

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ШТАММА ПОЛИОВИРУСА 3-ГО ТИПА С ИЗМЕНЕННЫМ КЛЕТЧНЫМ ТРОПИЗМОМ

А. Н. Хамад^{1,2,3}, А. В. Соболева¹, П. О. Воробьев¹, М. А. Махмуд^{1,2}, К. В. Василенко⁴, П. М. Чумаков¹, А. В. Липатова¹✉

¹ Московский физико-технический институт (МФТИ), Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва, Россия

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Диффузная глиома является неизлечимым заболеванием, наиболее распространенным и агрессивным типом опухолей ЦНС. Разработка высокоонкоселективных вирусных штаммов для терапии злокачественных новообразований является актуальной задачей. Целью работы было создание онколитического вируса на базе вакцинного штамма полиовируса 3-го типа, обладающего природной противоопухолевой активностью, путем замены IRES полиовируса соответствующим участком из риновируса человека 30 типа. В результате был успешно получен рекомбинантный онколитический штамм RVP3, сохранивший серотип полиовируса 3-го типа, что было подтверждено микрореакцией нейтрализации специфической антисывороткой. Онколитическая эффективность RVP3 была оценена *in vitro* на широкой панели клеточных культур. RVP3 изменил тропизм, потеряв способность эффективно реплицироваться в условно нормальных клеточных линиях эмбриональных астроцитов и эмбриональных фибробластов, сохранив способность эффективно реплицироваться в опухолевых клетках.

Ключевые слова: онколитическая виротерапия, глиома, вакцинный штамм полиовируса

Финансирование: проект был поддержан Российским научным фондом (Соглашение №20-75-10157 от 14 августа 2020 г. «Изучение возможностей получения рекомбинантных штаммов онколитических вирусов с опухоль-специфической репликацией и экспрессией иммуномодулирующих белков»).

Вклад авторов: П. М. Чумаков, А. В. Липатова — разработка концепции и плана экспериментов, анализ данных; А. Н. Хамад, П. О. Воробьев, А. В. Соболева, М. А. Махмуд, К. В. Василенко и А. В. Липатова — проведение лабораторных экспериментов; А. Н. Хамад, А. В. Соболева и А. В. Липатова — подготовка рисунков и интерпретация результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.) и последующих ее пересмотров; с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Валерьевна Липатова
ул. Вавилова, д. 32/1, г. Москва, 119991, Россия; lipatovaanv@gmail.com

Статья получена: 18.04.2022 **Статья принята к печати:** 28.04.2022 **Опубликована онлайн:** 30.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.023

DEVELOPMENT OF A RECOMBINANT ONCOLYTIC POLIOVIRUS TYPE 3 STRAIN WITH ALTERED CELL TROPISM

Hamad A^{1,2,3}, Soboleva AV¹, Vorobyev PO¹, Mahmoud M^{1,2}, Vasilenko KV⁴, Chumakov PM¹, Lipatova AV¹✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), Moscow, Russia

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Diffuse gliomas are incurable, prevalent, and aggressive central nervous system tumors. Therefore, the development of selective oncolytic viral strains for malignant neoplasms is highly relevant. This study aimed to create an oncolytic virus based on a vaccine strain of poliovirus type 3 with natural antitumor activity. To achieve this goal, we replaced the internal ribosome entry site (IRES) of poliovirus with the corresponding fragment of human rhinovirus 30. The resulting recombinant oncolytic strain RVP3 retained the serotype of poliovirus type 3, as confirmed by virus neutralization micro-test with specific antiserum. In addition, the oncolytic efficacy of RVP3 was assessed *in vitro* on a broad panel of cell cultures. According to the results, RVP3 has changed its tropism, losing the ability to replicate in conditionally normal cell lines of embryonic astrocytes and embryonic fibroblasts while retaining the ability to replicate in tumor cells.

Keywords: oncolytic viral therapy, glioma, vaccine strain of poliovirus

Funding: the project was supported by the Russian Science Foundation (agreement number 20-75-10157 of 14 August 2020 "Research on the possibilities of obtaining recombinant strains of oncolytic viruses with tumor-specific replication and immunomodulatory protein expression").

Author contribution: Chumakov PM, Lipatova AV — study concept and planning, data analysis; Hamad A, Vorobyev PO, Soboleva AV, Mahmoud M, Vasilenko KV, and Lipatova AV — laboratory experimental work; Hamad A, Soboleva AV, and Lipatova AV — preparation of figures and data interpretation.

