

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ ИНТЕРФЕРОН ТИПА 1, КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ И МЕЛАНОМЫ

Е. Р. Набережная<sup>1</sup>, А. В. Соболева<sup>1</sup>, П. О. Воробьев<sup>1</sup>, В. В. Вадехина<sup>1</sup>, Г. М. Юсубалиева<sup>1,2,3</sup>, И. В. Исаева<sup>2</sup>, В. П. Баклаушев<sup>1,2,3,4</sup>, П. М. Чумаков<sup>1</sup>, А. В. Липатова<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Иммунотерапия онколитическими вирусами (ОВ) становится полноценным методом неoadъювантной терапии в парадигме доказательной медицины для все большего числа онкологических заболеваний. Особенно актуально применение ОВ для иммунологически «холодных» опухолей, вызывающих минимальный иммунный ответ и обладающих выраженным иммуносупрессивным опухолевым микроокружением. Для стимуляции противоопухолевого ответа применимы рекомбинантные ОВ, несущие последовательности иммуноактивирующих белков. Целью работы было исследовать онкоселективность и противоопухолевую активность рекомбинантного ОВ, созданного на базе штамма LVP вируса осповакцины, экспрессирующего последовательности интерферона-альфа человека и мыши (hIFN $\alpha$  и mIFN $\alpha$  соответственно). В экспериментах с помощью метода Рида и Менча было показано, что созданные рекомбинантные ОВ проявляют онкоселективность в отношении опухолевых линий соответствующего вида. Для LVP-hIFN $\alpha$  показана способность эффективно заражать линии аденокарциномы и глиобластомы человека. Для LVP-mIFN $\alpha$  *in vitro* продемонстрирована селективность в отношении глиомы Gl261 и меланомы B16. В эксперименте *in vivo* на мышах линии C57Bl/6 с подкожной меланомой B16 показана способность LVP-mIFN $\alpha$  после внутривенного введения уменьшать объем подкожного аллогraftа опухоли и увеличивать инфильтрацию опухоли CD8<sup>+</sup>- и NK-клетками. Созданный рекомбинантный вирус может быть потенциальной платформой для разработки онколитической виротерапии меланомы и глиобластомы человека.

**Ключевые слова:** онколитические вирусы, интерферон, вирусный онколиз, рекомбинантные штаммы вируса осповакцины

**Финансирование:** создание рекомбинантных штаммов вируса осповакцины было выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-14-00370, изучение их свойств на моделях *in vitro* и *in vivo* проводилось при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-64-00057, гистологические и иммуногистохимические исследования опухолевой ткани проводили при поддержке ФМБА России.

**Вклад авторов:** Е. Р. Набережная — реализация экспериментов *in vitro* и *in vivo*, написание рукописи; А. В. Соболева — получение данных проточной цитометрии, определение чувствительности линий к вирусам; П. О. Воробьев — создание рекомбинантных вирусов, наработка препаративных количеств штаммов; В. В. Вадехина — проведение экспериментов *in vivo*; Г. М. Юсубалиева — интерпретация данных эксперимента *in vivo*, написание статьи; И. В. Исаева — проведение гистологического и иммуногистохимического исследования; В. П. Баклаушев — проведение микроскопии, описание гистологических и иммуногистохимических данных, подготовка рисунка, написание статьи; П. М. Чумаков, редактирование рукописи; А. В. Липатова — концепция исследования, общее руководство проектом.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование *in vivo* одобрено этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (протокол № 7 от 06 сентября 2022 г.), проведено в соответствии с рекомендациями Коллегии ЕЭК от 14.11.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Число животных в группах было минимизировано, размеры подкожных опухолей в группах не превышали 2000 мм<sup>3</sup>. Эксперименты *in vitro* проведены на коммерчески доступных линиях клеток животных и человека.

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

Статья получена: 26.11.2024 Статья принята к печати: 19.12.2024 Опубликовано онлайн: 30.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.072

## INTERFERON TYPE I-EXPRESSING RECOMBINANT VACCINIA VIRUS AS A PLATFORM FOR SELECTIVE IMMUNOTHERAPY OF GLIOBLASTOMA AND MELANOMA

Naberezhnaya ER<sup>1</sup>, Soboleva AV<sup>1</sup>, Vorobyev PO<sup>1</sup>, Vadekhina VV<sup>1</sup>, Yusubalieva GM<sup>1,2,3</sup>, Isaeva IV<sup>2</sup>, Baklaushev VP<sup>1,2,3,4</sup>, Chumakov PM<sup>1</sup>, Lipatova AV<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Research Institute of Pulmonology of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Immunotherapy with oncolytic viruses (OVs) becomes a full-fledged neoadjuvant therapy method in the paradigm of evidence-based medicine for the growing number of cancers. The use of OVs for immunologically “cold” tumors causing minimal immune response and having the clearly immunosuppressive tumor microenvironment is especially relevant. Recombinant OVs carrying the sequences of proteins activating the immune system can be used to stimulate antitumor response. The study aimed to assess oncospecificity and antitumor activity of the recombinant OV designed based on the LVP vaccinia virus strain showing expression of human and murine interferon alpha sequences (hIFN $\alpha$  and mIFN $\alpha$ , respectively). The *in vitro* experiments showed that the recombinant OVs designed showed oncospecificity in relation to tumor cell lines of appropriate species. The ability to effectively infect human adenocarcinoma and glioblastoma cell lines was reported for LVP-hIFN $\alpha$ . LVP-mIFN $\alpha$  showed selectivity in relation to glioma Gl261 and melanoma B16 *in vitro*. The *in vivo* experiment involving the C57Bl/6 mice with subcutaneous melanoma B16 showed the ability of the intravenously administered LVP-mIFN $\alpha$  to reduce the size of the subcutaneous tumor allograft and increase tumor infiltration with the CD8<sup>+</sup> and NK cells. The recombinant virus designed can be a potential platform for the development of oncolytic virotherapy of human melanoma and glioblastoma.

**Keywords:** oncolytic viruses, interferon, viral oncolysis, recombinant vaccinia virus strains

**Funding:** the design of recombinant vaccinia virus strains was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-14-00370, and assessment of their properties in *in vitro* and *in vivo* models was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-64-00057; histologic and immunohistochemical assessment of tumor tissue was supported by FMBA of Russia.

**Author contribution:** Naberezhnaya ER — implementation of *in vitro* and *in vivo* experiments, manuscript writing; Soboleva AV — flow cytometry data acquisition, determining the cell line sensitivity to viruses; Vorobyev PO — designing recombinant viruses, production of preparative amounts of strains; Vadekhina VV — conducting *in vivo* experiments; Yusubalieva GM — interpretation of *in vivo* experimental data, manuscript writing; Isaeva IV — histologic and immunohistochemical assessment; Baklaushev VP — microscopy, describing histology and immunohistochemistry data, preparing a drawing, manuscript writing; Chumakov PM — manuscript editing; Lipatova AV — study concept, general project management.

**Compliance with ethical standards:** the *in vivo* study was approved by the Ethics Committee of the Federal Scientific and Clinical Center of FMBA of Russia (protocol No. 7 dated 06 September 2022) and conducted in accordance with the Eurasian Economic Commission Board's guidelines No. 33 dated 14 November 2023 "On the Guidelines for handling laboratory (experimental) animals when conducting preclinical (non-clinical) studies". The number of animals per group was minimized; the subcutaneous tumor size in the groups did not exceed 2000 mm<sup>3</sup>. *In vitro* experiments involved the commercially available animal and human cell lines.

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

Received: 11.12.2024 Accepted: 24.12.2024 Published online: 30.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.072

Несмотря на наличие множества терапевтических подходов, включающих современную хирургию с интраоперационной навигацией, современную радиотерапию, современную неоадьювантную терапию таргетными препаратами, ингибиторами контрольных иммунных точек и другие, продолжительность жизни пациентов при некоторых онкологических заболеваниях, таких как глиобластома, метастатическая меланома и ряд карцином с первичным метастазированием, остается крайне низкой. Именно поэтому актуальны исследования и разработки новых терапевтических подходов, направленных на элиминацию или предотвращение отдаленных метастазов.

