

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ШТАММЫ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

Обзор

© 2023 Я. Шакиба^{1,2}, П.О. Воробьев², М. Махмуд², А. Хамад², Д.В. Кочетков²,
Г.М. Юсубалиева^{2,3,4}, В.П. Баклаушев^{2,3,4}, П.М. Чумаков², А.В. Липатова^{2*}

¹ Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

² ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук,
119991 Москва, Россия; электронная почта: lipatovaanv@gmail.com

³ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, 115682 Москва, Россия

⁴ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, 117513 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.01.2023

После доработки 06.04.2023

Принята к публикации 24.04.2023

Онколитическая виротерапия представляет собой альтернативный подход к лечению онкологических заболеваний, основанный на использовании вирусов, избирательно инфицирующих и уничтожающих опухолевые клетки. Вирус осповакцины (VV, vaccinia virus) является членом семейства оболочечных вирусов *Poxviridae*, содержащих крупный геном, представленный двуцепочечной линейной молекулой ДНК. Подтвержденная многолетним клиническим применением безопасность штаммов VV и широкие возможности для генно-инженерной модификации вируса делают его отличной платформой для создания рекомбинантных онколитических вирусов с улучшенной избирательностью действия и повышенной терапевтической эффективностью в отношении злокачественных заболеваний. Вирус может быть «вооружен» вставкой в геном последовательностей проапоптотических молекул, усиливающих прямое цитопатическое действие вируса на опухоль, факторами, усиливающими онкоселективность, или иммуномодулирующими белками, экспрессия которых в инфицированных опухолевых клетках активирует иммунную систему организма-хозяина и повышает перекрестное распознавание опухолевых неоантигенов Т-клетками или НК-клетками. В настоящем обзоре мы суммировали биоинженерные подходы, направленные на создание рекомбинантных штаммов VV с усиленным иммунотерапевтическим действием.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус осповакцины, онколитические вирусы, рекомбинантные вирусы, иммуносупрессия, иммуномодуляция, цитокины.

DOI: 10.31857/S0320972523060106, EDN: EFRKQ

ВВЕДЕНИЕ

Вирус осповакцины (VV, vaccinia virus) является членом семейства *Poxviridae*. Он содержит линейную двуцепочечную ДНК длиной около 190 тыс. пар оснований, кодирующую

почти 200 генов. Так же, как и у других членов семейства *Poxviridae*, центральный сегмент генома VV содержит консервативные участки, кодирующие белки, необходимые для репликации вируса, и концевые неконсервативные участки, кодирующие белки, обеспечивающие

Принятые сокращения: CTL – цитотоксический Т-лимфоцит; CTLA-4 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4; EEV – внеклеточный оболочечный вирус; GM-CSF – гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор; DC – dendritic cells, дендритные клетки; ITIM – ингибирующий мотив на основе остатка тирозина иммунорецептора; IFN – интерферон; IL – интерлейкин; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; MLKL – подобная киназному домену смешанного происхождения псевдокиназа; MUC1 – муцин 1; MVA – модифицированный вирус осповакцины Анкара; NF-κB – ядерный фактор каппа В; NK – естественный киллер; PD-1 – белок запрограммированной гибели-1; PD-L1 – лиганд 1 запрограммированной гибели; Th1/2 – Т-хелпер 1/2; TIGIT – Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM; TK – тимидинкиназа; TME – микроокружение опухоли; TNF – фактор некроза опухоли; Treg – регуляторные Т-клетки; VGF – вирусный ростовой фактор; VV – вирус осповакцины; VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов.

* Адресат для корреспонденции.

распознавание и проникновение вируса в клетку-хозяина [1]. Определены две инфекционные формы VV: это внеклеточный оболочечный вирус (EEV, extracellular enveloped virus) и внутриклеточный зрелый вирус (IMV, intracellular mature virus), которые различаются по способности связываться с поверхностью клетки [2]. В 1922 г. Levaditi et al. показали, что VV может замедлять рост опухоли у мышей, что было первой демонстрацией онколитического эффекта этого вируса в лабораторных условиях [3]. Впоследствии было показано, что VV избирательно инфицирует и разрушает опухолевые клетки в клеточных культурах и на животных моделях [4]. С 1980-х гг. рекомбинантные штаммы VV и другие поксвирусы используются в качестве векторов в протоколах иммунизации при лечении инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований. Векторы VV были широко исследованы в клинических испытаниях, что позволяет рассматривать их как, пожалуй, самую безопасную платформу для создания новых рекомбинантных онколитических штаммов для адъювантной и неоадъювантной иммунотерапии [5].

Несколько свойств VV делают его перспективным агентом для онколитической вирусной терапии. Во-первых, VV был разработан в рамках программы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по искоренению оспы в качестве живой вакцины, которой было вакцинировано 200 миллионов человек, что подтвердило безопасность этого вируса как онколитического агента и вектора для доставки генов [6]. Даже при возникновении экстренных ситуаций при инфекции VV широко доступны антитела к этому вирусу и противовирусные препараты [7]. Во-вторых, VV обладает большим пластичным геномом, что позволяет включать в него протяжённые последовательности ДНК без существенного снижения эффективности репликации вируса [8]. В-третьих, репликация вируса в цитоплазме снижает риск интеграции вирусной ДНК в геном организма-хозяина. Геном ДНК-содержащего вируса VV определяет его большую генетическую стабильность в сравнении с РНК-содержащими вирусами [9]. Наконец, VV обладает тропизмом к опухолевым клеткам и одновременно может успешно избегать иммунного ответа организма-хозяина [10]. Все эти природные свойства делают его не только самой безопасной, но и очень перспективной платформой для иммунотерапии онкологических заболеваний. Повышенная экспрессия в опухолевых клетках таких факторов, как анти-

апоптотические белки, ферменты репарации ДНК и рибонуклеотидредуктаза, делает их устойчивыми к химиотерапии, в то время как штаммы VV могут целенаправленно воздействовать на такие резистентные клетки [11].

Для разработки рекомбинантных вариантов VV с повышенной онколитической активностью были использованы различные генно-инженерные подходы. Например, рекомбинантный VV с делецией гена тимидинкиназы (ТК, thymidine kinase), участвующей в синтезе геномных ДНК, повышает избирательность VV в отношении опухолей, делая возможной репликацию этого вируса только в быстро пролиферирующих опухолевых клетках, богатых нуклеотидами [4]. Также модификации генов, обеспечивающие уклонение VV от иммунного ответа, могут усиливать онколитическое действие и ответ иммунной системы для достижения длительных ремиссий [12], а экспрессия опухолевых антигенов или иммуномодулирующих молекул может повышать онколитические свойства VV [13]. В настоящем обзоре приведены данные о генно-инженерных подходах к созданию рекомбинантных штаммов VV для использования в иммунотерапии.

VV И ИММУННАЯ СИСТЕМА

VV использует ряд механизмов, чтобы избежать действия противовирусного иммунного ответа организма-хозяина и эффективно инфицировать опухолевые клетки без риска быть инактивированным [14] (рисунок). На основе данных о взаимодействии VV с некоторыми отдельными иммунными механизмами были получены различные рекомбинантные VV для запуска системного противоопухолевого иммунного ответа.

НК-Клетки (Natural killer, естественные киллеры). НК-Клетки – это клетки системы врождённого иммунитета, играющие роль первой линии защиты организма-хозяина от вирусов. НК-Клетки также имеют важное значение в иммунном надзоре за опухолевыми клетками и способны их эффективно уничтожить [15]. Перед тем как цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs, cytotoxic T lymphocytes) запустят инактивацию вируса, инфекция VV усиливает миграцию НК-клеток в опухоль, запускает синтез интерферонов (IFNs, interferons), цитокинов, а также модулирует активность основного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I, class I major histocompatibility complex) [16]. Кодированный VV гемагглютинин (белок А56) был идентифицирован как активирующий лиганд

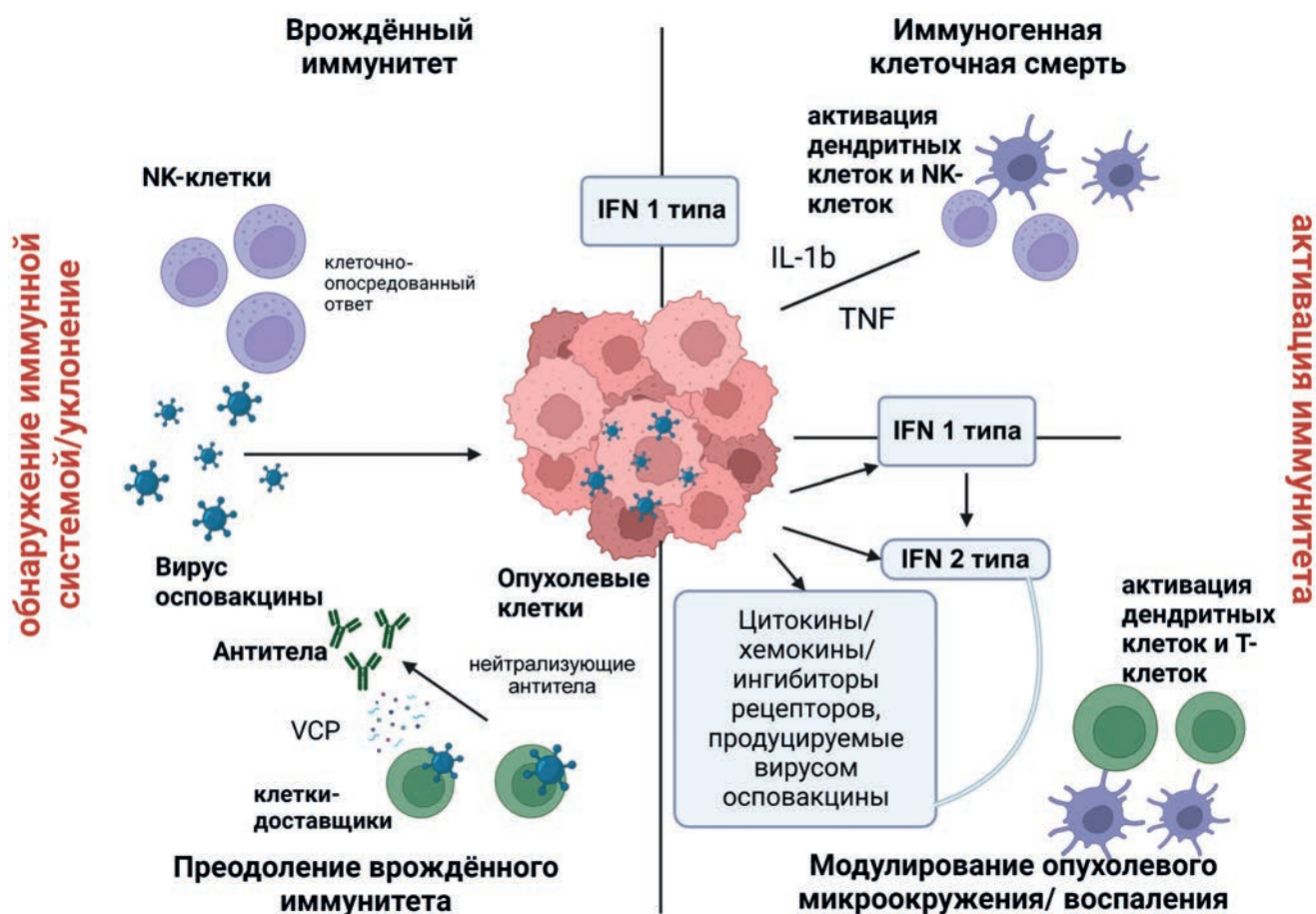


Иллюстрация взаимодействий онколитического VV с иммунной системой, приводящих к стимуляции иммунной системы и цитолизу раковых клеток

рецепторов NKp30 и NKp46 NK-клеток, связывание A56 с этими рецепторами модулирует их активность и способствует приданию NK-клеткам цитотоксичных свойств [16, 17]. Из вирусных белков VV на сегодняшний день только A56 определён как прямой модулятор NK-клеток в VV, хотя делеция ряда других белков, таких как N1, F3 и C12, также вызывала изменения ответа NK-клеток на VV-инфекцию [18].

Помимо собственных белков VV, возможно включение в геном последовательностей экзогенных иммуномодулирующих агентов, активирующих NK-клетки и усиливающих их миграцию в опухоль. Так, был создан рекомбинантный вариант VV, экспрессирующий хемотаксический цитокин CCL5, который привлекал NK-клетки в микроокружение инфицированной опухоли (TME, Tumor microenvironment) [19], а рекомбинантный VV, экспрессирующий интерлейкин-2 (IL-2), усиливал инфильтрацию NK-клеток в опухоль [20].

Система комплемента. Система комплемента разрушает инфицированные вирусом клетки и усиливает фагоцитоз вирионов.

VV экспрессирует секретируемый белок VCP (vaccinia complement protein), сходный с белками контроля комплемента. Этот белок является фактором вирулентности, необходимым для преодоления системы комплемента. VCP связывается с белками C3b и C4b системы комплемента и способствует их расщеплению, вызывая нарушение работы каскада ферментов системы комплемента [21]. Было показано, что VCP связывается с гемагглютинином (белок A56), экспонированным на поверхности инфицированных клеток, помогая EEV-частицам VV противодействовать системе комплемента [22]. Другой защитный механизм VV заключается в привлечении белков организма-хозяина, контролирующих работу системы комплемента, таких как CD46, CD55 и CD59. В частности, CD55 помогает EEV избежать разрушения системой комплемента, и это объясняет, почему EEV является более устойчивой формой вируса по сравнению с IMV [23]. Таким образом, использование EEV-формы VV широко распространено в схемах виротерапии для предотвращения элиминации вируса системой комплемента [24].