Compliance with ethical standards: the study was conducted per the requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki 2000 and its subsequent revisions; in compliance with the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia V. Lipatova
Vavilova, 32/1, Moscow, 119991, Russia; lipatovaanv@gmail.com

Received: 18.04.2022 **Accepted:** 28.04.2022 **Published online:** 30.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.023

Диффузная глиома является наиболее распространенным и агрессивным типом первичных злокачественных новообразований центральной нервной системы [1]. Рецидивы глиобластомы наблюдаются почти в 100% случаев и несмотря на использование всех стандартных лечебных подходов, включающих хирургическое удаление опухоли, лучевую, химио- и таргетную терапию, средняя выживаемость пациентов остается в пределах 12–18 месяцев после постановки диагноза [2]. В качестве альтернативного метода лечения была предложена вирусная терапия, основанная на применении непатогенных онколитических штаммов. Такие штаммы могут обладать природной тропностью к опухолевым клеткам, или их противоопухолевые свойства могут быть целенаправленно усилены путем модификации их генома. Развитие продуктивной инфекции в опухоли приводит к активации систем врожденного и адаптивного противоопухолевого иммунитета [3–5], что способствует уничтожению опухолевых клеток.

Для терапии глиобластомы был разработан и испытан эффективный рекомбинантный онколитический штамм PVS-RIPO [6]. Внутриопухолевое введение PVS-RIPO в сочетании с химиотерапией и лучевой терапией привело к долговременным ремиссиям (более трех лет) у 21% пациентов [7].

PVS-RIPO представляет собой аттенуированный непатогенный онколитический вирус, созданный на основе вакцинного штамма полиовируса 1-го типа Сэбина, в котором внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) на значительном протяжении содержит участок IRES риновируса человека типа 2 (HRV2). Его противоопухолевое действие основано на естественном тропизме полиовирусов к опухолевым клеткам, в том числе к опухолям нервной системы. Полиовирусы проникают в клетки через клеточный рецептор PVR/CD155, экспрессия которого существенно повышена в клетках солидных опухолей и клетках опухолевого микроокружения [7–9]. Однако существуют опасения, что при системном и внутриопухолевом введении полиовирусы могут проявлять нейротоксичность в связи с их способностью заражать нормальные нейроны. Тропизм полиовирусов обусловлен не только присутствием на клетке поверхностного рецептора, но и структурой вирусного IRES, обеспечивающего взаимодействие с рядом тканеспецифических клеточных факторов, влияющих на эффективность инициации трансляции вирусных РНК [10, 11]. Так, клеточный фактор DRBP76 способен связываться со структурным элементом на 3'-участке IRES риновируса HRV2, подавляя инициацию трансляции полиовирусной РНК в клетках нейронного происхождения [12]. Тропизм полиовирусов в отношении нейронов можно частично объяснить отсутствием ингибирующего связывания DRBP76 с полиовирусным IRES. Химерный IRES, сохранивший крестообразную 5'-концевую шпильку полиовирусной РНК и содержащий внутреннюю часть IRES риновируса сужает круг чувствительных к вирусу клеток, в результате чего его тропизм ограничивается опухолевыми клетками, происходящими из глии и

некоторых других тканей, дающих начало злокачественным новообразованиям человека, но не поражает нейроны [13]. Помимо опухолей головного мозга PVS-RIPO испытывают для терапии неоперабельных случаев меланом [14]. В целом многие чувствительные к иммунотерапии опухоли могут оказаться восприимчивы к виротерапии. Разработка таких штаммов в условиях увеличивающейся заболеваемости злокачественными новообразованиями становится особенно актуальной задачей. Связанные с использованием гетерологичных IRES изменения в тропизме вирусов в отношении индивидуальных опухолей пациентов расширяют потенциальный арсенал штаммов, из которых возможен персонализированный подбор онколитических препаратов. В связи с этим мы создали на основе вакцинного штамма полиовируса 3-го типа Сэбина рекомбинантный онколитический вирус, в котором IRES полиовируса был заменен соответствующим участком из риновируса человека 30-го типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание рекомбинантного вирусного штамма RVP3

Рекомбинантный штамм RVP3 создавали на базе вакцинного штамма полиовируса 3-го типа (Сэбин – PV3S). Плазмидная конструкция на основе pUC18, кодирующая геном PV3S под управлением T7 промотора, была разработана в лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН. Генетическую последовательность 5'-некодирующего участка риновируса A30 заимствовали из базы данных GenBank (Human rhinovirus 30 strain ATCC VR-1140, FJ445179.1). Участок генома HRV30 (от 108-го до 521-го нуклеотида) был синтезирован IDT DNA (США). Плазмидную конструкцию, кодирующую геном рекомбинантного штамма, получили путем безлигазного клонирования двух фрагментов, наработанных в ходе ПЦР с праймерами, приведенными в таблице в соответствии с протоколом, описанным ранее [15]. Схема итоговой последовательности представлена на рис. 1.