Важным требованием к разработке новых противоопухолевых средств является высокоизбирательное онколитическое действие, способность обнаруживать и уничтожать только злокачественные/метастатические опухолевые клетки. Поэтому идеальными кандидатами на разработку онкоселективных средств являются непатогенные или аттенуированные вирусы. Онкоселективные терапевтические штаммы способны разрушать опухолевые клетки, эффективно реплицируясь в них, не повреждая при этом нормальные ткани [1].

В настоящее время особое внимание уделяется применению вирусов семейства *Poxviridae* в качестве прототипов онколитических вирусов для лечения метастазирующих карцином и меланомы. Перспективным онколитическим вирусом семейства *Poxviridae* является вирус осповакцины (*vaccinia virus*, VV) [2], в частности, российский биовариант штамма Листер — LIVP VV. Данный штамм широко применяли в международной программе ликвидации оспы, и он обладает исключительной онкоселективностью [3, 4], в особенности после инактивации гена тимидинкиназы, что приводит к избирательной репликации вируса в опухолевых клетках, богатых данным ферментом [5].

Для повышения противоопухолевых свойств аттенуированных штаммов VV конструируют рекомбинантные штаммы VV, экспрессирующие различные трансгены [6]. На данный момент известно множество трансгенов, которые проявили свою эффективность при экспрессии в VV, включая гены цитокинов и их рецепторов [7], иммуностимуляторов [8–10], онкотоксических белков [11], ингибиторов ангиогенеза [12].

В данной работе были сконструированы высокоонкоселективные штаммы вируса осповакцины, экспрессирующие человеческий или мышинный IFN $\alpha$  и tagRFP в составе бицистронной кассеты. Экспрессия IFN $\alpha$  рекомбинантным онколитическим штаммом может усиливать не прямое иммуноопосредованное онколитическое действие, за счет индукции экспрессии комплекса гистосовместимости I класса, увеличения активности цитотоксических Т-лимфоцитов, активации Т-хелперных клеток, макрофагов и NK-клеток [13].

Секреция интерферона в нормальных клетках приостанавливает трансляцию белка и клеточный цикл, замедляет метаболизм [14], поэтому, защищая клетки от вирусов, интерфероновые механизмы мешают пролиферации опухолевых клеток. Микроэволюция развивается таким образом, что в опухолевых клетках накапливаются ошибки в сигнальных путях индукции интерферона и интерферонного ответа, вследствие чего клетки могут утрачивать способность переходить в противовирусное состояние [15, 16]. Утрата механизмов интерфероновой защиты является одним из факторов, обуславливающих бесконтрольную пролиферацию опухолевых клеток [17].

Еще одним фактором, который делает онколитическую виротерапию перспективной, является способность ОВ стимулировать продолжительный противоопухолевый иммунный ответ [18]. Вирусы разрушают опухолевые клетки, и высвобождаются различные молекулы, такие как опухоль-ассоциированные антигены; патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями и цитокины [19]. Эти молекулы способствуют активации иммунных клеток, таких как антигенпрезентирующие клетки и Т-клетки, что формирует эффективный адаптивный иммунный ответ против опухоли [20, 21].

Интерфероны I типа ингибируют репликацию вируса в нормальных клетках, но в опухолевых клетках их действие не так эффективно [8, 17]. Благодаря этому интерфероны I типа обладают противоопухолевым действием, они способны индуцировать опухольспецифические цитотоксические Т-лимфоциты и активировать антиангиогенные факторы [22]. Примечательно, что сам по себе VV ингибирует систему интерферонного ответа посредством экспрессии некоторых генов [22]. Цель работы — оценить вклад экспрессии интерферона вирусом осповакцины в онколитическую активность вируса *in vitro* и *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Штаммы вируса осповакцины, используемые в работе

LIVP-hIFN $\alpha$  — вирус осповакцины, экспрессирующий человеческий IFN $\alpha$  и tagRFP; LIVP-mIFN $\alpha$  — вирус осповакцины, экспрессирующий мышинный IFN $\alpha$  и tagRFP; LIVP-RFP — вирус осповакцины, экспрессирующий tagRFP.

### Культуры клеток, используемые в работе

VHK-21 — эмбриональная линия почки хомяка; HEK293T — трансформированная эмбриональная линия почки человека, содержащая SV40-антиген; U-87 MG, DBTRG-05MG, U251-MG, PrGlioma 3821, PrGlioma 6067, PrGlioma 6138 — линии глиобластомы человека; HeLa — линия клеток аденокарциномы шейки матки; HEF — эмбриональная линия фибробластов человека; Embr.astro — эмбриональная линия астроцитов человека; B16 — мышинная меланома; 4T1 — мышинная аденокарцинома молочной железы.

Клеточные линии культивировали на среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), антибиотика пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 2 мМ L-глутамин. Клетки инкубировали при температуре 37 °C и 5% CO $_2$ , пассировали каждые 3–5 дней.

### Создание рекомбинантных штаммов вируса осповакцины, экспрессирующих кДНК IFN $\alpha$ мыши и человека

#### Получение плазмидных конструций для рекомбинации

Для получения фрагмента кДНК мышинного IFN $\alpha$  самку мыши линии Balb/c инфицировали вирусом Сендай (Москва) в количестве 10 $^9$  инфекционных частиц. Через 24 ч мышью подвергали эвтаназии. мРНК экстрагировали из селезенки (total RNA isolation kit, Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. кДНК получали методом обратной транскрипции с помощью набора для синтеза кДНК Superscript III в соответствии с инструкциями производителя. Фрагменты

амплифицировали с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров:

Прямой: 5'-ATGGCTAGGCTCTGTG-3'

Обратный: 5'-TTTCTCTCTCAGTCTTCCCA-3'

кДНК человеческого IFN $\alpha$  была получена путем ревертирования тотальной РНК периферических мононуклеаров крови здорового донора. Последовательности праймеров, использованных для амплификации:

Прямой 5'-ATGGCCTCGCCCTTTC-3'

Обратный: 5'-TTCCCTCCTCCTTAATCTTCTTGCAAG-3'

После получения ампликона была проведена повторная ПЦР с праймерами, содержащими рестрикционные сайты. Далее в шаттл-вектор, разработанный ранее в лаборатории пролиферации клеток, производили клонирование по липким концам. Готовые конструкции подвергали секвенированию по методу Сэнгера.

Полученные конструкции трансфецировали в клетки линии HEK293T с использованием PEI [23], после чего инфицировали биовариантом L1VP штамма Листер вируса осповакцины. Методом бляшек рекомбинантные штаммы отобрали на линии ВНК-21 [7], а также наработали в препаративных количествах, как было описано ранее [24].

### Определение чувствительности линий опухолевых клеток к штаммам вируса осповакцины

Чувствительность линий опухолевых клеток к штаммам вируса осповакцины определяли с помощью окрашивания резазурином. Для этого клетки рассеивали на 96-луночные планшеты, далее инфицировали 10-кратными серийными разведениями вируса. В качестве контроля использовали среду, не содержащую вирус. Далее инкубировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Через 72 ч после инфицирования проводили оценку цитотоксичности. Тест основан на возможности жизнеспособных клеток превращать резазурин в резорурфин путем окислительно-восстановительных реакций. Клетки инкубировали в течение 4 ч с красителем. Далее измеряли уровень флуоресценции при длине волны 590 нм с использованием длины волны возбуждения 560 нм на микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). По полученным данным определяли количество живых клеток в процентах относительно не зараженного контроля и считали величины показателя TCID<sub>50</sub>.

### Оценка вирусной кинетики методом проточной цитометрии

Экспрессия RFP в инфицированных клетках коррелирует с репликацией вируса. Клеточные линии рассеивали на 24-луночные планшеты в количестве 10<sup>5</sup> клеток на лунку. Далее клетки инфицировали L1VP-hIFN $\alpha$  в MOI 5, 1 и 0,2. Клетки собирали через 24, 48, 72, 96 ч после заражения для анализа методом проточной цитометрии. Образцы анализировали путем детектирования красной флуоресценции в PE-канале с использованием цитофлуориметра BD LSR Fortessa (Beckman Dickinson, Franklin Lakes, NJ, США) с 10 000 событиями на образец.

