

СРАВНЕНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ L1VP-RFP И MVA-RFP В ОТНОШЕНИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Я. Шакиба^{1,2}, Е. Р. Набережная^{1,2}, Д. В. Кочетков¹, Г. М. Юсубалиева^{1,3}, П. О. Воробьев¹, П. М. Чумаков¹, В. П. Баклаушев^{1,3}, А. В. Липатова¹✉

¹ Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ Федеральное научно-клиническое учреждение здравоохранения «Федеральный научный центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Среди онколитических вирусов одним из наиболее изученных является вирус осповакцины (VV), штамма модифицированного высокоаттенуированного вируса Анкара (MVA), показавшего многообещающие результаты в доклинических и клинических испытаниях. Штамм Lister VV из Московского Института вирусных препаратов (LIVP) исследован в меньшей степени, чем MVA и имеет отличный от MVA тропизм. Целью работы было сравнить онколитическую эффективность штаммов LIVP и MVA в отношении солидных опухолей. Для повышения селективности LIVP и MVA к опухолевым клеткам нами были получены рекомбинантные варианты с инактивацией гена тимидинкиназы (TK), MVA-RFP и LIVP-RFP, экспрессирующие красный флуоресцентный белок. Кинетику репликации и онколитическую активность полученных рекомбинантных штаммов оценивали *in vitro* и *in vivo* на линиях опухолевых клеток и аллотрансплантатах мышечных сингенных моделей метастатической аденокарциномы молочной железы мыши 4T1, аденокарциномы толстой кишки CT26 и меланомы B16. Как MVA-RFP, так и LIVP-RFP показали высокую эффективность репликации в опухолевых клетках и выраженную онколитическую активность в отношении аллотрансплантатов меланомы B16 и аденокарциномы молочной железы 4T1. В отношении 4T1, являющейся моделью тройного негативного рака молочной железы человека, LIVP-RFP по сравнению с MVA-RFP показал более чем на 50% повышенную цитотоксичность в тестах *in vitro*, а также достоверное замедление прогрессирования аллотрансплантатов 4T1 и повышение выживаемости животных в экспериментах *in vivo*. Применение штамма LIVP в качестве платформы при разработке рекомбинантных онколитических вирусов для терапии рака молочной железы может быть более перспективным, чем применение штамма MVA.

Ключевые слова: вирус осповакцины, LIVP, MVA, вирусная онколитическая терапия, рак молочной железы, карцинома толстой кишки, меланома

Финансирование: разработка онколитических вирусов и эксперименты *in vitro* были выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант РФФИ № 20-75-10157); эксперименты *in vivo* также выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант РФФИ № 22-64-00057).

Вклад авторов: Я. Шакиба — анализ литературы, выполнение преаналитического этапа работы, проведение экспериментов *in vitro* и *in vivo*, анализ и интерпретация данных, подготовка рисунков и графиков; Е. Р. Набережная — проведение экспериментов *in vitro*, анализ и интерпретация данных; Д. В. Кочетков — уход за животными, интерпретация данных; Г. М. Юсубалиева — визуализация данных, редактирование рукописи; П. О. Воробьев — наработка препаративных количеств вируса для *in vivo* исследований; В. П. Баклаушев — планирование исследования, выполнение преаналитического этапа работы, анализ данных; А. В. Липатова, П. М. Чумаков — руководство исследованием, разработка дизайна, создание рекомбинантных штаммов, интерпретация данных, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИМБ РАН (протокол № 3 от 27 октября 2022 г.). Эксперименты проводили в соответствии с директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС о защите животных, используемых для исследований.

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

Статья получена: 20.02.2023 **Статья принята к печати:** 02.04.2023 **Опубликована онлайн:** 28.04.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.010

COMPARISON OF THE ONCOLYTIC ACTIVITY OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUS STRAINS L1VP-RFP AND MVA-RFP AGAINST SOLID TUMORS

Shakiba Y^{1,2}, Naberezhnaya ER^{1,2}, Kochetkov DV¹, Yusubalieva GM^{1,3}, Vorobyev PO¹, Chumakov PM¹, Baklaushiev VP^{1,3}, Lipatova AV¹✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

³ Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, Russia

Among oncolytic viruses, modified vaccinia virus Ankara (MVA), a highly attenuated vaccinia virus (VV) is a well-studied variant with promising results in preclinical and clinical trials. The Lister VV strain from the Moscow Institute of Viral Preparations (LIVP) has been studied to a lesser extent than MVA and has a different oncolytic property from MVA. The aim of this work was to compare the oncolytic efficacy of LIVP and MVA strains against solid tumors. We developed recombinant variants LIVP-RFP and MVA-RFP; to enhance onco-selectivity thymidine kinase (TK) gene was inactivated by insertion of red fluorescent protein (RFP) gene to the TK locus. The replication kinetics and oncolytic activity of the obtained recombinant strains were evaluated *in vitro* and *in vivo* on tumor cell lines and mouse syngeneic tumor models of metastatic mouse 4T1 mammary adenocarcinoma, CT26 colon adenocarcinoma, and B16 melanoma. Both MVA-RFP and LIVP-RFP showed high replication efficiency in tumor cells and pronounced oncolytic activity against B16 melanoma and 4T1 breast adenocarcinoma allografts. In relation to 4T1, which is a model of triple negative human breast cancer, LIVP-RFP showed more than 50% increased cytotoxicity in *in vitro* tests compared to MVA-RFP, as well as a significant slowdown in the progression of 4T1 allografts and an increase in animal survival in experiments *in vivo*. Thus, the LIVP strain may be more promising than MVA as a platform for the development of recombinant oncolytic viruses for the breast cancer treatment.

Keywords: vaccinia virus, LIVP, MVA, viral oncolytic therapy, breast cancer, colon carcinoma, melanoma

Funding: the development of oncolytic viruses and *in vitro* experiments were supported by the Russian Science Foundation (Russian Science Foundation grant № 20-75-10157); *in vivo* experiments were also supported by the Russian Science Foundation (Russian Science Foundation grant № 22-64-00057).