Для получения инфекционной геномной РНК плазмидную конструкцию трансфецировали в клетки линии HEK293T совместно с плазмидой, экспрессирующей кодон-оптимизированную полимеразу бактериофага T7, в соответствии с описанным ранее протоколом [16], спустя 36–48 ч собирали питательную среду и использовали для заражения свежих клеток HEK293T, после чего отслеживали появление фокусов цитопатического действия и формирование бляшек.

Наработка вирусных штаммов

Наработку энтеровирусов PV3S и RVP3 проводили на клеточных линиях RD и HEK293T. Клетки рассевали за сутки до заражения, при 70%-й конфлюэнтности и множественности (MOI), равной 0,1 инф. ед. на клетку. Цитопатическое действие развивалось спустя 24 ч. Вирусосодержащий супернатант осветляли от клеточного

Таблица. Перечень олигонуклеотидных последовательностей, используемых для наработки последовательности ДНК RVP3

№	Название	Последовательность	Температура плавления, °C
1	HRV30 IRES for	tttatacctccctccctagaagtttacataaagaccaataggt	56
2	HRV30 IRES rev	taagttaaggagtaaaacgcgaattgctcattacgact	56
3	P3vect for	ttttactcctaacttattgaaattgtttgaagac	57
4	P3vect rev	ggggaggagatataaacaggcgta	57

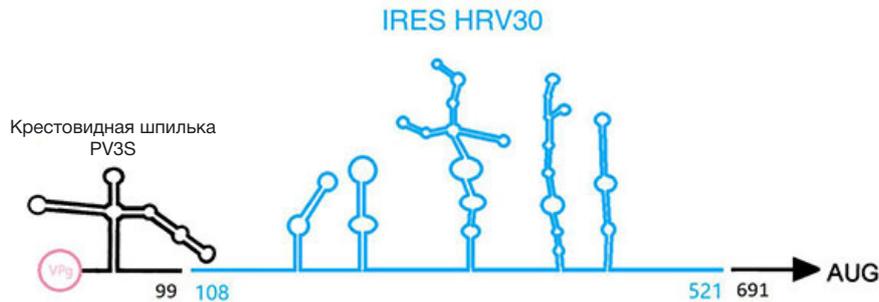


Рис. 1. Схема RVP3. Химерный участок составлен из IRES риновируса и полиовируса 3-го типа

дебриса центрифугированием при +4 °С, 2500 об./мин в течение 15 мин. Вирусосодержащую жидкость делили на аликвоты по 0,5 мл и хранили при –80 °С до проведения экспериментов.

Получение противовирусной нейтрализующей антисыворотки иммунизированной овцы и проведение микрореакции нейтрализации

В исследовании использовали шестимесячного ягненка породы Дорпер. Ягненок был получен от заводчиков фермы «Капри» (Калужская область). Содержали ягненка в условиях фермы, в рацион входило сено, комбикорм, витаминные добавки, проводились регулярные мероприятия по обработке против гельминтов.

Смешивали 1 мл вирусосодержащей жидкости (10^9 инф. ед) с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (DIFCO; США), гомогенизировали до получения стабильной суспензии и вводили ягненку внутривенно в объеме по 0,1 мл с двух сторон в область заднего бедра и по 0,4 мл внутримышечно с двух сторон в область бедер. Далее инъекции проводили аналогично, но в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (DIFCO; США) 4 раза с интервалом 7 дней. В ходе проведения эксперимента ягненок содержался отдельно от стада. Через 7 суток после пятого введения проводили забор крови с помощью нескольких вакуумных пробирок с коагулянтом объемом 9 мл — суммарно 40 мл из яремной вены. Животное не подлежало умерщвлению и присоединялось к стаду. Отобранную кровь оставляли на 4 ч до формирования сгустка, после чего осветляли центрифугированием при 5000 об./мин 15 мин. Полученную сыворотку делили на аликвоты и хранили при –70 °С.

В качестве дополнительного теста серотипа нового штамма проводили микротест на нейтрализацию инфекционности специфичной овечьей антисывороткой к полиовирусу 3-го типа, как подробно описано ранее [17]. Для этого вирусосодержащий раствор инкубировали в течение 2 ч с антисывороткой при 23 разведениях (1 : 10 000, 1 : 7500, 1 : 5 000, 1 : 4 000, 1 : 3500, 1 : 3000, 1 : 2500, 1 : 2000, 1 : 1500, 1 : 1000, 1 : 750, 1 : 500, 1 : 200, 1 : 100, 1 : 75, 1 : 50, 1 : 30, 1 : 20, 1 : 15, 1 : 10, 1 : 7, 1 : 5, 1 : 1). Кроме PV3S и RVP3 так же тестировали другие непатогенные онколитические штаммы: Коксаки B5 (GenBank: MG642820.1), Коксаки A7 (GenBank: JQ041367.1) и прототипный штамм Travis Эховируса 12 типа (GenBank: X79047.1).