### Оценка функциональной активности интерферона, экспрессируемого вирусами

Вирус везикулярного стоматита (штамм Индиана) является штаммом, чувствительным к противовирусному состоянию клетки, не способным оказывать цитопатогенное действие

на клетках с сохраненной системой интерферонного ответа после обработки интерфероном. Супернатант, содержащий IFN $\alpha$ , получали из вирусосодержащей среды, снятой с клеток ВНК-21, инфицированных в множественности 0,1 штаммом L1VP-hIFN $\alpha$ , или линии HEK293T в случае с штаммом L1VP-mIFN $\alpha$ . Вирусосодержащую среду собирали через 48 ч, осветляли путем центрифугирования при 4 °C 4000 rpm 20 мин, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и получали супернатант, содержащий IFN $\alpha$ . В фильтрованном супернатанте оставались лишь следовые количества вируса осповакцины. Опухолевую клеточную линию обрабатывали в трех повторностях рекомбинантным человеческим IFN $\alpha$ 2 $\beta$  (Фармаклон, Россия) или мышинным рекомбинантным интерфероном альфа (752802, Biolegend, США) в различных концентрациях, и супернатантом с интерферонами IFN $\alpha$  в различных концентрациях. В качестве контроля использовали супернатант с клеток, инфицированных L1VP-RFP и клетки без обработки интерфероном. Спустя день после обработки интерфероном на флуоресцентном микроскопе проверяли отсутствие вирусной инфекции. Через 24 ч после обработки супернатантом/интерфероном клетки инфицировали VSV в разных множественностях (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001). Через 24 ч проводили оценку цитопатического действия относительно не зараженного VSV контроля. И считали TCID<sub>50</sub> по методу Рида и Менча.

### Моделирование подкожной меланомы у мышей линии C57Bl/6, введение вирусов

Самкам ( $n = 12$ ) и самцам ( $n = 12$ ) мышей линии C57Bl/6 в возрасте 6–8 недель для создания модели мышинной меланомы подкожно, над задним бедром, вводили 10<sup>6</sup> клеток линии B16. Каждый день производили оценку роста и развития опухолей с помощью визуального осмотра и измерения размеров узла опухоли с использованием штангенциркуля. На седьмые сутки мышей с подтвержденным ростом подкожных аллогraftов опухоли случайным образом распределяли на три группы — L1VP-mIFN $\alpha$  ( $n = 8$ ), L1VP-RFP ( $n = 8$ ) и контроль ( $n = 8$ ), по 4 самки и по 4 самца в каждой группе. Вирусосодержащие растворы L1VP-mIFN $\alpha$  и L1VP-RFP в количестве 5 × 10<sup>6</sup> БОЕ/мл растворяли в 100 мкл PBS и внутривенно вводили мышам соответствующих групп на 7-й и 10-й дни после имплантации опухолей. Животным контрольной группы в те же временные точки вводили физиологический раствор. За животными наблюдали в течение 24 дней, измеряли объем опухоли, чтобы оценить динамику ее роста или регрессии. Размеры опухолей измеряли до начала лечения, а затем каждые 2 дня. Объем опухоли вычисляли с использованием формулы:

$$V = \frac{a \cdot b^2}{2}, \quad (3)$$

где  $a$  — меньшее из двух ортогональных измерений опухоли,  $b$  — второе ортогональное измерение. Затем, в каждой группе вычисляли средний объем опухоли ( $V_{ср}$ ).

### Гистологическое и иммуногистохимическое исследование

Гистологическое исследование проводили на трех дополнительных группах мышей C57Bl/6, которым вводили L1VP-mIFN $\alpha$  ( $n = 3$ ), L1VP-RFP ( $n = 3$ ) и физиологический раствор ( $n = 3$ ) так же, как мышам основных групп.

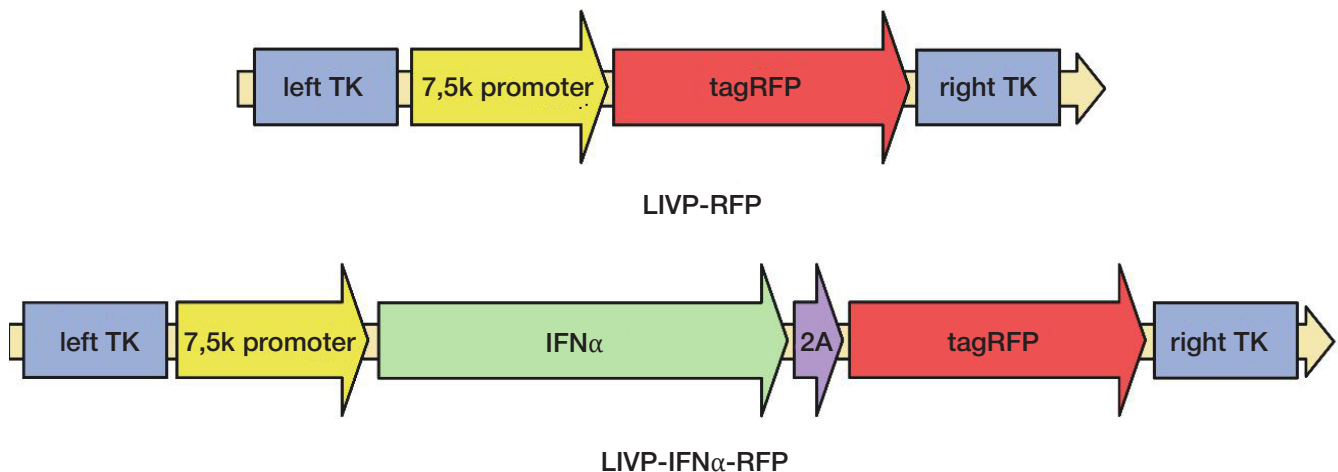


Рис. 1. Схематичная иллюстрация конструкции плазмиды

На 24-е сутки после имплантации опухоли (14-е сутки после последнего введения вирусов) животных глубоко наркотизировали внутривенным введением запредельной дозы пропофола, после возникновения апноэ мышей подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков, подкожные аллогraftы опухолей аккуратно выделяли вместе с окружающей клетчаткой во избежание повреждения кистозных полостей и помещали в десятикратный объем 10%-го нейтрального забуференного формалина на 72 ч. Фиксированные ткани дегидратировали в растворах этанола восходящей концентрации (70%, 80%, 96%), затем в изопропанол и О-ксилоле, после чего заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм приготавливали с помощью ротационного микротом и монтировали на предметные стекла. Перед окрашиванием срезы депарафинировали в О-ксилоле, изопропанол и этаноле. Для проведения гистологического исследования срезы окрашивали гематоксилином в течение 10 мин, промывали дистиллированной водой, затем проточной водопроводной водой и докрашивали эозином в течение 30 с. Далее срезы повторно дегидратировали в 96%-м этаноле, изопропанол и О-ксилоле и монтировали с помощью среды «Витрогель» и покровных стекол толщиной 0,15 мм. Иммунопероксидазное окрашивание парафиновых срезов на маркеры иммунных клеток проводили с помощью иммуноштейнера Benchmark Ultra Immunostainer (Ventana, США) с применением первичных антител к CD4, CD8, CD56 (Roche, США) и набора OptiView DAB IHC Detection Kit (Roche, США) в соответствии с протоколами производителя. Окрашенные и покрытые покровными стеклами препараты сканировали с помощью сканера Leica Aperio GT450 DX (Leica Biosystems, США) и обрабатывались при 20-кратном увеличении с помощью программного обеспечения Aperio ImageScope.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Создание рекомбинантных штаммов

Ген  $IFN\alpha$  — один из перспективных трансгенов, способный повысить онкоселективность вируса благодаря своим иммуностимулирующим свойствам и ингибированию вирусной репликации в нормальных тканях. В нашей работе были созданы рекомбинантные штаммы биоварианта LIVP, экспрессирующие под управлением промотора p7,5k VV  $IFN\alpha$  (человека или мыши) в составе бицистронной кассеты с красным флуоресцентным белком RFP (рис. 1). Применение

данного раннего промотора позволило добиться высокого уровня экспрессии интерферона в опухолевых клетках.

