giroglou T., Ebert O., Kraft A., Dietrich U., Zimmer G., Momma S. Pseudotyping vesicular stomatitis virus with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins enhances infectivity for glioma cells and minimizes neurotropism // *Journal of virology*. — 2011. — T. 85. — № 11. — C. 5679-5684.
73. Muik A., Stubbert L.J., Jahedi R.Z., Geib Y., Kimpel J., Dold C., Tober R., Volk A., Klein S., Dietrich U., Yadollahi B., Falls T., Miletic H., Stojdl D., Bell J.C., Von Laer D. Re-engineering vesicular stomatitis virus to abrogate neurotoxicity, circumvent humoral immunity, and enhance oncolytic potency // *Cancer Research*. — 2014. — T. 74. — № 13. — C. 3567-3578.
74. Dold C., Rodriguez Urbiola C., Wollmann G., Egerer L., Muik A., Bellmann L., Fiegl H., Marth C., Kimpel J., Von Laer D. Application of interferon modulators to overcome partial resistance of human ovarian cancers to VSV-GP oncolytic viral therapy // *Molecular Therapy Oncolytics*. — 2016. — T. 3. — C. 16021-16021.
75. Kimpel J., Urbiola C., Koske I., Tober R., Banki Z., Wollmann G., Von Laer D. The oncolytic virus VSV-GP is effective against malignant melanoma // *Viruses*. — 2018. — T. 10. — № 3.

76. Urbiola C., Santer F.R., Petersson M., van der Pluijm G., Horninger W., Erlmann P., Wollmann G., Kimpel J., Culig Z., von Laer D. Oncolytic activity of the rhabdovirus VSV-GP against prostate cancer // *International journal of cancer*. — 2018. — T. 143. — № 7. — C. 1786-1796.
77. Bergman I., Whitaker-Dowling P., Gao Y., Griffin J.A., Watkins S.C. Vesicular stomatitis virus expressing a chimeric Sindbis glycoprotein containing an Fc antibody binding domain targets to Her2/neu overexpressing breast cancer cells // *Virology*. — 2003. — T. 316. — № 2. — C. 337-347.
78. Betancourt D., Ramos J.C., Barber G.N. Retargeting oncolytic vesicular stomatitis virus to human T-cell lymphotropic virus type 1-associated adult T-cell leukemia // *Journal of virology*. — 2015. — T. 89. — № 23. — C. 11786-11800.
79. Janelle V., Brassard F., Lapierre P., Lamarre A., Poliquin L. Mutations in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect cytopathogenicity: potential for oncolytic virotherapy // *Journal of virology*. — 2011. — T. 85. — № 13. — C. 6513-6520.
80. Janelle V., Langlois M.P., Lapierre P., Charpentier T., Poliquin L., Lamarre A. The Strength of the T Cell Response Against a Surrogate Tumor Antigen Induced by Oncolytic VSV Therapy Does Not Correlate with Tumor Control // *Molecular Therapy*. — 2014. — T. 22. — № 6. — C. 1198-1210.
81. Wollmann G., Rogulin V., Simon I., Rose J.K., van den Pol A.N. Some attenuated variants of vesicular stomatitis virus show enhanced oncolytic activity against human glioblastoma cells relative to normal brain cells // *Journal of virology*. — 2010. — T. 84. — № 3. — C. 1563-1573.
82. Publicover J., Ramsburg E., Rose J.K. Characterization of nonpathogenic, live, viral vaccine vectors inducing potent cellular immune responses // *Journal of virology*. — 2004. — T. 78. — № 17. — C. 9317-9324.
83. Ramsburg E., Publicover J., Buonocore L., Poholek A., Robek M., Palin A., Rose J.K. A vesicular stomatitis virus recombinant expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces enhanced T-cell responses and is highly attenuated for replication in animals // *Journal of virology*. — 2005. — T. 79. — № 24. — C. 15043-15053.
84. van den Pol A.N., Davis J.N. Highly Attenuated Recombinant Vesicular Stomatitis Virus VSV-12'GFP Displays Immunogenic and Oncolytic Activity // *Journal of Virology*. — 2013. — T. 87. — № 2. — C. 1019-1034.
85. van den Pol A.N., Davis J.N. Highly attenuated recombinant vesicular stomatitis virus VSV-12' GFP displays immunogenic and oncolytic activity // *Journal of virology*. — 2013. — T. 87. — № 2. — C. 1019-1034.
86. Wertz G.W., Perepelitsa V.P., Ball L.A. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1998. — T. 95. — № 7. — C. 3501-3506.

87. Jenks N., Myers R., Greiner S.M., Thompson J., Mader E.K., Greenslade A., Griesmann G.E., Federspiel M.J., Rakela J., Borad M.J. Safety studies on intrahepatic or intratumoral injection of oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- β in rodents and nonhuman primates // *Human gene therapy*. — 2010. — T. 21. — № 4. — C. 451-462.
88. Vesicular stomatitis virus expressing interferon- β is oncolytic and promotes antitumor immune responses in a syngeneic murine model of non-small cell lung cancer : / *pyk.* Patel M.R., Jacobson B.A., Ji Y., Drees J., Tang S., Xiong K., Wang H., Prigge J.E., Dash A.S., Kratzke A.K., Mesev E., Etchison R., Federspiel M.J., Russell S.J., Kratzke R.A.
89. Naik S., Russell S.J. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways // *Expert opinion on biological therapy*. — 2009. — T. 9. — № 9. — C. 1163-1176.
90. Westcott M.M., Liu J., Rajani K., D'Agostino Jr R., Lyles D.S., Porosnicu M. Interferon beta and interferon alpha 2a differentially protect head and neck cancer cells from vesicular stomatitis virus-induced oncolysis // *Journal of virology*. — 2015. — T. 89. — № 15. — C. 7944-7954.
91. Liu Y.-P., Steele M.B., Suksanpaisan L., Federspiel M.J., Russell S.J., Peng K.W., Bakkum-Gamez J.N. Oncolytic measles and vesicular stomatitis virotherapy for endometrial cancer // *Gynecologic oncology*. — 2014. — T. 132. — № 1. — C. 194-202.
92. Patel M.R., Jacobson B.A., Ji Y., Drees J., Tang S., Xiong K., Wang H., Prigge J.E., Dash A.S., Kratzke A.K. Vesicular stomatitis virus expressing interferon- β is oncolytic and promotes antitumor immune responses in a syngeneic murine model of non-small cell lung cancer // *Oncotarget*. — 2015. — T. 6. — № 32. — C. 33165.
93. Kurisetty V.V., Heiber J., Myers R., Pereira G.S., Goodwin J.W., Federspiel M.J., Russell S.J., Peng K.W., Barber G., Merchan J.R. Preclinical safety and activity of recombinant VSV-IFN- β in an immunocompetent model of squamous cell carcinoma of the head and neck // *Head & neck*. — 2014. — T. 36. — № 11. — C. 1619-1627.
94. Miller A., Russell S.J. The use of the NIS reporter gene for optimizing oncolytic virotherapy // *Expert opinion on biological therapy*. — 2016. — T. 16. — № 1. — C. 15-32.
95. Yarde D.N., Naik S., Nace R.A., Peng K.-W., Federspiel M.J., Russell S.J. Meningeal myeloma deposits adversely impact the therapeutic index of an oncolytic VSV // *Cancer gene therapy*. — 2013. — T. 20. — № 11. — C. 616-621.
96. Twumasi-Boateng K., Pettigrew J.L., Kwok Y.E., Bell J.C., Nelson B.H. Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy // *Nature Reviews Cancer*. — 2018. — T. 18. — № 7. — C. 419-432.
97. Mastrangelo M.J., Maguire H.C., Eisenlohr L.C., Laughlin C.E., Monken C.E., McCue P.A., Kovatich A.J., Lattime E.C. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in

patients with cutaneous melanoma // *Cancer gene therapy*. — 1999. — T. 6. — № 5. — C. 409-422.

98. Lun X., Chan J., Zhou H., Sun B., Kelly J.J.P., Stechishin O.O., Bell J.C., Parato K., Hu K., Vaillant D., Wang J., Liu T.C., Breitbach C., Kirn D., Senger D.L., Forsyth P.A. Efficacy and safety/toxicity study of recombinant vaccinia virus JX-594 in two immunocompetent animal models of glioma // *Molecular Therapy*. — 2010. — T. 18. — № 11. — C. 1927-1936.

99. Kaufman H.L., Kim D.W., DeRaffele G., Mitcham J., Coffin R.S., Kim-Schulze S. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma // *Annals of surgical oncology*. — 2010. — T. 17. — № 3. — C. 718-730.

100. Bristol J.A., Zhu M., Ji H., Mina M., Xie Y., Clarke L., Forry-Schaudies S., Ennist D.L. In vitro and in vivo activities of an oncolytic adenoviral vector designed to express GM-CSF // *Molecular Therapy*. — 2003. — T. 7. — № 6. — C. 755-764.

101. Rangsitratkul C., Lawson C., Bernier-Godon F., Niavarani S.-R., Boudaud M., Rouleau S., Gladu-Corbin A.-O., Surendran A., Ekindi-Ndongo N., Koti M. Intravesical immunotherapy with a GM-CSF armed oncolytic vesicular stomatitis virus improves outcome in bladder cancer // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2022. — T. 24. — C. 507-521.

102. Heiniö C., Havunen R., Santos J., de Lint K., Cervera-Carrascon V., Kanerva A., Hemminki A. TNF α and IL2 encoding oncolytic adenovirus activates pathogen and danger-associated immunological signaling // *Cells*. — 2020. — T. 9. — № 4. — C. 798.

103. Beug S.T., Pichette S.J., St-Jean M., Holbrook J., Walker D.E., LaCasse E.C., Korneluk R.G. Combination of IAP antagonists and TNF- α -armed oncolytic viruses induce tumor vascular shutdown and tumor regression // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2018. — T. 10. — C. 28-39.

104. Heiniö C., Havunen R., Santos J., de Lint K., Cervera-Carrascon V., Kanerva A., Hemminki A. TNF α and IL2 Encoding Oncolytic Adenovirus Activates Pathogen and Danger-Associated Immunological Signaling // *Cells*. — 2020. — T. 9. — № 4.

105. Quixabeira D.C., Zafar S., Santos J.M., Cervera-Carrascon V., Havunen R., Kudling T.V., Basnet S., Anttila M., Kanerva A., Hemminki A. Oncolytic adenovirus coding for a variant interleukin 2 (vIL-2) cytokine re-programs the tumor microenvironment and confers enhanced tumor control // *Frontiers in Immunology*. — 2021. — T. 12. — C. 674400.

106. Carew J.F., Kooby D.A., Halterman M.W., Kim S.-H., Federoff H.J., Fong Y. A novel approach to cancer therapy using an oncolytic herpes virus to package amplicons containing cytokine genes // *Molecular Therapy*. — 2001. — T. 4. — № 3. — C. 250-256.