Оценка чувствительности клеточных линий к заражению и продуктивности вирусной репликации

Для проверки чувствительности клеточной линии к заражению вирусами испытываемые клетки высевали

на 96-луночные планшеты до конфлюэнтности 40% (4000–8000 клеток на лунку, в зависимости от культуры). На следующий день клетки инфицировали вирусом в широком диапазоне множественности (MOI от 0,001 до 100) в бессывороточной среде DMEM. Через час после адсорбции вируса среду заменяли на DMEM с 1% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Через 72 ч оценивали жизнеспособность клеток постановкой МТТ-теста. Для удобства интерпретации значения $TCID_{50}$ рассчитывали по методу Рида и Менча [18]. Титрования проводили в четырех технических параллелях и трех независимых биологических повторностях эксперимента.

Для проверки продуктивности репликации клетки высевали на 12-луночный планшет, заражение проводили путем инкубации клеток 50%-й конфлюэнтности с вирусом в течение 1 ч (MOI = 0,1) при 37 °С в среде DMEM. Отмытые от вируса клетки помещали в свежую среду с 0,5% ФБС. Через 48 ч после инфицирования собирали супернатанты. Продуктивность вирусной репликации определяли путем титрования на клетках HEK293T заражением серийными разведениями супернатантов (метод Рида и Менча).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оживление и наработка RVP3 в культуре

В результате трансфекции плазмиды, кодирующей геном RVP3 в присутствии плазмиды, экспрессирующей кодон-оптимизированную полимеразу бактериофага T7, через 48 ч в клеточном супернатанте появились инфекционные частицы, наличие которых определяли по цитопатическому действию после повторного заражения свежего монослоя клеток HEK293T. В дальнейшем вирус прошел более 15

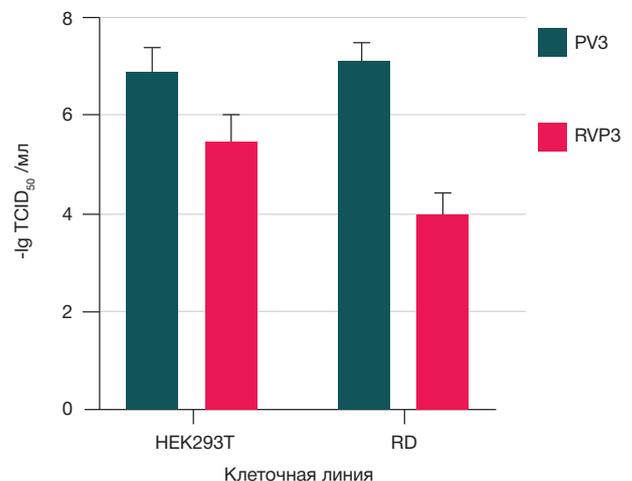


Рис. 2. Сравнение вирусного титра на чувствительных к энтеровирусам культурах клеток RD и HEK293T

адаптационных пассажей, после чего была проведена его наработка на линиях HEK293T и RD. Титр вируса был определен методом Рида и Менча и проведено сравнение продуктивности наработки в сравнении с PV3S (рис. 2). Для дальнейшей наработки вируса была выбрана культура HEK293T, поскольку на ней вирус реплицировался наиболее эффективно.

RVP3 сохраняет серотип полиовируса 3-го типа

Микрореакция нейтрализации подтвердила эффективную инактивацию PV3S в разведении 1/3000–1/2500. Данный тест подтвердил также высокую специфичность сыворотки: перекрестная инактивация энтеровирусов другого серотипа (вирусов Коксаки А7, В5 и эховируса 12) была эффективна лишь в разведениях 1/10–1/7. Вирус RVP3 инактивировался овечьей антисывороткой против PV3 в разведениях 1/2000–1/1500, что свидетельствует о сохранении серотипа полиовируса 3-го типа (рис. 3).

Сравнение цитолитической активности RVP3 и PV3S *in vitro*

Сравнительная оценка способности нового штамма RVP3 и исходного штамма PV3S оказывать цитолитическое действие на ряд линий опухолевых и условно нормальных культур клеток приведена на рис. 4. Опухолевые линии были представлены модельными культурами глиобластом DBTRG-05 MG, A-172 и U-251 MG (из коллекции ATCC; США) и малопассажными линиями глиобластом PrGI1, PrGI2, PrGI3, PrGI4, PrGI5 и PrGI6, полученными и охарактеризованными в лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН [19], тремя модельными линиями нейробластом SK-N-MC, Lan1 и IMR-32, приобретенными в коллекции Института цитологии РАН (Россия), а также две опухолевые линии клеток RD и HOS из коллекции лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН. В качестве условно нормальных клеток были использованы эмбриональные фибробласты человека (HEF) и нормальные эмбриональные астроциты, полученные из лаборатории иммунохимии НМИЦ ПН им. В. П. Сербского (Россия), а также мононуклеарные клетки периферической крови, полученные от двух разных пациентов (peripheral blood mononuclear cells, PBMC).