Интерфероны (IFNs). IFNs I, II и III типа играют решающую роль в противовирусной защите. В ряде работ было показано, что крупные делеции на концевых участках генома VV приводят к повышению чувствительности вируса к действию IFNs, что позволяет предполагать роль этих участков в кодировании белков, противодействующих противовирусной активности IFNs. Чтобы ингибировать индукцию IFNs, VV минимизирует продукцию или распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns) [25]. Кроме того, для индукции IFNs необходим фактор транскрипции NF- κ B (Nuclear factor kappa B, ядерный фактор каппа B), а множество внутриклеточных белков VV, такие как A46, A49, A52, B14, C4 и E3, ингибируют этот фактор транскрипции. Например, белок A46 связывается с адапторными молекулами, ассоциированными с цитоплазматическими хвостовыми участками Toll-подобных рецепторов (TLRs, Toll-Like Receptors), позволяя белку A46 блокировать активацию NF- κ B и IFN- β . Белок A52 ингибирует активность IL-1 и деактивирует NF- κ B, связываясь с IL-1-рецептор-ассоциированной киназой 2 и фактором 6, ассоциированным с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF6, Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6) [26]. Другой пример вмешательства VV в интерфероновый ответ связан с экспрессией гена B18, который кодирует аналог рецептора IFN I типа. Последний секретируется из клетки и препятствует связыванию IFN с рецептором, тем самым предотвращая его активацию [27]. В качестве примера реверсии этой активности VV против IFN был разработан рекомбинантный вариант вируса с удалением генов, кодирующих противоинтерфероновые белки. Для активации IFN- β в геном VV была вставлена кодирующая его последовательность. Онколитическая эффективность этого штамма резко возросла, так как IFN- β ингибирует пролиферацию раковых клеток, индуцирует противоопухолевый иммунный ответ и останавливает ангиогенез опухоли. С другой стороны, из-за нарушения сигнальных путей IFNs в большинстве клеток после злокачественной трансформации данный рекомбинантный штамм может быстро распространяться в опухолевой ткани [28].

Цитокины и хемокины. Цитокины, такие как IL-1, IL-15, IL-18 и фактор некроза опухоли (TNF, Tumor Necrosis Factor), участвуют в развитии адаптивного иммунного ответа на вирусную инфекцию. Эволюция VV происходила таким путём, чтобы сдерживать воз-

действие этих цитокинов, продуцируя растворимые рецепторы-приманки, блокирующие их протеолитическое созревание или ингибирующие сигналы, вызываемые цитокинами. VV может целенаправленно воздействовать на IL-1, ингибируя синтез NF- κ B и подавляя синтез IL-1 β [29]. Было показано, что VV ингибирует активность IL-18, блокируя образование зрелого белка IL-18 путём подавления белком B13 каспазы-1.

Белок C12, секретируемый VV, связывает IL-18 [30]. VV продуцирует белки, называемые вирусными рецепторами TNF (vTNFR), которые действуют как ложные рецепторы. Штамм *Lister* экспрессирует на клеточной поверхности vTNFR, кодируемые вирусными генами *CrmC* и *CrmE*. Эти белки-приманки обладают сходной аминокислотной последовательностью с TNFR, что приводит к снижению активности TNF [31]. Инфицирование штаммом MVA (Modified Vaccinia Virus Ankara, модифицированный вирус осповакцины Анкара) индуцирует экспрессию нескольких противовирусных хемокинов, таких как CXCL10. Чтобы противостоять этому, VV продуцирует вирусные хемокин-связывающие белки (vCKBP), которые предотвращают связывание хемокинов со своими специфическими рецепторами [32]. Белки B7 и B23 штамма WR (Western Reserve) также обладают хемокин-связывающей активностью [33]. Распространённой стратегией онколитической терапии с использованием вирусов является усиление онколитических свойств VV путём его «вооружения» различными цитокинами или хемокинами, такими как GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), IL-2, IL-12 и некоторыми другими, экспрессия которых способствует формированию противоопухолевого иммунитета [34]. Эта стратегия будет подробно рассмотрена ниже.

VV можно применять в качестве генетического вектора для подавления провоспалительных цитокинов и других биологически активных молекул, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, Vascular endothelial growth factor), играющий важную роль в неоангиогенезе опухоли. Блокирование VEGF достигалось путём слияния VEGF-рецептора 1 с Fc-фрагментом IgG-антитела человека (VEGFR-1-Ig) или за счёт секреции одноцепочечного наноантитела (GLAF-1) против VEGF. В обоих случаях нарушалось взаимодействие VEGF с рецепторами VEGF эндотелиальных клеток, что приводило к снижению плотности кровеносных сосудов в опухоли. Снижение степени васкуляризации опухоли

сопровождалось более быстрой её регрессией и зависело от дозы введённого вируса [35]. Gholami et al. разработали антиангиогенный VV, экспрессирующий одноцепочечное наноканцероциклическое антитело против VEGF. Этот вирус продемонстрировал шестикратное усиление регрессии опухоли в группе мышей с ортотопической моделированной карциномой трипл-негативного рака молочной железы, получавших лечение, по сравнению с контрольной группой [36].

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ VV С ПОВЫШЕННОЙ ОНКОСЕЛЕКТИВНОСТЬЮ

Большинство штаммов VV, одобренных для применения в клинике и обладающих повышенной селективностью к опухолям, содержат делецию гена J2R, кодирующего вирусную тимидинкиназу (ТК). В нормальных клетках экспрессия тимидинкиназы происходит во время S-фазы клеточного цикла. Однако в опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия этого фермента независимо от фазы клеточного цикла. Нарушение экспрессии ТК в VV вынуждает вирус полагаться на внутриклеточные ТК, что приводит к его преимущественной репликации в раковых клетках [37]. Нарушение открытой рамки считывания ТК удобно проводить с одновременной инсерцией трансгенов в геном VV и дальнейшим отбором рекомбинантных вариантов на клетках с делецией ТК, обработанных бромдезоксисуридином. Hung et al. показали, что нарушение гена тимидинкиназы путём встраивания гена люциферазы в геном VV приводит к избирательному заражению клеток рака яичников человека и мыши *in vitro* и *in vivo*, что вызывает гибель опухолевых клеток и регрессию опухоли [38]. Два наиболее хорошо изученных штамма VV, а именно Реха-Vec (JX-594) и GL-ONC1, широко используемые в клинических испытаниях, характеризуются делецией ТК [39, 40].

Всесторонние исследования биологии VV выявили дополнительные факторы, повышающие его опухолевую селективность. В частности, фактор роста VV (VGF, vaccinia growth factor) является вирусным аналогом клеточного эпидермального фактора роста (EGF, epidermal growth factor) [41]. VGF представляет собой секретируемый белок, продуцируемый на ранних стадиях вирусной инфекции. При инфицировании клеток вирусом VV этот белок индуцирует митогены для праймирования соседних неинфицированных клеток.

Он в значительной мере способствует репликации вируса за счёт активации сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), зависимой от рецептора EGF. Уровень экспрессии EGF практически во всех опухолевых клетках намного превышает таковой в нормальных клетках. Делеция VGF в некоторой степени снижает репликацию вируса, однако повышает его специфичность к опухолевым клеткам [42]. Ещё один вирусный белок, O1, помогает поддерживать МАРК-зависимую передачу сигналов, инициированную VGF. Предполагается, что белок O1 отвечает за остаточную вирусную патогенность, наблюдаемую у мышей, инфицированных VV с делецией VGF [43]. Поэтому ожидается, что МАРК-зависимый рекомбинантный VV с делециями VGF и O1 будет существенно ослаблен в нормальных клетках и сможет эффективно реплицироваться в опухолевых клетках с повышенной активностью МАРК-зависимого сигнального пути [44].

Опухоли с активированными МАРК-зависимыми сигнальными путями являются подходящими мишенями для сильно ослабленных штаммов VV. Например, аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma), один из наиболее агрессивных видов рака, обычно характеризуется мутацией в четырёх значимых генах, связанных с МАРК-зависимым путём: *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* и *SMAD4* [45]. Конститутивно активированный *KRAS* увеличивает эндогенную экспрессию вышестоящего рецептора эпидермального фактора роста (EGFR, epidermal growth factor receptor) и запускает передачу сигналов нижестоящего МАРК-пути [46], что делает его идеальной мишенью для МАРК-зависимых VV. В частности, для лечения PDAC был разработан МАРК-зависимый рекомбинантный VV, несущий суицидальный ген дрожжевой цитозиндезаминазы. С помощью цитозиндезаминазы и урацилфосфорибозилтрансферазы нетоксичный 5-фторцитозин превращается в высокотоксичный 5-фторурацилмонофосфат, который, в свою очередь, образует 5-фтордезоксисуридинмонофосфат, являющийся конкурентным ингибитором тимидинсинтетазы, блокирующим синтез ДНК [47]. Системное введение этого МАРК-зависимого VV показало высокую терапевтическую эффективность *in vivo* на мышинных моделях, что делает его перспективным агентом для терапии PDAC [48].

Другим методом достижения надёжной избирательности VV в отношении опухолевых клеток является делеция генов *Spi-2/Spi-1*.

Это заменимые иммуномодулирующие гены VV с антиапоптотическими и противовоспалительными свойствами. Они обладают сходной аминокислотной последовательностью с серпинами (ингибиторы сериновых протеаз), противодействующими функционированию различных каспаз организма-хозяина. Делеция генов *Spi-2/Spi-1* из генома VV делает вирус ослабленным в нормальных клетках, в то время как в раковых клетках он поддерживает репликацию и действует как мощный онколитический агент [49, 50]. Legrand et al. показали, что делеция *Spi-2/Spi-1*, сопровождающаяся экспрессией вирусного IFN- γ , улучшает индукцию иммунного ответа на введение VV и предотвращает репликацию вируса в нормальных тканях, что делает такой вектор безопасным и эффективным [51].

УСИЛЕННЫЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ VV, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ЦИТОКИНЫ

Опухолевое микроокружение (ТМЕ) наиболее злокачественных опухолей характеризуется высокой активностью иммуносупрессивных факторов и отсутствием стимулирующих молекул, опухоль-специфических цитотоксических иммунных клеток и воспалительной клеточной инфильтрации [52]. Реверсия этого иммуносупрессивного ТМЕ в настоящее время является одной из основных задач иммунотерапии опухолей. Репликация онколитического вируса в опухолевой ткани сама по себе приводит к мощному воспалению в ТМЕ, вызывая иммунный ответ. Предполагается, что если при этом использовать рекомбинантный штамм, экспрессирующий провоспалительные цитокины, это ещё в большей степени будет стимулировать иммунную систему организма-хозяина к эффективному уничтожению опухолевых клеток [53] (табл. 1).

IL-2. Интерлейкин-2 является мощным цитокином, который способен активировать Т-клетки и расширять их функции, активируя противоопухолевый иммунитет. IL-2 содержит гликозилфосфатидилинозитоловый якорь с пептидным линкером, презентующий функциональный IL-2 на поверхности опухолевых клеток [54]. Liu et al. описали опухоль-селективный рекомбинантный VV (vvDD-IL-2-RG), вызывающий экспрессию мембраносвязанного IL-2 в инфицированных опухолевых клетках, и показали усиленный онколитический эффект такого рекомбинантного VV на модели рака толстого кишечника у мышей [55].

Помимо воспалительных реакций и высвобождения неоантигенов в результате репликации этого вируса в ТМЕ, повышение IL-2 увеличивало инфильтрацию опухоль-специфическими Т-клетками, ограничивая при этом опасные для жизни побочные эффекты, связанные с системным введением интерлейкинов. Scholl et al. описали аттенуированный рекомбинантный штамм VV TG1031, экспрессирующий одновременно человеческий IL-2 и эпителиальный мембранный антиген муцин 1 (MUC1). Показана повышенная экспрессия MUC1 в большинстве опухолей молочной железы, в связи с чем этот белок представляет собой потенциальную мишень для иммунотерапии. У пациентов с рецидивирующим раком молочной железы вакцинация этим вирусом стимулировала иммунную систему и приводила к регрессии опухолей [56].

IL-10. Интерлейкин-10 был впервые описан как фактор, продуцируемый Th2-клетками (Т-хелперные клетки), ингибирующий продукцию цитокина Th1. Это мощный ингибитор противовирусного ответа с участием Т-клеток, предотвращающий активацию дендритных клеток (DC, dendritic cells) воспалительного пути CD4⁺ Th1. Исторически IL-10 считался иммунодепрессивным цитокином, усиливающим ускользание опухолевых клеток из-под контроля иммунной системы [57]. Недавние исследования показывают, что IL-10 играет ключевую роль в установлении персистенции вируса *in vivo* [58]. Оказалось, что этот цитокин обладает иммуностимулирующими и противоопухолевыми свойствами, включая активацию NK-клеток, ингибирование ангиогенеза, усиление инфильтрации макрофагов и предотвращение метастазирования [59]. В многочисленных доклинических и клинических испытаниях была показана безопасность применения IL-10 при лечении таких заболеваний, как хронический гепатит С, псориаз и болезнь Крона, что делает его потенциально безопасным инструментом для терапии рака [60]. Сообщалось, что IL-10 улучшает терапевтическую эффективность агентов на основе VV в отношении опухолевых клеток мышей. Это связано с его способностью усиливать пролиферацию Т-клеток и его ролью в качестве хемотаксического агента для CD8⁺ Т-клеток [61].

Chard et al. получили реплицирующийся VV с удалённым геном ТК (штамм Lister), снабжённый мышинным IL-10 (VVLΔTK-IL-10). Они протестировали его подкожное введение на модели рака поджелудочной железы у трансгенных мышей. VVLΔTK-IL-10 продемонстрировал более выраженную противо-

опухолевую активность по сравнению с VV без IL-10 (VVLΔTK), приводящую к практически полной регрессии опухоли, значительному увеличению продолжительности жизни и выработке длительного противоопухолевого иммунитета [62, 63]. Авторы утверждают, что гипоксия, связанная с агрессивным и резистентным к лечению фенотипом протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, не приводила к ингибированию этого онколитического VV и может даже усиливать его активность [63].