107. Liu Z., Ge Y., Wang H., Ma C., Feist M., Ju S., Guo Z.S., Bartlett D.L. Modifying the cancer-immune set point using vaccinia virus expressing re-designed interleukin-2 // *Nature Communications*. — 2018. — T. 9. — № 1. — C. 4682.
108. Choi K.-J., Zhang S.-N., Choi I.-K., Kim J.-S., Yun C.-O. Strengthening of antitumor immune memory and prevention of thymic atrophy mediated by adenovirus expressing IL-12 and GM-CSF // *Gene therapy*. — 2012. — T. 19. — № 7. — C. 711-723.
109. Veinalde R., Grossardt C., Hartmann L., Bourgeois-Daigneault M.-C., Bell J.C., Jäger D., von Kalle C., Ungerechts G., Engeland C.E. Oncolytic measles virus encoding interleukin-12 mediates potent antitumor effects through T cell activation // *Oncoimmunology*. — 2017. — T. 6. — № 4. — C. e1285992.
110. Ren G., Tian G., Liu Y., He J., Gao X., Yu Y., Liu X., Zhang X., Sun T., Liu S. Recombinant Newcastle disease virus encoding IL-12 and/or IL-2 as potential candidate for hepatoma carcinoma therapy // *Technology in cancer research & treatment*. — 2016. — T. 15. — № 5. — C. NP83-NP94.
111. Granot T., Venticinque L., Tseng J.-C., Meruelo D. Activation of cytotoxic and regulatory functions of NK cells by Sindbis viral vectors // *PloS one*. — 2011. — T. 6. — № 6. — C. e20598.
112. Shin E.J., Wanna G.B., Choi B., Aguila III D., Ebert O., Genden E.M., Woo S.L. Interleukin-12 expression enhances vesicular stomatitis virus oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma // *The Laryngoscope*. — 2007. — T. 117. — № 2. — C. 210-214.
113. Deng L., Yang X., Ding Y., Fan J., Peng Y., Xu D., Huang B., Hu Z. Oncolytic therapy with vaccinia virus carrying IL-24 for hepatocellular carcinoma // *Virology journal*. — 2022. — T. 19. — № 1. — C. 44.
114. Yan Y., Li S., Jia T., Du X., Xu Y., Zhao Y., Li L., Liang K., Liang W., Sun H. Combined therapy with CTL cells and oncolytic adenovirus expressing IL-15-induced enhanced antitumor activity // *Tumor Biology*. — 2015. — T. 36. — № 6. — C. 4535-4543.
115. Stephenson K., Barra N., Davies E., Ashkar A., Lichty B. Expressing human interleukin-15 from oncolytic vesicular stomatitis virus improves survival in a murine metastatic colon adenocarcinoma model through the enhancement of anti-tumor immunity // *Cancer gene therapy*. — 2012. — T. 19. — № 4. — C. 238-246.
116. Ino Y., Saeki Y., Fukuhara H., Todo T. Triple combination of oncolytic herpes simplex virus-1 vectors armed with interleukin-12, interleukin-18, or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy // *Clinical cancer research*. — 2006. — T. 12. — № 2. — C. 643-652.
117. Chen T., Ding X., Liao Q., Gao N., Chen Y., Zhao C., Zhang X., Xu J. IL-21 arming potentiates the anti-tumor activity of an oncolytic vaccinia virus in monotherapy and combination therapy // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. — 2021. — T. 9. — № 1. — C. e001647.

118. Chen L., Chen H., Ye J., Ge Y., Wang H., Dai E., Ren J., Liu W., Ma C., Ju S. Intratumoral expression of interleukin 23 variants using oncolytic vaccinia virus elicit potent antitumor effects on multiple tumor models via tumor microenvironment modulation // *Theranostics*. — 2021. — T. 11. — № 14. — C. 6668.
119. Miller J.M., Bidula S.M., Jensen T.M., Reiss C.S. Vesicular stomatitis virus modified with single chain IL-23 exhibits oncolytic activity against tumor cells in vitro and in vivo // *International journal of interferon, cytokine and mediator research*. — 2010. — C. 63-72.
120. Hu H.-J., Liang X., Li H.-L., Du C.-M., Hao J.-L., Wang H.-Y., Gu J.-F., Ni A.-M., Sun L.-Y., Xiao J. The armed oncolytic adenovirus ZD55-IL-24 eradicates melanoma by turning the tumor cells from the self-state into the nonself-state besides direct killing // *Cell Death & Disease*. — 2020. — T. 11. — № 11. — C. 1022.
121. Xu X., Yi C., Yang X., Xu J., Sun Q., Liu Y., Zhao L. Tumor cells modified with newcastle disease virus expressing IL-24 as a cancer vaccine // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2019. — T. 14. — C. 213-221.
122. Wang L.-C.S., Lynn R.C., Cheng G., Alexander E., Kapoor V., Moon E.K., Sun J., Fridlender Z.G., Isaacs S.N., Thorne S.H. Treating tumors with a vaccinia virus expressing IFN β illustrates the complex relationships between oncolytic ability and immunogenicity // *Molecular Therapy*. — 2012. — T. 20. — № 4. — C. 736-748.
123. Wilderman M.J., Sun J., Jassar A.S., Kapoor V., Khan M., Vachani A., Suzuki E., Kinniry P.A., Sterman D.H., Kaiser L.R. Intrapulmonary IFN- β gene therapy using an adenoviral vector is highly effective in a murine orthotopic model of bronchogenic adenocarcinoma of the lung // *Cancer research*. — 2005. — T. 65. — № 18. — C. 8379-8387.
124. Moglan A.M., Albaradie O.A., Alsayegh F.F., Alharbi H.M., Samman Y.M., Jalal M.M., Saeedi N.H., Mahmoud A.B., Alkayyal A.A. Preclinical efficacy of oncolytic VSV-IFN β in treating cancer: A systematic review // *Frontiers in Immunology*. — 2023. — T. 14. — C. 1085940.
125. Fang L., Yuan S., Wang M., Zhang C., Wang X., Li H., Yang J., Li W., Sun N., Zhang Q. Recombinant oncolytic adenovirus armed with CCL5, IL-12, and IFN- γ promotes CAR-T infiltration and proliferation in vivo to eradicate local and distal tumors // *Cell Death Discovery*. — 2023. — T. 9. — № 1. — C. 328.
126. Ye J., Qi W., Liu M., Li Y. The combination of NK and CD8 $^+$ T cells with CCL20/IL15-armed oncolytic adenoviruses enhances the growth suppression of TERT-positive tumor cells // *Cellular immunology*. — 2017. — T. 318. — C. 35-41.
127. Dinsart C., Pervolaraki K., Stroh-Dege A., Lavie M., Ronsse I., Rommelaere J., Van Damme J., Van Raemdonck K., Struyf S. Recombinant parvoviruses armed to deliver CXCL4L1 and CXCL10 are impaired in their antiangiogenic and antitumoral effects in a Kaposi sarcoma tumor model due to the

chemokines' interference with the virus cycle // *Human gene therapy*. — 2017. — T. 28. — № 3. — C. 295-306.

128. Li X., Lu M., Yuan M., Ye J., Zhang W., Xu L., Wu X., Hui B., Yang Y., Wei B. CXCL10-armed oncolytic adenovirus promotes tumor-infiltrating T-cell chemotaxis to enhance anti-PD-1 therapy // *Oncoimmunology*. — 2022. — T. 11. — № 1. — C. 2118210.

129. Eckert E.C., Nace R.A., Tonne J.M., Evgin L., Vile R.G., Russell S.J. Generation of a tumor-specific chemokine gradient using oncolytic vesicular stomatitis virus encoding CXCL9 // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2020. — T. 16. — C. 63-74.

130. von Roemeling C.A., Patel J.A., Carpenter S.L., Yegorov O., Yang C., Bhatia A., Doonan B.P., Russell R., Trivedi V.S., Klippel K. Adeno-associated virus delivered CXCL9 sensitizes glioblastoma to anti-PD-1 immune checkpoint blockade // *Nature Communications*. — 2024. — T. 15. — № 1. — C. 5871.

131. Tamura S., Tazawa H., Hori N., Li Y., Yamada M., Kikuchi S., Kuroda S., Urata Y., Kagawa S., Fujiwara T. p53-armed oncolytic adenovirus induces autophagy and apoptosis in KRAS and BRAF-mutant colorectal cancer cells // *PloS one*. — 2023. — T. 18. — № 11. — C. e0294491.

132. An Y., Liu T., He J., Wu H., Chen R., Liu Y., Wu Y., Bai Y., Guo X., Zheng Q. Recombinant Newcastle disease virus expressing P53 demonstrates promising antitumor efficiency in hepatoma model // *Journal of biomedical science*. — 2016. — T. 23. — № 1. — C. 55.

133. Heiber J.F., Barber G.N. Vesicular stomatitis virus expressing tumor suppressor p53 is a highly attenuated, potent oncolytic agent // *Journal of virology*. — 2011. — T. 85. — № 20. — C. 10440-10450.

134. Russell L., Swanner J., Jaime-Ramirez A.C., Wang Y., Sprague A., Banasavadi-Siddegowda Y., Yoo J.Y., Sizemore G.M., Kladney R., Zhang J. PTEN expression by an oncolytic herpesvirus directs T-cell mediated tumor clearance // *Nature communications*. — 2018. — T. 9. — № 1. — C. 5006.

135. Ding M., Cao X., Xu H., Fan J., Huang H., Yang D., Li Y., Wang J., Li R., Liu X.-Y. Prostate cancer-specific and potent antitumor effect of a DD3-controlled oncolytic virus harboring the PTEN gene // *PLoS One*. — 2012. — T. 7. — № 4. — C. e35153.

136. Gong W., Zhao X., Tang X., Gao L., Sun Y., Ma J. Infectious Recombinant Senecavirus A Expressing p16INK4A Protein // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — T. 24. — № 7. — C. 6139.

137. Zhang R., Zhang X., Ma B., Xiao B., Huang F., Huang P., Ying C., Liu T., Wang Y. Enhanced antitumor effect of combining TRAIL and MnSOD mediated by CEA-controlled oncolytic adenovirus in lung cancer // *Cancer Gene Therapy*. — 2016. — T. 23. — № 6. — C. 168-177.