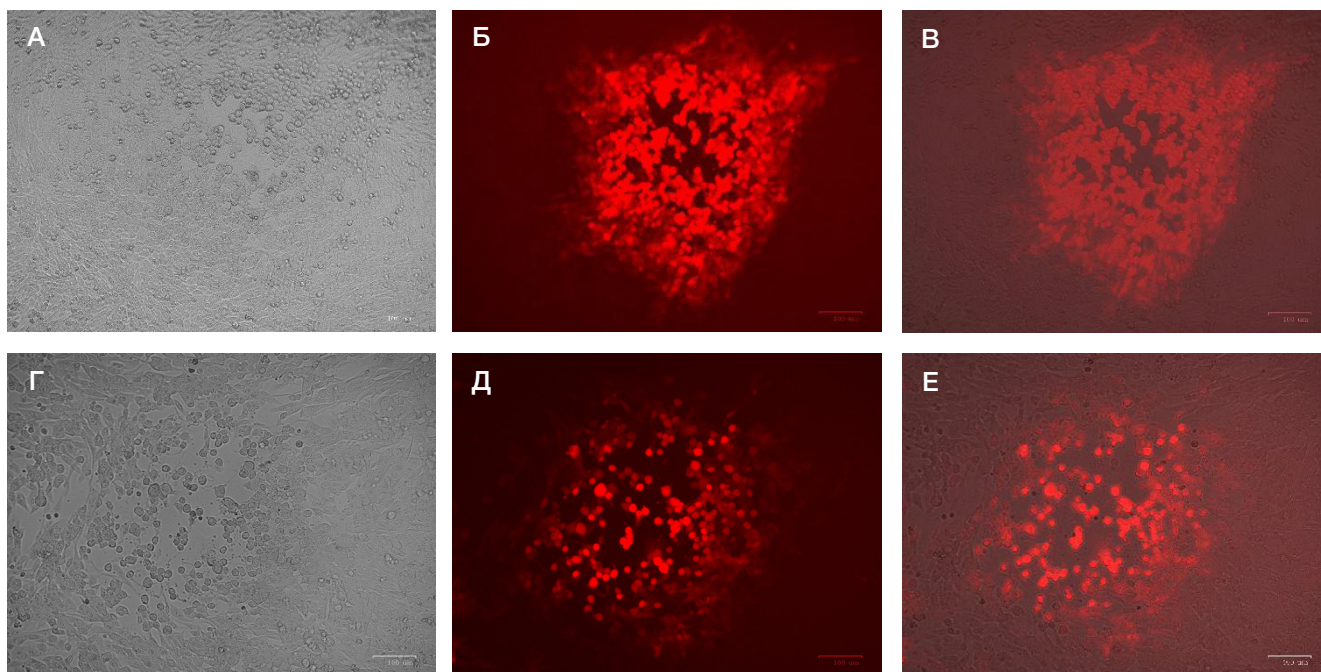
Для дальнейшего культивирования рекомбинантного штамма вируса осповакцины была выбрана клеточная культура ВНК-21 как высокочувствительная к вирусу осповакцины. Рекомбинантные варианты экспрессировали флуоресцентный белок (рис. 2). Корректность экспрессии трансгена была подтверждена путем секвенирования по Сэнгеру ампликонов транскриптов, фланкированных участками гена тимидинкиназы вируса осповакцины.

Эффективность репликации вируса в различных опухолевых линиях была определена методом проточной цитометрии спустя 24, 48, 72 и 96 ч после инфицирования вирусом. Были протестированы опухолевые клеточные линии человека: (аденокарцинома HeLa, глиобластома U251-MG) и мыши (меланома B16, аденокарцинома 4T1). Клеточная линия ВНК-21 была использована в качестве эталонной. Клеточные культуры HeLa и U251-MG были инфицированы в MOI 1 и 0,1 штаммами LIVP-hIFN $\alpha$ , LIVP-RFP. Клеточные культуры B16 и 4T1 инфицированы в тех же множественностях штаммами LIVP-mIFN $\alpha$ , LIVP-RFP. Через 24, 48, 72 и 96 ч после заражения определяли процент RFP-положительных клеток.

Было обнаружено, что рекомбинантный штамм LIVP-mIFN $\alpha$  слабо реплицируется в аденокарциноме 4T1, но при MOI 1 дает более чем 20%-й уровень репликации в меланоме B16 (рис. 3). LIVP-hIFN $\alpha$  показал эффективную репликацию в культурах опухолевых клеток человека. Спустя 24 ч линия HeLa при инфицировании различными множественностями показала максимальную заражаемость среди исследованных линий: MOI 1 —  $34,44 \pm 1,38\%$ , MOI 0,1 —  $7,82 \pm 0,96\%$ . Примечательно, что в культуре глиобластомы человека при MOI 1 через 96 ч после заражения репликация вируса LIVP-hIFN $\alpha$  не отличалась от контрольного и составляла почти 100%. Для подтверждения гипотезы об онкоселективности LIVP-hIFN $\alpha$  в отношении глиобластомы мы протестировали его цитопатогенное действие на расширенной панели линий этой опухоли.

### Оценка цитопатогенного действия рекомбинантных штаммов на панели опухолевых и нормальных клеточных линий

На панели опухолевых и нормальных клеток человека и мыши была исследована онколитическая активность вируса осповакцины, экспрессирующего интерфероны альфа, в сравнении со штаммом, экспрессирующим tagRFP. С



**Рис. 2.** Фотографии клеток ВНК-21 через 24 ч после инфицирования LVP-mIFN $\alpha$  (А–В) и LVP-hIFN $\alpha$  (Г–Е) (А, Г — в светлом поле; Б, Д — в красном флуоресцентном канале; В, Е — совмещенное изображение. Увеличение:  $\times 200$ ; отрезок = 100 мкм)

помощью титрования вируса LVP-hIFN $\alpha$  по методу Рида и Менча и определения величины TCID<sub>50</sub>, была оценена чувствительность клеточных линий глиобластомы U-87 MG, DBTRG-05MG, U251-MG, PrGlioma 3821, PrGlioma 6067, PrGlioma 6138 (рис. 4А), а также две нормальные клеточные линии: эмбриональная линия фибробластов человека HEF, эмбриональная линия астроцитов человека Embr.astro. Штамм, экспрессирующий мышинный интерферон, был протестирован на линиях мышинной глиомы CT2A и GL261, а также на аденокарциноме 4T1 и меланоме B16 (рис. 4Б).

Исследование на панели линий глиобластомы человека показало достаточно высокую чувствительность этих линий к LVP-hIFN $\alpha$ , сопоставимую с чувствительностью клеток глиобластомы к контрольному вирусу, экспрессирующему tagRFP (рис. 4). Было обнаружено, что нормальные фибробласты и астроциты имеют меньшую чувствительность к вирусу осповакцины, экспрессирующему hIFN $\alpha$ , чем к вирусу, экспрессирующему tagRFP. Эти данные свидетельствуют о том, что полученный рекомбинантный штамм является более онкоселективным, по сравнению с контрольным штаммом LVP-RFP. Одинаковая чувствительность исследованных линий к вирусам, экспрессирующим IFN $\alpha$  и tagRFP, в свою очередь свидетельствует, что прямая цитопатическая активность вируса, экспрессирующего интерферон, по отношению к опухолевым клеткам сохранилась.

#### Исследование функциональной активности интерферонов, экспрессируемых вирусом осповакцины

Функциональную активность экспрессируемых интерферонов определяли классическим тестом с использованием вируса везикулярного стоматита (VSV). Вирус везикулярного стоматита чувствителен к противовирусному состоянию, т. е. не способен оказывать цитопатогенное действие на клетки с сохраненной системой интерферонового ответа после обработки интерфероном. Было показано, что опухолевые клеточные линии U87-MG и B16 имеют сохранную систему интерферонового ответа [25].