Оба вируса продемонстрировали высокую онколитическую активность в отношении исследованной панели культур. Продуктивность репликации RVP3 была существенно ниже, причем особенно существенное снижение было отмечено на эмбриональных фибробластах и эмбриональных астроцитах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка онкоселективных штаммов, обладающих усиленной способностью реплицироваться в клетках злокачественных опухолей при отсутствии поражения нормальных клеток в органах и тканях является важным этапом на пути скорейшего внедрения онколитической вирусной терапии в клиническую практику.

Тропизм энтеровирусов в отношении различных типов клеток определяется не только различиями в экспрессии на поверхности клеток специфических белков, используемых вирусами в качестве рецепторов проникновения, но и структурой 5'-концевых нетранслируемых участков, представленных областью внутренней посадки

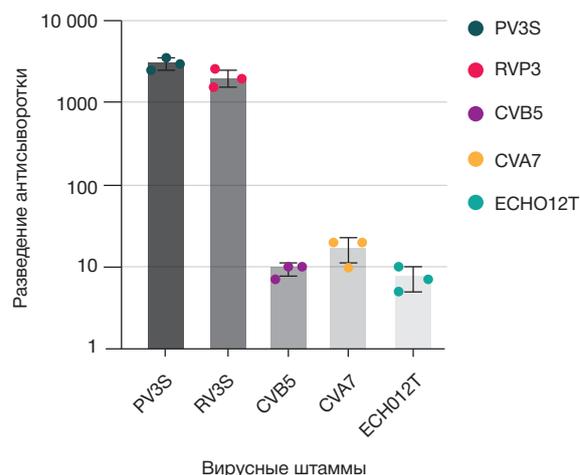


Рис. 3. Анализ результатов микрореакции нейтрализации штаммов антисывороткой к полиовирусу 3-го типа

рибосом. Эффективность трансляции вирусной РНК во многом зависит от связывания тех или иных клеточных регуляторных факторов, присутствие которых может варьироваться в широких пределах в клетках как различных тканей, так и индивидуальных опухолей пациентов. В этой связи один и тот же вирусный штамм может оказаться эффективным в отношении опухоли одного пациента, но не способным реплицироваться и убивать клетки другого пациента, в которых экспрессия необходимых рецепторов или внутренних факторов ограничена. На фоне такого разнообразия опухолевых клеток для онколитической вирусной терапии требуется персонализированный подбор препаратов из большого арсенала вирусных штаммов, обладающих различным клеточным тропизмом. Замена IRES может быть источником дополнительного разнообразия вирусных штаммов, а также инструментом для изучения влияния отдельных структурных элементов на способность заражать те или иные типы клеток.

Основываясь на этой концепции, мы сконструировали рекомбинатный вариант на основе вакцинного штамма полиовируса 3-го типа (PV3S). Из трех вакцинных штаммов полиовирусов PV3S демонстрировал наиболее эффективные литические свойства в отношении первичных линий глиобластомы. В IRES PV3S есть всего лишь одна нуклеотидная замена, по сравнению с диким патогенным штаммом PV3 Leon, из которой он был получен путем длительного пассирования в клетках обезьян *in vitro* и *in vivo* [20]. PV3S при этом намного чаще чем PV1S был причиной ассоциированного с вакцинацией полиомиелита в результате реверсий [21]. Поэтому замена регуляторного участка на IRES риновируса полностью предотвращает возможность реверсий и повышает безопасность потенциального онколитического вируса.

В результате повсеместной вакцинации от полиомиелита трехвалентной живой полиовирусной вакциной, почти все население планеты обладает пожизненным иммунитетом. Однако эффективность нейтрализации PV3S антителами вакцинированных людей минимальна по сравнению с двумя другими вариантами полиовирусов [22], что может обеспечить ему большую эффективность при терапии онкологических заболеваний.

По результатам испытания продуктивности вирусной инфекции на панели опухолевых и нормальных клеток (рис. 4) обнаружено существенное изменение тропизма RVP3 по сравнению с PV3S. Только в клетках остеосаркомы HOS вирус RVP3 реплицировался так же эффективно, как