138. Wohlfahrt M.E., Beard B.C., Lieber A., Kiem H.P. A capsid-modified, conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL leads to enhanced cancer cell killing in human glioblastoma models // *Cancer Research*. — 2007. — T. 67. — № 18. — C. 8783-8790.
139. Wu Y., He J., Geng J., An Y., Ye X., Yan S., Yu Q., Yin J., Zhang Z., Li D. Recombinant Newcastle disease virus expressing human TRAIL as a potential candidate for hepatoma therapy // *European Journal of Pharmacology*. — 2017. — T. 802. — C. 85-92.
140. Li W., Turaga R.C., Li X., Sharma M., Enadi Z., Tompkins S.N.D., Hardy K.C., Mishra F., Tsao J., Liu Z. Overexpression of smac by an armed vesicular stomatitis virus overcomes tumor resistance // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2019. — T. 14. — C. 188-195.
141. Xiao T., Fan J.K., Huang H.L., Gu J.F., Li L.-Y., Liu X.Y. VEGI-armed oncolytic adenovirus inhibits tumor neovascularization and directly induces mitochondria-mediated cancer cell apoptosis // *Cell research*. — 2010. — T. 20. — № 3. — C. 367-378.
142. Kang Y.-A., Shin H.-C., Yoo J.Y., Kim J.-H., Kim J.-S., Yun C.-O. Novel cancer antiangiotherapy using the VEGF promoter-targeted artificial zinc-finger protein and oncolytic adenovirus // *Molecular Therapy*. — 2008. — T. 16. — № 6. — C. 1033-1040.
143. Hutzler S., Erbar S., Jabulowsky R.A., Hanauer J.R., Schnotz J.H., Beissert T., Bodmer B.S., Eberle R., Boller K., Klamp T. Antigen-specific oncolytic MV-based tumor vaccines through presentation of selected tumor-associated antigens on infected cells or virus-like particles // *Scientific Reports*. — 2017. — T. 7. — № 1. — C. 16892.
144. Hasegawa K., Pham L., O'Connor M.K., Federspiel M.J., Russell S.J., Peng K.-W. Dual therapy of ovarian cancer using measles viruses expressing carcinoembryonic antigen and sodium iodide symporter // *Clinical cancer research*. — 2006. — T. 12. — № 6. — C. 1868-1875.
145. Yang Y., Xue S., Lu Z., Xiao F., Yin Y., Zhang Q., Wu C., Wang H., Wang L. Antitumor effects of oncolytic adenovirus armed with PSA-IZ-CD40L fusion gene against prostate cancer // *Gene therapy*. — 2014. — T. 21. — № 8. — C. 723-731.
146. Bridle B.W., Stephenson K.B., Boudreau J.E., Koshy S., Kazdhan N., Pullenayegum E., Brunellière J., Bramson J.L., Lichty B.D., Wan Y. Potentiating cancer immunotherapy using an oncolytic virus // *Molecular Therapy*. — 2010. — T. 18. — № 8. — C. 1430-1439.
147. Kleinlützum D., Hanauer J.D., Muik A., Hanschmann K.-M., Kays S.-K., Ayala-Breton C., Peng K.-W., Mühlebach M.D., Abel T., Buchholz C.J. Enhancing the oncolytic activity of CD133-targeted measles virus: receptor extension or chimerism with vesicular stomatitis virus are most effective // *Frontiers in oncology*. — 2017. — T. 7. — C. 127.
148. Sato-Dahlman M., Miura Y., Huang J.L., Hajeri P., Jacobsen K., Davydova J., Yamamoto M. CD133-targeted oncolytic adenovirus demonstrates anti-tumor effect in colorectal cancer // *Oncotarget*. — 2017. — T. 8. — № 44. — C. 76044.

149. Wang G., Kang X., Chen K.S., Jehng T., Jones L., Chen J., Huang X.F., Chen S.-Y. An engineered oncolytic virus expressing PD-L1 inhibitors activates tumor neoantigen-specific T cell responses // *Nature communications*. — 2020. — T. 11. — № 1. — C. 1395.
150. Veinalde R., Pidelaserra-Martí G., Moulin C., Jeworowski L.M., Küther L., Buchholz C.J., Jäger D., Ungerechts G., England C.E. Oncolytic measles vaccines encoding PD-1 and PD-L1 checkpoint blocking antibodies to increase tumor-specific T cell memory // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2022. — T. 24. — C. 43-58.
151. Khalique H., Baugh R., Dyer A., Scott E.M., Frost S., Larkin S., Lei-Rossmann J., Seymour L.W. Oncolytic herpesvirus expressing PD-L1 BiTE for cancer therapy: exploiting tumor immune suppression as an opportunity for targeted immunotherapy // *Journal for immunotherapy of cancer*. — 2021. — T. 9. — № 4. — C. e001292.
152. Vitale M., Scialò F., Passariello M., Leggiero E., D'Agostino A., Tripodi L., Gentile L., Bianco A., Castaldo G., Cerullo V. Oncolytic adenoviral vector-mediated expression of an anti-PD-L1-scFv improves anti-tumoral efficacy in a melanoma mouse model // *Frontiers in oncology*. — 2022. — T. 12. — C. 902190.
153. Wu C., Wu M., Liang M., Xiong S., Dong C. A novel oncolytic virus engineered with PD-L1 scFv effectively inhibits tumor growth in a mouse model // *Cellular & molecular immunology*. — 2019. — T. 16. — № 9. — C. 780-782.
154. Tian L., Liu T., Jiang S., Cao Y., Kang K., Su H., Ren G., Wang Z., Xiao W., Li D. Oncolytic Newcastle disease virus expressing the co-stimulator OX40L as immunopotentiator for colorectal cancer therapy // *Gene Therapy*. — 2023. — T. 30. — № 1. — C. 64-74.
155. Ylösmäki E., Ylösmäki L., Fusciello M., Martins B., Ahokas P., Cojoc H., Uoti A., Feola S., Kreutzman A., Ranki T. Characterization of a novel OX40 ligand and CD40 ligand-expressing oncolytic adenovirus used in the PeptiCRAd cancer vaccine platform // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2021. — T. 20. — C. 459-469.
156. Yang H., Lei G., Deng Z., Sun F., Tian Y., Cheng J., Yu H., Li C., Bai C., Zhang S. An Engineered Influenza A Virus Expressing the Co-Stimulator OX40L as an Oncolytic Agent Against Hepatocellular Carcinoma // *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. — 2024. — C. 1-13.
157. Wang R., Chen J., Wang W., Zhao Z., Wang H., Liu S., Li F., Wan Y., Yin J., Wang R. CD40L-armed oncolytic herpes simplex virus suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma by facilitating the tumor microenvironment favorable to cytotoxic T cell response in the syngeneic mouse model // *Journal for immunotherapy of cancer*. — 2022. — T. 10. — № 1. — C. e003809.
158. Parviainen S., Ahonen M., Diaconu I., Hirvinen M., Karttunen Å., Vähä-Koskela M., Hemminki A., Cerullo V. CD40 ligand and tdTomato-armed vaccinia virus for induction of antitumor immune response and tumor imaging // *Gene therapy*. — 2014. — T. 21. — № 2. — C. 195-204.

159. Galivo F., Diaz R.M., Thanarajasingam U., Jevremovic D., Wongthida P., Thompson J., Kottke T., Barber G.N., Melcher A., Vile R.G. Interference of CD40L-mediated tumor immunotherapy by oncolytic vesicular stomatitis virus // *Human gene therapy*. — 2010. — T. 21. — № 4. — C. 439-450.
160. Kudo-Saito C., Hodge J.W., Kwak H., Kim-Schulze S., Schlom J., Kaufman H.L. 4-1BB ligand enhances tumor-specific immunity of poxvirus vaccines // *Vaccine*. — 2006. — T. 24. — № 23. — C. 4975-4986.
161. Islam S.B.U., Lee B., Jiang F., Kim E.-K., Ahn S.C., Hwang T.-H. Engineering and characterization of oncolytic vaccinia virus expressing truncated herpes simplex virus thymidine kinase // *Cancers*. — 2020. — T. 12. — № 1. — C. 228.
162. Zheng F., Xu Y., Qin Y., Yang R., Han J. An oncolytic adenovirus expressing herpes simplex virus-thymidine kinase for targeting cancer therapy: An in vitro evaluation // *Chinese Journal of Cancer Research*. — 2009. — T. 21. — № 2. — C. 90-96.
163. Muñoz-Álvarez K.A., Altomonte J., Laitinen I., Ziegler S., Steiger K., Esposito I., Schmid R.M., Ebert O. PET imaging of oncolytic VSV expressing the mutant HSV-1 thymidine kinase transgene in a preclinical HCC rat model // *Molecular Therapy*. — 2015. — T. 23. — № 4. — C. 728-736.
164. Yamada S., Kuroda T., Fuchs B.C., He X., Supko J.G., Schmitt A., McGinn C.M., Lanuti M., Tanabe K.K. Oncolytic herpes simplex virus expressing yeast cytosine deaminase: relationship between viral replication, transgene expression, prodrug bioactivation // *Cancer gene therapy*. — 2012. — T. 19. — № 3. — C. 160-170.
165. Ding Y., Fan J., Deng L., Huang B., Zhou B. Antitumor efficacy of cytosine deaminase-armed vaccinia virus plus 5-fluorocytosine in colorectal cancers // *Cancer cell international*. — 2020. — T. 20. — № 1. — C. 243.
166. Hartkopf A., Bossow S., Lampe J., Zimmermann M., Taran F.-A., Wallwiener D., Fehm T., Bitzer M., Lauer U. Enhanced killing of ovarian carcinoma using oncolytic measles vaccine virus armed with a yeast cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase // *Gynecologic oncology*. — 2013. — T. 130. — № 2. — C. 362-368.
167. Portsmouth D., Hlavaty J., Renner M. Suicide genes for cancer therapy // *Molecular aspects of medicine*. — 2007. — T. 28. — № 1. — C. 4-41.
168. Braidwood L., Dunn P.D., Hardy S., Evans T.J., Brown S.M. Antitumor activity of a selectively replication competent herpes simplex virus (HSV) with enzyme prodrug therapy // *Anticancer research*. — 2009. — T. 29. — № 6. — C. 2159-2166.
169. Singleton D.C., Mowday A.M., Guise C.P., Syddall S.P., Bai S.Y., Li D., Ashoorzadeh A., Smaill J.B., Wilson W.R., Patterson A.V. Bioreductive prodrug PR-104 improves the tumour distribution and

- titre of the nitroreductase-armed oncolytic adenovirus ONYX-411NTR leading to therapeutic benefit // *Cancer Gene Therapy*. — 2022. — T. 29. — № 7. — C. 1021-1032.
170. Studebaker A.W., Hutzen B.J., Pierson C.R., Haworth K.B., Cripe T.P., Jackson E.M., Leonard J.R. Oncolytic herpes virus rRp450 shows efficacy in orthotopic xenograft group 3/4 medulloblastomas and atypical teratoid/rhabdoid tumors // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2017. — T. 6. — C. 22-30.
171. Goradel N.H., Mohajel N., Malekshahi Z.V., Jahangiri S., Najafi M., Farhood B., Mortezaee K., Negahdari B., Arashkia A. Oncolytic adenovirus: A tool for cancer therapy in combination with other therapeutic approaches // *Journal of cellular physiology*. — 2019. — T. 234. — № 6. — C. 8636-8646.
172. Parry C.M., Simas J.P., Smith V.P., Stewart C.A., Minson A.C., Efstathiou S., Alcami A. A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus // *The Journal of experimental medicine*. — 2000. — T. 191. — № 3. — C. 573-578.
173. Zheng M., Huang J., Tong A., Yang H. Oncolytic viruses for cancer therapy: barriers and recent advances // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2019. — T. 15. — C. 234-247.
174. Zhang R., Zhang X., Ma B., Xiao B., Huang F., Huang P., Ying C., Liu T., Wang Y. Enhanced antitumor effect of combining TRAIL and MnSOD mediated by CEA-controlled oncolytic adenovirus in lung cancer // *Cancer Gene Therapy*. — 2016. — T. 23. — № 6. — C. 168-177.
175. Wu Y., He J., Geng J., An Y., Ye X., Yan S., Yu Q., Yin J., Zhang Z., Li D. Recombinant Newcastle disease virus expressing human TRAIL as a potential candidate for hepatoma therapy // *European Journal of Pharmacology*. — 2017. — T. 802. — C. 85-92.
176. Hutzler S., Erbar S., Jabulowsky R.A., Hanauer J.R.H., Schnotz J.H., Beissert T., Bodmer B.S., Eberle R., Boller K., Klamp T., Sahin U., Mühlebach M.D. Antigen-specific oncolytic MV-based tumor vaccines through presentation of selected tumor-Associated antigens on infected cells or virus-like particles // *Scientific Reports*. — 2017. — T. 7. — № 1.
177. Yang Y.F., Xue S.Y., Lu Z.Z., Xiao F.J., Yin Y., Zhang Q.W., Wu C.T., Wang H., Wang L.S. Antitumor effects of oncolytic adenovirus armed with PSA-IZ-CD40L fusion gene against prostate cancer // *Gene Therapy*. — 2014. — T. 21. — № 8. — C. 723-731.
178. Bridle B.W., Boudreau J.E., Lichty B.D., Brunellière J., Stephenson K., Koshy S., Bramson J.L., Wan Y. Vesicular stomatitis virus as a novel cancer vaccine vector to prime antitumor immunity amenable to rapid boosting with adenovirus // *Molecular Therapy*. — 2009. — T. 17. — № 10. — C. 1814-1821.
179. Schmohl J.U., Vallera D.A. CD133, selectively targeting the root of cancer // *Toxins*. — 2016. — T. 8. — № 6. — C. 165.