IL-12. Интерлейкин-12 привлёк большое внимание в области иммунотерапии благодаря своей важной роли в иммунной системе и противоопухолевой активности. В основном IL-12 секретируется моноцитами и макрофагами. Он активирует клеточный иммунитет за счёт повышения цитолитической активности NK-клеток, усиления специфических цитотоксических Т-клеточных ответов и ответов аллореактивных лимфоцитов [64]. Кроме того, IL-12 индуцирует продукцию IFN лимфоцитами периферической крови и способствует дифференцировке Т-клеток в клетки Th1, которые, в свою очередь, активируют клеточно-опосредованный иммунитет [65]. Широко исследована противоопухолевая активность мышинового IL-12 (mIL-12). Системное введение рекомбинантного белка mIL-12 (rmIL-12) вызывает дозозависимое уменьшение метастазов меланомы B16 F10 и аденокарциномы толстой кишки MC-38 [66]. Регрессия опухоли и повышение выживаемости мышей наблюдались после локальной перитуморальной инъекции mIL-12 в ксенотрансплантаты карциномы яичника. Даже через месяц после образования опухоли, когда её диаметр составлял более 1,5 см, введение этого белка приводило к полной регрессии опухоли [67]. У мышей, которым делали инъекции клеток меланомы BL-6, смешанных с секретирующими белок mIL-12 фибробластами NIH3T3, наблюдалась значительная задержка развития опухоли. У мышей, иммунизированных облучёнными опухолевыми клетками BL-6, смешанными с теми же фибробластами, наблюдалась значительная задержка появления пальпируемой опухоли после повторного заражения родительскими онкогенными клетками BL-6, что позволяет предположить, что IL-12 может вызвать специфический противоопухолевый иммунитет. Meiko et al. сконструировали рекомбинантный нереплицирующийся штамм VV, содержащий кодирующую последовательность mIL-12 в локусе гемагглютинаина VV. Они показали, что опухолевые клетки, инфици-

рованные этим VV, в течение 3 дней продуцировали большое количество биологически активного mIL-12. Чтобы вызвать образование опухоли у мышей, они вводили инфицированные опухолевые клетки с этим рекомбинантным вирусом, что значительно замедляло появление опухолей и уменьшало их размер по сравнению с опухолями мышей, которым вводили контрольный VV, не содержащий гена mIL-12 [68].

IL-15. Интерлейкин-15 — цитокин, способствующий выживанию, пролиферации и активации NK-клеток, CD8⁺ Т-клеток и миелоидных DC CD56⁺. IL-15 может избирательно стимулировать CD8⁺ Т-клетки памяти. Несмотря на то что этот цитокин является родственником IL-2, в адаптивной иммунной системе он демонстрирует собственную активность [69]. Многочисленные исследования показывают, что IL-15, экспрессируемый в ТМЕ, может ингибировать рост опухоли путем активации Т-клеток [53, 70, 71]. Одним из уникальных свойств IL-15 является то, что его активность *in vivo* осуществляется через транспрезентацию. Это означает, что IL-15 представлен в комплексе с α-субъединицей растворимого рецептора IL-15 (IL-15Rα), нацеленном на клетки-мишени, такие как NK-, NKT- (Natural Killer T, естественные киллеры Т) и Т-клетки, при этом не взаимодействуя напрямую с мембраносвязанным рецептором IL-15. На основе этой концепции были разработаны агонисты IL-15, состоящие из IL-15 с частично или полностью растворимым IL-15Rα для улучшения его активности *in vivo* [72]. Растворимые комплексы IL-15/IL-15Rα существенно повышают время полужизни IL-15 и его биодоступность *in vivo*. Этот гибридный белок может активировать инфильтрированные в опухоли CD8⁺ Т-клетки и способствовать разрушению уже образовавшихся опухолей [73].

Kowalsky et al. получили высокоспецифичный к опухолям онколитический штамм VV с двойной делецией генов TK и VGF, экспрессирующий гибридный мышинный белок IL-15/IL-15Rα (vvDD-IL15-Rα). Терапия мышей с раком яичника ID8 и аденокарциномой толстой кишки MC38 с помощью этого рекомбинантного VV продемонстрировала его значительную противоопухолевую активность, увеличение продолжительности жизни мышей. Кроме того, этот рекомбинантный вирус модулировал ТМЕ путём активации как Т-, так и NK-клеток [74].

Цитокины с общей g-цепью, в том числе IL-15, IL-2, IL-7 и IL-21, вызывают экспрессию белка запрограммированной смерти-1 (PD-1,

Таблица 1. Список рекомбинантных VV, экспрессирующих различные цитокины

Цитокины, экспрессируемые VV	Варианты VV	Другие модификации генетического материала	Тип рака	Результат	Ссылки
IL-2	vDD-IL-2-RG	двойная делеция генов TK/VGF	рак толстой кишки	регрессия опухолей/ активация опухоле-специфичных Т-клеток	[55]
	TG1031	экспрессия MUC1	рак молочной железы	лечение рецидивов рака молочной железы	[56]
IL-10	VVLΔTK-IL-10	делеция TK	аденокарцинома протоков поджелудочной железы	инфильтрация макрофагов	[63]
				элиминация опухолей	[62]
IL-12	ivKT0327mIL-12	делеция гемагглютинирина	меланома	полная элиминация опухоли	[68]
IL-15	vDD-IL15-Rα	двойная делеция генов TK/VGF	колоректальная карцинома рак яичников	инфильтрация клеток CD8 ⁺	[74]
		экспрессия гибридного белка IL15/IL15-рецептор α в сочетании с терапией PD1		регрессия опухолей	
IL-21	rTTVΔTK-mIL-21	делеция TK	меланома, карцинома толстой кишки	активация клеток CAR T; инфильтрация NK-клеток	[77]
	VVΔTK-STCΔN1L-mIL-21	делеция TK в сочетании с PD1-терапией	глиома	регрессия опухолей	[78]
GM-CSF	rV-GM-CSF	делеция TK	карцинома толстой кишки	привлечение NK-клеток, DC, индукция опухоле-специфичных CTLs	[87]
	JX-594	делеция TK и VGF	карцинома яичников		[86]
	VV-GMCSF-Lact	экспрессия лактапина	глиобластома, рак молочной железы	регрессия опухолей, усиленный апоптоз	[88, 92]

programmed death-1) и его лиганда (PD-L1) [75]. Совместное применение блокады белка PD-1 и VV, снабжённого геном IL-15, значительно улучшало результаты терапии по сравнению с группами, получавшими только анти-PD-1 или vDD-IL15-Rα [74].

IL-21. Интерлейкин-21 в основном секретируется активированными CD4⁺ Т-клет-

ками и NKT-клетками и выполняет различные функции в подавлении опухолей [76, 77]. Внутритропуховое введение рекомбинантного штамма Tian Tan VV, вооружённого мышинным IL-21 (rTTVΔTK-mIL-21), приводило к запуску системного ответа и значительной регрессии меланомы B16. У гуманизированных мышей с ксенографтами глиомы, меланомы или рака

толстой кишки, VV, экспрессирующий IL-21 человека, продемонстрировал синергический онколитический эффект в сочетании с CAR-T-клетками или инвариантными NK-клетками. Было показано, что рекомбинантный штамм Lister с *IL21* (VVΔTK-STCΔN1L-mIL-21) в комбинации с α-PD1 вызывает полную элиминацию глиомы GL261 после инъекции в опухоль [78].

GM-CSF. GM-CSF, или колониестимулирующий фактор 2, представляет собой мономерный гликопротеиновый цитокин, продуцируемый Т-клетками, тучными клетками, NK-клетками, эндотелиальными клетками, макрофагами и фибробластами. GM-CSF является мощным индуктором специфического и длительного противоопухолевого иммунитета, который может привлекать NK-клетки и DC и индуцировать опухолеспецифические цитотоксичные лимфоциты [79–85]. JX-594, штамм Wyeth, экспрессирующий GM-CSF, вызывал положительную динамику и быстро продвинулся в клинических испытаниях [39]. Исследования клеточной линии злокачественной карциномы яичника, устойчивой к стандартной химиотерапии и вызывающей гиперкальцемию, продемонстрировали её чувствительность к некоторым онколитическим вирусам, включая VV JX-594 [86]. Также был разработан другой рекомбинантный VV, несущий ген белка GM-CSF (rV-GM-CSF). Инфицирование этим рекомбинантным вирусом линии клеток аденокарциномы толстой кишки мыши MC-38 в конечном итоге привело к подавлению роста первичной опухоли. Эксперименты с деpleцией Т-клеток *in vivo* показали, что подавление роста опухолевых клеток после терапии rV-GM-CSF зависит от инфильтрации Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ [87]. Хотя дальнейшие исследования подтвердили, что индуцированный иммунитет является длительным и антиген-специфическим, подобный эффект не наблюдался при инфицировании опухолевых клеток MC-38 рекомбинантными штаммами VV, экспрессирующими IL-2 или IL-6. Было показано, что паракринное высвобождение мышинового GM-CSF опухолевыми клетками, инфицированными rV-GM-CSF, улучшает внутреннюю иммуногенность мышинной карциномы толстой кишки, приводя к антиген-специфическому Т-клеточному противоопухолевому ответу, который останавливает образование первичной опухоли при повторной инокуляции клеток [87]. Таким образом, GM-CSF был описан как высокоэффективный вакцинный адъювант, обладающий значительной противоопухолевой активностью.

Помимо этого, коэкспрессия GM-CSF с онкотоксическими молекулами, такими как апоптин и лактоферрин, приводит к повышению онколитической эффективности вирусных штаммов [88, 89]. Штамм Lister Московского института вирусных препаратов (LIVP) обладает высокой онколитической активностью [90]. В своей работе Grazhdantseva et al. создали рекомбинантный VV на основе LIVP, экспрессирующий GM-CSF человека и продуцирующий гликозилированную зрелую форму этой молекулы в GM-CSF-зависимых клетках [91]. Кроме того, для повышения цитотоксичности этого варианта онкотоксической молекулы в геном вируса был вставлен ген лактапина. Лактапин представляет собой полипептид, полученный из грудного молока человека, способный индуцировать апоптоз в опухолевых клетках. Описанный штамм также содержал делецию TK и VGF. Онколитическую эффективность этого рекомбинантного VV исследовали на мышинной модели рака молочной железы, в качестве контроля использовался штамм, кодирующий только GM-CSF [88]. Также было показано значительное онколитическое действие этого вируса на моделях глиобластомы человека. Данный штамм исследуется в первой фазе клинических испытаний в России [92].

ШТАММЫ VV, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕНЫ ПОВЫШЕННОЙ ИММУНОГЕННОСТИ

Вирусные штаммы семейства поксвирусов зарекомендовали себя как эффективные и весьма безопасные индукторы Т- и В-клеточного ответа. Лицензированная вакцина против оспы третьего поколения, MVA-BN®, являющаяся сильно аттенуированным ортопоксвирусом, демонстрирует превосходный профиль безопасности и иммуногенность [93]. Однако эффективность виротерапии с помощью VV может сильно снижаться вследствие активации иммунного ответа на собственные антигены вирусного вектора. Особенно это касается VV, поскольку подавляющее большинство людей старшего поколения были вакцинированы VV в рамках программы ликвидации оспы [94]. Вирусные векторы на основе VV, экспрессирующие различные целевые антигены, способны стимулировать усиленные клеточные и гуморальные иммунные ответы и могут быть использованы как для разработки вакцин против инфекционных заболеваний, так и для иммунотерапии рака [32] (табл. 2).

Костимулирующие молекулы. Одной из стратегий повышения иммуногенности является экспрессия с помощью VV-векторов белков, напрямую стимулирующих Т-клетки. Например, костимулирующая молекула B7.1 (CD80) представляет собой интегральный мембранный белок, обнаруживаемый на поверхности активированных антиген-презентирующих клеток. Когда на поверхности Т-клеток происходит связывание этой молекулы с белком CD152 или CD28, это служит костимулирующим сигналом для повышения или снижения активности Т-клеток [95]. Было проведено несколько успешных исследований рекомбинантных штаммов VV, кодирующих иммунные костимулирующие молекулы [96]. Hodge et al. показали, что терапия двумя штаммами VV, один из которых экспрессировал канцероэмбриональный антиген (CEA, carcinoembryonic antigen), а другой – костимулирующую молекулу B7.1, вызывала появление оптимальных CEA-специфичных Т-клеточных ответов и предотвращала возникновение CEA⁺ карциномы толстой кишки у мышей [97]. Позднее авторы разработали поксвирусный вектор TRICOM, кодирующий три костимулирующие молекулы: B7.1, ICAM (intercellular adhesion molecule, молекула межклеточной адгезии) и LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen 3, антиген 3, ассоциированный с функцией лимфоцитов). Было показано, что этот вектор вызывает усиленную активацию Т-клеток по сравнению с клетками, инфицированными аналогичным вирусом, кодирующим одну или две из этих костимулирующих молекул [98].

Иммуносупрессивное микроокружение опухолей вызывает локальную толерантность к Т-клеткам за счёт подавления костимулирующих молекул, таких как B7.1 (CD80). Были проведены клинические испытания рекомбинантного VV, экспрессирующего B7.1, с участием 12 пациентов с меланомой с использованием 2 различных доз вирусного препарата (фаза I). У всех пациентов наблюдалось повышение уровня антител и Т-клеток. Такое лечение хорошо переносилось, сообщалось лишь о случаях небольшого повышения температуры, боли в мышцах и утомляемости. У двух пациентов наблюдалась стабилизация, а один пациент перенёс вакцинацию без осложнений и прожил более 59 месяцев после неё [96].

Другой важной для противоопухолевой активности костимулирующей молекулой является гликозилированный мембранный белок типа 1, называемый 4-1BBL, который связывается с 4-1BB на активированных Т-клетках. Белок 4-1BBL, в частности, необходим для про-

лиферации Т-клеток и индукции CD8⁺ Т-клеток памяти. Онколитический VV, экспрессирующий 4-1BBL (rV-4-1BBL), обладал заметной противоопухолевой активностью с увеличением количества опухолевых антиген-специфичных Т-клеток в ТМЕ на модели опухолевых ксенографтов у трансгенных мышей [99].

