



# Сравнительное изучение репликативных свойств противоопухолевых рекомбинантных вирусов осповакцины на культурах клеток глиобластомы человека U87 и почки мартышки CV-1

Р.А. Максютов<sup>1</sup>, И.В. Колосова<sup>1</sup>, Т.В. Трегубчак<sup>1</sup>, И.А. Разумов<sup>2</sup>, С.Н. Щелкунов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

В современном мире одно из активно развивающихся направлений в лечении онкологических заболеваний – виротерапия, особенностью которой является избирательное уничтожение раковых клеток при минимальном воздействии на здоровые клетки организма. Перспективной основой для создания онколитических препаратов могут стать ортопоксвирусы, имеющие ряд преимуществ перед другими вирусными векторами, одно из которых – большая емкость генома, что позволяет встраивать в их геном гены, кодирующие белки с различными противоопухолевыми свойствами. В данной работе проведено сравнительное изучение репликативных свойств десяти различных вариантов штамма ЛИВП вируса осповакцины (ВОВ), в которых встроены дополнительные гены гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора, апоптоз-индуцирующего белка TRAIL и гена зеленого флуоресцирующего белка, на перевиваемой культуре клеток глиобластомы человека U87 и почки африканской зеленой мартышки CV-1. Кроме того, изучен вирус с пятью удаленными генами вирулентности (гемагглютинаина,  $\gamma$ -интерферон-связывающего белка, тимидинкиназы, комплемент-связывающего белка и Bcl-2-подобного ингибитора апоптоза), характеризующийся значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным штаммом ЛИВП ВОВ. Полученные данные свидетельствуют о том, что в культуре клеток глиобластомы активнее всего реплицируются различные варианты ВОВ с нарушенным геном тимидинкиназы.

Ключевые слова: культура клеток глиобластомы; виротерапия; онколитический вирус.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Максютов Р.А., Колосова И.В., Трегубчак Т.В., Разумов И.А., Щелкунов С.Н. Сравнительное изучение репликативных свойств противоопухолевых рекомбинантных вирусов осповакцины на культурах клеток глиобластомы человека U87 и почки мартышки CV-1. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):949-953. DOI 10.18699/VJ16.207

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Maksyutov R.A., Kolosova I.V., Tregubchak T.V., Razumov I.A., Shchelkunov S.N. A comparative study of replicative properties of antitumor recombinant vaccinia viruses on human glioblastoma cell culture U87 and monkey kidney cell culture CV-1. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):949-953. DOI 10.18699/VJ16.207

ORIGINAL ARTICLE

Received 26.04.2016

Accepted for publication 14.06.2016

© AUTHORS, 2016

## A comparative study of replicative properties of antitumor recombinant vaccinia viruses on human glioblastoma cell culture U87 and monkey kidney cell culture CV-1

R.A. Maksyutov<sup>1</sup>, I.V. Kolosova<sup>1</sup>, T.V. Tregubchak<sup>1</sup>, I.A. Razumov<sup>2</sup>, S.N. Shchelkunov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

In the world of today, virotherapy is one of the rapidly developing areas in the treatment of cancer, and its advantage is selective destruction of cancer cells with minimizing the destructive effect on normal cells of the body. A promising basis for the creation of oncolytic drugs is orthopoxviruses, which have a number of advantages over other viral vectors, and one of these advantages is a large capacity of the genome, which allows genes encoding proteins with antitumor properties to be cloned into their genome. In this study, we compared the replicative properties of ten variants of vaccinia virus (the strain LIVP of VACV) using human glioblastoma cell culture; some of these viruses have additional genes, such as the gene encoding granulocyte-macrophage colony stimulating factor, gene encoding apoptosis-inducing protein TRAIL and gene encoding green fluorescent protein. Furthermore, the virus with five virulence genes deleted (genes encoding hemagglutinin,  $\gamma$ -interferon-binding protein, thymidine kinase, complement-binding protein and Bcl2-like inhibitor of apoptosis), which has significantly lower reactogenicity and neurovirulence compared to the original strain LIVP of VACV, was studied. These data suggest that variants of vaccinia virus with a defective gene encoding thymidine kinase most actively replicate in glioblastoma cell culture.

Key words: glioblastoma cell culture; virotherapy; oncolytic virus.