180. Jiang H., Rivera-Molina Y., Gomez-Manzano C., Clise-Dwyer K., Bover L., Vence L.M., Yuan Y., Lang F.F., Toniatti C., Hossain M.B. Oncolytic adenovirus and tumor-targeting immune modulatory therapy improve autologous cancer vaccination // *Cancer research*. — 2017. — T. 77. — № 14. — C. 3894-3907.
181. Zamarin D., Wolchok J.D. Potentiation of immunomodulatory antibody therapy with oncolytic viruses for treatment of cancer // *Molecular Therapy Oncolytics*. — 2014. — T. 1. — C. 14004-14004.
182. Lee E.S., Jin S.Y., Kang B.K., Jung Y.-T. Construction of replication-competent oncolytic retroviral vectors expressing R peptide-truncated 10A1 envelope glycoprotein // *Journal of virological methods*. — 2019. — T. 268. — C. 32-36.
183. Foloppe J., Kintz J., Futin N., Findeli A., Cordier P., Schlesinger Y., Hoffmann C., Tosch C., Balloul J.M., Erbs P. Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus // *Gene Therapy*. — 2008. — T. 15. — № 20. — C. 1361-1371.
184. Löhr M., Müller P., Karle P., Stange J., Mitzner S., Jesnowski R., Nizze H., Nebe B., Liebe S., Salmons B., Günzburg W.H. Targeted chemotherapy by intratumour injection of encapsulated cells engineered to produce CYP2B1, an ifosfamide activating cytochrome P450 // *Gene Therapy*. — 1998. — T. 5. — № 8. — C. 1070-1078.
185. Leveille S., Samuel S., Goulet M., Hiscott J. Enhancing VSV oncolytic activity with an improved cytosine deaminase suicide gene strategy // *Cancer gene therapy*. — 2011. — T. 18. — № 6. — C. 435-443.
186. Le Boeuf F., Gebremeskel S., McMullen N., He H., Greenshields A.L., Hoskin D.W., Bell J.C., Johnston B., Pan C., Duncan R. Reovirus FAST protein enhances vesicular stomatitis virus oncolytic virotherapy in primary and metastatic tumor models // *Molecular Therapy-Oncolytics*. — 2017. — T. 6. — C. 80-89.
187. Osaki M., Takeshita F., Sugimoto Y., Kosaka N., Yamamoto Y., Yoshioka Y., Kobayashi E., Yamada T., Kawai A., Inoue T. MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression // *Molecular therapy*. — 2011. — T. 19. — № 6. — C. 1123-1130.
188. Sakuda T., Kubo T., Johan M.P., Furuta T., Sakaguchi T., Adachi N. Oncolytic effect of a recombinant vesicular stomatitis virus encoding a tumor-suppressor microRNA in an osteosarcoma mouse model // *Anticancer Research*. — 2023. — T. 43. — № 3. — C. 1185-1191.
189. Sakuda T., Kubo T., Johan M.P., Furuta T., Sakaguchi T., Adachi N. Development of an oncolytic recombinant vesicular stomatitis virus encoding a tumor-suppressor MicroRNA // *Anticancer Research*. — 2020. — T. 40. — № 11. — C. 6319-6325.

190. Garijo R., Hernández-Alonso P., Rivas C., Diallo J.-S., Sanjuan R. Experimental evolution of an oncolytic vesicular stomatitis virus with increased selectivity for p53-deficient cells // *PLoS One*. — 2014. — T. 9. — № 7. — C. e102365.
191. Wollmann G., Tattersall P., van den Pol A.N. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential // *Journal of virology*. — 2005. — T. 79. — № 10. — C. 6005-6022.
192. Paglino J.C., van den Pol A.N. Vesicular stomatitis virus has extensive oncolytic activity against human sarcomas: rare resistance is overcome by blocking interferon pathways // *Journal of virology*. — 2011. — T. 85. — № 18. — C. 9346-9358.
193. Özduman K., Wollmann G., Piepmeyer J.M., Van Den Pol A.N. Systemic vesicular stomatitis virus selectively destroys multifocal glioma and metastatic carcinoma in brain // *Journal of Neuroscience*. — 2008. — T. 28. — № 8. — C. 1882-1893.
194. Ulasov I.V., Zhu Z.B., Tyler M.A., Han Y., Rivera A.A., Khramtsov A., Curiel D.T., Lesniak M.S. Survivin-driven and fiber-modified oncolytic adenovirus exhibits potent antitumor activity in established intracranial glioma // *Human gene therapy*. — 2007. — T. 18. — № 7. — C. 589-602.
195. Muik A., Dold C., Geiß Y., Volk A., Werbizki M., Dietrich U., von Laer D. Semireplication-competent vesicular stomatitis virus as a novel platform for oncolytic virotherapy // *Journal of molecular medicine*. — 2012. — T. 90. — № 8. — C. 959-970.
196. Fisher K., Stallwood Y., Green N., Ulbrich K., Mautner V., Seymour L. Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies // *Gene therapy*. — 2001. — T. 8. — № 5. — C. 341-348.
197. Tesfay M.Z., Kirk A.C., Hadac E.M., Griesmann G.E., Federspiel M.J., Barber G.N., Henry S.M., Peng K.-W., Russell S.J. PEGylation of vesicular stomatitis virus extends virus persistence in blood circulation of passively immunized mice // *Journal of virology*. — 2013. — T. 87. — № 7. — C. 3752-3759.
198. Batenchuk C., Le Boeuf F., Stubbert L., Falls T., Atkins H., Bell J., Conrad D. Non-replicating rhabdovirus-derived particles (NRRPs) eradicate acute leukemia by direct cytolysis and induction of antitumor immunity // *Blood cancer journal*. — 2013. — T. 3. — № 7. — C. e123-e123.
199. Yang Z., Bruno D.P., Martens C.A., Porcella S.F., Moss B. Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2010. — T. 107. — № 25. — C. 11513-11518.
200. Hsu C.-Y., Huang J.-W., Huang W.-R., Chen I.-C., Chen M.-S., Liao T.-L., Chang Y.-K., Munir M., Liu H.-J. Oncolytic avian reovirus σ A-modulated upregulation of the HIF-1 α /C-myc/glut1 pathway to produce more energy in different cancer cell lines benefiting virus replication // *Viruses*. — 2023. — T. 15. — № 2. — C. 523.

201. Larrieux A., Sanjuán R. Cellular resistance to an oncolytic virus is driven by chronic activation of innate immunity // *Iscience*. — 2023. — T. 26. — № 1.
202. Sakhawat A., Liu Y., Ma L., Muhammad T., Wang S., Zhang L., Cong X., Huang Y. Upregulation of Coxsackie adenovirus receptor sensitizes cisplatin-resistant lung cancer cells to CRAAd-induced inhibition // *Journal of Cancer*. — 2017. — T. 8. — № 8. — C. 1425.
203. Zang J., Zheng M.-H., Cao X.-L., Zhang Y.-Z., Zhang Y.-F., Gao X.-Y., Cao Y., Shi M., Han H., Liang L. Adenovirus infection promotes the formation of glioma stem cells from glioblastoma cells through the TLR9/NEAT1/STAT3 pathway // *Cell Communication and Signaling*. — 2020. — T. 18. — № 1. — C. 135.
204. Zhao J., Wang H., Chen J., Wang C., Gong N., Zhou F., Li X., Cao Y., Zhang H., Wang W. An oncolytic HSV-1 armed with Visfatin enhances antitumor effects by remodeling tumor microenvironment against murine pancreatic cancer // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2024. — T. 718. — C. 149931.
205. Kong D., Yang Z., Li G., Wu Q., Gu Z., Wan D., Zhang Q., Zhang X., Cheng S., Liu B. SIRP α antibody combined with oncolytic virus OH2 protects against tumours by activating innate immunity and reprogramming the tumour immune microenvironment // *BMC medicine*. — 2022. — T. 20. — № 1. — C. 376.
206. Vitiello G.A.F., Ferreira W.A.S., Cordeiro de Lima V.C., Medina T. da S. Antiviral responses in cancer: boosting antitumor immunity through activation of interferon pathway in the tumor microenvironment // *Frontiers in Immunology*. — 2021. — T. 12. — C. 782852.
207. Thompson M.R., Kaminski J.J., Kurt-Jones E.A., Fitzgerald K.A. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection // *Viruses*. — 2011. — T. 3. — № 6. — C. 920.
208. Hervas-Stubbs S., Perez-Gracia J.L., Rouzaut A., Sanmamed M.F., Le Bon A., Melero I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system // *Clinical Cancer Research*. — 2011. — T. 17. — № 9. — C. 2619-2627.
209. Ortiz A., Fuchs S.Y. Anti-metastatic functions of type 1 interferons: Foundation for the adjuvant therapy of cancer // *Cytokine*. — 2017. — T. 89. — C. 4-11.
210. Fuertes M.B., Kacha A.K., Kline J., Woo S.-R., Kranz D.M., Murphy K.M., Gajewski T.F. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells // *Journal of Experimental Medicine*. — 2011. — T. 208. — № 10. — C. 2005-2016.
211. Zhang K., Matsui Y., Hadaschik B.A., Lee C., Jia W., Bell J.C., Fazli L., So A.I., Rennie P.S. Down-regulation of type I interferon receptor sensitizes bladder cancer cells to vesicular stomatitis virus-induced cell death // *International journal of cancer*. — 2010. — T. 127. — № 4. — C. 830-838.
212. Nejatipour Z., Teimoori-Toolabi L., Forooshani R.S., Barough M.S., Farahmand M., Biglari A., Azadmanesh K. Looking for biomarkers in interferon response pathway to predict response to oncolytic