Флагеллин. Как только патогены достигают поверхности слизистых оболочек, они сталкиваются с первой линией защиты, представленной врождённой иммунной системой. Врождённый иммунитет активируется за счёт взаимодействия с кодируемыми зародышевой линией рецепторами распознавания образов (PRR, pattern-recognition receptors), экспрессируемыми на клетках врождённого иммунитета посредством уникальных микробных компонентов, таких как PAMP, или DAMP (damage-associated molecular patterns) – эндогенных молекулярных паттернов, связанных с повреждением. Семейства PRR включают мембраносвязанные TLR (TLR1, 2, 4, 5, 6 и 10) и эндосомальные TLR (TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 и 13) рецепторы [51]. Первоначально сообщалось, что бактериальный белок флагеллин связывает и активирует TLR5 на поверхности DC, что приводит к миелоидно-зависимому высвобождению провоспалительных цитокинов [100]. Позже было установлено, что цитозольный флагеллин также может восприниматься NOD-подобными рецепторами NAIP5 и NLRC4, что приводит к образованию инфламмосомы [101].

Флагеллин в настоящее время исследуется во многих вакцинах в качестве мощного адьюванта, включая вакцины для слизистых оболочек, используемые отдельно с антигеном или вводимые вместе в виде слитых белков [102]. Флагеллин использовался в качестве адьюванта при создании терапевтической вакцины против отдельных типов рака и продемонстрировал высокую эффективность на моделях генитального рака и мышинной меланомы [103]. Помимо индукции врождённых иммунных ответов, флагеллин влияет на адаптивный иммунитет, индуцируя пролиферацию антиген-специфических CD4⁺ Т-клеток и активируя гуморальный ответ [104].

Sanos et al. разработали рекомбинантный штамм MVA, кодирующий флагеллин *Salmonella typhimurium*. Авторы показали, что иммунизация этим вирусом системно усиливала гуморальный и клеточный иммунный ответ на участках слизистой оболочки. Он индуцировал секрецию IL-1β и TNF-α на слизистых оболочках, что приводило к усилению ответа IgA как при бронхоальвеолярном, так и

при кишечном лаваже и активации миграции CD8⁺ Т-клеток в мезентериальные лимфатические узлы [105].

Колоректальный рак является одним из самых распространённых и третьим по смертности злокачественным новообразованием в мире [106]. Несмотря на разработку новых таргетных препаратов, общая пятилетняя выживаемость при колоректальном раке составляет всего 46% [107]. Рекombинантный поксвирус (на основе штамма вируса Танарох), экспрессирующий флагеллин (кодируемый геном *fliC Salmonella enterica*), вызывал регрессию ксенотрансплантатов колоректальной карциномы HCT-116 человека у иммунодефицитных бестимусных мышей [108]. В этом эксперименте рекомбинантные вирусы имели делецию гена *2L* (кодирует TNF-связывающий белок), гена *66R* (кодирует тимидинкиназу) или обоих генов сразу. Кроме того, штаммы экспрессировали мышинный гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (mGM-CSF), мышинный хемотаксический белок 1 (mCCL2/mMCP-1) или бактериальный флагеллин (FliC). Терапию проводили путем внутриопухолевой инъекции одного из этих рекомбинантных поксвирусов. Значительная регрессия наблюдалась в опухолях, в которые вводили штамм, экспрессирующий флагеллин, с двойной делецией генов *2L* и *66R* (TPV/ Δ 2L/ Δ 66R/*fliC*). Авторы предполагают, что этот рекомбинантный вариант может быть эффективен и для терапии колоректального рака человека [108].

Wang et al. разработали рекомбинантную противоопухолевую вакцину на основе вируса осповакцины, экспрессирующую сурвивин T34A (SurT24A) и флагеллин (FliC), на базе штамма WR VV [109]. Сурвивин (или Birc-5) является членом семейства белков, ингибирующих апоптоз, он может стимулировать противоопухолевый цитотоксический Т-клеточный ответ [110]. В исследовании были продемонстрированы терапевтические эффекты SurT34A и показано усиление иммуногенности FliC. Их комбинация в конечном итоге привела к синергическому усилению противоопухолевой активности в экспериментах на моделях рака желудка [109].

Нашей группой недавно был разработан рекомбинантный штамм LIPV VV, кодирующий субъединицу В флагеллина *Vibrio vulnificus*, показавший усиленную регрессию опухоли на моделях мышей с меланомой B16. Онколитическая терапия этим штаммом повышала уровень TNF- α , GM-CSF, увеличивала количество макрофагов в TME и способ-

ствовала лучшему выживанию животных с экспериментальными аллографтами меланомы B16 [111].

Блокада иммунных контрольных точек. В последние годы одной из активно развивающихся областей иммунотерапии рака стала разработка ингибиторов иммунных контрольных точек. В особенности активно шёл поиск антител к PD1 – фактору программируемой клеточной смерти, имеющему два лиганда, PD-L1 и PD-L2, и CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) – гликопротеину цитотоксических Т-лимфоцитов-4. Сообщалось, что экспрессия PD-1 повышается у мышей с деплецией CD8⁺ Т-клеток, инфицированных вирусом лимфоцитарного хориоменингита, а блокада PD-1/PD-L1 способствует активации CD8⁺ Т-клеток и снижает вирусную нагрузку [112].

Был получен рекомбинантный штамм WR VV, экспрессирующий антитела к PD-1 человека. Доклинические исследования на мышах с моделированным раком молочной железы и карциномы лёгкого показали, что такой VV повышает экспрессию IFN- γ и активирует опухоль-специфические цитотоксические Т-клетки и, таким образом, представляет большой интерес для дальнейших клинических испытаний [113].

CTLA-4, также известный как белок CD152, экспрессируется в основном регуляторными Т-клетками (Treg) и опосредует ослабление иммунного ответа, связываясь с белками CD86 или CD80 на поверхности антиген-презентирующих клеток. Рекombинантный VV BT-001, экспрессирующий рекомбинантный мышинный анти-CTLA-4, оказался эффективным противоопухолевым агентом, показавшим хороший эффект на животных моделях с имплантированными опухолевыми клетками линий C38, CT26, A20 и EMT6. Анти-CTLA-4 уменьшал иммуносупрессивное действие Treg и, наряду с экспрессией GM-CSF, позволил полностью элиминировать опухоли у экспериментальных животных [114].

Новой мишенью для стратегии ингибирования иммунных контрольных точек является TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), экспрессия которого значительно повышена в опухолевых клетках. Иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM) представляет собой консервативную последовательность аминокислот, обнаруженную на цитоплазматических доменах многих ингибирующих рецепторов иммунных клеток, включая Т-клетки. Рецепторы, содержащие ITIM-домен, действуют как

Таблица 2. Сведения о модификациях генома VV, направленных на усиление его онколитических свойств

Генетические модификации	Описание вариантов	Задействованные клетки иммунной системы	Тип злокачественного новообразования	Результат	Ссылки
Экспрессия костимулирующих молекул	TRICOM; экспрессия B7.1, ICAM и LFA-3	T-клетки	меланома	усиленная активация T-клеток, регрессия опухолей в фазе I клинических испытаний	[96, 98]
	rV-4-1BBL; экспрессия 4-1BBL	CD8 ⁺ T-клетки	карцинома	повышение уровня T-клеток, специфичных к опухолевым антигенам, в TME	[99]
Бактериальный флагеллин	rMVA-fla; кодирующий флагеллин из <i>S. typhimurium</i>	CD8 ⁺ T-клетки	рак желудочно-кишечного тракта	IL-1 β и TNF- α , приводящие к повышению уровня ответа иммуноглобулина G (IgG)2с и антител CTL	[105]
	TPV/ Δ 2L/ Δ 66R/ <i>fliC</i> ; Танапокс (Tanapox), экспрессирующий флагеллин из <i>Salmonella enterica</i> /делеция генов 2L и 66R	нейтрофилы	колоректальный рак		[108]
	SurT24A; экспрессирующий сурвивин и флагеллин (FliC)	цитотоксические T-клетки	рак желудка	синергетическое привлечение T-клеток, регрессия опухолей	[109]
Блокада иммунного чекпойнта	Δ TK-Armed-VACV; экспрессирующий человеческие антитела против PD1	цитотоксические T-клетки	рак молочной железы/карцинома легких	повышенный уровень IFN- γ	[113]
	BT-00; экспрессия антител против CTLA4	T-клетки	карцинома толстой кишки	оптимизированная активность по удалению Treg/мыши на 100% свободные от опухолей	[114]
	VV- α -TIGIT; экспрессирует антитела против иммуноглобулинов T-клеток и домена ITIM	CD8 ⁺ T-клетки	гепатоцеллюлярная карцинома	70% полной регрессии опухоли/опухоль-специфичная иммунологическая память	[116]
Медиаторы некроптоза/апоптоза	WR/TK-/MLKL; делеция TK и экспрессия мышинных MLKL	CD8 ⁺ T-клетки	меланома	надёжный иммунитет, направленный против неопитопов/гибели иммуногенных клеток	[119]
	VVdGF-ApoS24/2; делеция VGF и экспрессия апоптина	CD8 ⁺ T-клетки	эпидермоидная карцинома	оказывает влияние на путь апоптоза	[120, 121]

врождённые ингибирующие рецепторы, вызывая негативную регуляцию на разных уровнях иммунного ответа [115]. Zuo et al. сконструировали рекомбинантный онколитический штамм VV, кодирующий полное моноклональное антитело к TIGIT (VV- α -TIGIT). Изучение противоопухолевой эффективности этого вируса *in vivo* показало полную регрессию экспериментальной гепатоцеллюлярной карциномы в 70%. Авторы показали, что VV- α -TIGIT способствовал привлечению активированных CD8⁺ Т-клеток в ТМЕ. Более того, у излеченных животных не возникали опухоли при повторном прививании опухолевых клеток, что свидетельствовало о наличии у них долговременной опухолеспецифической иммунологической памяти [116].

Медиаторы некроптоза и апоптоза. Согласно современным взглядам на механизмы лечения рака, гибель опухолевых клеток вследствие действия иммунной системы — например, некроптоз, сочетающий черты некроза и апоптоза — является ключевым этапом противоопухолевого ответа [117]. Запуск некроптоза регулируется через фосфорилирование белка MLKL (mixed lineage kinase domain-like) после его прикрепления к плазматической мембране. Недавно было показано, что доставка мРНК, кодирующей MLKL, внутрь опухоли способствует формированию устойчивого противоопухолевого иммунитета в экспериментах на мышиных моделях [118]. Заражение опухолевых клеток VV, экспрессирующим MLKL, приводило к гибели клеток *in vitro* в результате некроптоза. Впоследствии введение этого штамма в опухоль приводило к активации интенсивного противоопухолевого Т-клеточного ответа на опухолевые неоантигены и способствовало гибели инфицированных иммуногенных раковых клеток *in situ* после заметного улучшения противоопухолевой активности в моделях меланомы у мышей [119].

Апоптин представляет собой богатый остатками пролина неструктурный белок, выделенный из вируса куриной анемии. Этот белок может индуцировать апоптоз в раковых клетках и является новым противоопухолевым средством. Kochneva et al. сконструировали рекомбинантный VV, имеющий делецию гена VGF и экспрессирующий апоптин, вызывающий апоптоз преимущественно в опухолевых клетках. Исследования *in vitro* показали значительный цитолитический эффект этого штамма на различных культурах опухолевых клеток человека, включая A549, A431, U87MG, RD и MCF7 [120]. Описанный вирусный штамм вызывал резкую регрессию опухоли у мышей

с ксенотрансплантированной эпидермоидной карциномой A431 человека. Авторы также показали локализации этого рекомбинантного вируса в цитоплазме инфицированных клеток и его влияние на путь апоптоза [121].

Дальнейшие модификации для повышения иммуногенности. Продукты некоторых вирусных генов, в том числе A49, A52, B15, K1 и K7, ингибируют NF- κ B-зависимые сигнальные пути различными способами. Di Pilato et al. изучили влияние генов A52, B15 и K7, действующих как ингибиторы NF- κ B, на иммунную систему мышей. Делеция этих генов приводит к запуску NF- κ B при инфицировании клеток и продукции провоспалительных цитокинов или хемокинов, которые рекрутируют нейтрофилы (N α и N β), DC и NK-клетки [122]. В другом исследовании было показано, что делеция A44, A46 и C12 из генома MVA усиливает его иммуногенность с участием клеток врожденного иммунитета и запускает специфический Т-клеточный ответ [123]. Данные векторы ещё не были протестированы на моделях опухолей, но они могут быть потенциальными кандидатами для использования в онколитической виротерапии.

Другой стратегией повышения иммуногенности вирусной терапии является использование метода гетерологичного прайм-бустинга путём применения двух несовпадающих покс-вирусов. Например, использование комбинации векторов MVA и оспы птиц, экспрессирующих два человеческих антигена, MUC1 и CEA, наряду с TRICOM, привело к развитию специфического иммунного ответа против опухолевых антигенов [124].

Ещё одним интересным подходом является использование оболочечных онколитических вирусов, включая EЕV-форму VV, для расширения ответа на опухолевые антигены путём физического прикрепления опухолеспецифических пептидов, таких как эпитопы МНС класса I или II, к вирусной оболочке. Например, эти покрытые пептидом оболочки VV вызывали сильный Т-клеточный специфический иммунный ответ на опухолевые антигены в моделях меланомы [125].

СОЧЕТАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ VV С ДРУГИМИ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ПОДХОДАМИ

Ген-направленная терапия с использованием пролекарств и ферментов. Ещё одним подходом к усилению онколитического действия

VV является терапия опухолей с использованием пролекарства и ген-специфичного фермента (GDEPT, gene-directed enzyme prodrug therapy). В этом случае нетоксичное пролекарство превращается в токсичное лекарство уже внутри ТМЕ, убивая опухолевые клетки, продуцирующие фермент. Кроме того, диффузия лекарства приводит к гибели клеток, локализованных рядом с клетками, продуцирующими ферменты, даже если они сами не экспрессируют белок, превращающий пролекарство в лекарство. Ключевым ферментом в VV-опосредованном методе GDEPT является цитозиндезаминаза в сочетании с 5-фторцитозином, которого нет в клетках млекопитающих [126]. Как уже упоминалось выше, это пролекарство под действием цитозиндезаминазы и урацилфосфорибозилтрансферазы превращается в токсичный для клеток продукт 5-фторурацилмонофосфат [47]. Такая система в рекомбинантных штаммах VV продемонстрировала лучшие терапевтические результаты, чем монотерапия онколитическими вирусами. Chalikonda et al. разработали рекомбинантный VV, который экспрессирует ген *FCY1*, кодирующий цитозиндезаминазу из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с двойной делецией генов TK и VGF. Этот рекомбинантный VV избирательно инфицировал опухоли яичников и вызывал их регрессию. Кроме того, сочетание этого VV с пролекарством 5-фторцитозином привело к долгосрочной выживаемости иммунокомпетентных мышей, несущих опухоли. На этом основании можно предположить, что комбинированная терапия с онколитическими вирусами является многообещающим средством для лечения рака яичников [126]. Аналогичные результаты были получены в другом исследовании по лечению PDAC с использованием MAPK-зависимого VV, экспрессирующего суицидальный ген цитозиндезаминазы дрожжей и ген урацилфосфорибозилтрансферазы [48].

Другим пролекарством, используемым в этой области, является Seso-аналог, полученный из антибиотика дуокармицина SA. β -Галактозидаза переводит это пролекарство в токсичную форму. Лечение рекомбинантным VV, экспрессирующим β -галактозидазу, в сочетании с Seso-аналогом оказало положительное влияние на животных моделях рака молочной железы [127].

Сочетание с лекарствами. Для повышения эффективности виро-терапии могут использоваться фармацевтические препараты, способные влиять на регуляцию врождённой или адаптивной иммунной системы. Например,

сочетание с ингибиторами гистондеацетилазы (HDI, histone deacetylase inhibitors) способствует репликации вируса и повышает эффективность терапии [128]. Дальнейшие исследования показали, что HDI усиливает репликацию вируса и распространение онколитического VV внутри опухоли за счёт снижения клеточного IFN-ответа и усиления вирус-индуцированного апоптоза [129].

Francis et al. показали, что лечение онколитическими VV совместно с коктейлем, состоящим из IFN- α , поли I: C и ингибитора COX-2, повышает экспрессию Th1-привлекающих хемокинов, снижает уровень Treg-привлекающих хемокинов (CCL22 и CXCL12) и увеличивает количество опухоль-инфильтрирующих NK-клеток и CD8⁺ T-клеток в пределах ТМЕ. Эта комбинация привела к долгосрочному выживанию мышей с карциномой толстой кишки MC38 [130].

В другом исследовании комбинация перорального низкомолекулярного многоцелевого ингибитора рецепторной тирозинкиназы (сунитиниба) с mpJX-594 VV показала, что вирус нацеливается на кровеносные сосуды опухоли, распространяясь в опухолевых клетках и вызывая их гибель, опосредованную CD8⁺ T-клетками, активированными под влиянием иммуномодулирующего действия сунитиниба [131]. Эти исследования демонстрируют, что фармацевтические препараты в сочетании с онколитическим вирусом могут регулировать врождённый и адаптивный противоопухолевый иммунный ответ в ТМЕ для достижения устойчивого терапевтического эффекта.

Сочетание VV с химио- и радиотерапией. Различные варианты использования онколитических вирусов в сочетании с химиотерапией за счёт их взаимодополняющего действия стали новой платформой для повышения противоопухолевой эффективности [132]. Клинические испытания фазы I внутривенной инъекции штамма GL-ONC1 VV на пациентах с распространённым раком головы/шеи, проходящих химиотерапию (с использованием цисплатина) и лучевую терапию, подтвердили безопасность и эффективность этого лечения. Это дало возможность проводить испытания фазы II [133]. Исследования фазы II комбинированного лечения штаммом VV TG4010 с химиотерапией у пациентов с немелкоклеточным раком лёгких на стадии III/IV показало значительную регрессию опухоли и увеличение показателей выживаемости [134]. По-видимому, эффективность химиотерапии повышается в присутствии иммунотерапии VV за счёт усиления опухолевых антиген-

специфичных CD8⁺ Т-клеток, праймируемых введением VV [135]. Кроме того, применение метода высокодозной стереотаксической лучевой терапии в режиме гипофракционирования (SBRT, hypofractionated stereotactic body radiotherapy) вместе с VV усиливало противоопухолевый эффект *in vivo* и повышало противоопухолевое действие Т-клеток [136].

Сочетание VV с другими иммунотерапевтическими подходами. Чтобы усилить иммуностимулирующие эффекты VV, многие исследователи комбинируют вирусы с агонистами иммунных костимулирующих молекул или антагонистами иммунных коингибирующих молекул (например, ингибиторами иммунных контрольных точек) или другими методами иммунотерапии. Одной из стратегий коррекции иммунотерапии является использование режима немиелоаблативной лимфодеплеции организма-хозяина перед клеточной терапией рака, такой как терапия CAR-T или адоптивная Т-клеточная терапия. Обычно эта процедура включает короткий курс химиотерапии для уничтожения Т-клеток [137]. Kim et al. использовали лимфодеплецию организма-хозяина в качестве дополнения к иммунотерапии с использованием VV. Они сконструировали VV, экспрессирующий белок суперсемейства TNF, названный 4-1BBL (rV-4-1BBL), в качестве костимулирующей молекулы, и оценили его онколитическую активность в сочетании с методом лимфодеплеции на моделях меланомы. Поскольку лимфодеплеция блокирует ответ антител против вируса, выживаемость вируса в TME увеличивается, что приводит к значительному повышению его противоопухолевой активности [138].

Как обсуждалось ранее, блокада иммунных контрольных точек играет важную роль в иммунотерапии. Например, ипилимумаб, гуманизированное моноклональное антитело, специфичное к CTLA-4, является первым одобренным FDA (Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) препаратом из нового класса иммунотерапии рака. Ипилимумаб увеличивает среднюю общую выживаемость пациентов с метастатической меланомой и вызывает стойкую регрессию опухоли [139]. Кроме того, ниволумаб является первым человеческим моноклональным антителом IgG4 против PD-1. Клинические испытания ниволумаба у пациентов с прогрессирующей неоперабельной метастатической меланомой продемонстрировали удовлетворительные результаты с меньшим количеством токсических побочных эффектов по сравнению с химиотерапией [140].

Кроме того, сочетание рекомбинантных VV с этими ингибирующими препаратами даёт оптимальный иммунный ответ против опухолей. Например, введение ранее упомянутого vvDD-IL-2-RG с антителами, блокирующими иммунную контрольную точку PD-1/PD-L1, приводило к регрессии запущенных опухолей у большинства мышей [55]. А введение TG4010, хорошо изученного варианта MVA, экспрессирующего человеческий MUC1 и IL-2, в сочетании с лигандом TLR9 [141] и блокадой PD-1 специфическим антагонистом обеспечивало оптимальные терапевтические результаты в клинических и доклинических исследованиях [142].

Foy et al. исследовали влияние комбинации блокады CTLA-4 с рекомбинантным модифицированным MVA, снабжённым внеклеточным доменом рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (MVA-BN-HER2). Противоопухолевую эффективность MVA-BN-HER2 отдельно или в сочетании с блокадой CTLA-4 оценивали на моделях мышей с метастазами в лёгкие. MVA-BN-HER2 значительно повышал общую выживаемость мышей по сравнению с контролем (без лечения) или только с блокадой CTLA-4, что сопровождалось значительной инфильтрацией опухоли CTLs и коэкспрессией TNF-α и IFN-γ. Кроме того, комбинация с блокадой CTLA-4 значительно усиливала HER2-специфичные Т-клеточные ответы с высокой долей коэкспрессии TNF-α и IL-2 с IFN-γ. При этом индуцируемый белок-костимулятор Т-клеток (ICOS) экспрессировался на эффекторных Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺, но не на регуляторных Т-клетках (Treg). Напротив, контрольные мыши, не получавшие лечения или получавшие только блокаду CTLA-4, имели повышенный уровень ICOS⁺ Treg – фенотип, связанный с высокой супрессией TME [143, 144].

ВЫВОДЫ

VV, являющийся первым онколитическим вирусом, широко изученным в клинических испытаниях, демонстрирует многообещающие терапевтические результаты. За последнее десятилетие с помощью различных биоинженерных подходов получено большое количество его рекомбинантных штаммов с улучшенной онколитической активностью. Модификации VV включают экспрессию проапоптотических молекул, усиливающих прямое цитопатическое действие вируса на опухоль, факторов, усиливающих онкоселективность, или

иммуномодулирующих белков, усиливающих противоопухолевый иммунный ответ. Весьма перспективно комбинирование онколитической виротерапии с другими иммунотерапевтическими подходами, обеспечивающими снижение гуморального ответа на вирусные антигены и индукцию противоопухолевых цитотоксических лимфоцитов.

Вклад авторов. Я. Шакиба — концепция обзора, анализ литературы, написание рукописи. Я. Шакиба, П.О. Воробьев, М. Махмуд, А. Хамад, Д.В. Кочетков, Г.М. Юсубалиева, А.В. Липатова — анализ литературы и написа-

ние рукописи. В.П. Баклаушев, П.М. Чумаков, А.В. Липатова — редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10157). Часть работы, связанная с анализом сочетания лечения с онколитическими вирусами и другими иммунотерапевтическими подходами, была поддержана Российским научным фондом (грант № 22-64-00057).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания исследований с участием людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M., and Smith, G. L. (2005) Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans, *J. Gen. Virol.*, **86**, 1279-1290, doi: 10.1099/vir.0.80831-0.
2. Roberts, K. L., and Smith, G. L. (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination, *Trends Microbiol.*, **16**, 472-479, doi: 10.1016/j.tim.2008.07.009.
3. Levaditi, C., and Nicolau, S. (1922) On the culture of the vaccinal virus in epithelial neoplasia [in French], *CR Soc. Biol.*, **86**, 928.
4. Guse, K., Cerullo, V., and Hemminki, A. (2011) Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **11**, 595-608, doi: 10.1517/14712598.2011.558838.
5. Schlom, J. (2012) Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward, *J. Natl. Cancer Inst.*, **104**, 599-613, doi: 10.1093/jnci/djs033.
6. Fenner, F. (1989) Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign, *Res. Virol.*, **140**, 465-466; discussion 487-491, doi: 10.1016/s0923-2516(89)80126-8.
7. Fenner, F. (1993) Smallpox: emergence, global spread, and eradication, *Hist. Philos. Life Sci.*, **15**, 397-420.
8. Thorne, S. H., Bartlett, D. L., and Kirn, D. H. (2005) The use of oncolytic vaccinia viruses in the treatment of cancer: a new role for an old ally? *Curr. Gene Ther.*, **5**, 429-443, doi: 10.2174/1566523054546215.
9. Hermiston, T. (2000) Gene delivery from replication-selective viruses: arming guided missiles in the war against cancer, *J. Clin. Invest.*, **105**, 1169-1172, doi: 10.1172/JCI9973.
10. Thorne, S. H., Hwang, T. H., and Kirn, D. H. (2005) Vaccinia virus and oncolytic virotherapy of cancer, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **7**, 359-365.
11. Gammon, D. B., Gowrishankar, B., Duraffour, S., Andrei, G., Upton, C., and Evans, D. H. (2010) Vaccinia virus-encoded ribonucleotide reductase subunits are differentially required for replication and pathogenesis, *PLoS Pathog.*, **6**, e1000984, doi: 10.1371/journal.ppat.1000984.
12. Wang, L. C., Lynn, R. C., Cheng, G., Alexander, E., Kapoor, V., Moon, E. K., Sun, J., Fridlender, Z. G., Isaacs, S. N., Thorne, S. H., and Albelda, S. M. (2012) Treating tumors with a vaccinia virus expressing IFN β illustrates the complex relationships between oncolytic ability and immunogenicity, *Mol. Ther.*, **20**, 736-748, doi: 10.1038/mt.2011.228.
13. Thorne, S. H. (2012) Next-generation oncolytic vaccinia vectors, *Methods Mol. Biol.*, **797**, 205-215, doi: 10.1007/978-1-61779-340-0_14.
14. Smith, G. L., Benfield, C. T. O., Maluquer de Motes, C., Mazzon, M., Ember, S. W. J., Ferguson, B. J., and Sumner, R. P. (2013) Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity, *J. Gen. Virol.*, **94**, 2367-2392, doi: 10.1099/vir.0.055921-0.
15. Hu, W., Wang, G., Huang, D., Sui, M., and Xu, Y. (2019) Cancer immunotherapy based on natural killer cells: current progress and new opportunities, *Front. Immunol.*, **10**, 1205, doi: 10.3389/fimmu.2019.01205.
16. Kirwan, S., Merriam, D., Barsby, N., McKinnon, A., and Burshtyn, D. N. (2006) Vaccinia virus modulation of natural killer cell function by direct infection, *Virology*, **347**, 75-87, doi: 10.1016/j.virol.2005.11.037.
17. Chisholm, S. E., and Reyburn, H. T. (2006) Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors, *J. Virol.*, **80**, 2225-2233, doi: 10.1128/JVI.80.5.2225-2233.2006.
18. Benfield, C. T. O., Ren, H., Lucas, S. J., Bahsoun, B., and Smith, G. L. (2013) Vaccinia virus protein K7 is a virulence factor that alters the acute immune response to infection, *J. Gen. Virol.*, **94**, 1647-1657, doi: 10.1099/vir.0.052670-0.