Author contribution: Ya Shakiba — literature analysis, pre-analytical work, *in vitro* and *in vivo* experiments, analysis and interpretation of data, preparation of figures and graphs; ER Naberezhnaya — *in vitro* experiments, data analysis and interpretation; DV Kochetkov — animal care, data interpretation; GM Yusubalieva — data visualization, manuscript editing; PO Vorobyev — production of preparative quantities of the virus for *in vivo* studies; VP Baklaushiev — study planning, preanalytical stage of work, data analysis; AV Lipatova, PM Chumakov — research management, design development of recombinant strains, data interpretation, editing the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics committee of the EIMB RAS (protocol № 3 dated October 27, 2022). Experiments carried out in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of Europe on the protection of animals used for research.

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

Received: 20.02.2023 **Accepted:** 02.04.2023 **Published online:** 28.04.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.010

Онколитические вирусы представляют собой новый класс препаратов для лечения злокачественных новообразований, устойчивых к классическим подходам противоопухолевой терапии. Онколитические вирусы избирательно инфицируют опухолевые клетки, вызывая прямой цитопатический эффект и опосредованную активацию цитотоксических клеток, что в итоге приводит к регрессии опухоли [1]. Вирус осповакцины (VV) представляет собой онколитический вектор с превосходными характеристиками, включающими высокую тропность и цитолитическую активность в отношении опухолевых клеток, быструю репликацию без интеграции в геном клетки-хозяина, устойчивость к гипоксическому микроокружению опухоли и хорошо охарактеризованный профиль безопасности [2, 3].

Штамм L1VP продемонстрировал значительную цитотоксическую активность в отношении опухолей различной гистологической принадлежности (колоректальный рак, рак желудка, злокачественные мезотелиомы, рак легких, рак щитовидной и молочной железы) [4, 5]. Было исследовано и биораспределение штамма L1VP — вирус избирательно заражает опухолевые клетки без обнаружения его в яичниках, селезенке или тканях мозга после внутривенной инъекции [6, 7]. Вирус осповакцины экспрессирует несколько иммуномодулирующих белков для маскировки от иммунного ответа организма, например, рецепторы-приманки интерферона или ингибиторы регуляторных путей врожденного иммунитета, таких как toll-подобные рецепторы или сигналинг NF- κ B [8]. Сообщалось, что штамм Lister кодирует больше генов, участвующих в уклонении от иммунного ответа, таких как A53R, рецептор растворимого фактора некроза опухоли, или T1/35кДа — ингибитор CC-хемокинов, которые отсутствуют в других штаммах, таких как MVA или WR (Western Reserve) [9, 10]. L1VP является биовариантом английского штамма Lister, полученным путем его адаптации в коже теленка [11]. Этот штамм частично использовали в программе ликвидации оспы после 1971 г., и, как сообщается, он обладает онколитическими свойствами и значительно меньшей вирулентностью по сравнению с другими биовариантами штамма Lister [12, 13], кроме этого, он не был изучен в ряде доклинических и клинических исследований [14–19].

Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) является одним из самых широко изученных штаммов VV с многообещающими перспективами в онколитической вирусной терапии. MVA — высокоаттенуированный штамм; он плохо реплицируется в клетках человека, и его способность к репродукции в основном ограничена эмбриональными клетками птиц, что делает его весьма безопасным [20]. Кроме того, MVA является мощным индуктором интерферонов I типа и вызывает сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ. Эти свойства MVA делают его важным кандидатом для разработки противоопухолевой терапии [20]. MVA одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в качестве безопасной вакцины против оспы [21]. Кроме того, рекомбинантный вариант вакцинного вектора MVA-BN был одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) в составе вакцины против лихорадки Эбола и его активно используют в клинических испытаниях инфекционных заболеваний и иммунотерапии опухолей [22].

В данном исследовании мы получили рекомбинантные штаммы MVA-RFP и L1VP-RFP с инактивацией вирусного

гена тимидинкиназы (TK) для повышения специфичности к опухолевым клеткам [23] путем вставки репортерного гена tagRFP (красный флуоресцентный белок) в область делегируемого гена. Инактивация гена TK делает репликацию вируса зависимой от клеточной TK, которая экспрессируется только во время S-фазы клеточного цикла, в то время как трансформированные клетки постоянно ее экспрессируют. Так, рекомбинантные вирусы с дефектным геном TK избирательно реплицируются в быстро делящихся опухолевых клетках, постоянно экспрессирующих клеточную тимидинкиназу [24].

Целью работы было сравнить онколитическую эффективность MVA-RFP и L1VP-RFP в солидных опухолях мышинных сингенных моделей аденокарциномы молочной железы 4T1, меланомы B16 и карциномы толстой кишки CT26.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток

Клетки почки хомячка ВНК-21 (ATCC № CCL-10), карциномы толстой кишки CT26 (ATCC № CRL-2639), аденокарциномы молочной железы 4T1 (ATCC № CRL-3406), меланомы B16 (ATCC № CRL-6475) и линии клеток HEK293T (ATCC № CRL-3216) приобретены в Американской коллекции культур (ATCC; США). Крысиные фибробласты с дефицитом TK (Rat2 TK-/-) были взяты из коллекции Лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН (Москва, Россия). Все клетки культивировали в среде DMEM с добавлением глутамина (Gibco; США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco; США), и инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Вирусы

Вирус осповакцины штамма L1VP (ЛИВП) был получен из коллекции Лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН (Москва, Россия). Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) (ATCC № VR-1508) приобретен в ATCC.

Для конструирования штаммов MVA-RFP и L1VP-RFP была получена инсерционная плаزمиды, несущая ген tagRFP. Последовательность гена tagRFP амплифицировали методом ПЦП с плазмидной конструкции pTagRFP-C («Евроген»; Россия) с использованием праймеров 5-AGAGAG CCTGGATGGTGTCTAAGGGCGAAGAG и 5-AGAGAGGGAT CCTTAATTAAGTTTGTGCCCCAGTTTG («Евроген»; Россия). tagRFP экспрессировали под контролем 7.5k-промотора. Рамку фланкировали участками гена TK, исходная плазмидная конструкция для рекомбинации была создана в Лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН (Москва, Россия) [6]. Рекомбинантные штаммы получали путем липофекции клеток HEK293T реагентом Lipofectamine 3000 (Thermo Fischer; США) и последующим инфицированием штаммом осповакцины дикого типа. Спустя 48 ч готовили криолизат инфицированных клеток и проводили селекцию вирусных частиц на клетках Rat-2 TK-/-, обработанных бромдезоксипридином в концентрации 25 мкг/мл [24]. После нескольких раундов селекции вирус клонировали методом бляшек для очистки от дикого штамма. Полученные рекомбинантные штаммы нарабатывали в клетках ВНК-21 и очищали методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [25]. Правильность вставок в рекомбинантных вариантах была подтверждена