- HSV-1 in breast cancer: An ex vivo study // *Cancer Biomarkers*. — 2023. — T. 38. — № 1. — C. 37-47.
213. Mendoza J.L., Escalante N.K., Jude K.M., Sotolongo Bellon J., Su L., Horton T.M., Tsutsumi N., Berardinelli S.J., Haltiwanger R.S., Piehler J. Structure of the IFN γ receptor complex guides design of biased agonists // *Nature*. — 2019. — T. 567. — № 7746. — C. 56-60.
214. Burke J.D., Young H.A. IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place // *Seminars in immunology*. — Elsevier, 2019. — T. 43. — C. 101280.
215. Ravichandran G., Neumann K., Berkhout L.K., Weidemann S., Langeneckert A.E., Schwinge D., Poch T., Huber S., Schiller B., Hess L.U. Interferon- γ -dependent immune responses contribute to the pathogenesis of sclerosing cholangitis in mice // *Journal of hepatology*. — 2019. — T. 71. — № 4. — C. 773-782.
216. Ong C.E., Lyons A.B., Woods G.M., Flies A.S. Inducible IFN- γ expression for MHC-I upregulation in devil facial tumor cells // *Frontiers in immunology*. — 2019. — T. 9. — C. 3117.
217. Jorgovanovic D., Song M., Wang L., Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review // *Biomarker research*. — 2020. — T. 8. — № 1. — C. 49.
218. Song M., Ping Y., Zhang K., Yang L., Li F., Zhang C., Cheng S., Yue D., Maimela N.R., Qu J. Low-dose IFN γ induces tumor cell stemness in tumor microenvironment of non-small cell lung cancer // *Cancer research*. — 2019. — T. 79. — № 14. — C. 3737-3748.
219. Gao Y., Yang J., Cai Y., Fu S., Zhang N., Fu X., Li L. IFN- γ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling // *International journal of cancer*. — 2018. — T. 143. — № 4. — C. 931-943.
220. Li Y., Li C., Xue P., Zhong B., Mao A.-P., Ran Y., Chen H., Wang Y.-Y., Yang F., Shu H.-B. ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2009. — T. 106. — № 19. — C. 7945-7950.
221. Pidugu V.K., Wu M.-M., Yen A.-H., Pidugu H.B., Chang K.-W., Liu C.-J., Lee T.-C. IFIT1 and IFIT3 promote oral squamous cell carcinoma metastasis and contribute to the anti-tumor effect of gefitinib via enhancing p-EGFR recycling // *Oncogene*. — 2019. — T. 38. — № 17. — C. 3232-3247.
222. Liu Y., Li J., Han M., Li J., Ye Q., Lin S., Zhou J., Liu S., Zou X. IFIT1+ neutrophil is a causative factor of immunosuppressive features of poorly cohesive carcinoma (PCC) // *Journal of translational medicine*. — 2024. — T. 22. — № 1. — C. 580.
223. Pidugu V.K., Pidugu H.B., Wu M.-M., Liu C.-J., Lee T.-C. Emerging functions of human IFIT proteins in cancer // *Frontiers in molecular biosciences*. — 2019. — T. 6. — C. 148.
224. Dinarello C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family // *Annual review of immunology*. — 2009. — T. 27. — № 1. — C. 519-550.

225. Abushouk A., Nasr A., Masuadi E., Allam G., Siddig E.E., Fahal A.H. The Role of Interleukin-1 cytokine family (IL-1 β , IL-37) and interleukin-12 cytokine family (IL-12, IL-35) in eumycetoma infection pathogenesis // *PLoS neglected tropical diseases*. — 2019. — T. 13. — № 4. — C. e0007098.
226. Arend W.P., Malyak M., Guthridge C.J., Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology // *Annual review of immunology*. — 1998. — T. 16. — № 1. — C. 27-55.
227. Gelfo V., Romaniello D., Mazzeschi M., Sgarzi M., Grilli G., Morselli A., Manzan B., Rihawi K., Lauriola M. Roles of IL-1 in cancer: from tumor progression to resistance to targeted therapies // *International journal of molecular sciences*. — 2020. — T. 21. — № 17. — C. 6009.
228. Kato H., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Uematsu S., Matsui K., Tsujimura T., Takeda K., Fujita T., Takeuchi O. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response // *Immunity*. — 2005. — T. 23. — № 1. — C. 19-28.
229. Zhang P., Han X., Tan W., Chen D., Sun Q. RIG-I-mediated innate immune signaling in tumors reduces the therapeutic effect of oncolytic vesicular stomatitis virus // *Thoracic Cancer*. — 2023. — T. 14. — № 3. — C. 246-253.
230. Jiang Y., Zhang H., Wang J., Chen J., Guo Z., Liu Y., Hua H. Exploiting RIG-I-like receptor pathway for cancer immunotherapy // *Journal of Hematology & Oncology*. — 2023. — T. 16. — № 1. — C. 8.
231. Hou J., Zhou Y., Zheng Y., Fan J., Zhou W., Ng I.O., Sun H., Qin L., Qiu S., Lee J.M. Hepatic RIG-I predicts survival and interferon- α therapeutic response in hepatocellular carcinoma // *Cancer cell*. — 2014. — T. 25. — № 1. — C. 49-63.
232. Jing D., Zhou W., Shen L., Zhang Q., Xie W., Shen E., Li Z., Shen L., Sun L. RIG-I promotes IFN/JAK2 expression and the endoplasmic reticulum stress response to inhibit chemoradiation resistance in nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Medicine*. — 2019. — T. 8. — № 14. — C. 6344-6357.
233. Wheelock M.J., Shintani Y., Maeda M., Fukumoto Y., Johnson K.R. Cadherin switching // *Journal of cell science*. — 2008. — T. 121. — № 6. — C. 727-735.
234. Williams E.-J., Williams G., Howell F.V., Skaper S.D., Walsh F.S., Doherty P. Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth // *Journal of Biological Chemistry*. — 2001. — T. 276. — № 47. — C. 43879-43886.
235. Luo Y., Radice G.L. N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis // *The Journal of cell biology*. — 2005. — T. 169. — № 1. — C. 29-34.
236. Lou C., Wu K., Shi J., Dai Z., Xu Q. N-cadherin protects oral cancer cells from NK cell killing in the circulation by inducing NK cell functional exhaustion via the KLRG1 receptor // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. — 2022. — T. 10. — № 9. — C. e005061.

237. Kowalski P.J., Rubin M.A., Kleer C.G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases // *Breast cancer research*. — 2003. — T. 5. — № 6. — C. R217.
238. Hassanzadeh Ghassabeh G., De Baetselier P., Brys L., Noël W., Van Ginderachter J.A., Meerschaut S., Beschin A., Brombacher F., Raes G. Identification of a common gene signature for type II cytokine-associated myeloid cells elicited in vivo in different pathologic conditions // *Blood*. — 2006. — T. 108. — № 2. — C. 575-583.
239. Nieman M.T., Prudoff R.S., Johnson K.R., Wheelock M.J. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression // *The Journal of cell biology*. — 1999. — T. 147. — № 3. — C. 631-644.
240. De Matos A.L., Franco L.S., McFadden G. Oncolytic viruses and the immune system: the dynamic duo // *Molecular therapy Methods & clinical development*. — 2020. — T. 17. — C. 349-358.
241. Wolfrum P., Fietz A., Schnichels S., Hurst J. The function of p53 and its role in Alzheimer's and Parkinson's disease compared to age-related macular degeneration // *Frontiers in Neuroscience*. — 2022. — T. 16. — C. 1029473.
242. Kang R., Kroemer G., Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2019. — T. 133. — C. 162-168.
243. Balachandran S., Porosnicu M., Barber G.N. Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis // *Journal of virology*. — 2001. — T. 75. — № 7. — C. 3474-3479.
244. Martinez-Ruiz G., Maldonado V., Ceballos-Cancino G., Grajeda J.P.R., Melendez-Zajgla J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression // *Journal of experimental & clinical cancer research*. — 2008. — T. 27. — № 1. — C. 48.
245. Vince J.E., Wong W.W.-L., Khan N., Feltham R., Chau D., Ahmed A.U., Benetatos C.A., Chunduru S.K., Condon S.M., McKinlay M. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis // *Cell*. — 2007. — T. 131. — № 4. — C. 682-693.
246. Yan Y., Mahotka C., Heikaus S., Shibata T., Wethkamp N., Liebmann J., Suschek C., Guo Y., Gabbert H., Gerharz C. Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas // *British journal of cancer*. — 2004. — T. 91. — № 7. — C. 1349-1357.
247. Qin S., Yang C., Li S., Xu C., Zhao Y., Ren H. Smac: Its role in apoptosis induction and use in lung cancer diagnosis and treatment // *Cancer Letters*. — 2012. — T. 318. — № 1. — C. 9-13.
248. Paul A., Krelin Y., Arif T., Jeger R., Shoshan-Barmatz V. A new role for the mitochondrial pro-apoptotic protein SMAC/Diablo in phospholipid synthesis associated with tumorigenesis // *Molecular Therapy*. — 2018. — T. 26. — № 3. — C. 680-694.

249. Broz P., Pelegrín P., Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation // *Nature Reviews Immunology*. — 2020. — T. 20. — № 3. — C. 143-157.
250. De Beeck K.O., Van Camp G., Thys S., Cools N., Callebaut I., Vrijens K., Van Nassauw L., Van Tendeloo V.F., Timmermans J.P., Van Laer L. The DFNA5 gene, responsible for hearing loss and involved in cancer, encodes a novel apoptosis-inducing protein // *European Journal of Human Genetics*. — 2011. — T. 19. — № 9. — C. 965-973.
251. Zhang Z., Zhang Y., Xia S., Kong Q., Li S., Liu X., Junqueira C., Meza-Sosa K.F., Mok T.M.Y., Ansara J. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity // *Nature*. — 2020. — T. 579. — № 7799. — C. 415-420.
252. Wang M., Chen X., Zhang Y. Biological functions of gasdermins in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic potential // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. — 2021. — T. 9. — C. 638710.
253. Wang Y., Gao W., Shi X., Ding J., Liu W., He H., Wang K., Shao F. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin // *Nature*. — 2017. — T. 547. — № 7661. — C. 99-103.
254. Du X.-B., Lang J.-Y., Xu J.-R., Lu Y., Wen Y.-J., Zhao J.-M., Diao P., Yuan Z.-P., Yao B., Fan L.-Y. Vesicular stomatitis virus matrix protein gene enhances the antitumor effects of radiation via induction of apoptosis // *Apoptosis*. — 2008. — T. 13. — № 10. — C. 1205-1214.
255. Alajez N.M., Mocanu J.D., Krushel T., Bell J.C., Liu F.-F. Enhanced vesicular stomatitis virus (VSVΔ51) targeting of head and neck cancer in combination with radiation therapy or ZD6126 vascular disrupting agent // *Cancer Cell International*. — 2012. — T. 12. — № 1. — C. 27.
256. Udayakumar T.S., Betancourt D.M., Ahmad A., Tao W., Totiger T.M., Patel M., Marples B., Barber G., Pollack A. Radiation attenuates prostate tumor antiviral responses to vesicular stomatitis virus containing IFN β , resulting in pronounced antitumor systemic immune responses // *Molecular cancer research*. — 2020. — T. 18. — № 8. — C. 1232-1243.
257. Wang Q., Ju X., Wang J., Fan Y., Ren M., Zhang H. Immunogenic cell death in anticancer chemotherapy and its impact on clinical studies // *Cancer letters*. — 2018. — T. 438. — C. 17-23.
258. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy // *Nature Reviews Cancer*. — 2012. — T. 12. — № 12. — C. 860-875.
259. Hastie E., Besmer D.M., Shah N.R., Murphy A.M., Moerdyk-Schauwecker M., Molestina C., Roy L.D., Curry J.M., Mukherjee P., Grdzlishvili V.Z. Oncolytic vesicular stomatitis virus in an immunocompetent model of MUC1-positive or MUC1-null pancreatic ductal adenocarcinoma // *Journal of Virology*. — 2013. — T. 87. — № 18. — C. 10283-10294.