Клеточные культуры обрабатывали профильтрованным супернатантом, снятым с клеток, инфицированных LVP-hIFN $\alpha$  или LVP-mIFN $\alpha$ , а также заводскими рекомбинантными IFN $\alpha$  (рис. 5). В качестве контроля использовали клетки без обработки интерфероном и клетки, обработанные профильтрованным супернатантом, который был снят с клеток, инфицированных LVP-RFP.

Супернатант для эксперимента с человеческим интерфероном был снят с клеточной линии ВНК-21, инфицированной LVP-hIFN $\alpha$ . Супернатант для эксперимента с штаммом LVP-mIFN $\alpha$  получили с клеток линии HEK293T, так как мышинный и хомячковый интерфероны обладают кроссактивностью.

Спустя день после обработки интерфероном на флуоресцентном микроскопе проверяли отсутствие вирусной инфекции. Через 24 ч после обработки интерфероном клетки инфицировали VSV в разных множественностях инфекции.

ЦПД вируса везикулярного стоматита полностью отсутствовало при обработке клеток рекомбинантным интерфероном в концентрации 320 ед./мл, или 2%-м разведении кондиционированной среды в случае человеческого интерферона. Для мышинного интерферона ЦПД отсутствовало при обработке клеток рекомбинантным интерфероном в концентрации 6,6 нг/мл или 0,25%-м разведении кондиционированной среды.

#### Противоопухолевая активность LVP-mIFN $\alpha$ *in vivo*

Онколитическую активность вируса осповакцины LVP-mIFN $\alpha$  исследовали на мышах линии C57Bl/6 с мышинной меланомой B16 (рис. 6). Внутривенная виротерапия была проведена на 7-й и 10-й дни после имплантации опухоли. Контрольной группе мышей был введен физиологический раствор.

Объем опухолей измеряли через день. При лечении вирусом осповакцины наблюдали меньший объем опухолей по сравнению с контрольной группой, особенно при лечении вирусом, экспрессирующим мышинный интерферон альфа.

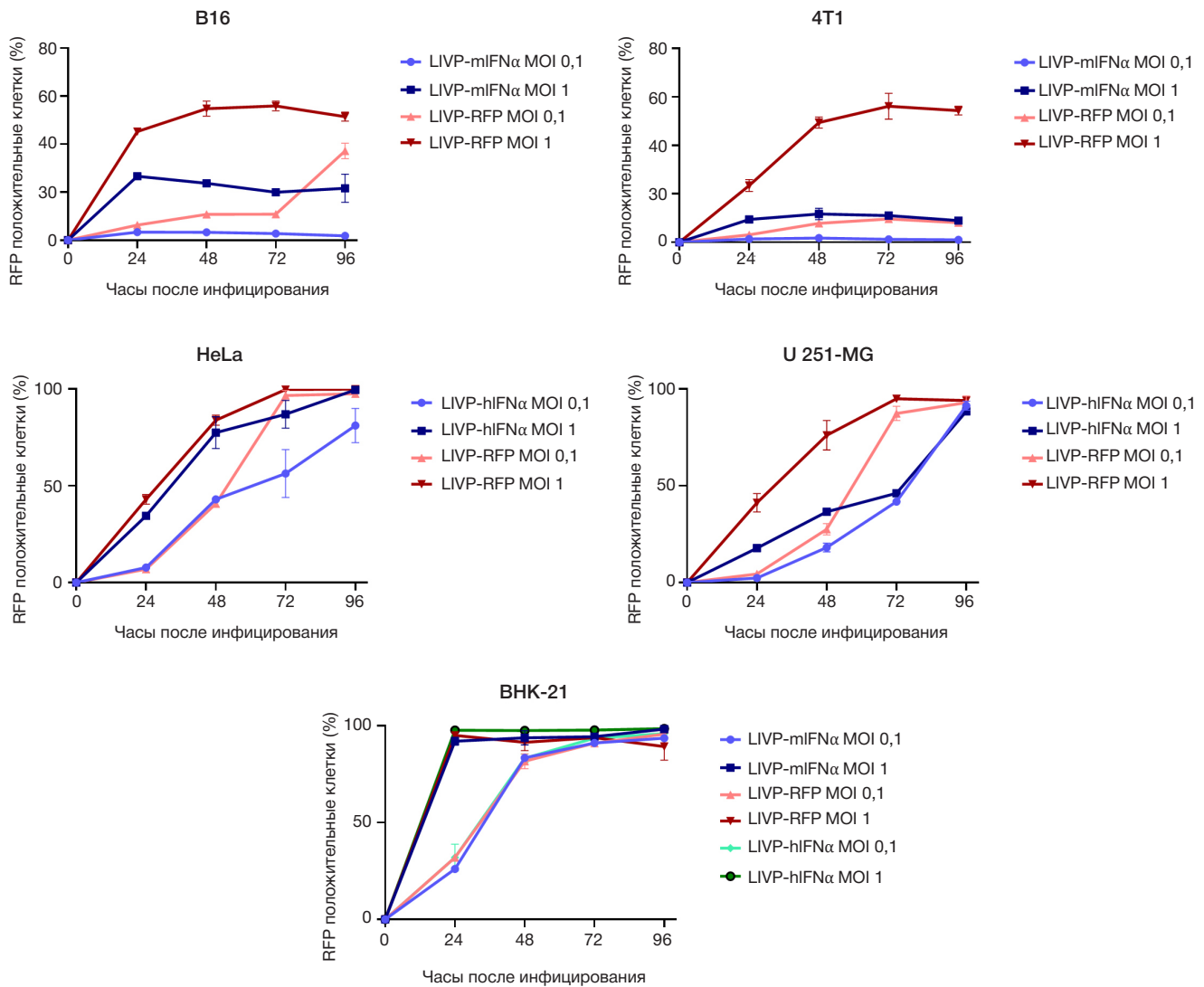


Рис. 3. Оценка кинетики репликации вируса через 24, 48, 72 и 96 ч после инфицирования рекомбинантным штаммом VV на различных клеточных линиях

Средний объем опухолей в контрольной группе составил 1800 мм<sup>3</sup>, в группе, получавшей LIVP-RFP, — 1450 мм<sup>3</sup>, а в группе, получавшей вирус с мышинным интерфероном альфа, — 650 мм<sup>3</sup> ( $p$ -value < 0,01). Снижение объема опухолей по сравнению с группой контроля составило 64% (рис. 6).