Глиомы образуют гетерогенную группу опухолей центральной нервной системы (Louis et al., 2007; Perry, Wesseling, 2016). Одна из наиболее агрессивных форм глиом – глиобластома. За последние 30 лет появление новых методов лечения и терапевтических препаратов позволило увеличивать прогнозируемую продолжительность жизни людей с данным диагнозом всего лишь на несколько месяцев (Hulou et al., 2016), в связи с чем проблема разработки новых препаратов, модификации уже имеющихся веществ, усовершенствования схем лечения остается актуальной.

Основным методом лечения онкологических заболеваний является хирургический, который также применяется для резекции опухолей головного мозга. Однако в случае центральной нервной системы оперативное вмешательство сопряжено с высокой степенью риска возникновения послеоперационных осложнений. Такие осложнения могут нести как региональный характер (травмы функционально значимых зон мозга, послеоперационный отек ткани мозга и геморрагические осложнения), так и системный (острые язвы желудочно-кишечного тракта, тромбозы, тромбоэмболии) (Jackson et al., 2016). Только у 26.5 % пациентов, перенесших резекцию глиомы совместно с другими методами лечения, прогнозируемая продолжительность жизни составляет два года (Stupp et al., 2005).

К другим методам лечения, прежде всего, относится лучевая терапия, которая характеризуется своими преимуществами и недостатками. Зачастую в клинической практике глиомы оказываются наименее чувствительными к излучению даже при высоких дозировках, при этом наблюдается значительный токсический эффект на нетрансформированные клетки (Snider, Mehta, 2016). Наиболее результативно комбинирование радиотерапии с химиотерапией. Однако большинство химиотерапевтических препаратов невозможно применять при лечении опухолей головного мозга, что вызвано, в первую очередь, непроницаемостью гематоэнцефалического барьера для многих химических веществ. Существуют различные стратегии по разработке препаратов, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер, – это и химическая модификация существующих препаратов, и создание наночастиц, которые способны доставлять вещества к клеткам головного мозга (Karim et al., 2016). Таким образом, только комплексное лечение, включающее хирургическое вмешательство, химио- и лучевую терапию, позволяет увеличить продолжительность и улучшить качество жизни больных.

В последние годы появилось еще одно активно развивающееся направление в терапии онкологических заболеваний – биотерапия, которая может быть успешно применена в комплексе с уже существующими методами лечения. Принцип такой терапии заключается, прежде всего, в активации защитных систем организма при помощи противоопухолевых вакцин, моноклональных антител, клеточных факторов и т. д. Такой подход в лечении позволяет вовлечь в противоопухолевую защиту иммунную систему, а также воздействовать на факторы и механизмы, контролируемые процессы ангиогенеза и апоптоза (Ding, Wei, 2012).

К одному из перспективных направлений биотерапии злокачественных опухолей относится виротерапия, которая позволяет избирательно уничтожать раковые клетки при минимальном воздействии на здоровые клетки организма. Также вирусы можно использовать в качестве способа доставки в клетки факторов, необходимых для поддержания естественных антиканцерогенных свойств организма (Bienkowska-Szewczyk, Szewczyk, 1999; Weibel et al., 2011).

Данная работа посвящена оценке потенциальной возможности использования созданного ранее набора онколитических вирусов с иммуностимулирующими свойствами на основе вируса осповакцины (ВОВ) (Максютов и др., 2013; Петров и др., 2013; Якубицкий и др., 2015) для терапии глиом, а именно изучению репликативных свойств различных вариантов ВОВ на перевиваемой культуре клеток глиобластомы человека U87, для которой показана успешная ортотопическая ксенотрансплантация мышам линии SCID (Завьялов и др., 2015).

## Материалы и методы

**Культуры клеток.** В работе использовали перевиваемую культуру клеток почки африканской зеленой марьши CV-1 из коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор» и перевиваемую культуру клеток глиобластомы человека U87 из криобанка ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН.

**Культивирование и ростовая среда.** Монослойное культивирование линий клеток проводили при температуре 37 °С в присутствии 5 % CO<sub>2</sub> с использованием сред ДМЕМ (для культуры клеток CV-1) и ДМЕМ/F12 (для культуры клеток U87) производства «Биолот» (Россия), содержащих 10 % эмбриональной сыворотки коров («HyClone», США).