260. Dobson C.C., Naing T., Beug S.T., Faye M.D., Chabot J., St-Jean M., Walker D.E., LaCasse E.C., Stojdl D.F., Korneluk R.G. Oncolytic virus synergizes with Smac mimetic compounds to induce rhabdomyosarcoma cell death in a syngeneic murine model // *Oncotarget*. — 2016. — T. 8. — № 2. — C. 3495.
261. Nikitina A.S., Lipatova A.V., Goncharov A.O., Kliuchnikova A.A., Pyatnitskiy M.A., Kuznetsova K.G., Hamad A., Vorobyev P.O., Alekseeva O.N., Mahmoud M. Multiomic profiling identified EGF receptor signaling as a potential inhibitor of type I interferon response in models of oncolytic therapy by vesicular stomatitis virus // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — T. 23. — № 9. — C. 5244.
262. Yun C.-O., Hong J., Yoon A.-R. Current clinical landscape of oncolytic viruses as novel cancer immunotherapeutic and recent preclinical advancements // *Frontiers in immunology*. — 2022. — T. 13. — C. 953410.
263. Sterner R.C., Sterner R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies // *Blood cancer journal*. — 2021. — T. 11. — № 4. — C. 69.
264. Ribas A., Dummer R., Puzanov I., VanderWalde A., Andtbacka R.H.I., Michielin O., Olszanski A.J., Malvehy J., Cebon J., Fernandez E., Kirkwood J.M., Gajewski T.F., Chen L., Gorski K.S., Anderson A.A., Diede S.J., Lassman M.E., Gansert J., Hodi F.S., Long G.V. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy // *Cell*. — 2017. — T. 170. — № 6. — C. 1109-1119.e10.
265. Shen W., Patnaik M.M., Ruiz A., Russell S.J., Peng K.-W. Immunovirotherapy with vesicular stomatitis virus and PD-L1 blockade enhances therapeutic outcome in murine acute myeloid leukemia // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. — 2016. — T. 127. — № 11. — C. 1449-1458.
266. Nelson A., Gebremeskel S., Lichty B.D., Johnston B. Natural killer T cell immunotherapy combined with IL-15-expressing oncolytic virotherapy and PD-1 blockade mediates pancreatic tumor regression // *Journal for immunotherapy of cancer*. — 2022. — T. 10. — № 3. — C. e003923.
267. Tang S., Shi L., Luker B.T., Mickler C., Suresh B., Lesinski G.B., Fan D., Liu Y., Luo M. Modulation of the tumor microenvironment by armed vesicular stomatitis virus in a syngeneic pancreatic cancer model // *Virology journal*. — 2022. — T. 19. — № 1. — C. 32.
268. Suder E., Furuyama W., Feldmann H., Marzi A., de Wit E. The vesicular stomatitis virus-based Ebola virus vaccine: From concept to clinical trials // *Human vaccines & immunotherapeutics*. — 2018. — T. 14. — № 9. — C. 2107-2113.
269. Walker J.W., Lebbé C., Grignani G., Nathan P., Dirix L., Fenig E., Ascierto P.A., Sandhu S., Munhoz R., Benincasa E. Efficacy and safety of avelumab treatment in patients with metastatic Merkel

cell carcinoma: experience from a global expanded access program // *Journal for immunotherapy of cancer*. — 2020. — T. 8. — № 1. — C. e000313.

270. Barlesi F., Tomasini P. Non-small-cell lung cancer brain metastases and PD-(L)1 immune checkpoint inhibitors // *The Lancet Oncology*. — 2020. — T. 21. — № 5. — C. 607-608.

271. Mills K.A., Chess-Williams R., McDermott C. Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro // *Archives of Toxicology*. — 2019. — Vol. 93. — Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity. — No. 11. — P. 3291-3303.

272. Mills K.A., Chess-Williams R., McDermott C. Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro // *Archives of Toxicology*. — 2019. — T. 93. — № 11. — C. 3291-3303.

273. James L., Vanna C.-S., Rene G., Jacques G.J., Lance C.C., D L.C., Dirk S., Reinhard D., Michael S., Piotr R., F F.P., Andrew H., John W., S C.M., B H.J., Michele M., Ivan M.-R., A M.G., A A.P., V L.G., K C.M., A P.M., Kenneth G., Mario S., Brigitte D., Lars B., Arvin Y., M R.L., Christine H., Stephen H.F., D W.J. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma // *New England Journal of Medicine*. — 2024. — T. 373. — № 1. — C. 23-34.

274. Forčić D.F., Mršić K.M., Perićperić-Balja M., Kurtovićkurtović T., Ramić S.R., Silovski T., Pedišić I.P., Milas I., Halassy B. An Unconventional Case Study of Neoadjuvant Oncolytic Virotherapy for Recurrent Breast Cancer. — 2024.

275. Marquis K.A., Becker R.L., Weiss A.N., Morris M.C., Ferran M.C. The VSV matrix protein inhibits NF- κ B and the interferon response independently in mouse L929 cells // *Virology*. — 2020. — T. 548. — C. 117-123.

276. Lim H.E., Yoo H.Y. Regulation of cellular states via targeted phosphorylation of p53 using a nanobody-coupled kinase system // *Cell Death Discovery*. — 2025. — T. 11. — № 1. — C. 527.

277. De Visser K.E., Joyce J.A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth // *Cancer cell*. — 2023. — T. 41. — № 3. — C. 374-403.

278. Mayer S., Milo T., Isaacson A., Halperin C., Miyara S., Stein Y., Lior C., Pevsner-Fischer M., Tzahor E., Mayo A. The tumor microenvironment shows a hierarchy of cell-cell interactions dominated by fibroblasts // *Nature communications*. — 2023. — T. 14. — № 1. — C. 5810.

279. Finkelshtein D., Werman A., Novick D., Barak S., Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2013. — T. 110. — № 18. — C. 7306-7311.

280. Yang C., Gagnon C., Hou X., Hardy P. Low density lipoprotein receptor mediates anti-VEGF effect of lymphocyte T-derived microparticles in Lewis lung carcinoma cells // *Cancer biology & therapy*. — 2010. — T. 10. — № 5. — C. 448-456.

281. Hu W., Zhang S., Shen Y., Yang Q. Epidermal growth factor receptor is a co-factor for transmissible gastroenteritis virus entry // *Virology*. — 2018. — T. 521. — C. 33-43.
282. Ayala-Breton C., Barber G.N., Russell S.J., Peng K.-W. Retargeting Vesicular Stomatitis Virus Using Measles Virus Envelope Glycoproteins // *Human Gene Therapy*. — 2011. — T. 23. — № 5. — C. 484-491.
283. Chen J., Zeng F., Forrester S.J., Eguchi S., Zhang M.-Z., Harris R.C. Expression and function of the epidermal growth factor receptor in physiology and disease // *Physiological reviews*. — 2016. — T. 96. — № 3. — C. 1025-1069.
284. Gross A., Niemetz-Rahn A., Nonnenmacher A., Tucholski J., Keilholz U., Fusi A. Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway // *Targeted oncology*. — 2015. — T. 10. — № 1. — C. 77-84.
285. Li T., Zhang C., Zhao G., Zhang X., Hao M., Hassan S., Zhang M., Zheng H., Yang D., Liu L., Mehraein-Ghomi F., Bai X., Chen K., Zhang W., Yang J. IGFBP2 regulates PD-L1 expression by activating the EGFR-STAT3 signaling pathway in malignant melanoma // *Cancer Letters*. — 2020. — T. 477. — C. 19-30.
286. Lai M.-D., Yen M.-C., Lin C.-M., Tu C.-F., Wang C.-C., Lin P.-S., Yang H.-J., Lin C.-C. The effects of DNA formulation and administration route on cancer therapeutic efficacy with xenogenic EGFR DNA vaccine in a lung cancer animal model // *Genetic Vaccines and Therapy*. — 2009. — T. 7. — № 1. — C. 2.
287. Li T., Zhang C., Zhao G., Zhang X., Hao M., Hassan S., Zhang M., Zheng H., Yang D., Liu L. IGFBP2 regulates PD-L1 expression by activating the EGFR-STAT3 signaling pathway in malignant melanoma // *Cancer letters*. — 2020. — T. 477. — C. 19-30.
288. Piao Y., Jiang H., Alemany R., Krasnykh V., Marini F.C., Xu J., Alonso M.M., Conrad C.A., Aldape K.D., Gomez-Manzano C., Fueyo J. Oncolytic adenovirus retargeted to Delta-EGFR induces selective antiglioma activity // *Cancer Gene Therapy*. — 2009. — T. 16. — № 3. — C. 256-265.
289. Uchida H., Marzulli M., Nakano K., Goins W.F., Chan J., Hong C.S., Mazzacurati L., Yoo J.Y., Haseley A., Nakashima H., Baek H., Kwon H., Kumagai I., Kuroki M., Kaur B., Chiocca E.A., Grandi P., Cohen J.B., Glorioso J.C. Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus // *Molecular Therapy*. — 2013. — T. 21. — № 3. — C. 561-569.
290. Mitchell H.D., Eisfeld A.J., Stratton K.G., Heller N.C., Bramer L.M., Wen J., McDermott J.E., Gralinski L.E., Sims A.C., Le M.Q. The role of EGFR in influenza pathogenicity: multiple network-based approaches to identify a key regulator of non-lethal infections // *Frontiers in cell and developmental biology*. — 2019. — T. 7. — C. 200.