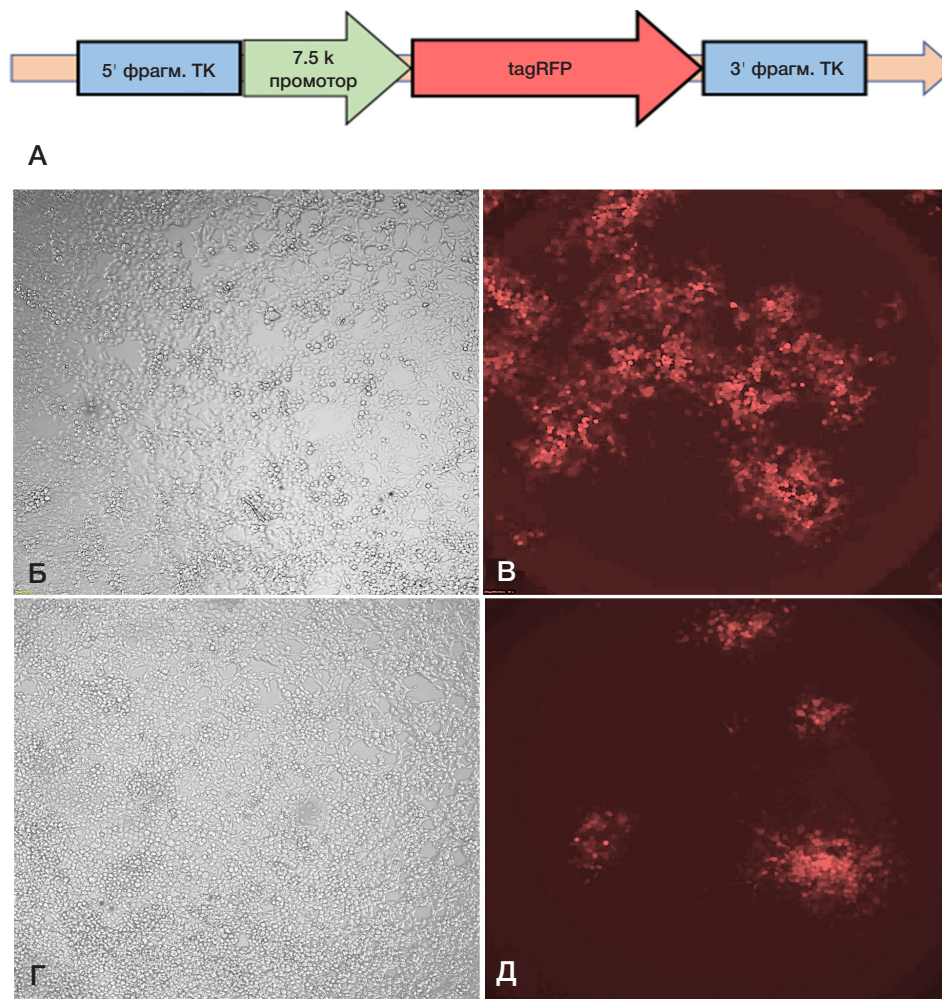


Рис. 1. Характеристика рекомбинантных штаммов LVP-RFP и MVA-RFP *in vitro*. **А.** Схема плазмидного вектора, используемого при разработке штаммов LVP-RFP и MVA-RFP. **Б, В.** Флуоресцентная микроскопия клеток HEK293T, инфицированных рекомбинантным штаммом LVP-RFP. **Г, Д.** Флуоресцентная микроскопия HEK293T, инфицированных MVA-RFP (увеличение $\times 100$)

секвенированием соответствующего участка генома по Сэнгеру. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (Thermo Fischer; США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Thermo Fischer; США) в Центре коллективного пользования «Геном» ИМБ РАН.

Титрование вируса

Клетки ВНК-21 рассевали по 10 000 клеток на лунку в 96-луночный планшет, на следующий день среду удаляли и клетки инфицировали 10-кратными разведениями вирусов и инкубировали в среде DMEM с добавлением 2% FBS. Через 48 ч, когда развивалось цитопатическое действие, 50%-ю инфекционную дозу культуры ткани (TCID₅₀) оценивали по методу Рида и Менча [26].

Оценка цитотоксической активности вирусов

Клетки 4T1, В16, СТ26 и ВНК-21 высевали по 10 000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты, затем инфицировали множественностью 1 и 10 БОЕ/кл. штаммами MVA-RFP или LVP-RFP. Оценку цитотоксической активности проводили с использованием МТТ-теста через 24, 48 и 72 ч после заражения. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали как соотношение жизнеспособности клеток

в инфицированных лунках к жизнеспособности клеток в неинфицированных контрольных лунках и умножения на 100 [27].

Оценка скорости репликации вируса методом проточной цитометрии

Уровень экспрессии RFP в зараженных клетках коррелирует с уровнем вирусной репликации. Клетки 4T1, В16, СТ26 и ВНК-21 высевали по 100 000 клеток на лунку в 24-луночные планшеты, на следующий день инфицировали штаммами MVA-RFP или LVP-RFP с MOI 1 и 10, затем снимали с подложки с помощью трипсина и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением 2% через 24 и 48 ч после инфицирования и измеряли количество ярко флуоресцирующих в диапазоне RFP клеток с использованием цитофлуориметра BD LSRFortessa Cell Analyser (Beckman Dickinson; США). Анализ выполняли с помощью Flowing Software 2.0 (Perttu Terho; Финляндия). Результаты основаны на трех независимых экспериментах с тремя повторами, не менее 10 000 событий на образец.