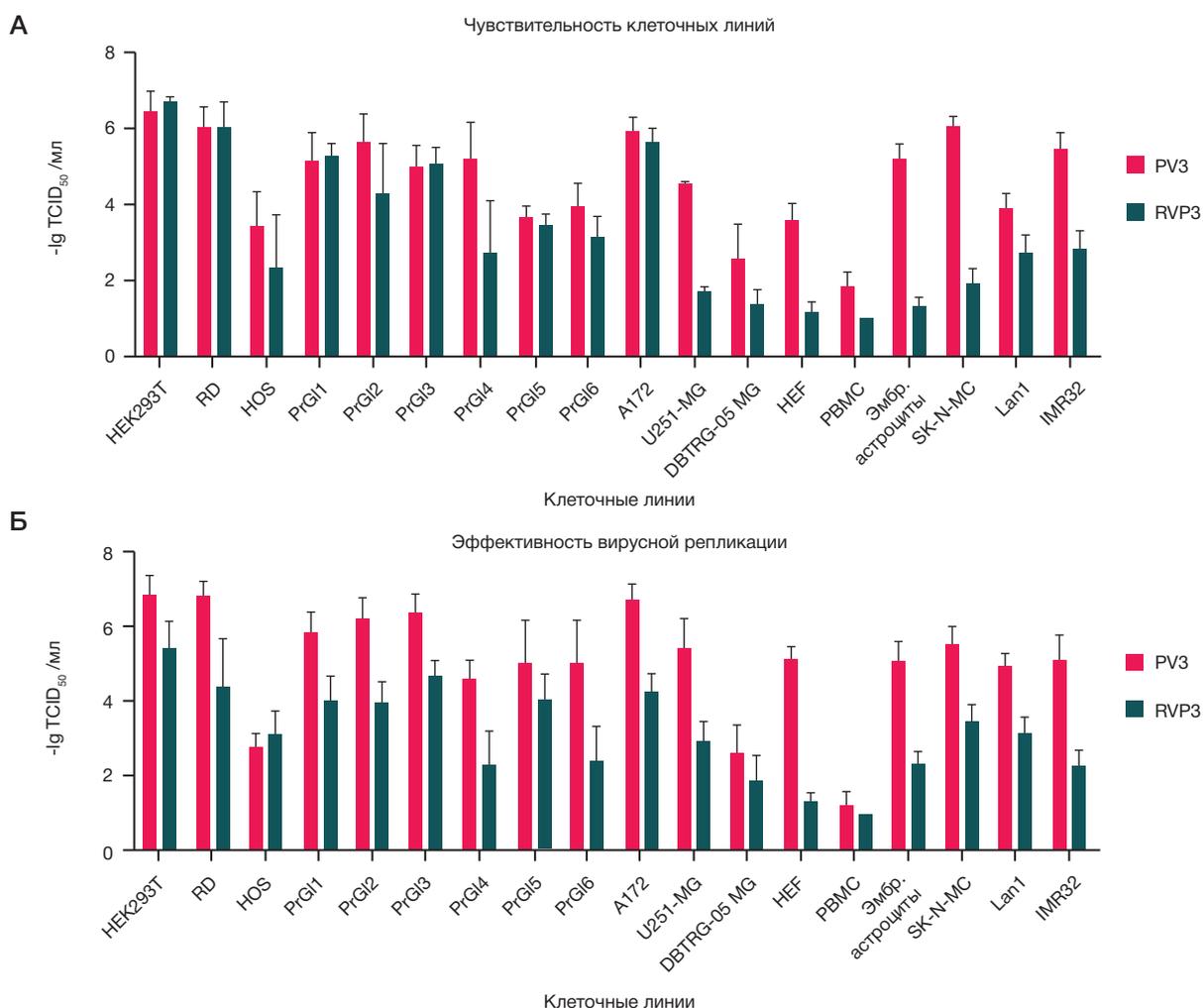


Рис. 4. Оценка потенциала RVP3 и PV3S *in vitro*. **А.** Чувствительность клеточных линий к вирусу. **Б.** Продуктивность вирусной репликации

PV3S, в остальных же типах клеток рекомбинантный вирус реплицировался на 2–4 порядка хуже. При этом менялась и относительная эффективность репликации: там, где PV3S показывал лучшую репликацию (например, в клетках PrG16 и U251MG), RVP3 мог показывать средние или худшие результаты. Мы не заметили также принципиальных различий между репликацией RVP3 в клетках нейронного происхождения, представленных нейробластомами. Хотя по сравнению с PV3S репликация RVP3 в клетках SK-N-MC, Lan1 и IMR-32 была снижена, она все же проходила и приводила к гибели клеток. Можно предположить, что нейробластомы существенно изменяют спектры экспрессии белковых факторов, взаимодействующих с IRES, что объясняет приобретение нейробластомами чувствительности к вирусу, который неспособен заражать нормальные нейроны.

Мы обнаружили также, что RVP3 обладает более высокой онкоселективностью, поскольку продуктивность его репликации в нормальных астроцитах и эмбриональных фибробластах была снижена по сравнению с репликацией PV3S на три и четыре порядка соответственно, а способность вируса реплицироваться в мононуклеарных клетках остается на минимальном уровне.