19. Li, F., Sheng, Y., Hou, W., Sampath, P., Byrd, D., Thorne, S., and Zhang, Y. (2020) CCL5-armed oncolytic virus augments CCR5-engineered NK cell infiltration and antitumor efficiency, *J. Immunother. Cancer*, **8**, e000131, doi: 10.1136/jitc-2019-000131.
20. Karupiah, G., Coupar, B. E., Andrew, M. E., Boyle, D. B., Phillips, S. M., Mullbacher, A., Blanden, R. V., and Ramshaw, I. A. (1990) Elevated natural killer cell responses in mice infected with recombinant vaccinia virus encoding murine IL-2, *J. Immunol.*, **144**, 290-298.
21. McKenzie, R., Kotwal, G. J., Moss, B., Hammer, C. H., and Frank, M. M. (1992) Regulation of complement activity by vaccinia virus complement-control protein, *J. Infect. Dis.*, **166**, 1245-1250, doi: 10.1093/infdis/166.6.1245.
22. Girgis, N. M., Dehaven, B. C., Xiao, Y., Alexander, E., Viner, K. M., and Isaacs, S. N. (2011) The Vaccinia virus complement control protein modulates adaptive immune responses during infection, *J. Virol.*, **85**, 2547-2556, doi: 10.1128/JVI.01474-10.
23. Isaacs, S. N., Kotwal, G. J., and Moss, B. (1992) Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 628-632, doi: 10.1073/pnas.89.2.628.
24. Jefferson, A., Cadet, V. E., and Hielscher, A. (2015) The mechanisms of genetically modified vaccinia viruses for the treatment of cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **95**, 407-416, doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.04.001.
25. Thorne, S. H. (2011) Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus, *Immunol. Res.*, **50**, 286-293, doi: 10.1007/s12026-011-8211-4.
26. Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K., and O'Neill, L. A. (2000) A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10162-10167, doi: 10.1073/pnas.160027697.
27. Alcamí, A., Symons, J. A., and Smith, G. L. (2000) The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN, *J. Virol.*, **74**, 11230-11239, doi: 10.1128/jvi.74.23.11230-11239.2000.
28. Kirn, D. H., Wang, Y., Le Boeuf, F., Bell, J., and Thorne, S. H. (2007) Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus, *PLoS Med.*, **4**, e353, doi: 10.1371/journal.pmed.0040353.
29. Gerlic, M., Faustin, B., Postigo, A., Yu, E. C., Proell, M., Gombosuren, N., Krajewska, M., Flynn, R., Croft, M., Way, M., Satterthwait, A., Liddington, R. C., Salek-Ardakani, S., Matsuzawa, S., and Reed, J. C. (2013) Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7808-7813, doi: 10.1073/pnas.1215995110.
30. Symons, J. A., Adams, E., Tschärke, D. C., Reading, P. C., Waldmann, H., and Smith, G. L. (2002) The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model, *J. Gen. Virol.*, **83**, 2833-2844, doi: 10.1099/0022-1317-83-11-2833.
31. Alcamí, A., Symons, J. A., Collins, P. D., Williams, T. J., and Smith, G. L. (1998) Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus, *J. Immunol.*, **160**, 624-633.
32. Lehmann, M. H., Kastenmüller, W., Kandemir, J. D., Brandt, F., Suezer, Y., and Sutter, G. (2009) Modified vaccinia virus ankara triggers chemotaxis of monocytes and early respiratory immigration of leukocytes by induction of CCL2 expression, *J. Virol.*, **83**, 2540-2552, doi: 10.1128/JVI.01884-08.
33. Alejo, A., Ruiz-Argüello, M. B., Ho, Y., Smith, V. P., Saraiva, M., and Alcamí, A. (2006) A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5995-6000, doi: 10.1073/pnas.0510462103.
34. Ylösmäki, E., and Cerullo, V. (2020) Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **65**, 25-36, doi: 10.1016/j.copbio.2019.11.016.
35. Guse, K., Sloniecka, M., Diaconu, I., Ottolino-Perry, K., Tang, N., Ng, C., Le Boeuf, F., Bell, J. C., McCart, J. A., Ristimäki, A., Pesonen, S., Cerullo, V., and Hemminki, A. (2010) Antiangiogenic arming of an oncolytic vaccinia virus enhances antitumor efficacy in renal cell cancer models, *J. Virol.*, **84**, 856-866, doi: 10.1128/JVI.00692-09.
36. Gholami, S., Marano, A., Chen, N. G., Aguilar, R. J., Frentzen, A., Chen, C. H., Lou, E., Fujisawa, S., Eveno, C., Belin, L., Zanzonico, P., Szalay, A., and Fong, Y. (2014) A novel vaccinia virus with dual oncolytic and anti-angiogenic therapeutic effects against triple-negative breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, **148**, 489-499, doi: 10.1007/s10549-014-3180-7.
37. Moss, B. (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11341-11348, doi: 10.1073/pnas.93.21.11341.
38. Hung, C. F., Tsai, Y. C., He, L., Coukos, G., Fodor, I., Qin, L., Levitsky, H., and Wu, T. C. (2007) Vaccinia virus preferentially infects and controls human and murine ovarian tumors in mice, *Gene Ther.*, **14**, 20-29, doi: 10.1038/sj.gt.3302840.
39. Heo, J., Reid, T., Ruo, L., Breitbach, C. J., Rose, S., Bloomston, M., Cho, M., Lim, H. Y., Chung, H. C., Kim, C. W., Burke, J., Lencioni, R., Hickman, T., Moon, A., Lee, Y. S., Kim, M. K., Daneshmand, M., Dubois, K., Longpre, L., Ngo, M., et al. (2013) Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer, *Nat. Med.*, **19**, 329-336, doi: 10.1038/nm.3089.

40. Mori, K. M., Giuliano, P. D., Lopez, K. L., King, M. M., Bohart, R., and Goldstein, B. H. (2019) Pronounced clinical response following the oncolytic vaccinia virus GL-ONC1 and chemotherapy in a heavily pretreated ovarian cancer patient, *Anticancer Drugs*, **30**, 1064-1066, doi: 10.1097/CAD.0000000000000836.
41. McCart, J. A., Ward, J. M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H. R., Libutti, S. K., Moss, B., and Bartlett, D. L. (2001) Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes, *Cancer Res.*, **61**, 8751-8757.
42. Buller, R. M., Chakrabarti, S., Cooper, J. A., Twardzik, D. R., and Moss, B. (1988) Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence, *J. Virol.*, **62**, 866-874, doi: 10.1128/JVI.62.3.866-874.1988.
43. Schweneker, M., Lukassen, S., Späth, M., Wolferstätter, M., Babel, E., Brinkmann, K., Wielert, U., Chaplin, P., Suter, M., and Hausmann, J. (2012) The vaccinia virus O1 protein is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes viral virulence, *J. Virol.*, **86**, 2323-2336, doi: 10.1128/JVI.06166-11.
44. Wee, P., and Wang, Z. (2017) Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways, *Cancers (Basel)*, **9**, 52, doi: 10.3390/cancers9050052.
45. Li, S., Balmain, A., and Counter, C. M. (2018) A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 767-777, doi: 10.1038/s41568-018-0076-6.
46. Yuan, T. L., Amzallag, A., Bagni, R., Yi, M., Afghani, S., Burgan, W., Fer, N., Strathern, L. A., Powell, K., Smith, B., Waters, A. M., Drubin, D., Thomson, T., Liao, R., Greninger, P., Stein, G. T., Murchie, E., Cortez, E., Egan, R. K., Procter, L., et al. (2018) Differential effector engagement by oncogenic KRAS, *Cell Rep.*, **22**, 1889-1902, doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.051.
47. Gopinath, P., and Ghosh, S. S. (2008) Implication of functional activity for determining therapeutic efficacy of suicide genes *in vitro*, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1913-1921, doi: 10.1007/s10529-008-9787-1.
48. Kurosaki, H., Nakatake, M., Sakamoto, T., Kuwano, N., Yamane, M., Ishii, K., Fujiwara, Y., and Nakamura, T. (2021) Anti-tumor effects of MAPK-dependent tumor-selective oncolytic vaccinia virus armed with CD/UPRT against pancreatic ductal adenocarcinoma in mice, *Cells*, **10**, 985, doi: 10.3390/cells10050985.
49. Guo, H., Callaway, J. B., and Ting, J. P. (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics, *Nat. Med.*, **21**, 677-687, doi: 10.1038/nm.3893.
50. Guo, Z. S., Naik, A., O'Malley, M. E., Popovic, P., Demarco, R., Hu, Y., Yin, X., Yang, S., Zeh, H. J., Moss, B., Lotze, M. T., and Bartlett, D. L. (2005) The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2, *Cancer Res.*, **65**, 9991-9998, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1630.
51. Legrand, F. A., Verardi, P. H., Chan, K. S., Peng, Y., Jones, L. A., and Yilma, T. D. (2005) Vaccinia viruses with a serpin gene deletion and expressing IFN-gamma induce potent immune responses without detectable replication *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2940-2945, doi: 10.1073/pnas.0409846102.
52. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., and Ribas, A. (2017) Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy, *Cell*, **168**, 707-723, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017.
53. Pearl, T. M., Markert, J. M., Cassady, K. A., and Ghonime, M. G. (2019) Oncolytic virus-based cytokine expression to improve immune activity in brain and solid tumors, *Mol. Ther. Oncolytics*, **13**, 14-21, doi: 10.1016/j.omto.2019.03.001.
54. Yang, J. C., Sherry, R. M., Steinberg, S. M., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., White, D. E., Liewehr, D. J., Merino, M. J., and Rosenberg, S. A. (2003) Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer, *J. Clin. Oncol.*, **21**, 3127-3132, doi: 10.1200/JCO.2003.02.122.
55. Liu, Z., Ge, Y., Wang, H., Ma, C., Feist, M., Ju, S., Guo, Z. S., and Bartlett, D. L. (2018) Modifying the cancer-immune set point using vaccinia virus expressing re-designed interleukin-2, *Nat. Commun.*, **9**, 4682, doi: 10.1038/s41467-018-06954-z.
56. Scholl, S., Squiban, P., Bizouarne, N., Baudin, M., Acres, B., Von Mensdorff-Pouilly, S., Shearer, M., Beuzeboc, P., Van Belle, S., Uziel, B., Pouillart, P., Taylor-Papadimitriou, J., and Miles, D. (2003) Metastatic breast tumour regression following treatment by a gene-modified vaccinia virus expressing MUC1 and IL-2, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2003**, 194-201, doi: 10.1155/S111072430320704X.
57. Yigit, R., Massuger, L. F., Figdor, C. G., and Torensma, R. (2010) Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination, *Gynecol. Oncol.*, **117**, 366-372, doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.019.
58. Brooks, D. G., Trifilo, M. J., Edelmann, K. H., Teyton, L., McGavern, D. B., and Oldstone, M. B. (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo*, *Nat. Med.*, **12**, 1301-1309, doi: 10.1038/nm1492.
59. Stearns, M. E., Wang, M., Hu, Y., Garcia, F. U., and Rhim, J. (2003) Interleukin 10 blocks matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1-matrix metalloproteinase synthesis in primary human prostate tumor lines, *Clin. Cancer Res.*, **9**, 1191-1199.
60. Schock, S. N., Chandra, N. V., Sun, Y., Irie, T., Kitagawa, Y., Gotoh, B., Coscoy, L., and Winoto, A. (2017) Induction of necroptotic cell death by viral