Оценка онколитической активности вирусов *in vivo*

В экспериментах использовали шестинедельных самок мышей BALB/c и C57BL/6. Мыши имели свободный

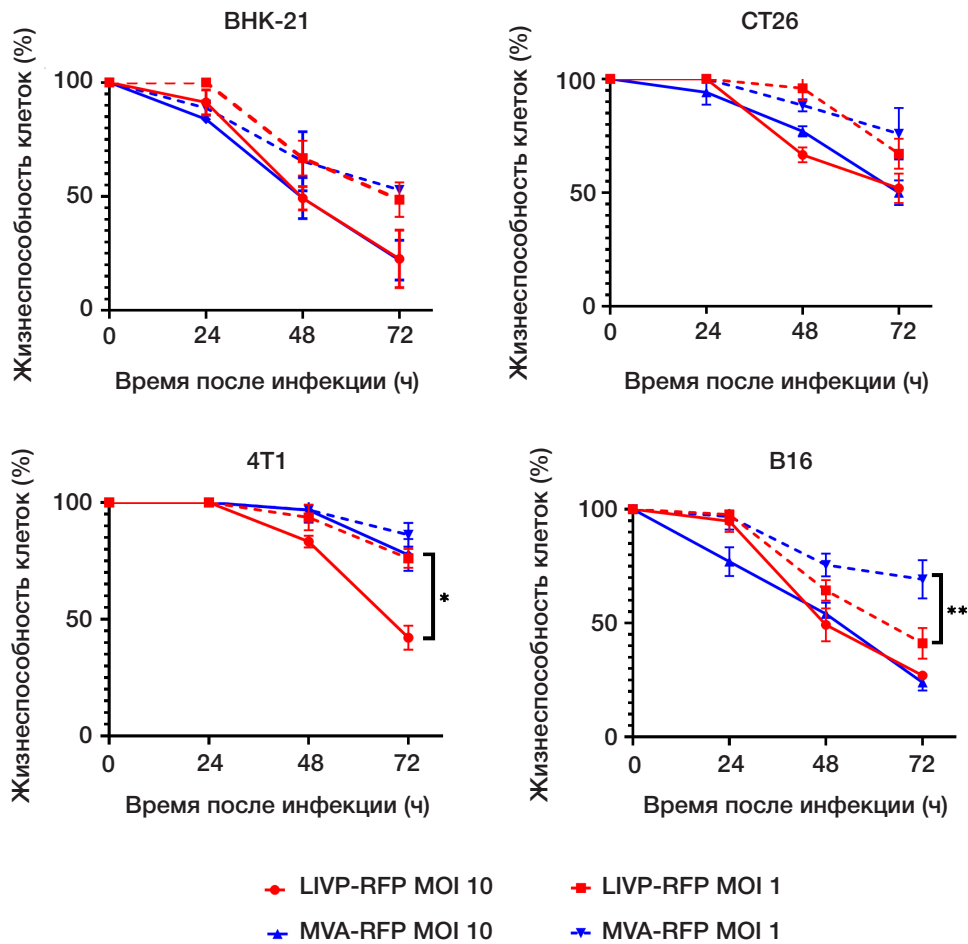


Рис. 2. Цитотоксичность рекомбинантных штаммов LIVP-RFP и MVA-RFP в различных культурах опухолевых клеток. Клетки BHK-21, B16, CT26 и 4T1 инфицировали с MOI 1 и 10 вирусами LIVP-RFP и MVA-RFP и оценивали жизнеспособность клеток с использованием МТТ-анализа в течение 24, 48 и 72 ч после заражения. Статистический анализ проводили с помощью *t*-теста; * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$

доступ к пище и воде и находились в стандартных условиях с контролируемой температурой (21–23 °C) и вентиляцией воздуха, а также световым режимом 12/12 ч. Для формирования опухолей 10^6 клеток карциномы толстой кишки CT26 или рака молочной железы 4T1 имплантировали подкожно в правый бок мышей BALB/c, а 10^6 клеток меланомы B16 имплантировали в правый бок мышей C57BL/6. До начала виротерапии мышей с верифицированными опухолевыми аллотрансплантатами клеток CT26 ($n = 15$), 4T1 ($n = 15$) и B16 ($n = 15$) делили на три подгруппы ($n = 5$ в каждой). Вирусы вводили на 7-й и 9-й дни после имплантации опухоли посредством внутриопухолевой инъекции в 20 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) («ПанЭко»; Россия). В экспериментальных подгруппах с аллотрансплантатами CT26, 4T1 и B16 делали внутриопухолевые инъекции, доза вируса составила 5×10^7 БОЕ. Контрольные подгруппы получали внутриопухолевые инъекции фосфатно-солевого буфера. Объем опухоли измеряли по модифицированной эллипсоидальной формуле: $V = \frac{1}{2}$ (длина \times ширина²) [28] каждые два дня до достижения опухоли объема 2000 мм³. После достижения максимально допустимого объема мышей подвергали эвтаназии и на основе этих данных строили кривые выживаемости.

Статистический анализ

Все данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистический анализ

проводили с использованием непарных *t*-тестов и двухфакторного дисперсионного анализа, различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для подготовки всех графиков и проведения статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование рекомбинантных вирусов

Штаммы LIVP-RFP и MVA-RFP с инактивацией ТК, содержащие вставку красного флуоресцентного белка (tagRFP), были созданы путем рекомбинации вирусного генома с плазмидной конструкцией. Флуоресцентная микроскопия клеток HEK293T, инфицированных рекомбинантными штаммами LIVP-RFP и MVA-RFP, показала, что вирусы реплицируются и продуцируют функционально активный RFP (рис. 1).

Цитотоксическая активность штаммов LIVP-RFP и MVA-RFP в отношении опухолевых клеток мышей

Цитотоксическую активность рекомбинантных штаммов вируса осповакцины LIVP-RFP и MVA-RFP оценивали в течение 72 ч с помощью МТТ-теста в культурах клеток меланомы мыши B16, карциномы толстой кишки CT26 и аденокарциномы молочной железы 4T1 мыши, а также в чувствительной к W клеточной линии BHK-21, которую