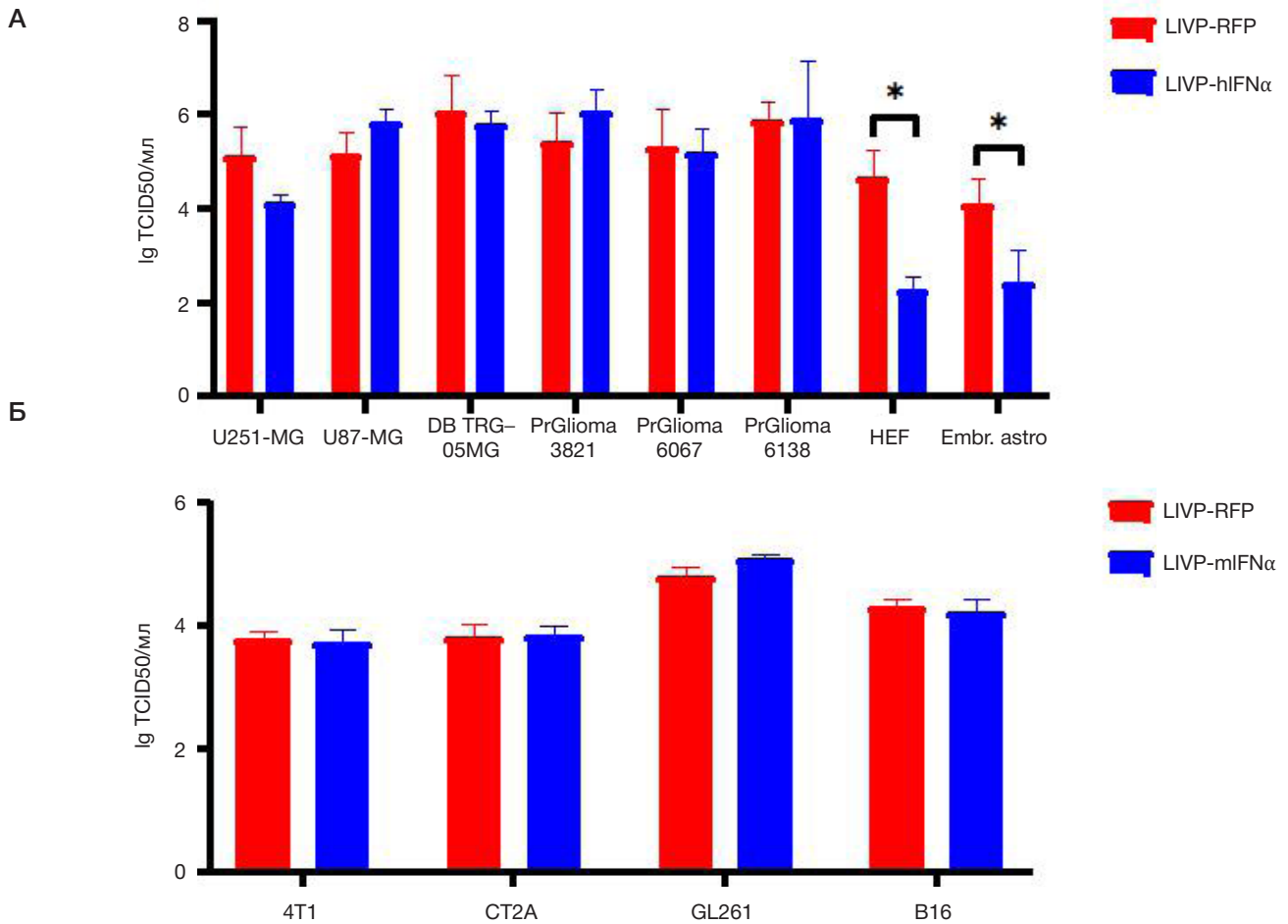
Гистологический анализ подкожных аллогraftов опухолей на 24-е сутки после имплантации (14-е сутки после последнего введения вирусов) показал гетерогенную гиперцеллюлярную структуру опухоли с участками некрозов и кровоизлияний, с включениями меланина и гистиоцитарной инфильтрацией. В препаратах животных, получивших внутривенную терапию онколитическими вирусами, наблюдали сливные некрозы с выраженной гистиоцитарной инфильтрацией (рис. 7; H & E). Иммуногистохимический анализ показал наличие инфильтрации CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-Т-клетками и CD56<sup>+</sup>-NK клетками во всех исследуемых образцах. При этом в препаратах после терапии VV наблюдалось значимо более высокое содержание цитотоксических Т-клеток и NK-клеток (до 40 в поле зрения) (рис. 7). Полученные результаты позволяют заключить, что репликация рекомбинантных вирусов существенно снижает иммунологическую «холодность» меланомы B16, способствуя инфильтрации стромы опухоли иммунокомпетентными клетками.

Резюмируя полученные результаты, можно заключить, что разработанный онкоселективный штамм вируса осповакцины, экспрессирующий функционально активный мышинный интерферон альфа, обладает существенной противоопухолевой активностью на модели мышинной меланомы B16.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ДНК-содержащий вирус осповакцины является перспективной платформой для создания селективных рекомбинантных онколитических штаммов, поскольку его геном может вмещать вставки размером до 25 т.п.н. [6]. К настоящему моменту созданы и успешно испытаны в доклинических и клинических исследованиях рекомбинантные штаммы VV, содержащие последовательности цитокинов, хемокинов, онкотоксических белков [11], бактериальных иммуоатрактантов (например, лиганда рецептора врожденной иммунной системы TLR5 флагеллина [10]) и других белков, активирующих противоопухолевый иммунный ответ и рекрутирующих в опухоль цитотоксические иммунные клетки [7, 26, 27].

Рекомбинантный штамм вируса JX-594, содержащий делецию в гене тимидинкиназы (ТК), а также последовательность гранулоцитарно-макрофагального



**Рис. 4.** Чувствительность опухолевых и нормальных клеточных линий к вирусу осповакцины, экспрессирующему tagRFP и **А)** экспрессирующему человеческий IFN $\alpha$  и **Б)** мышинный IFN $\alpha$ . По оси абсцисс показаны линии опухолевых клеток, по оси ординат — IgTCID<sub>50</sub>/мл

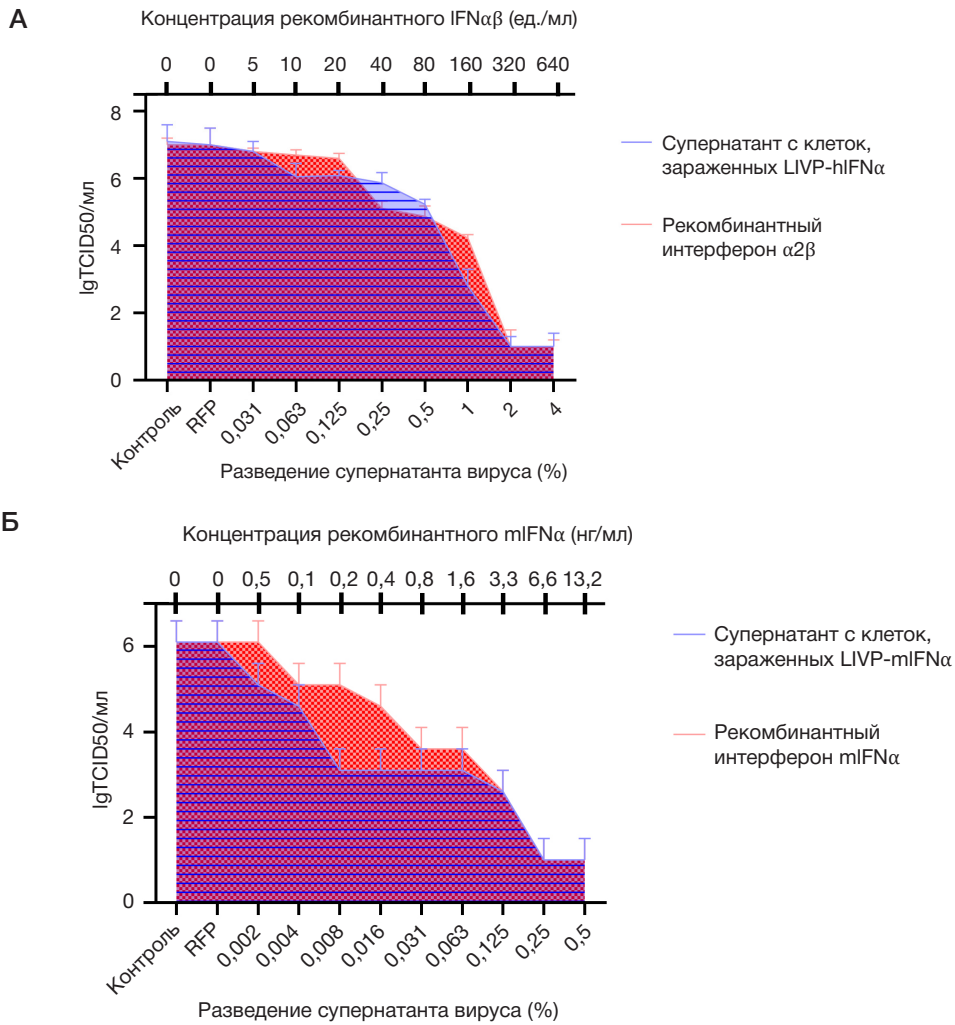
колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и трансгены lac-Z, показал весьма обнадеживающие результаты во II фазе клинических испытаний онколитической терапии метастазов в печени колоректального рака и меланомы. Введенный внутривенно вирус JX-594 обнаруживался в опухолевой ткани, что сопровождалось секрецией IFN $\alpha$ , индукцией хемокинов и активацией противоопухолевого иммунного ответа [26].