- activation of the RIG-I or STING pathway, *Cell Death Differ.*, **24**, 615-625, doi: 10.1038/cdd.2016.153.
61. Emmerich, J., Mumm, J. B., Chan, I. H., LaFace, D., Truong, H., McClanahan, T., Gorman, D. M., and Oft, M. (2012) IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8⁺ T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs, *Cancer Res.*, **72**, 3570-3581, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0721.
 62. Tanaka, F., Tominaga, K., Shiota, M., Ochi, M., Kuwamura, H., Tanigawa, T., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Iwao, H., and Arakawa, T. (2008) Interleukin-10 gene transfer to peritoneal mesothelial cells suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer cells due to a persistently high concentration in the peritoneal cavity, *Cancer Gene Ther.*, **15**, 51-59, doi: 10.1038/sj.cgt.7701104.
 63. Chard, L. S., Maniati, E., Wang, P., Zhang, Z., Gao, D., Wang, J., Cao, F., Ahmed, J., El Khouri, M., Hughes, J., Wang, S., Li, X., Denes, B., Fodor, I., Hagemann, T., Lemoine, N. R., and Wang, Y. (2015) A vaccinia virus armed with interleukin-10 is a promising therapeutic agent for treatment of murine pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 405-416, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0464.
 64. Trinchieri, G., and Scott, P. (1994) The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy, *Immunol. Today*, **15**, 460-463, doi: 10.1016/0167-5699(94)90189-9.
 65. Scott, P. (1993) IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity, *Science*, **260**, 496-497, doi: 10.1126/science.8097337.
 66. Nastala, C. L., Edington, H. D., McKinney, T. G., Tahara, H., Nalesnik, M. A., Brunda, M. J., Gately, M. K., Wolf, S. F., Schreiber, R. D., and Storkus, W. J. (1994) Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production, *J. Immunol.*, **153**, 1697-1706.
 67. Mu, J., Zou, J. P., Yamamoto, N., Tsutsui, T., Tai, X. G., Kobayashi, M., Herrmann, S., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. (1995) Administration of recombinant interleukin 12 prevents outgrowth of tumor cells metastasizing spontaneously to lung and lymph nodes, *Cancer Res.*, **55**, 4404-4408.
 68. Meko, J. B., Tsung, K., and Norton, J. A. (1996) Cytokine production and antitumor effect of a nonreplicating, noncytopathic recombinant vaccinia virus expressing interleukin-12, *Surgery*, **120**, 274-282; discussion 282-273, doi: 10.1016/s0039-6060(96)80298-4.
 69. Waldmann, T. A. (2015) The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy, *Cancer Immunol. Res.*, **3**, 219-227, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0009.
 70. Conlon, K. C., Miljkovic, M. D., and Waldmann, T. A. (2019) Cytokines in the treatment of cancer, *J. Interferon Cytokine Res.*, **39**, 6-21, doi: 10.1089/jir.2018.0019.
 71. Rhode, P. R., Egan, J. O., Xu, W., Hong, H., Webb, G. M., Chen, X., Liu, B., Zhu, X., Wen, J., You, L., Kong, L., Edwards, A. C., Han, K., Shi, S., Alter, S., Sacha, J. B., Jeng, E. K., Cai, W., and Wong, H. C. (2016) Comparison of the superagonist complex, ALT-803, to IL15 as cancer immunotherapeutics in animal models, *Cancer Immunol. Res.*, **4**, 49-60, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0093-T.
 72. Van den Bergh, J. M., Lion, E., Van Tendeloo, V. F., and Smits, E. L. (2017) IL-15 receptor alpha as the magic wand to boost the success of IL-15 antitumor therapies: the upswing of IL-15 transpresentation, *Pharmacol. Ther.*, **170**, 73-79, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.10.012.
 73. Epardaud, M., Elpek, K. G., Rubinstein, M. P., Yonekura, A. R., Bellemare-Pelletier, A., Bronson, R., Hamerman, J. A., Goldrath, A. W., and Turley, S. J. (2008) Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8⁺ T cells, *Cancer Res.*, **68**, 2972-2983, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0045.
 74. Kowalsky, S. J., Liu, Z., Feist, M., Berkey, S. E., Ma, C., Ravindranathan, R., Dai, E., Roy, E. J., Guo, Z. S., and Bartlett, D. L. (2018) Superagonist IL-15-armed oncolytic virus elicits potent antitumor immunity and therapy that are enhanced with PD-1 blockade, *Mol. Ther.*, **26**, 2476-2486, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.07.013.
 75. Kinter, A. L., Godbout, E. J., McNally, J. P., Sereti, I., Roby, G. A., O'Shea, M. A., and Fauci, A. S. (2008) The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands, *J. Immunol.*, **181**, 6738-6746, doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6738.
 76. Moroz, A., Eppolito, C., Li, Q., Tao, J., Clegg, C. H., and Shrikant, P. A. (2004) IL-21 enhances and sustains CD8⁺ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21, *J. Immunol.*, **173**, 900-909, doi: 10.4049/jimmunol.173.2.900.
 77. Chen, T., Ding, X., Liao, Q., Gao, N., Chen, Y., Zhao, C., Zhang, X., and Xu, J. (2021) IL-21 arming potentiates the anti-tumor activity of an oncolytic vaccinia virus in monotherapy and combination therapy, *J. Immunother. Cancer*, **9**, e001647, doi: 10.1136/jitc-2020-001647.
 78. Sun, Y., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, N., Wang, P., Chu, Y., Chard Dunmall, L. S., Lemoine, N. R., and Wang, Y. (2022) An effective therapeutic regime for treatment of glioma using oncolytic vaccinia virus expressing IL-21 in combination with immune checkpoint inhibition, *Mol. Ther. Oncolytics*, **26**, 105-119, doi: 10.1016/j.omto.2022.05.008.

79. Gasson, J. C. (1991) Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood*, **77**, 1131-1145.
80. Bauer, T. V., Tregubchak, T. V., Maksyutov, A. Z., Kolosova, I. V., Maksyutov, R. A., and Gavrilova, E. V. (2020) Development of the drug oncolytic immunotherapy based on vaccinia viruses (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) against breast cancer [in Russian], *Vopr. Virusol.*, **65**, 49-56, doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-1-49-56.
81. Deng, L., Yang, X., Fan, J., Ding, Y., Peng, Y., Xu, D., Huang, B., and Hu, Z. (2020) An oncolytic vaccinia virus armed with GM-CSF and IL-24 double genes for cancer targeted therapy, *Onco Targets Ther.*, **13**, 3535-3544, doi: 10.2147/OTT.S249816.
82. Duggan, M. C., Jochems, C., Donahue, R. N., Richards, J., Karpa, V., Foust, E., Paul, B., Brooks, T., Tridandapani, S., Olencki, T., Pan, X., Lesinski, G. B., Schlom, J., and Carson III, W. E. (2016) A phase I study of recombinant (r) vaccinia-CEA(6D)-TRICOM and rFowlpox-CEA(6D)-TRICOM vaccines with GM-CSF and IFN- α -2b in patients with CEA-expressing carcinomas, *Cancer Immunol. Immunother.*, **65**, 1353-1364, doi: 10.1007/s00262-016-1893-7.
83. Heinrich, B., Klein, J., Delic, M., Goepfert, K., Engel, V., Geberzahn, L., Lusky, M., Erbs, P., Preville, X., and Moehler, M. (2017) Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma in vitro model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes, *Onco Targets Ther.*, **10**, 2389-2401, doi: 10.2147/OTT.S126320.
84. Inoue, T., Byrne, T., Inoue, M., Tait, M. E., Wall, P., Wang, A., Dermeyer, M. R., Laklai, H., Binder, J. J., Lees, C., Hollingsworth, R., Maruri-Avidal, L., Kirn, D. H., and McDonald, D. M. (2021) Oncolytic vaccinia virus gene modification and cytokine expression effects on tumor infection, immune response, and killing, *Mol. Cancer Ther.*, **20**, 1481-1494, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0863.
85. Kannanganat, S., Wyatt, L. S., Gangadhara, S., Chamcha, V., Chea, L. S., Kozlowski, P. A., LaBranche, C. C., Chennareddi, L., Lawson, B., Reddy, P. B., Styles, T. M., Vanderford, T. H., Montefiori, D. C., Moss, B., Robinson, H. L., and Amara, R. R. (2016) High doses of GM-CSF inhibit antibody responses in rectal secretions and diminish modified vaccinia Ankara/Simian immunodeficiency virus vaccine protection in TRIM5 α -restrictive macaques, *J. Immunol.*, **197**, 3586-3596, doi: 10.4049/jimmunol.1600629.
86. Witmer-Pack, M. D., Olivier, W., Valinsky, J., Schuler, G., and Steinman, R. M. (1987) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells, *J. Exp. Med.*, **166**, 1484-1498, doi: 10.1084/jem.166.5.1484.
87. McLaughlin, J. P., Abrams, S., Kantor, J., Dobrzanski, M. J., Greenbaum, J., Schlom, J., and Greiner, J. W. (1997) Immunization with a syngeneic tumor infected with recombinant vaccinia virus expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces tumor regression and long-lasting systemic immunity, *J. Immunother.*, **20**, 449-459, doi: 10.1097/00002371-199711000-00004.
88. Kochneva, G., Sivolobova, G., Tkacheva, A., Grazhdantseva, A., Troitskaya, O., Nushtaeva, A., Tkachenko, A., Kuligina, E., Richter, V., and Koval, O. (2016) Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy, *Oncotarget*, **7**, 74171-74188, doi: 10.18632/oncotarget.12367.
89. Koval, O., Kochneva, G., Tkachenko, A., Troitskaya, O., Sivolobova, G., Grazhdantseva, A., Nushtaeva, A., Kuligina, E., and Richter, V. (2017) Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells, *Biomed Res. Int.*, **2017**, 3620510, doi: 10.1155/2017/3620510.
90. Shakiba, Y., Naberezhnaya, E., Kochetkov, D., Yusubalieva, G., Vorobyev, P., Chumakov, P., Baklaushev, V., and Lipatova, A. (2023) Comparison of the oncolytic activity of recombinant vaccinia virus strains LIVP-RFP and MVA-RFP against solid tumors, *Bull. RSMU*, **2023**, doi: 10.24075/brsmu.2023.010.
91. Grazhdantseva, A. A., Sivolobova, G. F., Tkacheva, A. V., Gileva, I. P., Kuligina, E. V., Rikhter, V. A., and Kochneva, G. V. (2016) Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **52**, 685-691, doi: 10.1134/S0003683816070036.
92. Vasileva, N., Ageenko, A., Dmitrieva, M., Nushtaeva, A., Mishinov, S., Kochneva, G., Richter, V., and Kuligina, E. (2021) Double recombinant vaccinia virus: a candidate drug against human glioblastoma, *Life (Basel)*, **11**, 1084, doi: 10.3390/life11101084.
93. Von Krempelhuber, A., Vollmar, J., Pokorny, R., Rapp, P., Wulff, N., Petzold, B., Handley, A., Mateo, L., Siersbol, H., Kollaritsch, H., and Chaplin, P. (2010) A randomized, double-blind, dose-finding Phase II study to evaluate immunogenicity and safety of the third generation smallpox vaccine candidate IMVAMUNE, *Vaccine*, **28**, 1209-1216, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.030.
94. Verardi, P. H., Titong, A., and Hagen, C. J. (2012) A vaccinia virus renaissance: new vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication, *Hum. Vaccin Immunother.*, **8**, 961-970, doi: 10.4161/hv.21080.
95. Collins, M., Ling, V., and Carreno, B. M. (2005) The B7 family of immune-regulatory ligands, *Genome Biol.*, **6**, 223, doi: 10.1186/gb-2005-6-6-223.

96. Kaufman, H. L., Deraffele, G., Mitcham, J., Moroziewicz, D., Cohen, S. M., Hurst-Wicker, K. S., Cheung, K., Lee, D. S., Divito, J., Voulo, M., Donovan, J., Dolan, K., Manson, K., Panicali, D., Wang, E., Hörig, H., and Marincola, F. M. (2005) Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma, *J. Clin. Invest.*, **115**, 1903-1912, doi: 10.1172/JCI24624.
97. Hodge, J. W., McLaughlin, J. P., Abrams, S. I., Shupert, W. L., Schlom, J., and Kantor, J. A. (1995) Admixture of a recombinant vaccinia virus containing the gene for the costimulatory molecule B7 and a recombinant vaccinia virus containing a tumor-associated antigen gene results in enhanced specific T-cell responses and antitumor immunity, *Cancer Res.*, **55**, 3598-3603.
98. Hodge, J. W., Sabzevari, H., Yafal, A. G., Gritz, L., Lorenz, M. G., and Schlom, J. (1999) A triad of costimulatory molecules synergize to amplify T-cell activation, *Cancer Res.*, **59**, 5800-5807.
99. Kudo-Saito, C., Hodge, J. W., Kwak, H., Kim-Schulze, S., Schlom, J., and Kaufman, H. L. (2006) 4-1BB ligand enhances tumor-specific immunity of poxvirus vaccines, *Vaccine*, **24**, 4975-4986, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.03.042.
100. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5, *Nature*, **410**, 1099-1103, doi: 10.1038/35074106.
101. Kofoed, E. M., and Vance, R. E. (2011) Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity, *Nature*, **477**, 592-595, doi: 10.1038/nature10394.
102. Weimer, E. T., Lu, H., Kock, N. D., Wozniak, D. J., and Mizel, S. B. (2009) A fusion protein vaccine containing OprF epitope 8, OprI, and type A and B flagellins promotes enhanced clearance of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.*, **77**, 2356-2366, doi: 10.1128/IAI.00054-09.
103. De Melo, F. M., Braga, C. J., Pereira, F. V., Maricato, J. T., Origassa, C. S., Souza, M. F., Melo, A. C., Silva, P., Tomaz, S. L., Gimenes, K. P., Scutti, J. A., Juliano, M. A., Zamboni, D. S., Câmara, N. O., Travassos, L. R., Ferreira, L. C., and Rodrigues, E. G. (2015) Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10, *Immunol. Cell Biol.*, **93**, 86-98, doi: 10.1038/icb.2014.74.
104. Mizel, S. B., and Bates, J. T. (2010) Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential, *J. Immunol.*, **185**, 5677-5682, doi: 10.4049/jimmunol.1002156.
105. Sanos, S. L., Kassub, R., Testori, M., Geiger, M., Pätzold, J., Giessel, R., Knallinger, J., Bathke, B., Gräbnitz, F., Brinkmann, K., Chaplin, P., Suter, M., Hochrein, H., and Lauterbach, H. (2017) NLRC4 inflammasome-driven immunogenicity of a recombinant MVA mucosal vaccine encoding flagellin, *Front. Immunol.*, **8**, 1988, doi: 10.3389/fimmu.2017.01988.
106. Chen, W., Zheng, R., Zhang, S., Zhao, P., Li, G., Wu, L., and He, J. (2013) The incidences and mortalities of major cancers in China, 2009, *Chin. J. Cancer*, **32**, 106-112, doi: 10.5732/cjc.013.10018.
107. Strong, V. E., Wu, A. W., Selby, L. V., Gonen, M., Hsu, M., Song, K. Y., Park, C. H., Coit, D. G., Ji, J. F., and Brennan, M. F. (2015) Differences in gastric cancer survival between the U.S. and China, *J. Surg. Oncol.*, **112**, 31-37, doi: 10.1002/jso.23940.
108. Conrad, S. J., El-Aswad, M., Kurban, E., Jeng, D., Tripp, B. C., Nutting, C., Eversole, R., Mackenzie, C., and Essani, K. (2015) Oncolytic tanapoxvirus expressing FLiC causes regression of human colorectal cancer xenografts in nude mice, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **34**, 19, doi: 10.1186/s13046-015-0131-z.
109. Wang, M., Luo, Y., Sun, T., Mao, C., Jiang, Y., Yu, X., Li, Z., Xie, T., Wu, F., Yan, H., and Teng, L. (2020) The ectopic expression of survivinT34A and FLiC can enhance the oncolytic effects of vaccinia virus in murine gastric cancer, *Oncotargets Ther.*, **13**, 1011-1025, doi: 10.2147/OTT.S230902.
110. Andersen, M. H., Svane, I. M., Becker, J. C., and Straten, P. T. (2007) The universal character of the tumor-associated antigen survivin, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 5991-5994, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0686.
111. Shakiba, Y., Vorobyev, P. O., Naumenko, V. A., Kochetkov, D. V., Zajtseva, K. V., Valikhov, M. P., Yusubalieva, G. M., Gumennaya, Y. D., Emelyanov, E. A., Semkina, A. S., Baklaushev, V. P., Chumakov, P. M., and Lipatova, A. V. (2023) Oncolytic efficacy of a recombinant vaccinia virus strain expressing bacterial flagellin in solid tumor models, *Viruses*, **15**, 828.
112. Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., and Ahmed, R. (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection, *Nature*, **439**, 682-687, doi: 10.1038/nature04444.
113. Shi, Z., Liu, B., Huang, C., Xie, W., Cen, Y., Chen, L., and Liang, M. (2021) An oncolytic vaccinia virus armed with anti-human-PD-1 antibody and anti-human-4-1BB antibody double genes for cancer-targeted therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **559**, 176-182, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.078.
114. Marchand, J.-B., Semmrich, M., Fend, L., Rehn, M., Silvestre, N., Teige, I., Foloppe, F., Mårtensson, L., Quéméneur, E., and Frendeus, B. (2020) BT-001, an oncolytic vaccinia virus armed with a Treg-depletion-optimized recombinant human anti-CTLA4 antibody and GM-CSF to target the tumor microenvironment, *Cancer Res.*, **8**, doi: 10.1136/jitc-2020-SITC2020.0594.
115. Dushek, O., Goyette, J., and van der Merwe, P. A. (2012) Non-catalytic tyrosine-phosphorylated receptors, *Immunol Rev.*, **250**, 258-276, doi: 10.1111/imr.12008.