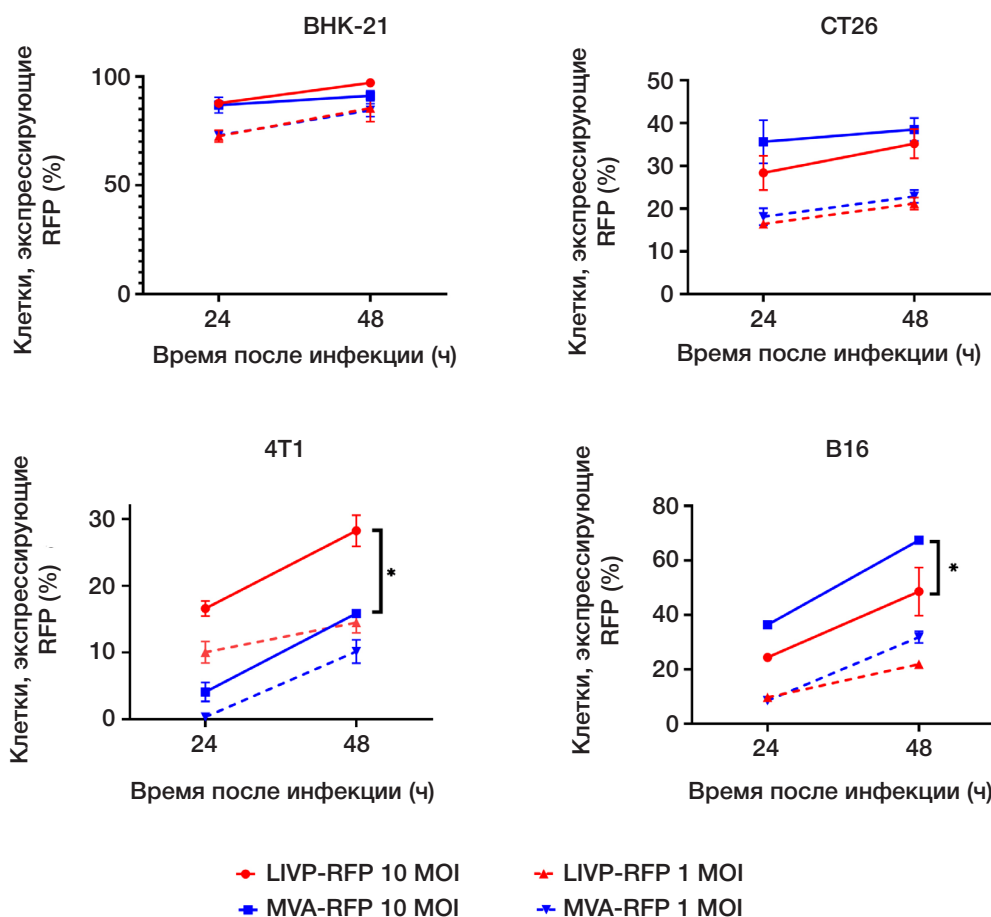


Рис. 3. Эффективность репликации вирусных штаммов в клеточных линиях BHK-21, B16, CT26, 4T1, инфицированных MOI 1 и 10 LIVP-RFP и MVA-RFP на основе результатов проточной цитофлуориметрии через 24 и 48 ч. По оси ординат отложено число клеток в процентах, экспрессирующих RFP. Статистический анализ проводили с помощью *t*-теста; * — $p < 0,05$

мы использовали в качестве положительного контроля. В культуре BHK-21 штаммы LIVP-RFP и MVA-RFP через 72 ч вызвали более чем 75% гибель клеток при MOI 10 и более 50% гибель при множественности инфекции 1 (MOI 1) (рис. 2). Наиболее чувствительной из исследованных линий метастатических опухолей оказалась меланома B16, в культуре которой наблюдали 50% гибель клеток спустя 72 ч после инфицирования MOI 10 LIVP-RFP или MVA-RFP (рис. 2B; сплошные линии). При инфицировании B16 MOI 1 рекомбинантный штамм LIVP-RFP показал достоверно более высокую цитотоксичность через 72 ч, по сравнению с MVA-RFP (рис. 2; пунктирные линии). Наиболее резистентной к онколитической виротерапии оказалась линия колоректальной карциномы CT26, в культуре которой наблюдалась менее чем 50%-я клеточная гибель при множественности инфекции 10 LIVP-RFP или MVA-RFP (рис. 2). В аденокарциноме молочной железы 4T1 цитопатическое действие выявлено только при инфекции множественностью 10. При этом для штамма LIVP-RFP отмечена значимо более высокая цитотоксичность (>50%) по сравнению с MVA-RFP (рис. 2).

Оценка вирусной репликации методом проточной цитометрии

Эффективность репликации вирусных штаммов в исследуемых клеточных линиях оценивали по количеству флуоресцирующих RFP-положительных клеток, которое определяли с помощью проточной цитометрии. Было обнаружено, что уровень инфицирования контрольной

линии BHK-21 уже через 24 ч приближается к 100% и существенно не меняется через 48 ч (рис. 3). В клеточной линии меланомы B16 наблюдалось увеличение количества RFP-положительных клеток, причем достоверно более высокую эффективность репликации показал штамм MVA-RFP, который инфицировал более 60% клеток в течение 48 ч. Линия аденокарциномы молочной железы 4T1, наоборот, характеризовалась самой низкой эффективностью репликации штаммов вируса осповакцины, при этом наибольший уровень заражения мы наблюдали при инфицировании штаммом LIVP-RFP и он достигал почти 30% через 48 ч. Эффективность вирусной репликации в культуре клеток CT26 (около 40% для MOI 10) не различалась между штаммами LIVP-RFP и MVA-RFP.

Оценка противоопухолевой активности штаммов LIVP-RFP и MVA-RFP в экспериментах *in vivo*

Онколитическую активность рекомбинантных штаммов LIVP-RFP и MVA-RFP исследовали на мышах BALB/c с аллогraftами карцином молочной железы 4T1 или толстой кишки CT26, а также на мышах C57BL/6 с аллогraftами меланомы B16. Двукратное внутриопухолевое введение онколитических вирусов на 7-й и 9-й дни после инокуляции опухоли приводило к замедлению роста опухоли (рис. 4) и повышению выживаемости животных (рис. 5) во всех группах, получавших как LIVP-RFP, так и MVA-RFP, по сравнению с контрольными группами, которым вводили PBS. Наиболее заметное замедление роста опухоли обнаружено в случае терапии аллогraftов меланомы B16