**Вирусы.** Изучали полученный из двух независимых клоновых вариантов ВОВ ЛИВП (клоны 5 и 14) набор из семи вирусов с направленно введенными инактивирующими делециями по генам *J2R* (кодирует тимидинкиназу) и *C11R* (вирусный фактор роста) и встройками генов, кодирующих фенотипический маркер (GFP), иммуностимулирующую (GMCSF) и противораковую (TRAIL) терапевтические молекулы. Также был использован аттенуированный вариант ВОВ 1421ABJCN с пятью направленно введенными делециями по генам *A56R* (кодирует гемагглютинин), *B8R* (гамма-интерферон-связывающий белок), *C3L* (комплемент-связывающий белок), *J2R* (тимидинкиназу) и *N1L* (Bcl2-подобный ингибитор апоптоза) (табл. 1).

**Определение динамики роста вариантов ВОВ *in vitro*.** Для изучения динамики роста вариантов ВОВ ЛИВП в системах *in vitro* 90 % монослой клеток линий CV-1 или U87, полученный на 12-луночных планшетах, инфицировали со множественностью заражения 0.1 БОЕ/клетку каждым из исследуемых вирусов в трех повторах с инкубацией 0, 24, 48 или 72 ч при 37 °С в условиях 5 % CO<sub>2</sub>. После трехкратного замораживания–оттаивания содержащие вирус препараты титровали методом бляшек в монослой клеток CV-1.

## Результаты

При разработке потенциального онколитического препарата на основе вируса важными аспектами являются

**Table 1.** VACV variants tested

Nº	Recombinant VACV	Disturbed VACV gene	Inserted gene	References
1	VACV cl. 5	–	–	Maksyutov et al., 2013
2	VACVΔJ2R	<i>J2R</i>	–	
3	VACVΔJ2R/GMCSF(+)	<i>J2R</i>	<i>GMCSF</i>	
4	VACVΔJ2RΔC11R	<i>J2R, C11R</i>	–	
5	VACVΔJ2RΔC11R/GMCSF(+)	<i>J2R, C11R</i>	<i>GMCSF</i>	
6	VACVΔJ2RΔC11R/GMCSF(+)/GFP(+)	<i>J2R, C11R</i>	<i>GMCSF, GFP</i>	
7	VACVΔJ2RΔC11R/GMCSF(+)/TRAIL(+)	<i>J2R, C11R</i>	<i>GMCSF, TRAIL</i>	
8	VACV cl. 14	–	–	Yakubitskiy et al., 2015
9	1421ABJCN	<i>A56R, B8R, J2R, C3L, N1L</i>	–	
10	LIVP-GFP	<i>J2R</i>	<i>GFP</i>	Petrov et al., 2013

Viruses 2–7 are derived from VACV clonal variant 5 (No. 1); Viruses 9, 10 are derived from VACV clonal variant 14 (No. 8).

**Table 2.** Growth dynamics of the studied VACV variants on the cell culture CV-1

Virus	Virus titer*, log <sub>10</sub> PFU/ml in a certain time after infection (h)			
	0	24	48	72
VACV cl. 5	3.81 ± 0.02	5.64 ± 0.01	7.13 ± 0.00	6.86 ± 0.02
VACVΔJ2R	3.95 ± 0.02	5.44 ± 0.07	7.05 ± 0.01	6.82 ± 0.01
VACVΔJ2R/GMCSF(+)	3.96 ± 0.02	4.63 ± 0.01	7.04 ± 0.00	6.58 ± 0.03
VACVΔJ2RΔC11R	3.89 ± 0.02	4.99 ± 0.01	6.77 ± 0.00	6.54 ± 0.04
VACVΔJ2RΔC11R/GMCSF(+)	4.00 ± 0.03	4.59 ± 0.06	6.65 ± 0.01	6.18 ± 0.08
VACVΔJ2RΔC11R/GMCSF(+)/GFP(+)	3.77 ± 0.01	4.58 ± 0.02	6.63 ± 0.03	6.40 ± 0.05
VACVΔJ2RΔC11R/GMCSF(+)/TRAIL(+)	3.80 ± 0.07	4.51 ± 0.03	6.75 ± 0.01	6.16 ± 0.04
VACV cl. 14	3.67 ± 0.03	5.56 ± 0.05	7.14 ± 0.02	6.78 ± 0.03
1421ABJCN	3.51 ± 0.03	5.19 ± 0.02	6.96 ± 0.02	6.66 ± 0.02
LIVP-GFP	3.71 ± 0.03	5.82 ± 0.02	6.98 ± 0.02	6.55 ± 0.02

\* Virus titers are presented as the mean value ( $\mu$ ) ± standard deviation ( $\sigma$ ).