116. Zuo, S., Wei, M., He, B., Chen, A., Wang, S., Kong, L., Zhang, Y., Meng, G., Xu, T., Wu, J., Yang, F., Zhang, H., Wang, S., Guo, C., Wu, J., Dong, J., and Wei, J. (2021) Enhanced antitumor efficacy of a novel oncolytic vaccinia virus encoding a fully monoclonal antibody against T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT), *EBioMedicine*, **64**, 103240, doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103240.
117. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2017) Immunogenic cell death in cancer and infectious disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 97-111, doi: 10.1038/nri.2016.107.
118. Van Hoecke, L., Van Lint, S., Roose, K., Van Parys, A., Vandenaabee, P., Grooten, J., Tavernier, J., De Koker, S., and Saelens, X. (2018) Treatment with mRNA coding for the necroptosis mediator MLKL induces antitumor immunity directed against neoepitopes, *Nat. Commun.*, **9**, 3417, doi: 10.1038/s41467-018-05979-8.
119. Van Hoecke, L., Riederer, S., Saelens, X., Sutter, G., and Rojas, J. J. (2020) Recombinant viruses delivering the necroptosis mediator MLKL induce a potent antitumor immunity in mice, *Oncimmunology*, **9**, 1802968, doi: 10.1080/2162402X.2020.1802968.
120. Kochneva, G. V., Babkina, I. N., Lupan, T. A., Grazhdantseva, A. A., Iudin, P. V., Sivolobova, G. F., Shvalov, A. N., Popov, E. G., Babkin, I. V., Netesov, S. V., and Chumakov, P. M. (2013) Apoptin enhances the oncolytic activity of vaccinia virus [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk)*, **47**, 842-852.
121. Kochneva, G., Zonov, E., Grazhdantseva, A., Yunusova, A., Sibolobova, G., Popov, E., Taranov, O., Netesov, S., Chumakov, P., and Ryabchikova, E. (2014) Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression, *Oncotarget*, **5**, 11269-11282, doi: 10.18632/oncotarget.2579.
122. Di Pilato, M., Mejías-Pérez, E., Sorzano, C. O. S., and Esteban, M. (2017) Distinct roles of vaccinia virus NF- κ B inhibitor proteins A52, B15, and K7 in the immune response, *J. Virol.*, **91**, doi: 10.1128/JVI.00575-17.
123. Holgado, M. P., Falivene, J., Maeto, C., Amigo, M., Pascutti, M. F., Vecchione, M. B., Bruttomesso, A., Calamante, G., Del Médico-Zajac, M. P., and Gherardi, M. M. (2016) Deletion of A44L, A46R and C12L vaccinia virus genes from the MVA genome improved the vector immunogenicity by modifying the innate immune response generating enhanced and optimized specific T-cell responses, *Viruses*, **8**, 139, doi: 10.3390/v8050139.
124. Tsang, K. Y., Palena, C., Yokokawa, J., Arlen, P. M., Gulley, J. L., Mazzara, G. P., Gritz, L., Yafal, A. G., Ogueta, S., Greenhalgh, P., Manson, K., Panicali, D., and Schlom, J. (2005) Analyses of recombinant vaccinia and fowlpox vaccine vectors expressing transgenes for two human tumor antigens and three human costimulatory molecules, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 1597-1607, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1609.
125. Ylösmäki, E., Malorzo, C., Capasso, C., Honkasalo, O., Fucciello, M., Martins, B., Ylösmäki, L., Louna, A., Feola, S., Paavilainen, H., Peltonen, K., Hukkanen, V., Viitala, T., and Cerullo, V. (2018) Personalized cancer vaccine platform for clinically relevant oncolytic enveloped viruses, *Mol. Ther.*, **26**, 2315-2325, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.06.008.
126. Chalikhonda, S., Kivlen, M. H., O'Malley, M. E., Eric Dong, X. D., McCart, J. A., Gorry, M. C., Yin, X. Y., Brown, C. K., Zeh, H. J., Guo, Z. S., and Bartlett, D. L. (2008) Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene, *Cancer Gene Ther.*, **15**, 115-125, doi: 10.1038/sj.cgt.7701110.
127. Seubert, C. M., Stritzker, J., Hess, M., Donat, U., Sturm, J. B., Chen, N., von Hof, J. M., Krewer, B., Tietze, L. F., Gentschev, I., and Szalay, A. A. (2011) Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a β -galactosidase-activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA, *Cancer Gene Ther.*, **18**, 42-52, doi: 10.1038/cgt.2010.49.
128. Marchini, A., Scott, E. M., and Rommelaere, J. (2016) Overcoming barriers in oncolytic virotherapy with HDAC inhibitors and immune checkpoint blockade, *Viruses*, **8**, 9, doi: 10.3390/v8010009.
129. MacTavish, H., Diallo, J. S., Huang, B., Stanford, M., Le Boeuf, F., De Silva, N., Cox, J., Simmons, J. G., Guimond, T., Falls, T., McCart, J. A., Atkins, H., Breitbach, C., Kirn, D., Thorne, S., and Bell, J. C. (2010) Enhancement of vaccinia virus based oncolysis with histone deacetylase inhibitors, *PLoS One*, **5**, e14462, doi: 10.1371/journal.pone.0014462.
130. Francis, L., Guo, Z. S., Liu, Z., Ravindranathan, R., Urban, J. A., Sathiah, M., Magge, D., Kalinski, P., and Bartlett, D. L. (2016) Modulation of chemokines in the tumor microenvironment enhances oncolytic virotherapy for colorectal cancer, *Oncotarget*, **7**, 22174-22185, doi: 10.18632/oncotarget.7907.
131. Kim, M., Nitschké, M., Sennino, B., Murer, P., Schriver, B. J., Bell, A., Subramanian, A., McDonald, C. E., Wang, J., Cha, H., Bourgeois-Daigneault, M. C., Kirn, D. H., Bell, J. C., De Silva, N., Breitbach, C. J., and McDonald, D. M. (2018) Amplification of oncolytic vaccinia virus widespread tumor cell killing by sunitinib through multiple mechanisms, *Cancer Res.*, **78**, 922-937, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3308.
132. Zhang, B., and Cheng, P. (2020) Improving antitumor efficacy via combinatorial regimens of oncolytic virotherapy, *Mol. Cancer*, **19**, 158, doi: 10.1186/s12943-020-01275-6.
133. Mell, L. K., Brumund, K. T., Daniels, G. A., Advani, S. J., Zakeri, K., Wright, M. E., Onyeama, S. J., Weisman, R. A., Sanghvi, P. R., Martin, P. J., and Szalay, A. A. (2017) Phase I trial of intravenous oncolytic vaccinia virus (GL-ONC1) with cisplatin

- and radiotherapy in patients with locoregionally advanced head and neck carcinoma, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 5696-5702, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3232.
134. Ramlau, R., Quoix, E., Rolski, J., Pless, M., Lena, H., Levy, E., Krzakowski, M., Hess, D., Tartour, E., Chenard, M. P., Limacher, J. M., Bizouarne, N., Acres, B., Halluard, C., and Velu, T. (2008) A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-II2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV Non-small cell lung cancer, *J. Thorac. Oncol.*, **3**, 735-744, doi: 10.1097/JTO.0b013e31817c6b4f.
 135. Song, C. K., Han, H. D., Noh, K. H., Kang, T. H., Park, Y. S., Kim, J. H., Park, E. S., Shin, B. C., and Kim, T. W. (2007) Chemotherapy enhances CD8⁺ T cell-mediated antitumor immunity induced by vaccination with vaccinia virus, *Mol. Ther.*, **15**, 1558-1563, doi: 10.1038/sj.mt.6300221.
 136. Chen, W. Y., Chen, Y. L., Lin, H. W., Chang, C. F., Huang, B. S., Sun, W. Z., and Cheng, W. F. (2021) Stereotactic body radiation combined with oncolytic vaccinia virus induces potent anti-tumor effect by triggering tumor cell necroptosis and DAMPs, *Cancer Lett.*, **523**, 149-161, doi: 10.1016/j.canlet.2021.09.040.
 137. Klebanoff, C. A., Khong, H. T., Antony, P. A., Palmer, D. C., and Restifo, N. P. (2005) Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy, *Trends Immunol.*, **26**, 111-117, doi: 10.1016/j.it.2004.12.003.
 138. Kim, H. S., Kim-Schulze, S., Kim, D. W., and Kaufman, H. L. (2009) Host lymphodepletion enhances the therapeutic activity of an oncolytic vaccinia virus expressing 4-1BB ligand, *Cancer Res.*, **69**, 8516-8525, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2522.
 139. Prieto, P. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hughes, M. S., Kammula, U. S., White, D. E., Levy, C. L., Rosenberg, S. A., and Phan, G. Q. (2012) CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma, *Clin. Cancer Res.*, **18**, 2039-2047, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1823.
 140. Vaddepally, R. K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R., and Chandra, A. B. (2020) Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence, *Cancers (Basel)*, **12**, 738, doi: 10.3390/cancers12030738.
 141. Schaedler, E., Remy-Ziller, C., Hortelano, J., Kehrer, N., Claudepierre, M. C., Gatard, T., Jakobs, C., Préville, X., Carpentier, A. F., and Rittner, K. (2017) Sequential administration of a MVA-based MUC1 cancer vaccine and the TLR9 ligand Litenimod (Li28) improves local immune defense against tumors, *Vaccine*, **35**, 577-585, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.12.020.
 142. Remy-Ziller, C., Thiouellet, C., Hortelano, J., Gantzer, M., Nourtier, V., Claudepierre, M. C., Sansas, B., Préville, X., Bendjama, K., Quemeneur, E., and Rittner, K. (2018) Sequential administration of MVA-based vaccines and PD-1/PD-L1-blocking antibodies confers measurable benefits on tumor growth and survival: preclinical studies with MVA-βGal and MVA-MUC1 (TG4010) in a murine tumor model, *Hum. Vaccin Immunother.*, **14**, 140-145, doi: 10.1080/21645515.2017.1373921.
 143. Foy, S. P., Mandl, S. J., dela Cruz, T., Cote, J. J., Gordon, E. J., Trent, E., Delcayre, A., Breitmeyer, J., Franzusoff, A., and Rountree, R. B. (2016) Poxvirus-based active immunotherapy synergizes with CTLA-4 blockade to increase survival in a murine tumor model by improving the magnitude and quality of cytotoxic T cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, **65**, 537-549, doi: 10.1007/s00262-016-1816-7.
 144. Mandl, S. J., Rountree, R. B., Dalpozzo, K., Do, L., Lombardo, J. R., Schoonmaker, P. L., Dirmeier, U., Steigerwald, R., Giffon, T., Laus, R., and Delcayre, A. (2012) Immunotherapy with MVA-BN®-HER2 induces HER-2-specific Th1 immunity and alters the intratumoral balance of effector and regulatory T cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, **61**, 19-29, doi: 10.1007/s00262-011-1077-4.

RECOMBINANT STRAINS OF ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

Review

**Y. Shakiba^{1,2}, P. O. Vorobyev², M. Mahmoud², A. Hamad², D. V. Kochetkov²,
G. M. Yusubalieva^{2,3,4}, V. P. Baklaushev^{2,3,4}, P. M. Chumakov², and A. V. Lipatova^{2*}**

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: lipatovaany@gmail.com*

³ *Federal Research Clinical Center for Specialized Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical-Biological Agency (FMBA), 115682 Moscow, Russia*

⁴ *Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the FMBA of Russia, 117513 Moscow, Russia*

Cancer virotherapy is an alternative therapeutic approach based on the viruses that selectively infect and kill tumor cells. Vaccinia virus (VV) is a member of the *Poxviridae* family of enveloped viruses with a large linear double-stranded DNA genome. The proven safety of VV strains as well as considerable transgene capacity of the viral genome, make VV an excellent platform for creating recombinant oncolytic viruses for cancer therapy. Furthermore, various genetic modifications can increase tumor selectivity and therapeutic efficacy of VV by arming it with the immune-modulatory genes or proapoptotic molecules, boosting the host immune system, and increasing cross-priming recognition of the tumor cells by T-cells or NK cells. In this review, we summarized the data on bioengineering approaches to develop recombinant VV strains for enhanced cancer immunotherapy.

Keywords: oncolytic virus, recombinant virus, immunosuppression, immunomodulation, cytokine, vaccinia virus