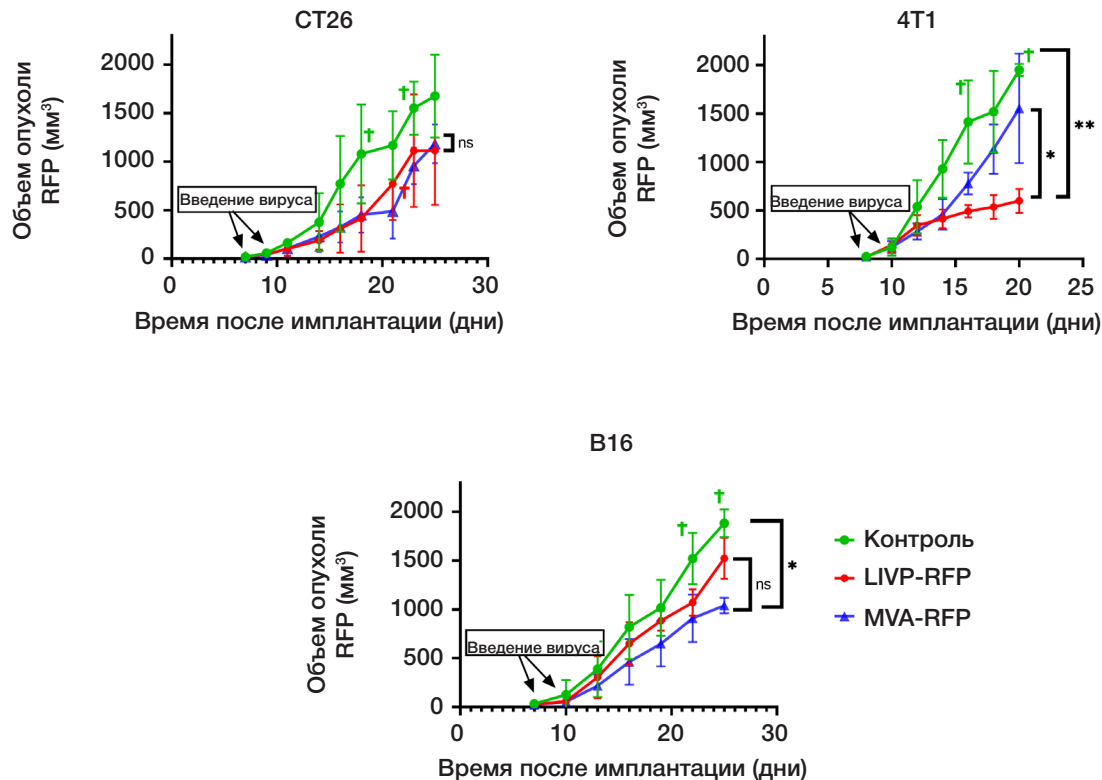


Рис. 4. Динамика изменения объема опухоли у мышей с аллогraftами карциномы толстой кишки CT26, карциномы молочной железы 4T1 и меланомы B16 после терапии рекомбинантными штаммами LVP-RFP или MVA-RFP. Измерение опухоли проводили каждые два дня после лечения. Символ † указывает на эвтаназию животного. Статистический анализ проводили с помощью *t*-теста; * — $p < 0,05$, ns — отсутствие статистически достоверных различий

с помощью внутриопухолевого введения MVA-RFP, а также аллогraftов карциномы 4T1 при введении LVP-RFP, что полностью соответствовало результатам, полученным *in vitro*. Выживаемость в подгруппах 4T1 и B16 (после применения виротерапии) была достоверно выше, по сравнению с контролем, при этом животные, получавшие LVP-RFP, имели большую продолжительность жизни, чем в подгруппах MVA-RFP (рис. 5). Прогрессирование карциномы CT26 никак не изменялось при терапии как LVP-RFP, так и MVA-RFP (рис. 4), хотя в обеих экспериментальных подгруппах наблюдалось увеличение выживаемости животных, получивших инъекции рекомбинантных вирусов (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном сравнительном исследовании мы оценили цитотоксичность, способность к репликации *in vitro*, а также терапевтический потенциал в отношении солидных мышинных опухолей *in vivo* рекомбинантных штаммов LVP-RFP и MVA-RFP, созданных на основе штаммов вируса осповакцины LVP и MVA соответственно и содержащих вставку одного и того же гена красного флуоресцентного белка в структурной части гена вирусной тимидинкиназы.

Эффективность терапии онколитическими вирусами складывается из двух основных компонентов: активации иммунной системы в ответ на введение вирусов и прямого цитотоксического действия вирусов на опухолевые клетки [29]. Активация иммунокомпетентных цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов, CD56⁺-NK-клеток и тканевых макрофагов имеет критически важное значение в связи с тем, что наиболее резистентные и злокачественные опухоли характеризуются наиболее выраженным иммуносупрессивным действием на опухолевое микроокружение [30]. Поэтому системное или внутриопухолевое введение вирусных частиц,

заражающих опухолевые клетки и активирующих антиген-презентирующие клетки, сопровождается повышенной продукцией воспалительных цитокинов и рекрутингом цитотоксических иммунных клеток, что в итоге может замедлять прогрессию опухоли. К противоопухолевым иммунным реакциям добавляется прямое цитопатическое действие онколитических вирусов на опухолевые клетки вследствие повышенной скорости пролиферации, ингибированием апоптоза и другими онкогенными механизмами [30].

Одним из ключевых затруднений применения онколитических вирусов для терапии является выраженный иммунный ответ хозяина на вирусную инфекцию, вызывающий неблагоприятные побочные эффекты и снижающий эффективность виротерапии. Поксвирусы уникальны по своей способности уклоняться от иммунного ответа хозяина, что делает их в целом безопасными для использования в терапии, в частности, штамм *Lister* доказал свою высокую безопасность для людей, поскольку его использовали во время программы ликвидации оспы во всем мире [7, 31]. Было показано, что этот штамм индуцирует меньше провоспалительных цитокинов, таких как IL8, IL6 и IFN γ , у хозяина и вызывает более высокий уровень противовоспалительных цитокинов, таких как IL10, по сравнению с другими штаммами, такими как WR [5, 32].

Усиление онкоселективности вируса ограничивает вирусную инфекцию в месте опухоли и предотвращает заражение других органов, что приводит к меньшим воспалительным побочным эффектам. Одной из стратегий повышения избирательности опухоли и снижения вирулентности вируса осповакцины является делеция гена вирусной тимидинкиназы [33].