селективность такого вируса в отношении онкогенно трансформированных клеток и эффективность размножения вируса в таких клетках. Поэтому нами было проведено сравнительное изучение репликативных свойств 10 вариантов ВОВ (см. табл. 1) на перевиваемых культурах клеток высокочувствительной для ВОВ линии CV-1 и широко используемой в исследованиях глиобластомы человека U87 с целью определения комбинации модификаций в геноме ВОВ, обеспечивающей наибольшую селективность размножения ВОВ в клетках глиом.

Проведенные эксперименты не выявили значимых различий в ростовых характеристиках исследуемых рекомбинантных вариантов ВОВ в сравнении с исходными клоновыми вариантами ВОВ в культуре клеток CV-1 (табл. 2).

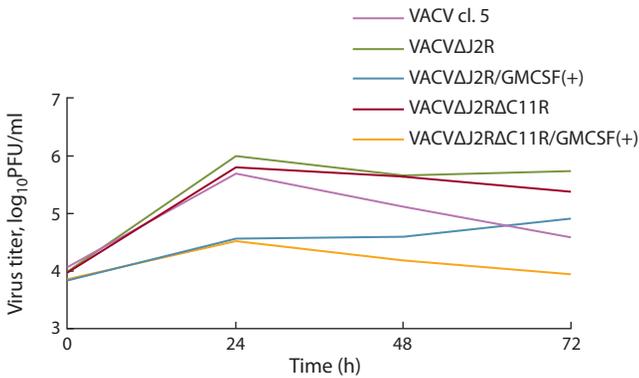
В группе вирусов с происхождением из клона 5 ВОВ на культуре клеток U87 наблюдалась более высокая эффективность роста в сравнении с исходным вирусом для вариантов ВОВ с нарушением одного гена, *J2R*, или двух генов, *J2R* и *C11R*, без встройки чужеродных генов. При этом встройка гена *GMCSF*, независимо от комбинации с

другими нарушаемыми и встраиваемыми генами, значительно (до полутора порядков) снижала репродуктивную способность рекомбинантных вирусов на данной глиомной культуре клеток U87 (рис. 1).

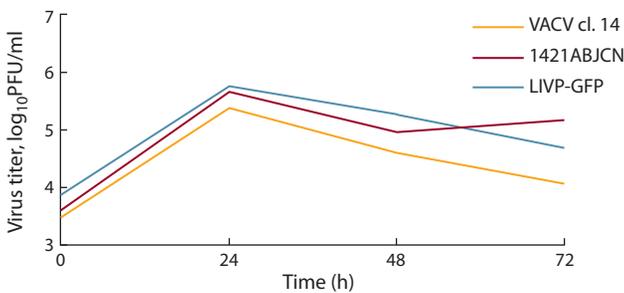
В группе вирусов с происхождением из клона 14 ВОВ на культуре клеток U87 также наблюдалась большая эффективность роста в сравнении с исходным вирусом для обоих вариантов ВОВ с нарушением гена *J2R* (и одновременной встройкой гена *GFP*) и с нарушением, помимо гена *J2R*, дополнительно четырех вирусных генов: *A56R*, *B8R*, *C3L* и *N1L* (рис. 2).

## Обсуждение

Вирусы являются естественными природными иммуномодуляторами, активно взаимодействующими как с иммунными, так и с другими, в частности опухолевыми, клетками и обладающими повышенным тропизмом к последним (Уразова, Кузнецова, 2013). Именно это природное свойство вирусов – тропность к опухолевым клеткам – позволяет рассматривать их в качестве терапевтических средств лечения онкологических заболеваний.