Более миллиарда случаев применения живой оральной полиомиелитной вакцины, способной попадать через Пейеровы бляшки в кровь и затем проходить гематоэнцефалический барьер, подтвердили, что использование таких вакцин, в частности, вакцинного

штамма полиовируса 3-го типа не приводит к неврологическим симптомам и появлению вируса в ЦНС. Клетки, пассируемые *in vitro*, как правило, более восприимчивы к вирусам, чем клетки организма. В процессе пассирования на искусственных средах метаболизм клеток существенно перестраивается [23]. Примечательно, что факт восприимчивости клеток *in vitro* не является показателем патогенности вируса. Однако для проявления патогенности репликация вируса в клетках важна, и, если вирус ограничен в репликации *in vitro*, он с меньшей вероятностью может оказаться патогенным. Поэтому терапевтические вирусные штаммы должны обладать максимальной репликативной способностью в клетках опухоли пациента, но оказывать минимальное воздействие на клеточные компоненты нормальных тканей.

Дальнейшее изучение роли IRES в определении способности энтеровирусов реплицироваться в различных типах опухолевых и нормальных клеток будет способствовать созданию еще большего разнообразия безопасных терапевтических вирусных штаммов и пополнять арсенал средств для персонализированной терапии онкологических больных.

ВЫВОДЫ

Получен рекомбинантный онколитический штамм RVP3, в котором IRES полиовируса был заменен соответствующим участком из риновируса человека 30-го типа. Данный

штамм может быть успешно наработан на модельных клеточных культурах. RVP3 сохранил серотип полиовируса 3-го типа. Онколитическая эффективность RVP3 была оценена *in vitro* на широкой панели клеточных культур. Штамм несколько изменил тропизм, существенно снизив способность реплицироваться в условно нормальных

клеточных линиях эмбриональных астроцитов и эмбриональных фибробластов. Отмечено также изменение спектра воздействия рекомбинантного вируса в отношении ряда линий опухолевых клеток, что придает ему отличные свойства по сравнению с исходным вакцинным штаммом полиовируса.

Литература

- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021; 23: 1231–51.
- Carpenter AB. Recombinant oncolytic poliovirus for glioblastoma: A current review of PVS (RIPO). *Georgetown Medical Review.* 2019; 3: 7789.
- Brown MC, Dobrikova EY, Dobrikov MI, Walton RW, Gemberling SL, Nair SK, et al. Oncolytic polio virotherapy of cancer. *Cancer.* 2014; 120: 3277–86.
- Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* 2018; 174: 1031–2.
- Twumasi-Boateng K, Pettigrew JL, Kwok YYE, Bell JC, Nelson BH. Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18: 419–32.
- Gromeier M, Alexander L, Wimmer E. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996; 93: 2370–5.
- Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, 2nd, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018; 379: 150–61.
- Sloan KE, Eustace BK, Stewart JK, Zehetmeier C, Torella C, Simeone M, et al. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer.* 2004; 4: 73.
- Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, et al. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer research.* 2015; 35: 2287–97.
- Merrill MK, Gromeier M. The double-stranded RNA binding protein 76:Nf45 heterodimer inhibits translation initiation at the rhinovirus type 2 internal ribosome entry site. *Journal of Virology.* 2006; 80: 6936–42.
- López-Ulloa B, Fuentes Y, Pizarro-Ortega MS, López-Lastra M. RNA-Binding Proteins as Regulators of Internal Initiation of Viral mRNA Translation. *Viruses.* 2022; 14.
- Merrill MK, Dobrikova EY, Gromeier M. Cell-type-specific repression of internal ribosome entry site activity by double-stranded RNA-binding protein 76. *J Virol.* 2006; 80: 3147–56.
- Kauder SE, Racaniello VR. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1743–53.
- Beasley GM, Nair SK, Farrow NE, Landa K, Selim MA, Wiggs CA, et al. Phase I trial of intratumoral PVSRIPO in patients with unresectable, treatment-refractory melanoma. *J Immunother Cancer.* 2021; 9.
- Aslanidis C, de Jong PJ, Schmitz G. Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Methods Appl.* 1994; 4: 172–7.
- Yun T, Park A, Hill TE, Pernet O, Beaty SM, Juelich TL, et al. Efficient reverse genetics reveals genetic determinants of budding and fusogenic differences between Nipah and Hendra viruses and enables real-time monitoring of viral spread in small animal models of henipavirus infection. *J Virol.* 2015; 89: 1242–53.
- Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, McInroy L, Baker N, Shaik I, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols.* 2021; 16: 3114–40.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology.* 1938; 27: 493–7.
- Lipatova AV, Soboleva AV, Gorshkov VA, Bubis JA, Solovyeva EM, Krasnov GS, et al. Multi-Omics Analysis of Glioblastoma Cells' Sensitivity to Oncolytic Viruses. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1–19.
- Sabin A. Oral poliovirus vaccine: History of its development and prospects for eradication of poliomyelitis. *JAMA.* 1965; 194 130–4.
- Boulger L, Magrath D. Differing neurovirulence of three Sabin attenuated type 3 vaccine seed pools and their progeny. *Journal of Biological Standardization.* 1973; 1: 139–47.
- Bianchi FP, Larocca AMV, Bozzi A, Spinelli G, Germinario CA, Tafuri S, et al. Long-term persistence of poliovirus neutralizing antibodies in the era of polio elimination: An Italian retrospective cohort study. *Vaccine.* 2021; 39: 2989–94.
- Golikov MV, Karpenko IL, Lipatova AV, Ivanova ON, Fedyakina IT, Larichev VF, et al. Cultivation of Cells in a Physiological Plasmid Medium Increases Mitochondrial Respiratory Capacity and Reduces Replication Levels of RNA Viruses. *Antioxidants.* 2021; 11: 97.