В нашем исследовании мы показали, что LVP-RFP более эффективно реплицируется и лизирует клетки 4T1 по сравнению со штаммом MVA-RFP. В последующих

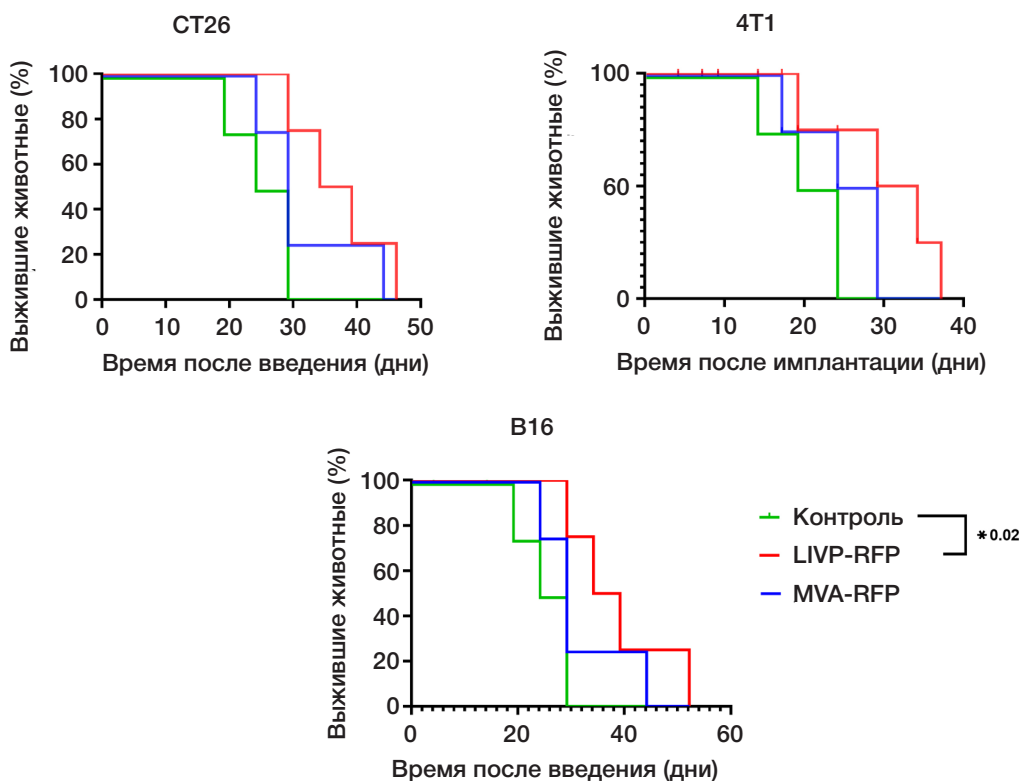


Рис. 5. Кривые выживания Каплана–Мейера в экспериментальных подгруппах мышей с аллографтами аденокарцином CT26, 4T1 и меланомы B16 после двукратной внутриопухолевой инъекции рекомбинантных вирусов LVP-RFP или MVA-RFP. Таким образом, как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* получены данные, подтверждающие онколитическую активность рекомбинантного штамма LVP-RFP в отношении модели аденокарциномы молочной железы 4T1

экспериментах *in vivo* нам удалось продемонстрировать взаимосвязь между способностью вируса к репликации в опухолевых клетках *in vitro* и его способностью замедлять прогрессирование опухоли *in vivo*. Достоверно меньший объем опухолевых аллографтов аденокарциномы 4T1 и увеличение выживания животных после терапии LVP-RFP по сравнению с MVA-RFP свидетельствуют о более выраженной онколитической активности LVP-RFP по отношению к аденокарциноме 4T1.

Линия клеток рака молочной железы 4T1 представляет собой высокоинвазивную и метастатическую клеточную модель тройного негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) [34]. ТНРМЖ считают наиболее агрессивной формой рака молочной железы с самым неблагоприятным прогнозом и отсутствием целевых вариантов лечения

[35]. Наши результаты показывают, что штамм LVP обладает большим потенциалом для лечения ТНРМЖ по сравнению с MVA.

ВЫВОДЫ

Сравнительное исследование онколитических свойств штаммов LVP-RFP и MVA-RFP с инактивированным геном тимидинкиназы показало, что штамм LVP-RFP более эффективен для онколитической виротерапии рака молочной железы 4T1. Применение штамма LVP в качестве платформы для разработки рекомбинантных онколитических вирусов для терапии трипл-негативного рака молочной железы может быть более перспективным, чем применение штамма MVA.

Литература

1. Thorne SH, Hwang TH, Kirn DH. Vaccinia virus and oncolytic virotherapy of cancer. *Curr Opin Mol Ther.* 2005; 7 (4): 359–65.
2. Ho TY, et al. Deletion of immunomodulatory genes as a novel approach to oncolytic vaccinia virus development. *Mol Ther Oncolytics.* 2021; 22: 85–97.
3. Kirn DH, et al. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res.* 2008; 68 (7): 2071–5.
4. Haddad D, et al. A novel genetically modified oncolytic vaccinia virus in experimental models is effective against a wide range of human cancers. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19: 665–74.
5. Hughes J, et al. Lister strain vaccinia virus with thymidine kinase gene deletion is a tractable platform for development of a new generation of oncolytic virus. *Gene Ther.* 2015; 22 (6): 476–84.
6. Shakiba Y, et al. Oncolytic efficacy of a recombinant vaccinia virus strain expressing bacterial flagellin in solid tumor models. *Viruses.* 2023; 15 (4): 828. DOI: 10.3390/v15040828.
7. Tysome JR, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin–angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl 1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther.* 2011; 22 (9): 1101–8.
8. Smith GL. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Lett.* 1999; 65 (1–2): 55–62.
9. Bahar MW, et al. How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *J Struct Biol.* 2011; 175 (2): 127–34.
10. Smith GL, et al. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol.* 2013; 94 (11): 2367–92.
11. Shvalov AN, et al. Complete genome sequence of vaccinia virus strain L-IVP. *Genome Announc.* 2016; 4 (3): e00372–16.
12. Gentschev I, et al. Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. 2012; 7 (5): e37239.
13. Shchelkunov SN, et al. Enhancing the protective immune