**Fig. 1.** Growth dynamics of VACV cl. 5 and its recombinants on the cell culture U87.



**Fig. 2.** Growth dynamics of VACV cl. 14 and its recombinants L1VP-GFP and 1421ABJCN on the cell culture U87.

В настоящее время известно немало препаратов на основе вирусов, которые успешно проходят клинические испытания. Для их создания используются вирусы, принадлежащие к широкому спектру вирусных семейств как ДНК-, так и РНК-содержащих. Одним из наиболее известных лекарственных препаратов вирусной природы является Rigvir, созданный на основе вируса семейства Picornaviridae. С 2004 г. Rigvir зарегистрирован в Латвии для лечения меланомы, локальной терапии кожных и подкожных метастазов меланомы, профилактики рецидивов и метастазов после операции (Donina et al., 2015). В 2015 г. для лечения меланомы в США был зарегистрирован герпесвирусный препарат Imlygic, его применяют в случае неоперабельных опухолей (Pol et al., 2015). Практически одновременно с Rigvir компания Shanghai Sunway Biotech зарегистрировала в Китае аденовирусный препарат Oncogine, который в сочетании с химиотерапией используется для лечения рака носоглотки (Liang, 2012).

В случае вирусной терапии опухолей головного мозга наиболее изучаемыми являются вирусы простого герпеса и аденовирусы. Так, вирус простого герпеса при попадании в клетку обуславливает синтез вирусной тимидинкиназы, что при совместной терапии с ганцикловиром приводит к нарушению клеточного цикла и, как следствие, – к клеточной гибели. Данный подход был описан еще в 1986 г. (Moolten, 1986) и остается актуальным. В недавних клинических испытаниях на пациентах с диагностированной глиобластомой изучали действие аденовирусного вектора,

несущего ген тимидинкиназы вируса простого герпеса. На третьей фазе клинических испытаний, проводимых в Европе (ASPECT), данный препарат не зарекомендовал себя как увеличивающий общую выживаемость по сравнению с препаратами, используемыми при стандартных методах лечения (Westphal et al., 2013). Однако аналогичный вирус (аденовирус, содержащий ген тимидинкиназы вируса простого герпеса) при совместной химиолучевой терапии показал обнадеживающие результаты на первой и второй стадиях испытаний (Chiocca et al., 2011). Большая часть потенциальных онколитических терапевтических средств в настоящее время находится на первой стадии клинических испытаний.

Нами предлагается использовать ВОВ как основу для создания онколитического терапевтического средства. Данный вирус имеет ряд преимуществ перед другими вирусами. Во-первых, репликация вируса происходит в цитоплазме клетки, что исключает мутагенез за счет интеграции вирусной ДНК в геном клетки; во-вторых, большая емкость двуцепочечного вирусного ДНК-генома позволяет осуществлять встройку в его состав многочисленных генов, кодирующих иммуностимулирующие и противораковые терапевтические молекулы, и адресно доставлять их в опухолевые клетки; в-третьих, долгая история клинического применения ВОВ в борьбе с натуральной оспой гарантирует эффективность его применения для человека.

В используемых нами вариантах ВОВ имеются различные комбинации модификаций вирусного генома. Варианты вируса с нарушенными генами тимидинкиназы и вирусного фактора роста позволяют снизить способность вируса к репликации в здоровых клетках организма (Максютов и др., 2013; Петров и др., 2013). Встройку в вирусный геном генов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и апоптоз-индуцирующего белка TRAIL позволяет представлять раковые антигены иммунной системе организма и запускать апоптоз. Полученный ранее вариант ВОВ с пятью удаленными генами вирулентности (генами гемагглютинина,  $\gamma$ -интерферон-связывающего белка, тимидинкиназы, комплемент-связывающего белка и Vcl-2-подобного ингибитора апоптоза) характеризуется значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным штаммом ЛИВП ВОВ (Якубицкий и др., 2015), что открывает перспективы для применения этого вируса как более безопасного вирусного вектора.

Ранее была отработана модель ортотопической ксенотрансплантации клеток глиобластомы человека U87 иммунодефицитным мышам линии SCID, которая может быть использована в качестве *in vivo* модели для проверки новых противоопухолевых препаратов и схем лечения онкологических заболеваний головного мозга человека (Завьялов и др., 2015).

Полученные нами данные по изучению динамики роста вирусов в перевиваемой культуре глиобластомы человека U87 свидетельствуют о том, что активнее всего реплицируются в культуре клеток глиом различные варианты ВОВ с нарушенным геном тимидинкиназы (см. рис. 1, 2). Встройку гена GMCSF, независимо от комбинации с другими нарушаемыми и встраиваемыми генами, значитель-

но (до полутора порядков) снижает репродуктивную способность рекомбинантных вирусов на данной глиомной культуре клеток U87 (см. рис. 1).