В нашем исследовании с целью повышения онкоселективности мы также использовали штамм LIVP с дефектным геном ТК — фермента, необходимого для синтеза ДНК вируса, который практически не экспрессируется в процессе нормального клеточного цикла, но высоко экспрессирован в низкодифференцированных опухолевых клетках [28]. Мы предположили, что включение в рекомбинантный вирус осповакцины последовательности IFN $\alpha$  может усилить селективность репликации вируса в опухолевых клетках, в которых интерфероновый сигналинг часто дефектен, а также будет способствовать активации NK-клеток, макрофагов и цитотоксических Т-клеток в ответ на опухольспецифичную репликацию вируса и таким образом, способствовать эффективной эрадикации опухоли.

Эксперименты с определением величины TCID<sub>50</sub> для опухолевых и нормальных клеточных линий подтвердили наше предположение о повышенной онкоселективности LIVP-hIFN $\alpha$ , показав, что нормальные клетки имеют меньшую чувствительность к вирусу осповакцины, экспрессирующему IFN $\alpha$ , чем к вирусу, экспрессирующему tagRFP. Эксперименты со снижением

ЦПД вируса везикулярного стоматита после обработки клеток глиобластомы человека и аденокарциномы мыши супернатантами от зараженных LIVP-hIFN $\alpha$  и LIVP-mIFN $\alpha$  клеток соответственно, подтвердили, что экспрессируемый зараженными клетками IFN $\alpha$  является функционально активным. Наиболее чувствительной к LIVP-hIFN $\alpha$  оказалась линия HeLa, что позволяет предполагать потенциальную применимость созданного рекомбинантного вируса для терапии аденокарцином. Обнаруженная нами чувствительность к LIVP-hIFN $\alpha$  у клеток глиобластомы U251-MG показала весьма интересной с точки зрения возможного практического применения данного вируса в терапии глиальных опухолей. Это предположение было подтверждено нами еще на пяти линиях этой опухоли, включая первичные культуры глиобластомы, имеющиеся в нашем распоряжении. Эти данные позволяют предположить, что LIVP-hIFN $\alpha$  может быть перспективным онколитическим вирусом для терапии глиобластомы.

Результаты исследований *in vivo* на мышинной модели меланомы B16 подтвердили наше предположение о высокой онкоселективности LIVP-mIFN $\alpha$  и усиленной онколитической активности. Снижение объема опухоли у животных, получивших внутривенную терапию LIVP-mIFN $\alpha$  на 64% по сравнению с контрольными животными, убедительно свидетельствует о преимуществах созданного нами рекомбинантного VV, приводящего к секреции зараженными клетками функционально активного IFN $\alpha$ . Иммуногистохимические исследования показали высокий уровень инфильтрации опухолей, пролеченных LIVP-mIFN $\alpha$  CD8<sup>+</sup>-Т-клетками и

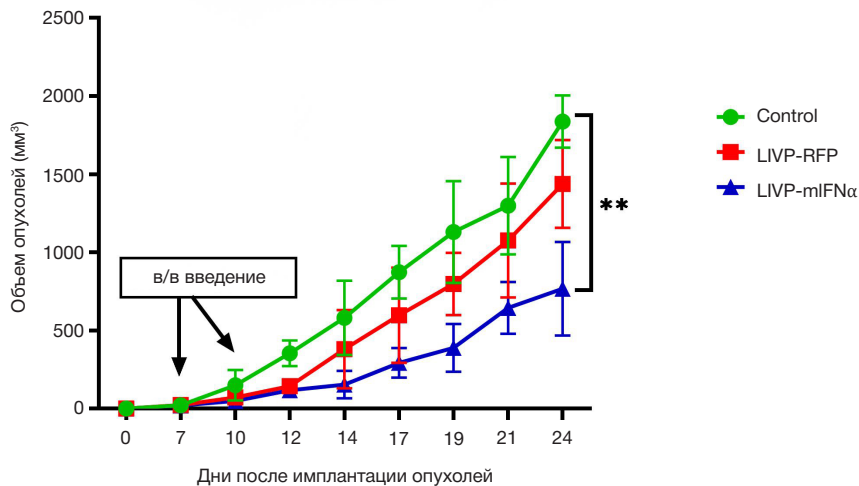


**Рис. 5.** Оценка функциональной активности интерферонов, экспрессируемых штаммами L1VP-hIFN $\alpha$  на клеточной линии U87-MG (**А**) или L1VP-mIFN $\alpha$  на клеточной линии V16 (**Б**)

NK-клетками. Механизмы повышенной онколитической активности L1VP-mIFN $\alpha$  нуждаются в дополнительных исследованиях, но по данным литературы и нашим собственным данным в отношении других рекомбинантных штаммов [7, 10], содержащих последовательности цитокинов, можно предположить, что наблюдается повышенная активация NK-клеток и цитотоксических T-клеток вокруг опухоли, секретирующей IFN $\alpha$ .

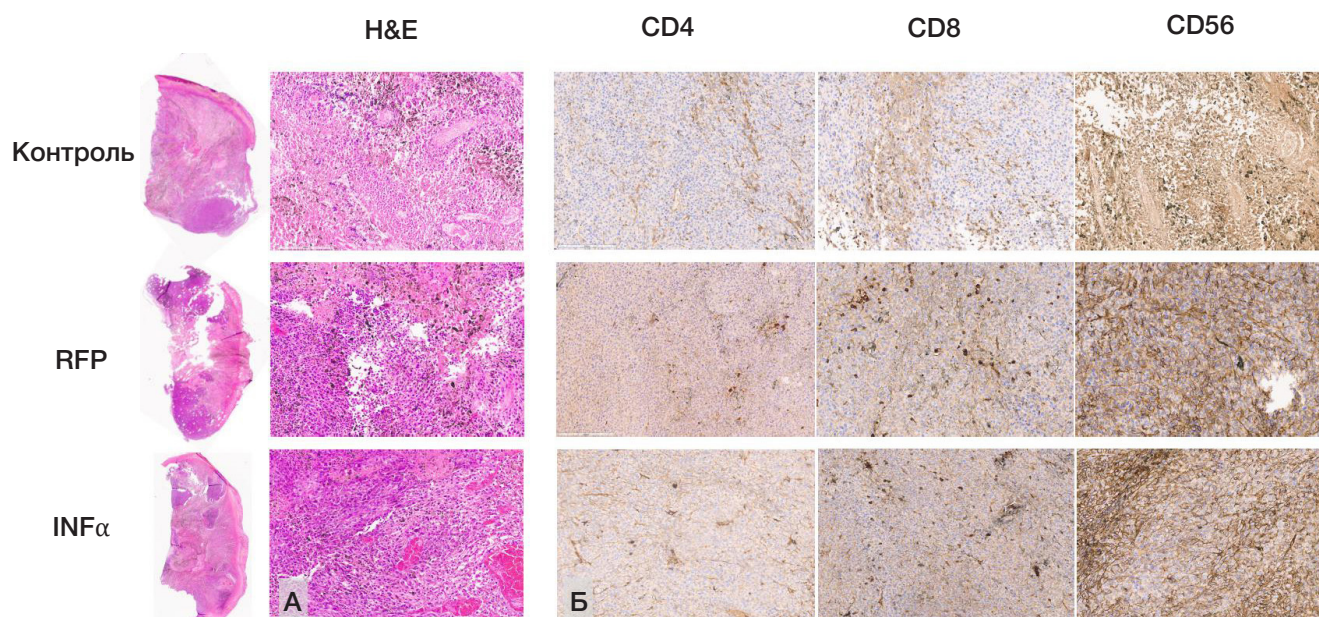
**Выводы**

Созданы новые рекомбинантные штаммы вируса осповакцины, экспрессирующие IFN $\alpha$  мыши и человека, характеризующиеся сопоставимой с материнским штаммом онколитической активностью, при этом для L1VP-hIFN $\alpha$  показана значимая онкоселективность за счет уменьшения чувствительности нормальных клеток



**Рис. 6.** Динамика роста опухолей после инъекции L1VP-mIFN $\alpha$





**Рис. 7.** Гистологическое и иммуногистохимическое исследование препаратов опухолей через 24 дня после инокуляции. **А.** Окрашивание гематоксилином и эозином (слева общий вид опухоли, справа фрагменты с увеличением  $\times 200$ ). **Б.** Иммуногистохимическое окрашивание на кластеры дифференцировки: CD4, CD8, CD56. Сверху вниз показаны репрезентативные препараты животных из контрольной группы, группы с LVP-RFP и группы LVP-mIFN $\alpha$  соответственно

к этому вирусу. В экспериментах *in vitro* подтверждена функциональная активность интерферонов, экспрессируемых рекомбинантными штаммами LVP-hIFN $\alpha$  и LVP-mIFN $\alpha$ .