- response to administration of a LVP-GFP live attenuated vaccinia virus to mice. *PLoS One*. 2021; 10 (3): 377.
14. Kochneva G, et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7 (45): 74171.
 15. Zonov E, et al. Features of the antitumor effect of vaccinia virus lister strain. *Viruses*. 2016; 8 (1): 20.
 16. Koval O, et al. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 3620510. DOI: 10.1155/2017/3620510.
 17. Tkacheva A, et al. Targeted therapy of human glioblastoma combining the oncolytic properties of parvovirus H-1 and attenuated strains of the vaccinia virus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2019; 37 (2): 83–91.
 18. Gholami S, et al. Vaccinia virus GLV-1h153 is a novel agent for detection and effective local control of positive surgical margins for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013; 15 (2): R26.
 19. Holloway R, et al. 837P Phase II trial of oncolytic vaccinia virus primed immunochemotherapy in platinum-resistant/refractory ovarian cancer (PRROC)(NCT02759588). *Annals of Oncology*. 2020; 31: 628.
 20. Suter M, et al. Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain. *Vaccine*. 2009; 27 (52): 7442–50.
 21. Pittman PR, et al. Phase 3 efficacy trial of modified vaccinia Ankara as a vaccine against smallpox. *N Engl J Med*. 2019; 381 (20): 1897–908.
 22. Gatti-Mays ME, et al. A phase I dose-escalation trial of BN-CV301, a recombinant poxviral vaccine targeting MUC1 and CEA with costimulatory molecules. *Clin Cancer Res*. 2019; 25 (16): 4933–44.
 23. Parato KA, et al. The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther*. 2012; 20 (4): 749–58.
 24. Byrd CM, et al. Construction of recombinant vaccinia virus: cloning into the thymidine kinase locus. *Methods Mol Biol*. 2004: 31–40.
 25. Cotter CA, et al. Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks. *Curr Protoc Mol Biol*. 2017; 117 (1): 16.16.1–16.16.18.
 26. Ramakrishnan MAJ. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016; 5 (2): 85.
 27. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol*. 1998: 179–84.
 28. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989; 24: 148–54.
 29. Cottingham MG, Carroll MW. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. *Vaccine*. 2013; 31 (39): 4247–51.
 30. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6 (10): 715–27.
 31. Thorne SH. Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus. *Immunol Res*. 2011; 50: 286–93.
 32. Matsuda T, et al. A comparative safety profile assessment of oncolytic virus therapy based on clinical trials. *Ther Innov Regul Sci*. 2018; 52 (4): 430–7.
 33. Buller RML, et al. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature*. 1985; 317 (6040): 813–5.
 34. Schrörs B, et al. Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Front Oncol*. 2020; 10: 1195.
 35. Li Z, et al. Immunotherapeutic interventions of triple negative breast cancer. *J Transl Med*. 2018; 16 (1): 147.

References

1. Thorne SH, Hwang TH, Kim DH. Vaccinia virus and oncolytic virotherapy of cancer. *Curr Opin Mol Ther*. 2005; 7 (4): 359–65.
2. Ho TY, et al. Deletion of immunomodulatory genes as a novel approach to oncolytic vaccinia virus development. *Mol Ther Oncolytics*. 2021; 22: 85–97.
3. Kirn DH, et al. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res*. 2008; 68 (7): 2071–5.
4. Haddad D, et al. A novel genetically modified oncolytic vaccinia virus in experimental models is effective against a wide range of human cancers. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19: 665–74.
5. Hughes J, et al. Lister strain vaccinia virus with thymidine kinase gene deletion is a tractable platform for development of a new generation of oncolytic virus. *Gene Ther*. 2015; 22 (6): 476–84.
6. Shakiba Y, et al. Oncolytic efficacy of a recombinant vaccinia virus strain expressing bacterial flagellin in solid tumor models. *Viruses*. 2023; 15 (4): 828. DOI: 10.3390/v15040828.
7. Tysome JR, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin–angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl 1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther*. 2011; 22 (9): 1101–8.
8. Smith GL. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Lett*. 1999; 65 (1–2): 55–62.
9. Bahar MW, et al. How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *J Struct Biol*. 2011; 175 (2): 127–34.
10. Smith GL, et al. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol*. 2013; 94 (11): 2367–92.
11. Shvalov AN, et al. Complete genome sequence of vaccinia virus strain L-IVP. *Genome Announc*. 2016; 4 (3): e00372–16.
12. Gentshev I, et al. Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. 2012; 7 (5): e37239.
13. Shchelkunov SN, et al. Enhancing the protective immune response to administration of a LVP-GFP live attenuated vaccinia virus to mice. *PLoS One*. 2021; 10 (3): 377.
14. Kochneva G, et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7 (45): 74171.
15. Zonov E, et al. Features of the antitumor effect of vaccinia virus lister strain. *Viruses*. 2016; 8 (1): 20.
16. Koval O, et al. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 3620510. DOI: 10.1155/2017/3620510.
17. Tkacheva A, et al. Targeted therapy of human glioblastoma combining the oncolytic properties of parvovirus H-1 and attenuated strains of the vaccinia virus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2019; 37 (2): 83–91.
18. Gholami S, et al. Vaccinia virus GLV-1h153 is a novel agent for detection and effective local control of positive surgical margins for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013; 15 (2): R26.
19. Holloway R, et al. 837P Phase II trial of oncolytic vaccinia virus primed immunochemotherapy in platinum-resistant/refractory ovarian cancer (PRROC)(NCT02759588). *Annals of Oncology*. 2020; 31: 628.
20. Suter M, et al. Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain. *Vaccine*. 2009; 27 (52): 7442–50.
21. Pittman PR, et al. Phase 3 efficacy trial of modified vaccinia Ankara as a vaccine against smallpox. *N Engl J Med*. 2019; 381 (20): 1897–908.
22. Gatti-Mays ME, et al. A phase I dose-escalation trial of BN-CV301, a recombinant poxviral vaccine targeting MUC1 and CEA with costimulatory molecules. *Clin Cancer Res*. 2019; 25 (16): 4933–44.
23. Parato KA, et al. The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther*. 2012; 20 (4): 749–58.
24. Byrd CM, et al. Construction of recombinant vaccinia virus: cloning into the thymidine kinase locus. *Methods Mol Biol*. 2004: 31–40.
25. Cotter CA, et al. Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks. *Curr Protoc Mol Biol*. 2017; 117 (1): 16.16.1–16.16.18.
26. Ramakrishnan MAJ. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016; 5 (2): 85.

27. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol.* 1998; 179–84.
28. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 24: 148–54.
29. Cottingham MG, Carroll MW. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. *Vaccine.* 2013; 31 (39): 4247–51.
30. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6 (10): 715–27.
31. Thorne SH. Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus. *Immunol Res.* 2011; 50: 286–93.
32. Matsuda T, et al. A comparative safety profile assessment of oncolytic virus therapy based on clinical trials. *Ther Innov Regul Sci.* 2018; 52 (4): 430–7.
33. Buller RML, et al. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature.* 1985; 317 (6040): 813–5.
34. Schrörs B, et al. Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Front Oncol.* 2020; 10: 1195.
35. Li Z, et al. Immunotherapeutic interventions of triple negative breast cancer. *J Transl Med.* 2018; 16 (1): 147.