References

- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021; 23: 1231–51.
- Carpenter AB. Recombinant oncolytic poliovirus for glioblastoma: A current review of PVS (RIPO). *Georgetown Medical Review.* 2019; 3: 7789.
- Brown MC, Dobrikova EY, Dobrikov MI, Walton RW, Gemberling SL, Nair SK, et al. Oncolytic polio virotherapy of cancer. *Cancer.* 2014; 120: 3277–86.
- Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* 2018; 174: 1031–2.
- Twumasi-Boateng K, Pettigrew JL, Kwok YYE, Bell JC, Nelson BH. Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18: 419–32.
- Gromeier M, Alexander L, Wimmer E. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996; 93: 2370–5.
- Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, 2nd, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018; 379: 150–61.
- Sloan KE, Eustace BK, Stewart JK, Zehetmeier C, Torella C, Simeone M, et al. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer.* 2004; 4: 73.
- Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, et al. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer research.* 2015; 35: 2287–97.
- Merrill MK, Gromeier M. The double-stranded RNA binding protein

- 76:NF45 heterodimer inhibits translation initiation at the rhinovirus type 2 internal ribosome entry site. *Journal of Virology*. 2006; 80: 6936–42.
11. López-Ulloa B, Fuentes Y, Pizarro-Ortega MS, López-Lastra M. RNA-Binding Proteins as Regulators of Internal Initiation of Viral mRNA Translation. *Viruses*. 2022; 14.
 12. Merrill MK, Dobrikova EY, Gromeier M. Cell-type-specific repression of internal ribosome entry site activity by double-stranded RNA-binding protein 76. *J Virol*. 2006; 80: 3147–56.
 13. Kauder SE, Racaniello VR. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1743–53.
 14. Beasley GM, Nair SK, Farrow NE, Landa K, Selim MA, Wiggs CA, et al. Phase I trial of intratumoral PVSRIPO in patients with unresectable, treatment-refractory melanoma. *J Immunother Cancer*. 2021; 9.
 15. Aslanidis C, de Jong PJ, Schmitz G. Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Methods Appl*. 1994; 4: 172–7.
 16. Yun T, Park A, Hill TE, Pernet O, Beaty SM, Juelich TL, et al. Efficient reverse genetics reveals genetic determinants of budding and fusogenic differences between Nipah and Hendra viruses and enables real-time monitoring of viral spread in small animal models of henipavirus infection. *J Virol*. 2015; 89: 1242–53.
 17. Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, McInroy L, Baker N, Shaik I, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols*. 2021; 16: 3114–40.
 18. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*. 1938; 27: 493–7.
 19. Lipatova AV, Soboleva AV, Gorshkov VA, Bubis JA, Solovyeva EM, Krasnov GS, et al. Multi-Omics Analysis of Glioblastoma Cells' Sensitivity to Oncolytic Viruses. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 1–19.
 20. Sabin A. Oral poliovirus vaccine: History of its development and prospects for eradication of poliomyelitis. *JAMA*. 1965; 194: 130–4.
 21. Boulger L, Magrath D. Differing neurovirulence of three Sabin attenuated type 3 vaccine seed pools and their progeny. *Journal of Biological Standardization*. 1973; 1: 139–47.
 22. Bianchi FP, Larocca AMV, Bozzi A, Spinelli G, Germinario CA, Tafuri S, et al. Long-term persistence of poliovirus neutralizing antibodies in the era of polio elimination: An Italian retrospective cohort study. *Vaccine*. 2021; 39: 2989–94.
 23. Golikov MV, Karpenko IL, Lipatova AV, Ivanova ON, Fedyakina IT, Larichev VF, et al. Cultivation of Cells in a Physiological Plasmax Medium Increases Mitochondrial Respiratory Capacity and Reduces Replication Levels of RNA Viruses. *Antioxidants*. 2021; 11: 97.