291. Yang L., Xu J., Guo L., Guo T., Zhang L., Feng L., Chen H., Wang Y. Porcine epidemic diarrhea virus-induced epidermal growth factor receptor activation impairs the antiviral activity of type I interferon // *Journal of virology*. — 2018. — T. 92. — № 8. — C. 10-1128.
292. Durham N.M., Mulgrew K., McGlinchey K., Monks N.R., Ji H., Herbst R., Suzich J., Hammond S.A., Kelly E.J. Oncolytic VSV primes differential responses to immuno-oncology therapy // *Molecular Therapy*. — 2017. — T. 25. — № 8. — C. 1917-1932.
293. Naik S., Nace R., Barber G.N., Russell S.J. Potent systemic therapy of multiple myeloma utilizing oncolytic vesicular stomatitis virus coding for interferon- β // *Cancer gene therapy*. — 2012. — T. 19. — № 7. — C. 443-450.
294. Sato Y., Fu Y., Liu H., Lee M.Y., Shaw M.H. Tumor-immune profiling of CT-26 and Colon 26 syngeneic mouse models reveals mechanism of anti-PD-1 response // *BMC cancer*. — 2021. — T. 21. — № 1. — C. 1222.
295. Fu Y., Peng Y., Zhao S., Mou J., Zeng L., Jiang X., Yang C., Huang C., Li Y., Lu Y., Wu M., Yang Y., Kong T., Lai Q., Wu Y., Yao Y., Wang Y., Gou L., Yang J. Combination Foretinib and Anti-PD-1 Antibody Immunotherapy for Colorectal Carcinoma // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. — 2021. — T. 9.
296. Larrieux A., Sanjuán R. Murine colon cancer derived cells exhibit heterogeneous resistance profiles against an oncolytic virus // *Scientific Reports*. — 2024. — T. 14. — № 1. — C. 27209.
297. Okamura K., Wang L., Nagayama S., Yamashita M., Tate T., Matsumoto S., Takamatsu M., Kitano S., Kiyotani K., Nakamura Y. Characterization of double-negative T cells in colorectal cancers and their corresponding lymph nodes // *Oncoimmunology*. — 2024. — T. 13. — № 1. — C. 2373530.
298. Wu Z., Zheng Y., Sheng J., Han Y., Yang Y., Pan H., Yao J. CD3⁺ CD4⁺CD8⁻(Double-negative) T cells in inflammation, immune disorders and cancer // *Frontiers in Immunology*. — 2022. — T. 13. — C. 816005.
299. Schad S.E., Chow A., Mangarin L., Pan H., Zhang J., Ceglia N., Caushi J.X., Malandro N., Zappasodi R., Gigoux M. Tumor-induced double positive T cells display distinct lineage commitment mechanisms and functions // *Journal of Experimental Medicine*. — 2022. — T. 219. — № 6. — C. e20212169.
300. de Winde C.M., Munday C., Acton S.E. Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer // *Medical microbiology and immunology*. — 2020. — T. 209. — № 4. — C. 515-529.
301. Martín-Fontecha A., Sebastiani S., Höpken U.E., Ugucioni M., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming // *The Journal of experimental medicine*. — 2003. — T. 198. — № 4. — C. 615-621.

302. Beury D.W., Parker K.H., Nyandjo M., Sinha P., Carter K.A., Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors // *Journal of leukocyte biology*. — 2014. — T. 96. — № 6. — C. 1109-1118.
303. Pan Y., Yu Y., Wang X., Zhang T. Corrigendum: tumor-associated macrophages in tumor immunity // *Frontiers in immunology*. — 2021. — T. 12. — C. 775758.
304. Qi Y., Zhang L., Liu Y., Li Y., Liu Y., Zhang Z. Targeted modulation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: Implications for cancer therapy // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2024. — T. 180. — C. 117590.
305. Noonepalle S.K.R., Gracia-Hernandez M., Aghdam N., Berrigan M., Coulibaly H., Li X., Zevallos-Delgado C., Pletcher A., Weselman B., Palmer E. Cell therapy using ex vivo reprogrammed macrophages enhances antitumor immune responses in melanoma // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. — 2024. — T. 43. — № 1. — C. 263.
306. Wang Q., Ma W. Revisiting TAM polarization: beyond M1-and M2-type TAM toward clinical precision in macrophage-targeted therapy // *Experimental and Molecular Pathology*. — 2025. — T. 143. — C. 104982.
307. Zinovieva M., Ryapolova A., Karabelsky A., Minskaia E. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus: Optimisation Strategies for Anti-Cancer Therapies // *FBL*. — 2024. — T. 29. — № 11. — C. 374-null.
308. Shakiba Y., Vorobyev P.O., Naumenko V.A., Kochetkov D.V., Zajtseva K.V., Valikhov M.P., Yusubalieva G.M., Gumennaya Y.D., Emelyanov E.A., Semkina A.S. Oncolytic efficacy of a recombinant vaccinia virus strain expressing bacterial flagellin in solid tumor models // *Viruses*. — 2023. — T. 15. — № 4. — C. 828.
309. Ryapolova A., Zinovieva M., Vorona K., Krapivin B., Moroz V., Gasanov N., Imatdinov I., Imatdinov A., Ivanov R., Karabelsky A., Minskaia E. Recombinant Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Expressing Mouse Interleukin-12 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (rVSV-dM51-mIL12-mGMCSF) for Immunotherapy of Lung Carcinoma // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2025. — T. 26. — № 17.
310. Ueki I.F., Min-Oo G., Kalinowski A., Ballon-Landa E., Lanier L.L., Nadel J.A., Koff J.L. Respiratory virus-induced EGFR activation suppresses IRF1-dependent interferon λ and antiviral defense in airway epithelium // *Journal of Experimental Medicine*. — 2013. — T. 210. — № 10. — C. 1929-1936.
311. Polzin M., McCanless J., Owen S., Sizemore D., Lucero E., Fuller R., Neufeld H.S., Seals D.F., Ahmed M. Oncolytic vesicular stomatitis viruses selectively target M2 macrophages // *Virus research*. — 2020. — T. 284. — C. 197991.

312. Zou J.J., Schoenhaut D.S., Carvajal D.M., Warriar R.R., Presky D.H., Gately M.K., Gubler U. Structure-function analysis of the p35 subunit of mouse interleukin 12 // *Journal of Biological Chemistry*. — 1995. — T. 270. — № 11. — C. 5864-5871.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Анализ экспрессии генов раковых клеток в ответ на заражение rVSV-GFP in vitro

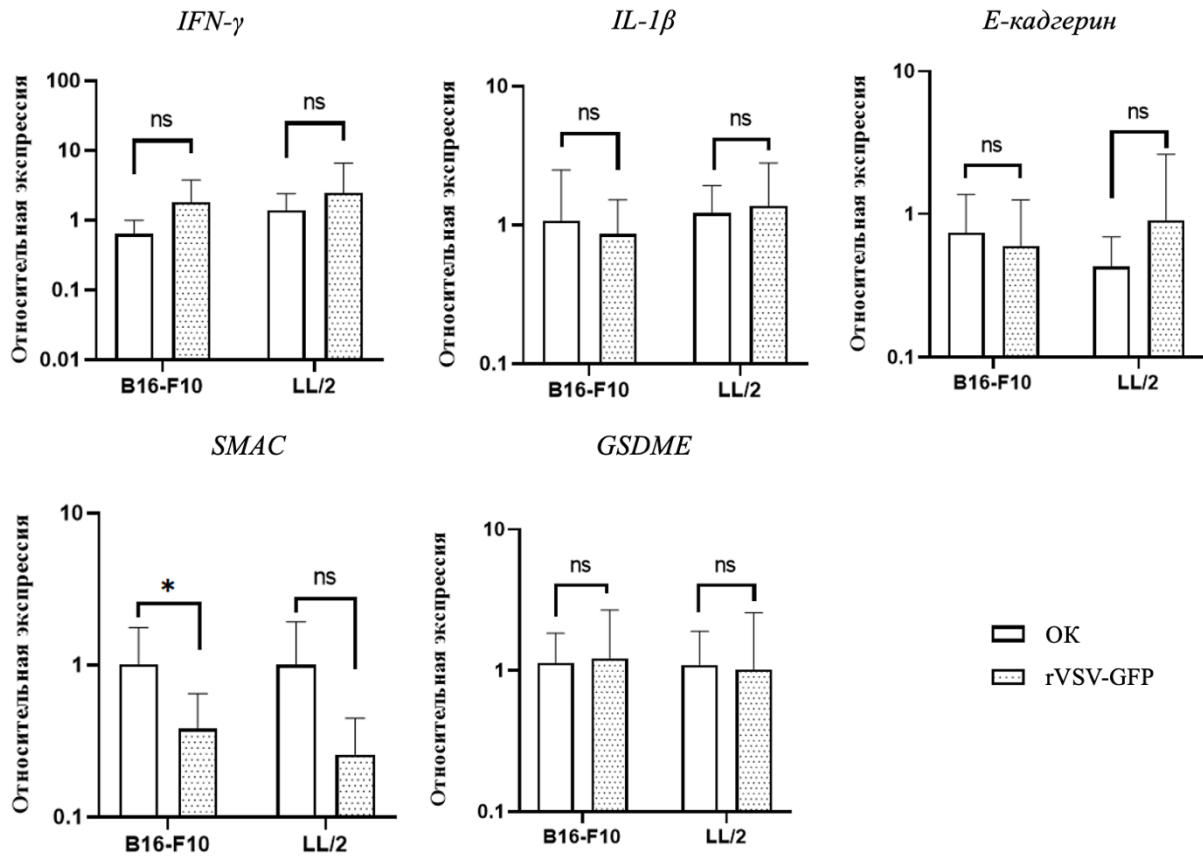


Рисунок А1 – Анализ методом кПЦР клеток B16-F10 и LL/2, инфицированных rVSV-GFP, через 12 часов после заражения. ОК – отрицательный контроль. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Анализ инфильтрации опухолевого узла иммунными клетками на модели СТ26.WT

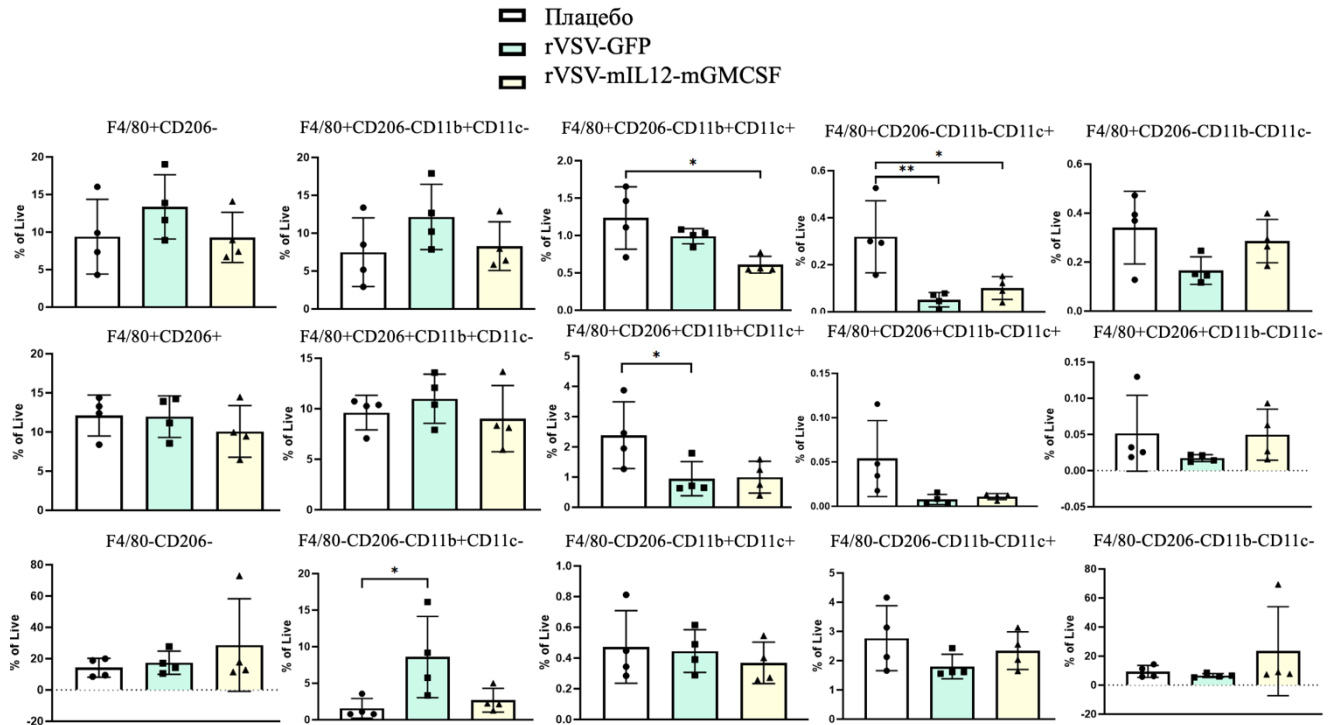


Рисунок Б1 – Анализ количества клеток миелоидной панели, инфильтрирующих опухоль, на 11 день роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value <0.05 , (**) p -value <0.01 , (***) p -value <0.001 , (****) p -value <0.0001 , not significant (ns) – p -value >0.05