Полученные результаты в эксперименте *in vitro* показывают, что, по крайней мере, некоторые исследованные кандидатные онколитические ВОВ могут быть после испытаний в системе *in vivo* использованы при создании новых препаратов для лечения глиом человека.

### Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004; the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-01326a, and the Russian Science Foundation, project 16-15-10101.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Bienkowska-Szewczyk K., Szewczyk B. Expression of genes coding for viral glycoproteins in heterologous systems. *Acta Biochim. Pol.* 1999;2:325-339.
- Chiocca E.A., Aguilar L.K., Bell S.D., Kaur B., Hardcastle J., Cavaliere R., McGregor J., Lo S., Ray-Chaudhuri A., Chakravarti A., Grecula J., Newton H., Harris K.S., Grossman R.G., Trask T.W., Baskin D.S., Monterroso C., Manzanera A.G., Aguilar-Cordova E., New P.Z. Phase IB study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy adjuvant to up-front surgery and intensive timing radiation for malignant glioma. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(27):3611-3619. DOI 10.1200/JCO.2011.35.5222.
- Ding Z.Y., Wei Y.Q. Cancer biotherapy: Progress in China. *Recent Advances Cancer Res. Ther.* 2012;1-31. DOI 10.1016/B978-0-12-397833-2.00001-7.
- Doniņa S., Strēle I., Proboka G., Auziņš J., Alberts P., Jonsson B., Venskus D., Muceniece A. Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study. *Melanoma Res.* 2015;25(5):421-426. DOI 10.1097/CMR.000000000000180.
- Hulou M.M., Cho C.F., Chiocca E.A., Bjerkvig R. Experimental therapies: gene therapies and oncolytic viruses. *Handb. Clin. Neurol.* 2016;134:183-197. DOI 10.1016/B978-0-12-802997-8.00011-6.
- Jackson C., Westphal M., Quiñones-Hinojosa A. Complications of glioma surgery. *Handb. Clin. Neurol.* 2016;134:201-218. DOI 10.1016/B978-0-12-802997-8.00012-8.
- Karim R., Palazzo C., Evrard B., Piel G. Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *J. Control. Release.* 2016;227:23-37. DOI 10.1016/j.jconrel.2016.02.026.
- Liang M. Clinical development of oncolytic viruses in China. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012;13(9):1852-1857.
- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109. DOI 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Maksyutov R.A., Tregubchak T.V., Denisova N.I., Maksyutov A.Z., Gavrilova E.V. Creating a modern platform comprising a set of oncolytic viruses with immune-stimulating properties. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Immunological Journal.* 2013;7(4):456-459. (in Russian)
- Moolten F.L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* 1986;46(10):5276-5281.
- Perry A., Wesseling P. Histologic classification of gliomas. *Handb. Clin. Neurol.* 2016;134:71-95. DOI 10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0.
- Petrov I.S., Goncharova E.P., Kolosova I.V., Pozdnyakov S.G., Schelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V. Antitumor effect of the LIVP-GFP recombinant vaccinia virus. *Doklady Akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences.* 2013;451(5):592-597. (in Russian)
- Pol J., Kroemer G., Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunol.* 2015;5(1):e1115641. DOI 10.1080/2162402X.2015.1115641.
- Snider J.W., Mehta M. Principles of radiation therapy. *Handb. Clin. Neurol.* 2016;134:131-147. DOI 10.1016/B978-0-12-802997-8.00008-6.
- Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:987-996.
- Urazova L.N., Kuznetsova T.I. Oncolytic viruses in oncology. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology.* 2013;4:28-35. (in Russian)
- Weibel S., Raab V., Yu Y.A., Worschech A., Wang E., Marincola F.M., Szalay A.A. Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection. *BMC Cancer.* 2011;11:68. DOI 10.1186/1471-2407-11-68.
- Westphal M., Ylä-Herttua S., Martin J., Warnke P., Menei P., Eckland D., Kinley J., Kay R., Ram Z.; ASPECT Study Group. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(9):823-833. DOI 10.1016/S1470-2045(13)70274-2.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae.* 2015;7:108-117. (in Russian)
- Zav'yalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., Romashchenko A.V. In vivo MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2015;19(4):460-465. DOI 10.18699/VJ15.061. (in Russian)