Продемонстрирована достоверно более высокая онколитическая активность LVP-mIFN $\alpha$  *in vivo* на модели мышинной меланомы B16.

## Литература

- Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016; 107 (10): 1373–9.
- Shakiba Y, et al., Recombinant Strains of Oncolytic Vaccinia Virus for Cancer Immunotherapy. *Biochemistry (Mosc).* 2023; 88 (6): 823–41.
- Shvalov AN, et al. Complete Genome Sequence of Vaccinia Virus Strain L-IVP. *Genome Announc.* 2016; 4 (3).
- Zonov E, et al. Features of the Antitumor Effect of Vaccinia Virus Lister Strain. *Viruses.* 2016; 8 (1).
- Hamad A, et al. Recent Developments in Glioblastoma Therapy: Oncolytic Viruses and Emerging Future Strategies. *Viruses.* 2023; 15 (2).
- Naik S, Russell SJ. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9 (9): 1163–76.
- Shakiba Y, et al. Oncolytic therapy with recombinant vaccinia viruses targeting the interleukin-15 pathway elicits a synergistic response. *Mol Ther Oncolytics.* 2023; 29: 158–68.
- Kirn DH, et al. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med.* 2007; 4 (12): e353.
- Park BH, et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol.* 2008; 9 (6): 533–42.
- Shakiba Y, et al. Oncolytic Efficacy of a Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Bacterial Flagellin in Solid Tumor Models. *Viruses.* 2023; 15 (4).
- Kochneva G, et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression. *Oncotarget.* 2014; 5 (22): 11269–82.
- Tysome JR, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin-angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther.* 2011; 22 (9): 1101–8.
- Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15 (4): 231–42.
- Gastl G, Huber C. The biology of interferon actions. *Blut.* 1988; 56 (5): 193–9.
- Matveeva OV, Chumakov PM. Defects in interferon pathways as potential biomarkers of sensitivity to oncolytic viruses. *Rev Med Virol.* 2018; 28 (6): e2008.
- Pikor LA, Bell JC, Diallo JS. Oncolytic Viruses: Exploiting Cancer's Deal with the Devil. *Trends Cancer.* 2015; 1 (4): 266–77.
- Stojdl DF, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med.* 2000; 6 (7): 821–5.
- Feola S, et al. Oncolytic ImmunoViroTherapy: A long history of crosstalk between viruses and immune system for cancer treatment. *Pharmacol Ther.* 2022; 236: 108103.
- Li R, et al. Using oncolytic viruses to ignite the tumour immune microenvironment in bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2021; 18 (9): 543–55.
- Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14 (9): 642–62.
- Davola ME, Mossman KL. Oncolytic viruses: how "lytic" must they be for therapeutic efficacy? *Oncoimmunology.* 2019; 8 (6): e1581528.
- Kirn DH, Thorne SH. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9 (1): 64–71.
- Vorobyev PO, et al. Comparative Efficiency of Accessible Transfection Methods in Model Cell Lines for Biotechnological Applications. *Bulletin of RSMU.* 2022; 3: 11–18.
- Kochneva G, et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget.* 2016; 7 (45): 74171–88.
- Lin AH, et al. Blockade of type I interferon (IFN) production by retroviral replicating vectors and reduced tumor cell responses to IFN likely contribute to tumor selectivity. *J Virol.* 2014; 88 (17): 10066–77.
- Samson A, et al. Neoadjuvant Intravenous Oncolytic Vaccinia

- Virus Therapy Promotes Anticancer Immunity in Patients. *Cancer Immunol Res.* 2022; 10 (6): 745–56.
27. Vasileva N, et al. The Recombinant Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact and Chemotherapy Drugs against Human Glioma. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (8).
28. Shakiba Y, et al. Comparison of the oncolytic activity of recombinant vaccinia virus strains LIVP-RFP and MVA-RFP against solid tumors. *Bulletin of RSMU.* 2023; 2: 4–11.

## References

- Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016; 107 (10): 1373–9.
- Shakiba Y, et al., Recombinant Strains of Oncolytic Vaccinia Virus for Cancer Immunotherapy. *Biochemistry (Mosc).* 2023; 88 (6): 823–41.
- Shvalov AN, et al. Complete Genome Sequence of Vaccinia Virus Strain L-IVP. *Genome Announc.* 2016; 4 (3).
- Zonov E, et al. Features of the Antitumor Effect of Vaccinia Virus Lister Strain. *Viruses.* 2016; 8 (1).
- Hamad A, et al. Recent Developments in Glioblastoma Therapy: Oncolytic Viruses and Emerging Future Strategies. *Viruses.* 2023; 15 (2).
- Naik S, Russell SJ. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9 (9): 1163–76.
- Shakiba Y, et al. Oncolytic therapy with recombinant vaccinia viruses targeting the interleukin-15 pathway elicits a synergistic response. *Mol Ther Oncolytics.* 2023; 29: 158–68.
- Kirn DH, et al. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med.* 2007; 4 (12): e353.
- Park BH, et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol.* 2008; 9 (6): 533–42.
- Shakiba Y, et al. Oncolytic Efficacy of a Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Bacterial Flagellin in Solid Tumor Models. *Viruses.* 2023; 15 (4).
- Kochneva G, et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression. *Oncotarget.* 2014; 5 (22): 11269–82.
- Tysome JR, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin-angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther.* 2011; 22 (9): 1101–8.
- Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15 (4): 231–42.
- Gastl G, Huber C. The biology of interferon actions. *Blut.* 1988; 56 (5): 193–9.
- Matveeva OV, Chumakov PM. Defects in interferon pathways as potential biomarkers of sensitivity to oncolytic viruses. *Rev Med Virol.* 2018; 28 (6): e2008.
- Pikor LA, Bell JC, Diallo JS. Oncolytic Viruses: Exploiting Cancer's Deal with the Devil. *Trends Cancer.* 2015; 1 (4): 266–77.
- Stojdl DF, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med.* 2000; 6 (7): 821–5.
- Feola S, et al. Oncolytic ImmunoViroTherapy: A long history of crosstalk between viruses and immune system for cancer treatment. *Pharmacol Ther.* 2022; 236: 108103.
- Li R, et al. Using oncolytic viruses to ignite the tumour immune microenvironment in bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2021; 18 (9): 543–55.
- Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14 (9): 642–62.
- Davola ME, Mossman KL. Oncolytic viruses: how "lytic" must they be for therapeutic efficacy? *Oncoimmunology.* 2019; 8 (6): e1581528.
- Kirn DH, Thorne SH. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9 (1): 64–71.
- Vorobyev PO, et al. Comparative Efficiency of Accessible Transfection Methods in Model Cell Lines for Biotechnological Applications. *Bulletin of RSMU.* 2022; 3: 11–18.
- Kochneva G, et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget.* 2016; 7 (45): 74171–88.
- Lin AH, et al. Blockade of type I interferon (IFN) production by retroviral replicating vectors and reduced tumor cell responses to IFN likely contribute to tumor selectivity. *J Virol.* 2014; 88 (17): 10066–77.
- Samson A, et al. Neoadjuvant Intravenous Oncolytic Vaccinia Virus Therapy Promotes Anticancer Immunity in Patients. *Cancer Immunol Res.* 2022; 10 (6): 745–56.
- Vasileva N, et al. The Recombinant Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact and Chemotherapy Drugs against Human Glioma. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (8).
- Shakiba Y, et al. Comparison of the oncolytic activity of recombinant vaccinia virus strains LIVP-RFP and MVA-RFP against solid tumors. *Bulletin of RSMU.* 2023; 2: 4–11.