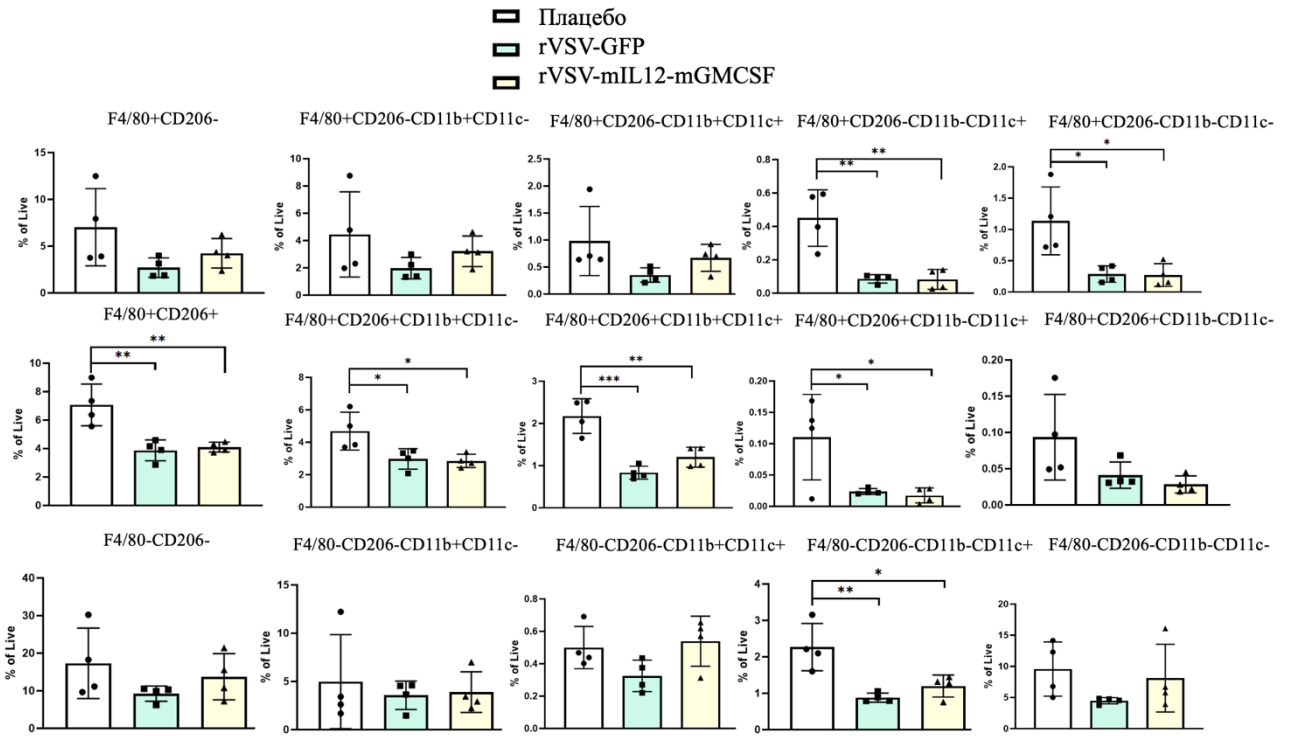


Рисунок Б2 – Анализ количества клеток миелоидной панели, инфильтрирующих опухоль, на 20 день роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

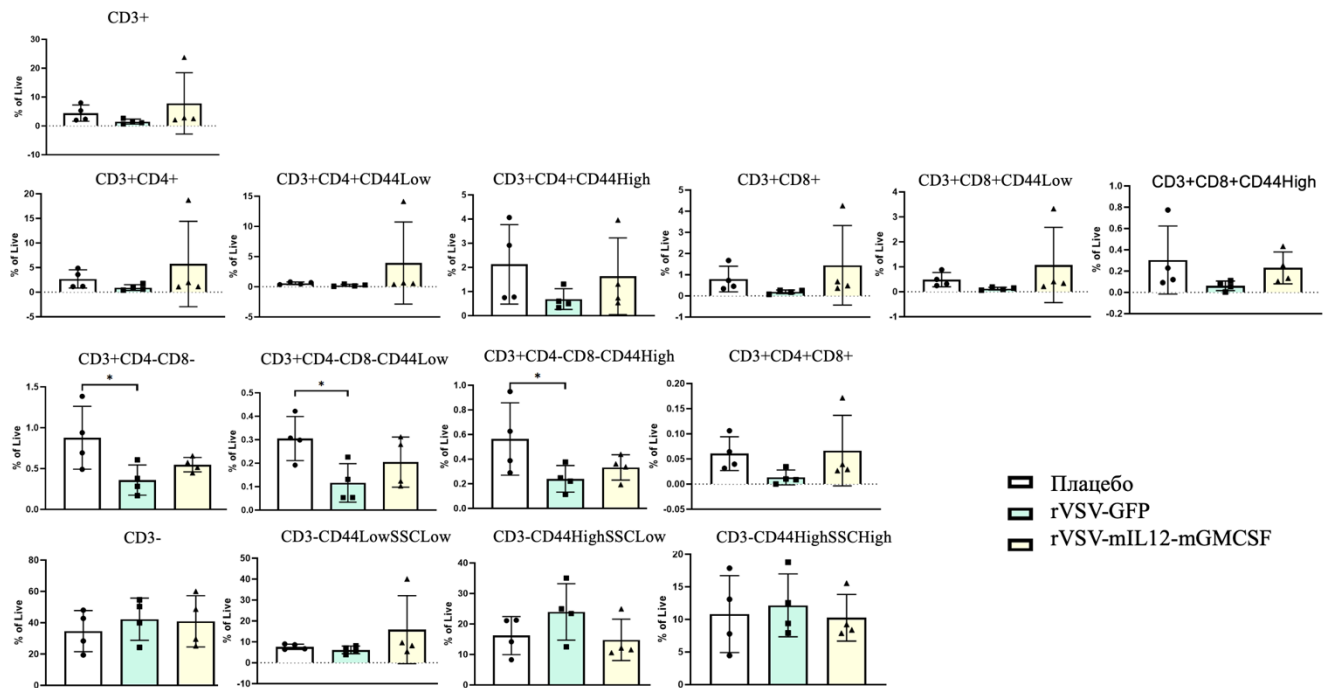


Рисунок Б3 – Анализ количества клеток Т-панели, инфильтрирующих опухоль, на 11 день роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value <0.05, (**) p -value <0.01, (***) p -value <0.001, (****) p -value <0.0001, not significant (ns) – p -value >0.05

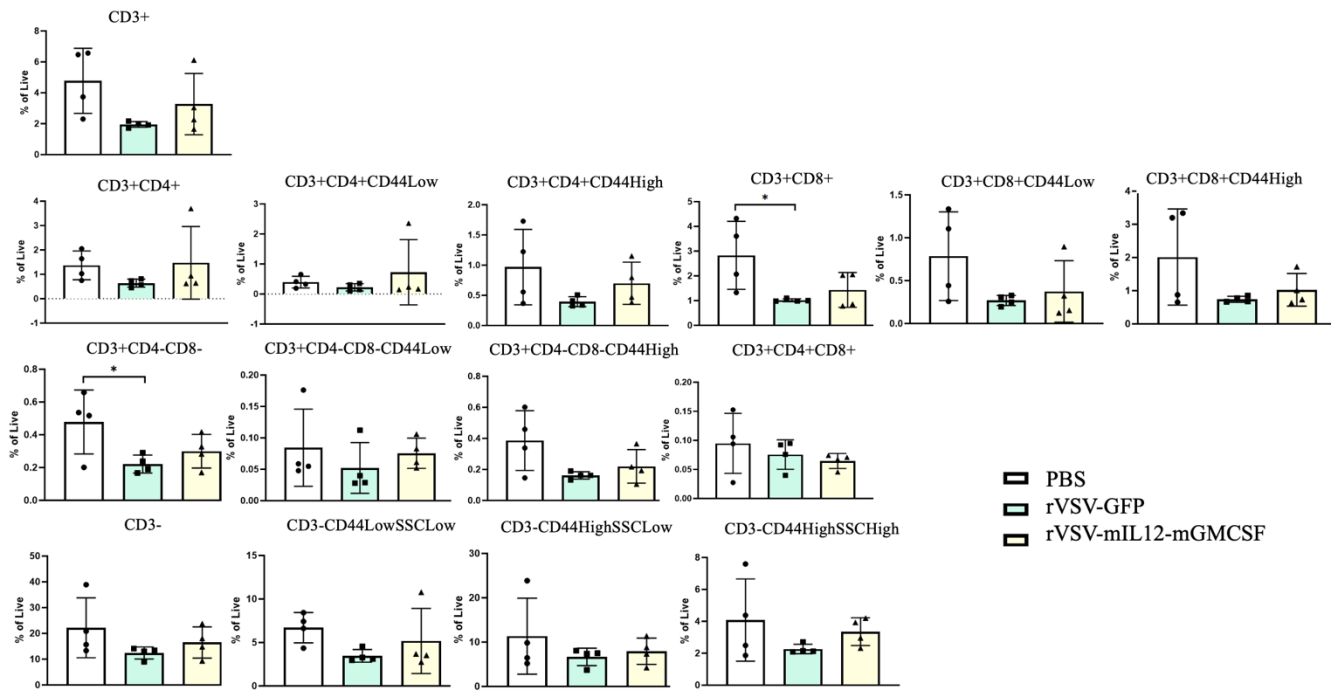


Рисунок Б4 – Анализ количества клеток Т-панели, инфильтрирующих опухоль, на 20 день роста опухоли у животных экспериментальных групп. (*) p -value <0.05 , (**) p -value <0.01 , (***) p -value <0.001 , (****) p -value <0.0001 , not significant (ns) – p -value >0.05